



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DE ESPECIES DE *Fusarium*
CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA DEL
TRIGO EN MÉXICO**

MINELY CERÓN BUSTAMANTE

T E S I S

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

AGRADECIMIENTOS

Los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por su excelente dirección durante este trabajo de investigación, su invaluable apoyo y los consejos acertados. Por ser no sólo un excelente profesor consejero, sino un compañero de trabajo. Su conocimiento y experiencia han sido de gran ayuda en mi formación académica y profesional, pero sobre todo su calidad humana y sincera amistad. Por hacerme ver que uno mismo es quien establece sus límites y alcances.

Al Dr. Gerardo Leyva Mir por su apoyo y confianza en el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Eduardo Villaseñor Mir por su mejor disposición en el muestreo realizado durante este trabajo. Sus consejos y observaciones en la planeación y ejecución de esta investigación.

A la M.C Victoria Ayala Escobar por sus invaluable consejos y su excelente disposición de trabajo en la caracterización morfológica realizada en este estudio.

Al Dr. Todd J. Ward por acceder amablemente a la colaboración científica, financiada a través del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Por confiar en mí y permitirme formarme bajo su tutela.

A los M.C Tom Usgard, Nathan Orwig y la Dra. Amy Kelly por todo el conocimiento brindado y su apoyo en la caracterización molecular y análisis filogenético realizado en este estudio. Por haberme hecho sentir en casa.

A la MFP. Ana Isabel Bieler Antolin del laboratorio de Microcine, Fac. De Ciencias, UNAM, por su excelente apoyo en la toma de fotomicrografías.

Al Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza por su constante apoyo e interés durante el desarrollo y ejecución del proyecto de investigación.

Al Ing. Hilario Romero por su apoyo en la cartografía del presente trabajo.

Se agradece al fondo SAGARPA-CONACYT por el financiamiento de la presente investigación a través del proyecto N° 146788 denominado “Sistemas de mejoramiento genético para generar variedades resistentes a royas de alto rendimiento y alta calidad para una producción sustentable de trigo en México”.

Así como el financiamiento parcial otorgado por el proyecto estratégico de la Universidad Autónoma Chapingo E262015.

A mis padres Socorro Bustamante Méndez y Benjamín Cerón Paredes por su apoyo y amor incondicional. Por haberme dado el gran regalo de la educación, por levantarme ante cada fracaso y elogiarme ante cada éxito.

A Hilario Romero, Paul Méndez, David Torres y Daniel Loaeza por ser mi familia durante estos dos años. Por las palabras, las sonrisas y los abrazos pero sobre todo por su sincera amistad. Especialmente a ti Hil por ser mi amigo y apoyo constante.

A mi mejor amiga Karla C. Sánchez Lara porque a pesar de la distancia siempre has estado muy cerca de mí. Me has escuchado, apoyado y regañado siempre con el corazón en la mano.

A Alejandro González Tellez por todas las palabras, los consejos y las risas durante estos 12 años. A Yanira Olivares Pacheco por estar conmigo siempre.

A todas aquellas personas que han sido parte de lo que soy, en especial a Claudia Contreras, Jorge Perez, Adrian Reyna, Paos Rojas, Joel Becerra, Oscar Varela.

A J. Omar por el tiempo compartido.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	1
1. Fusariosis o tizón de la espiga.....	1
1.1 Ciclo de la enfermedad.....	3
1.2 Agentes causales	4
2. Diagnóstico	6
3. Manejo de la enfermedad	7
3.1 Resistencia.....	7
3.2 Rotación de cultivos	8
3.3 Sistema de labranza.....	8
3.4 Control químico.....	8
3.5 Control biológico.....	9
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
HIPÓTESIS.....	10
REFERENCIAS	11
REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
1. Taxonomía del género <i>Fusarium</i>	15
1.1 Estado taxonómico actual del género <i>Fusarium</i> y la clasificación de los complejos de especies	17
2. Identificación de las especies de <i>Fusarium</i>	19
2.1 Caracterización morfológica	19
2.2 Identificación molecular.....	22
3. Micotoxinas en <i>Fusarium</i>	26
3.1 Tricotecenos	27
REFERENCIAS	32

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE <i>Fusarium</i> CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA EN TRIGO EN TRES REGIONES DE MÉXICO	38
RESUMEN	38
ABSTRACT	39
1. INTRODUCCIÓN	40
2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1 Zona de estudio.....	41
2.2 Determinación de tamaño de muestra	44
2.3 Aislamiento y purificación	44
2.4 Extracción de ácidos nucleicos.....	45
2.5 Identificación molecular de los aislados.....	45
2.6 Análisis filogenético.....	46
2.7 Identificación morfológica y cultural	46
2.8 Pruebas de patogenicidad	47
3. RESULTADOS	48
3.1 Identificación molecular	48
3.2 Análisis filogenético.....	50
3.3 Caracterización morfológica.....	55
3.4 Pruebas de patogenicidad	65
4. DISCUSIÓN.....	66
5. CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN DE QUIMIOTIPOS DE TRICOTECENOS DE LAS ESPECIES DEL CLADO B CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA EN TRIGO EN TRES REGIONES DE MÉXICO	77
RESUMEN	77
ABSTRACT	78
1. INTRODUCCIÓN	79
2. MATERIALES Y MÉTODOS	80
2.1 Origen y aislamiento de cepas de <i>Fusarium</i>	80

2.1 Determinación de quimiotipos de tricotecenos a partir del ensayo de genotipificación multilocus (MLGT)	81
3. RESULTADOS	83
4. DISCUSIÓN.....	86
5. CONCLUSIONES	90
REFERENCIAS	91
CONCLUSIONES GENERALES.....	95
ANEXOS.....	97

ÍNDICE DE CUADROS

INTRODUCCIÓN

Cuadro 1. Enfermedades de mayor importancia por <i>Fusarium</i> en cereales. Modificado de Chandra <i>et al.</i> , 2011	2
--	----------

REVISIÓN DE LITERATURA

Cuadro 1. Distribución geográfica y quimiotipos de tricotecenos producidos por las filoespecies agrupadas en el complejo <i>Fusarium graminearum</i> (FGSC). Modificado de Aoki <i>et al.</i> , 2012.	25
---	-----------

Cuadro 2. Principales micotoxinas producidas por algunas de las especies de <i>Fusarium</i> causantes del tizón de la espiga en trigo. (Modificado de Desjardins, 2006).....	27
---	-----------

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA EN TRIGO EN TRES REGIONES DE MÉXICO

Cuadro 1. Diversidad de especies de <i>Fusarium</i> causantes del tizón de la espiga en trigo en las tres regiones de la República Mexicana.....	50
---	-----------

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN DE QUIMIOTIPOS DE TRICOTECENOS DE LAS ESPECIES DEL CLADO B CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA EN TRIGO EN TRES REGIONES DE MÉXICO

Cuadro 1. Determinación de quimiotipos de tricoteceno e identificación de especies de <i>Fusarium</i> causantes del tizón de la espiga en trigo por el ensayo de genotipificación multilocus.	84
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Ciclo de la enfermedad del tizón de la espiga en trigo causado por *F. graminearum*. El inóculo permanece en el suelo. Tanto esporas sexuales como asexuales pueden iniciar la infección en la parte media de las espigas. Imágenes: Leslie & Summerell, 2006; Carl Bradley, University of Illinois 5

REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1. Caracterización morfológica de macroconidios de *Fusarium*. **A-D:** Formas de macroconidios. **A.** Macroconido de *Fusarium* con una célula apical (izquierda) y a célula basal (derecha). **B.** Esporas delgadas en forma de ajuga. Ej. *F. avenaceum*. **C.** Macroconidio con curvatura dorsiventral. *F. equiseti*. **D.** Macroconidio con curvatura pronunciada en el lado dorsal. *F. culmorum*. **E-H:** Formas de la célula apical. **E.** Roma. **F.** Papilada. **G.** ganchuda. **H.** estrecha. **I-L:** Formas de la célula basal. **I.** Forma de pie. **J.** Elongada. **K.** Mellada. **L.** Ligeramente mellada. **M-T:** formas de microconidios. **M.** Ovalados. **N.** Ovalado bicelular. **O.** Ovalado a tricelular. **P.** Reniforme. **Q.** Ovoide. **R.** Periforme. **S.** Napiforme. **T.** Globosa. **U-X:** Morfología de las fialides. **U.** Monofialides. Ej. *F. solani*. **V.** Monifialides. Ej. *F. oxysporum*. **W.** Polifialides. Ej. *F. polyphialidicum*. **X.** Polifilides. Ej. *F. semitectum*. **Y-Z:** Cadenas de microconidios. **Y.** Cortas. **Z.** largas. Modificado de Leslie & Summerell, 2006. 21

Figura 2. Estructura química de los tricotecenos. **A.** Estructura básica de los tricotecenos. **B.** Tricotecenos tipo B. Modificado de McCormick *et al.*, 2011 29.

Figura 3. Vía de biosíntesis de tricotecenos en *F. graminearum* y mapa genético del cluster *TRI5*. Dentro del cluster el gen *TRI5* (verde) es el centro organizador, *TRI 13* (amarillo), *TRI7* (morado) y *TRI8* (rojo) son los genes responsables de la producción de NIV o DON. Modificado de McCormick *et al.*, 2011..... 31.

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA EN TRIGO EN TRES REGIONES DE MÉXICO

Figura 1. Localidades de muestreo en la región del sur o Mixteca durante el ciclo de cultivo de 2013 42

Figura 2. Localidades de muestreo en la región del este correspondientes al estado de Guanajuato durante el ciclo de cultivo de 2014	43
Figura 3. Localidades de muestreo en la región de los Valles Altos de México durante los ciclos de cultivo de 2013 y 2014	43
Figura 4. Distribución de frecuencias de las especies de <i>Fusarium</i> causantes del tizón de la espiga en trigo en tres regiones de la República Mexicana aislados durante los ciclos de cultivo de 2013-2014.....	47
Figura 5. Distribución de frecuencias de las especies de <i>Fusarium</i> causantes del tizón de la espiga en trigo en cada una de las regiones de estudio. A) Región Mixteca o del Sur. B) Región del Bajío. C) Valles Altos de México. Barras: FTSC: complejo de especies de <i>F. tricinctum</i> . FO SC: complejo de especies de <i>F. oxysporum</i> , FEIS: complejo de especies de <i>F. incarnatum-equiseti</i> , FFSC: complejo de especies de <i>F. fujikuroi</i> , FSSC: complejo de especies de <i>F. sambucinum</i> , FGSC: complejo de especies <i>F. graminearum</i>	49.
Figura 6. Análisis filogenético de los 116 aislados de <i>Fusarium</i> causantes del tizón de la espiga en trigo en tres regiones de la República Mexicana. La historia evolutiva de las especies fue inferida por el método de Máxima verosimilitud. El análisis se llevó a cabo en MEGA6 analizando 151 nucleótidos codificantes para el gen <i>RPB2</i> . Los valores de soporte se muestran en la base de los nodos. Sección A. Agrupación de los aislados de <i>F. avenaceum</i> y <i>F. tricinctum</i> dentro del complejo de especies de <i>F. tricinctum</i> (FTSC) soportado con un valor de 99% BS	52
Figura 6. Sección B. Agrupación de las especies pertenecientes a los complejos de especies de <i>F. fujikuroi</i> (FFSC) (54% BS), <i>F. oxysporum</i> (FO SC) (99% BS), <i>F. incarnatum/equiseti</i> (FEIS) (99%BS), <i>F. sambucinum</i> (FSSC) (96%BS).....	53
Figura 6. Sección B. Agrupación de las especies del complejo de <i>F. graminearum</i> (FGSC) (99% BS)	54
Figura 7. Caracterización cultural y morfológica de <i>F. andiyazi</i> . A) Colonia en medio PDA. B a D) Microconidios producidos en medio SNA de colonias de 7 días de edad. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases.....	55
Figura 8. Caracterización cultural y morfológica de <i>F. temperatum</i> . A) Colonia en medio PDA. B) a D) Macro y microconidios producidos en medio SNA de colonias de 7 días de edad. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Notese la variación en el tamaño de los conidios. Microscopía de contraste de fases	56
Figura 9. Caracterización cultural y morfológica de <i>F. boothii</i> . A) Colonia en medio PDA. B a D) Macroconidios producidos en medio SNA de colonias de 7 días de edad. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases.	57

Figura 10. Caracterización cultural y morfológica de *F. meridionale*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases **58**

Figura 11. Caracterización cultural y morfológica de *F. equiseti*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases..... **59**

Figura 12. Caracterización cultural y morfológica de *F. cerealis*. A) Colonia en medio PDA. B) Esporodoquios. Microscopía de luz C) y D) Microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases **60**

Figura 13. Caracterización cultural y morfológica de *F. poae*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macro y microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases **61**

Figura 14. Caracterización cultural y morfológica de *F. sambucinum*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macroconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases **62**

Figura 15. Caracterización cultural y morfológica de *F. avenaceum*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macroconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases **63**

Figura 16. Caracterización cultural y morfológica de *F. oxysporum*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macro y microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μ M. y 8 μ M. Microscopía de contraste de fases **64**

Figura 17. Porcentaje de floretes infectados de trigo con distintas especies de *Fusarium* aisladas de semilla de trigo infectadas en tres diferentes regiones de la República Mexicana **65**

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN DE QUIMIOTIPOS DE TRICOTECENOS DE LAS ESPECIES DEL CLADO B CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA EN TRIGO EN TRES REGIONES DE MÉXICO

Figura 1. Distribución de frecuencias de quimiotipos de tricotecenos tipo B en las tres regiones de la República Mexicana. Barras: 15-ADON: 15 acetildeoxynivalenol, NIV: nivalenol **85**

Figura 2. Distribución de frecuencias de quimiotipos de tricotecenos tipo B por región. Barras: 15-ADON: 15 acetildeoxynivalenol, NIV: nivalenol **85**

Figura 3. Distribución geográfica de los quimiotipos de tricotecenos tipo B en México
Barras: 15-ADON: 15 acetildeoxynivalenol, NIV: nivalenol **86**

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

DON: deoxinivalenol

EFI- α : gen factor de elongación 1 α

FFSC: complejo de especies de *F. fujikuroi*

FGSC: complejo de especies de *F. graminearum*

FIESC: complejo de especies de *F. incarnatum/F. equiseti*

FOSC: complejo de especies de *F. oxysporum*.

FSSC: complejo de especies de *F. sambucinum*

FTSC: complejo de especies de *F. tricinctum*

g: gravedades

MAT: gen mating type

ML-BS: Máxima verosimilitud-bootstrapping

MLGT: ensayo de genotipificación multilocus

NIV: nivalenol

TMAC: Amortiguador de hibridación

TE: Amortiguador Tris-EDTA

RED: gen reductasa

RPB2: gen subunidad grande la ARN polimerasa II

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimrasa

PDA: Medio papa dextrosa agar

s: segundos

15-ADON: 15-acetildeoxinivalenol

3-ADON: 3-acetildeoxinivalenol

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA DEL TRIGO EN MÉXICO

Minely Cerón Bustamante, M.C
Colegio de Posgraduados, 2014

El tizón de la espiga por *Fusarium* es una de las principales enfermedades que afecta la producción y rendimiento del trigo en zonas templadas y semitropicales de México. La afectación del trigo resulta en severas pérdidas en la producción, calidad del grano y contaminación con micotoxinas, principalmente tricotecenos. Aunque más de 30 especies diferentes han sido asociadas al tizón de la espiga, *F. graminearum* es el principal agente causal en todo el mundo. Muchas de las especies son capaces de producir micotoxinas tipo tricotecenos tales como el nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) y sus derivados acetilados 15-ADON y 3-ADON. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) Identificar morfológica y molecularmente las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en trigo en tres regiones de la República Mexicana.,2) Determinar el tipo de tricotecenos producidas por los mismas 3) Estudiar las relaciones filogenéticas dentro de la población del tizón de la espiga. Durante los ciclos de cultivo de 2013-2014, se colectaron semillas de trigo de diversas variedades en el Bajío, sur (región Mixteca) y Valle Altos de México. Los aislados se identificaron molecularmente con base en la secuenciación del gen factor de elongación 1- α (*EF1- α*). El quimiotipo de las especies pertenecientes al clado B se determinó a través del ensayo de genotipificación multilocus (MLGT). La relación filogenética entre los aislamientos se determinó con el alineamiento del gen codificante para la subunidad grande la ARN polimerasa II (*RPB2*) usando el método de máxima verosimilitud (ML). Se obtuvieron 116 aislamientos, los cuales pertenecen a los complejos FTSC (56%) y FSSC (33.3%), con una proporción menor de las especies de los complejos FSSC (5.5%), FFSC (4.5%), FIESC (2.5%) y FO SC (2%). El quimiotipo predominante entre las especies pertenecientes al clado B fue 15-ADON (82 %) y NIV (18%). Ningún aislamiento presento el quimiotipo 3-ADON. Este estudio provee el análisis más completo de la diversidad de especies causantes del tizón de la espiga en trigo en México.

Palabras clave: tizón de la espiga, quimiotipo de tricotecenos, *F. boothii*, 15-ADON, NIV.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Fusarium* SPECIES CAUSING FUSARIUM HEAD BLIGHT OF WHEAT IN MEXICO.

Minely Cerón Bustamante, M.C
Colegio de Posgraduados, 2014

Fusarium Head Blight (FHB) is a destructive disease of all small grain cereals, and is caused by several species of *Fusarium*. Epidemics in wheat result in severe yield losses, reduction in crop quality and mycotoxin contamination of grains. Although more than 30 different species are associated with FHB, *F. graminearum* is the major causal agent worldwide. Many FHB species are able to produce trichothecene mycotoxins such as nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON) and their acetylated derivatives including 15ADON and 3ADON. The objectives of this study were: 1) to conduct morphological and molecular identification of *Fusarium* strains causing FHB in three regions of Mexico; 2) assess trichothecene chemotype diversity; and 3) determine the phylogenetic relationships among FHB strains recovered from wheat in Mexico. During the growing season of 2013-2014, wheat heads with symptoms of FHB were collected in three different regions: Bajío (West region), Mixteca region (South region) and the High Lands. *Fusarium* strains were identified to species level using a combination of translation elongation factor (*EF1- α*) and RNA polymerase II second largest subunit (*RPB2*) sequence analyses, as well as multilocus genotyping (MLGT). Phylogenetic relationships were inferred from aligned sequences using the maximum likelihood (ML). In addition, MLGT analyses were used to determine the trichothecene chemotype of isolates from the B clade of the *F. sambucinum* species complex (FSSC), which includes *F. graminearum* and related species. Among the 116 *Fusarium* isolates characterized, most belonged to the *F. tricinctum* species complex (56%) or the FSSC (33.6%), although a small number of isolates belonged to the *F. fujikuroi*, *F. incarnatum/F. equiseti*, and *F. oxysporum* species complexes. *F. boothii* with the 15-ADON chemotype predominated (82 %) among the B clade species of the FSSC, with NIV chemotype strains of *F. cerealis* (n = 4) and *F. meridionale* (n = 3) accounting for the rest of the B clade isolates (18%). *F. graminearum* was not observed. This study provides the most comprehensive analysis to date of FHB species and chemotype diversity in Mexico.

Keywords: FHB, trichothecene chemotype, *F. boothii*, 15-ADON, NIV.

INTRODUCCIÓN

Los cereales son la fuente de alimentos más importante del mundo, tanto para el consumo humano directo, como de manera indirecta en los insumos de la producción pecuaria. Se siembran en 75% de la superficie cultivada del mundo y son la principal fuente de calorías y proteínas para la mayor parte de la población (FAO, 2015). Entre los granos básicos para la alimentación, el trigo ocupa el primer lugar a nivel mundial, tanto en términos de superficie cultivada como en producción. En México, el trigo ocupa el segundo lugar en la producción de cereales después del maíz (Santoyo & Quiroz, 2004). Según cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la producción de trigo para 2014 fue de 3,669,813.71 ton, producidas en 23 estados del país, concentrándose más del 85% de la producción total en los estados de Sonora (50%), Baja California (14.10%), Guanajuato (8%), Michoacán (4.2%), Chihuahua (3.9%), Jalisco (3.6%) y Tlaxcala (2.3%).

Uno de los principales factores que afecta la producción y rendimiento de los cereales es la incidencia de plagas y enfermedades. El tizón de la espiga por *Fusarium* spp. es un problema muy importante en la producción de trigo en zonas templadas y semitropicales de México y el mundo (Gilchrist-Saavedra, 2000). La afectación del trigo por esta enfermedad, resulta en severas pérdidas en la producción, reducción en la calidad del grano y contaminación con micotoxinas (Goswami & Kistler, 2004).

1. Fusariosis o tizón de la espiga

El género *Fusarium* pertenece al reino: *Fungi*, Phylum: *Ascomycota*, Clase: *Sordariomycetes*, Familia: *Nectriaceae*. Fue descrito por primera vez en 1809 por Link quien utilizó como carácter morfológico distintivo la presencia de esporas fusiformes o falcadas (Leslie & Summerell, 2006). Los miembros de este género pueden causar enfermedades en plantas, humanos y animales. En el caso particular de plantas, al menos 81 de las 101 especies económicamente importantes han sido asociadas a enfermedades causadas por *Fusarium* (Chandra *et al.*, 2011). *Fusarium* puede causar enfermedades en todos los estado fenológicos de las plantas ocasionando una amplia variedad de síntomas entre los que se incluyen

podrición de semillas, ahogamiento de plántulas, pudrición de raíz, tizones, canceres, marchitez y enfermedades foliares.

Cuadro 1. Enfermedades de mayor importancia por *Fusarium* en cereales. Modificado de Chandra *et al.*, 2011

Enfermedad	Hospedante	Patógeno
Pudrición de la corona / tizón de plántula / pudrición de raíz.	Trigo	<i>Fusarium</i> spp. <i>Fusarium pseudograminearum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium avenaceum</i> <i>Fusarium culmorum</i>
Tizón o fusariosis de la espiga	Cebada	<i>Fusarium</i> spp. <i>Fusarium pseudograminearum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium avenaceum</i>
Pudrición de la mazorca, raíz y tallo/ tizón en plántula	Maíz	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium avenaceum</i> <i>Fusarium subglutinans</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium pallidoroseum</i>
Pudrición de raíz / tizón en plántula / enfermedad de la bakanae	Arroz	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium fujikuroi</i> <i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium</i> spp.
Tizón de la espiga / pudrición de la raíz y el tallo	Sorgo	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>Fusarium subglutinans</i>
Moho de la espiga	Mijo	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium</i> spp.

La fusariosis, sarna o tizón de la espiga (*Fusarium* head blight FHB) es una enfermedad en trigo, cebada y avena causada principalmente por hongos del género *Fusarium* (Cuadro 1). La fusariosis fue descrita por primera vez en 1884 afectando cultivos de trigo y cebada en Inglaterra (Goswami & Kistler, 2004) y hasta ahora sigue siendo una de las enfermedades más comunes y limitantes de la producción de cereales en todo el mundo. Tan solo en Estados Unidos de Norteamérica y Centro América se han calculado pérdidas de 2.7 billones de dólares durante los años 1998 a 2002 (McMullen *et al.*, 2012).

1.1 Ciclo de la enfermedad

F. graminearum Schwabe el principal agente causal del tizón de la espiga en trigo, es un hongo haploide, homotalico, con fase sexual [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch] (Leslie & Summerell, 2006). En trigo, la infección por *F. graminearum* tiene como síntoma característico la presencia de espigas blancas, las cuales pueden llegar a ser muy conspicuas en variedades susceptibles y son un carácter diagnóstico de la enfermedad (McMullen *et al.*, 2012).

El inóculo primario reside en el residuo de cosecha, donde inverna como micelio saprofítico. Una vez que las condiciones de humedad son adecuadas, el desarrollo del estado sexual ocurre. Los peritecios contienen ascas con ascosporas, que son descargadas con fuerza de los peritecios y dispersadas por el viento o lluvia (Inch & Gilbert, 2003; McMullen *et al.*, 2012). La penetración del hongo ocurre en el gametofito masculino ocasionando que las primeras infecciones ocurran poco después de la antesis (Goswami & Kistler, 2004). Estas germinan principalmente en las anteras y a partir de ahí colonizan el ovario, otras estructuras florales y el resto de la espiga. El crecimiento de *F. graminearum* es estimulado en las anteras debido a la alta concentración de dos compuestos (colina y betaína) que favorecen la extensión hifal (Strange *et al.*, 1974). La infección puede ocurrir pasivamente a través de aberturas naturales como los estomas o por penetración directa dentro de las primeras 36 a 48 horas después de la inoculación (Walter *et al.*, 2010). En el caso particular de *F. gramineraum*, hifas infectivas pueden desarrollarse en el extremo apical del florete así como entre la lema y la palea (Lewandowski *et al.*, 2006). La infección temprana puede inhibir el desarrollo del grano (Schmale & Bergstrom, 2003). Sin embargo, la afectación principal ocurre durante el desarrollo del grano, con una evidente reducción en tamaño y apariencia deshidratada, lo que afecta el rendimiento, calidad, valor alimenticio además de contaminar el grano.

En campo las espiguillas infectadas se localizan en el tercio medio de la espiga, debido a que es ahí donde se inicia la antesis; si las condiciones ambientales son favorables, la infección avanza hacia las espiguillas adyacentes y en algunos casos puede llegar a toda la espiga incluyendo el raquis o pedúnculo de la misma (Ireta & Gilchrist, 1994). Particularmente, si las condiciones de humedad relativa son favorables puede llegar a ser evidente la presencia de masas de esporas rosa o salmón (macroconidios) observadas en las

espiquillas y glumas infectadas lo que se relaciona al estado asexual del hongo e inóculo secundario de la enfermedad (McMullen *et al.*, 2008).

La temperatura óptima para la infección por *F. graminearum* es de 25 -29°C con una humedad relativa de 95 a 99 %. Siendo la temperatura mínima de 10 °C y la máxima de 35°C (Rossi *et al.*, 2001). Con respecto al estado sexual, la temperatura óptima de producción de peritecios se encuentra de 15 a 28.5 °C, mientras que la producción de ascosporas ocurre de 20 a 28°C (Inch & Gilbert, 2003). El hongo puede persistir en el suelo en forma de estructuras de resistencia denominadas clamidosporas por hasta 24 meses (Inch & Gilbert, 2003). Ascosporas, micelio y macronidios permanecen de forma latente en los residuos de cosecha. *F. graminearum* puede degradar enzimáticamente los residuos vegetales y usarlos como sustrato de crecimiento (Leplat *et al.*, 2012). Las actividades de labranza mínima o la práctica de dejar los residuos de cosecha en el suelo hasta el siguiente ciclo de cultivo representan un riesgo y fuente permanente de inóculo para la enfermedad (Dill-Macky & Jones, 2000). A pesar de la capacidad de sobrevivir saprofiticamente en rastrojos infectados, *F. graminearum* tiene una escasa habilidad de competencia microbiana y con el tiempo otras especies saprófitas colonizan el rastrojo desplazando a este hongo (Leplat *et al.*, 2012).

1.2 Agentes causales

Aunque frecuentemente el tizón de la espiga se relaciona a *F. graminearum*, los agentes causales pertenecen a dos géneros: *Microdochium* y *Fusarium* (Bottalico, 1998). Dentro del género *Microdochium*, sólo *Microdochium nivale* (anteriormente denominado *Fusarium nivale*) con dos sub-especies *M. nivale nivale* (Fr.) Samuels y I.C. Hallett. While y *M. nivale majus* son capaces de causar fusariosis de espiga. En el género *Fusarium* han sido reportados *F. graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc y *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. como agentes causales primarios, aunque también se han reportado *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. cerealis* Burgess, Nelson and Toussouns, *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. sporotrichiodes* Sherb., *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. acuminatum* Ell., *F. subglutinans* (Wollenw. y Reinking) Nelson., *F. solani* (Martius) Apple y Wollenweber, *F. oxysporum* Schlecht. Emend., *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. semitectum* Berk. Rav. y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (Aoki *et al.*, 2014; Bottalico & Perrone, 2002).



Figura 1. Ciclo de la enfermedad del tizón de la espiga en trigo causado por *F. graminearum*. El inóculo permanece en el suelo. Tanto esporas sexuales como asexuales pueden iniciar la infección en la parte media de las espigas. Imágenes: Leslie & Summerell, 2006; Carl Bradley, University of Illinois

La distribución y predominancia de las especies está determinada por factores ambientales, particularmente por temperatura y humedad (Xu, 2003) así como por las variedades de trigo presentes (Champeil *et al.*, 2004). En general, *F. culmorum*, *F. poae* y *M. nivale* son más frecuentes en regiones más frías; mientras que *F. graminearum* prevalece en regiones cálidas (Audenaert *et al.*, 2009; Nicholson *et al.*, 2003). No obstante, la comunidad de hongos fitopatógenos causantes del FHB frecuentemente está integrada por dos o tres especies.

2. Diagnóstico

Debido a la gran diversidad de especies relacionadas al tizón de la espiga, el diagnóstico o identificación del o los agentes causales es parte importante del control de esta enfermedad. Así mismo, la importancia en el conocimiento de la diversidad de especies reside en la habilidad de *Fusarium* en producir distintos tipos de micotoxinas (Desjardins, 2006).

Por mucho tiempo la identificación morfológica fue el carácter único de diagnóstico. No obstante, la identificación de las especies de *Fusarium* basada exclusivamente en caracteres morfológicos puede ser influenciada directa o indirectamente por la edad y estado fisiológico del hospedante, el grado de patogenicidad o virulencia del hongo y las condiciones ambientales imperantes (Saharan *et al.*, 2004). En el caso particular de crecimientos axénicos, por la disponibilidad de micronutrientes y las condiciones de crecimiento (Chandra *et al.*, 2011). Por lo que las técnicas moleculares han llegado a ser una herramienta versátil, rápida y específica para la identificación de la especie, la detección de la variación génica y el análisis de las poblaciones responsables del tizón de la espiga (Nicholson *et al.*, 2003). Algunos métodos que pueden ser utilizados para complementar la identificación son: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y diferentes técnicas basadas en el uso de marcadores moleculares (Wang *et al.*, 2011). Un marcador molecular es un sitio dentro del genoma que permite evidenciar variación (también denominadas polimorfismos) de la secuencia del ADN entre dos individuos. Dentro del género *Fusarium*, los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados para identificar especies que en un principio fueron descritas como una única morfoespecie. Marcadores como los

polimorfismos amplificados azarosamente (randomly amplified polymorphic DNA RAPD), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism AFLP), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism RFLP), polimorfismos de nucleótido simple (single nucleotide polymorphism SNP) y el número variable de repeticiones en tándem (variable number of tandem repeat VNTR) por mencionar algunos, han sido extensivamente utilizados en el estudio de la diversidad genética (Wang *et al.*, 2011).

Algunas técnicas basadas en variaciones de la técnica común de PCR (PCRq) han permitido cuantificar especies particulares dentro de la comunidad del tizón de la espiga, así como diferenciar entre los distintos de micotoxinas y sus variaciones o quimiotipos producidos (Nicholson *et al.*, 2003).

3. Manejo de la enfermedad

Dado que el patosistema tizón de la espiga en trigo (como cualquier otro patosistema) está integrado por múltiples factores biológicos, ecológicos y ambientales, el manejo de la enfermedad necesita el conocimiento y control integral de las variables que lo componen. Actualmente el manejo integral es la mejor estrategia de manejo de la enfermedad. El esquema de manejo integral del tizón de la espiga debe incluir una combinación de algunas de las siguientes estrategias de manejo:

3.1 Resistencia

Hasta ahora no se encuentra comercialmente disponible ninguna variedad resistente a la infección por *Fusarium*. Sin embargo, diferencias en la reacción ante la infección son reportadas. Se han clasificado dos tipos de resistencia en trigo denominadas tipo I y tipo II (Engle *et al.*, 2003; Gilbert & Haber, 2013). La resistencia tipo I se relaciona a todos aquellos mecanismo por los cuales se evita la penetración o infección del hongo en el tejido. Este tipo de resistencia conforma el primer mecanismo de defensa en contra de *Fusarium*. La prevención al establecimiento es determinada por las características fisiológicas, morfológicas y puede ser incrementada por propiedades bioquímicas tales como las ceras o componentes de la pared celular (Walter *et al.*, 2010). La resistencia tipo II se relaciona a la

restricción de la invasión dentro del tejido (Engle *et al.*, 2003). Algunos de los mecanismos relacionados incluyen las barreras físicas y químicas (ej. fitoanticipinas), defensas químicas inducidas (ej. proteínas relacionadas a patogénesis y flavonoides) y la biotransformación de micotoxinas a compuestos menos tóxicos (Walter *et al.*, 2010).

Así mismo, características tales como la altura de la planta, el tiempo de floración y la duración del mismo, la densidad del grano en la espiga también influyen en la resistencia a la infección de *Fusarium* (Yoshida *et al.*, 2005).

3.2 Rotación de cultivos

La rotación de cultivos es una de las medidas más efectivas dentro de los planes de manejo integrado contra la fusariosis de la espiga. La rotación debe realizarse con cultivos que no sean susceptibles a la infección por *F. graminearum*. Una rotación no recomendada es la de trigo-maíz. Esta rotación incrementa el riesgo de enfermedad dado que el agente causal primario también infecta maíz, por lo que el inóculo se incrementa con cada ciclo de cultivo (Gilbert & Haber, 2013). Rotaciones con cultivos como canola y alfalfa han sido ampliamente recomendadas.

3.3 Sistema de labranza

El sistema de labranza es uno de los factores más importantes en el progreso del tizón de la espiga en trigo. La labranza por inversión es uno de los sistemas que reduce el riesgo de desarrollo de la enfermedad en comparación al sistema de labranza mínima. Algunas de las ventajas de la labranza por inversión son: 1) enterrar el inóculo o evitar su exposición directa en la superficie y con ello la dispersión de esporas, 2) incrementar la descomposición de residuos de cosecha y con ello limitar la sobrevivencia de *Fusarium*, 3) control de posibles gramíneas silvestres que pudieran ser un reservorio de inóculo (Leplat *et al.*, 2012).

3.4 Control químico

Dentro de los fungicidas, los triazoles han sido ampliamente utilizados en el control del tizón de la espiga. De igual manera, estos fungicidas sistémicos han mostrado tener un efecto positivo en la reducción de las concentraciones de micotoxinas en trigo (Jones, 2000). El modo de acción de los triazoles reside en la inhibición de la dimetilación del esterol,

inhibiendo la biosíntesis del ergosterol de las membranas celulares (Muller, 2006). Algunos de los triazoles más efectivos en la supresión de la enfermedad y el control de micotoxinas son el propiconazol, metconazol y tebuconazol hasta en un periodo de 30 días previo a la cosecha del grano (Gilbert & Haber, 2013).

3.5 Control biológico

Como parte de un adecuado manejo integrado, el control biológico de *Fusarium* es una de las estrategias considerada principalmente como preventiva y efectiva al llevarse a cabo adecuadamente. Hasta ahora se conocen algunos exitosos agentes de control biológicos entre los que destacan *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. principalmente (Inch & Gilbert, 2011; Schisler *et al.*, 2006). No obstante, su aplicación en campo puede llegar a no ser efectiva. Al tratarse de microorganismos, las formulaciones deben preservar la viabilidad y estabilización de los mismos (Schisler *et al.*, 2006), por lo que debe tenerse particular cuidado en la calidad de los productos.

Debido a la carencia de trabajos de investigación enfocados a la identificación y caracterización patogénica, morfológica, morfométrica, molecular y quimiotípica de las especies de *Fusarium* que afectan a trigo en México, se planteó la presente investigación, que tiene como objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Conocer la diversidad de especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga del trigo en México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y caracterizar morfológica, morfométrica y molecularmente las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga del trigo en tres regiones de la República Mexicana.
- Determinar el quimiotipo de tricotecenos producidos por los aislamientos de *F. graminearum* y especies relacionadas a través del ensayo de genotipificación multilocus.
- Analizar las relaciones filogenéticas entre la población de especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga del trigo en México.
- Corroborar la capacidad de los aislamientos de *Fusarium* de inducir la enfermedad del tizón de la espiga a través de pruebas de patogenicidad en plantas de trigo.

HIPÓTESIS

La variación en climas, regiones y variedades de trigo presentes en México nos hace hipotetizar que más de una especie de *Fusarium* está ocasionando el síntoma de tizón de la espiga del trigo. Esta diversidad de especies puede entonces ser diferenciada por características patogénicas, morfológicas, morfométricas, moleculares y quimiotípicas.

REFERENCIAS

- Aoki, T., O'Donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology* 80(3): 189–201. doi:10.1007/s10327-014-0509-3
- Audenaert, K., Broeck, R. Van, Bekaert, B., De Witte, F., Heremans, B., Messens, K., Haesaert, G. (2009). *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology*, 125, 445–458. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-009-9494-3>
- Bottalico A. (1998). *Fusarium* disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles. *European Journal of Plant Pathology*, 80:85–103.
- Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 611–624. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1020635214971>
- Champeil, a, Doré, T., & Fourbet, J. (2004). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science* 166(6): 1389–1415. doi:10.1016/j.plantsci.2004.02.004
- Chandra, N. S., Wulff, E. G., Udayashankar, A C., Nandini, B. P., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N., & Prakash, H. S. (2011). Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied microbiology and biotechnology* 90(5): 1625–39. doi:10.1007/s00253-011-3209-3
- Dill-Macky, R., & Jones, R. (2000). The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant disease* 84: 71–76. Retrieved from <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2000.84.1.71>
- Engle, J., Madden, L., & Lipps, P. (2003). Evaluation of inoculation methods to determine resistance reactions of wheat to *Fusarium graminearum*. *Plant disease* 87(12): 1530–1535.
- FAO. 2015. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Situación Alimentaria Mundial. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
- Gilbert, J., & Haber, S. (2013). Overview of some recent research developments in *Fusarium* head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 35(2): 149–174. doi:10.1080/07060661.2013.772921

- Gilchrist-Saavedra, L.I. (2000). Problemas fitosanitarios de los cereales de grano pequeño en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18, 132-137
- Goswami, S. R., & Kistler, H. C. (2004). Pathogen profile Heading for disaster : *Fusarium graminearum* on cereal crops 5: 515–525. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00252.X
- Inch, S. A., & Gilbert, J. (2003). Survival of *Gibberella zeae* in Fusarium -Damaged Wheat Kernels. *Plant Disease* 87(3): 282–287.
- Inch, S., & Gilbert, J. (2011). Scanning electron microscopy observations of the interaction between *Trichoderma harzianum* and perithecia of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 103(1): 1–9. doi:10.3852/09-285
- Ireta J. M. & Gilchrist S. (1994). Roña o tizón de la espiga del trigo. Informe especial de trigo No. 20. México, CIMMYT.
- Jones, R. (2000). Assessments of Fusarium head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. *Plant Disease* 84(9): 1021–1030. doi:doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1021
- Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., & Steinberg, C. (2012). Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33(1): 97–111. doi:10.1007/s13593-012-0098-5
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (p. 388). United States of America: Blackwell Publishing.
- Lewandowski, S., Bushnell, W., & Evans, C. (2006). Distribution of mycelial colonies and lesions in field-grown barley inoculated with *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 96(6): 567–581. Retrieved from <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-96-0567>
- McMullen, M, Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., & Van Sanfrod, D. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*, 96(12): 1712–1728. Retrieved from <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE>
- McMullen, Marcia, Zhong, S., & Neate, S. (2008). Fusarium head blight (scab) of small grains. *North Dakota State University* 804(September): 1–6.
- Mueller, D. (2006). Integrated crop management. Fungicides: triazoles. <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2006/5-30/fungicides.html>. (28 de Julio, 2015).
- Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R., Gosman, N., Simpson, D., Thomsett, M., & Wilson, A. H. (2003). Molecular tools to study epidemiology and toxicology of Fusarium head

- blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 691–703. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-1452-5_4
- Rossi, V., Ravanetti, A., Patteri, E., & Giosue, S. (2001). Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing Fusarium head blight. *Journal of Plant Pathology* 83(3): 189–198. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/41998061>
- Saharan, M., Kumar, J., Sharma, A., & Nagarajan, S. (2004). Fusarium head blight (FHB) or head scab of wheat—a review. *Proceedings of the Indian National Science Academy B70(3):255–268*. Retrieved from http://www.new1.dli.ernet.in/data1/upload/insa/INSA_1/2000c954-255.pdf
- Santoyo C. E & Quiroz M. J. (2004). Guía para el cultivo de cereales en el estado de México. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México, ICAMEX. Metepec, Estado de México. Folleto técnico. 22 p.
- Schisler, D. A., Khan, N. I., Boehm, M. J., Lipps, P. E., Slininger, P. J., & Zhang, S. (2006). Selection and evaluation of the potential of choline-metabolizing microbial strains to reduce Fusarium head blight. *Biological Control* 39(3): 497–506. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.08.007
- Schmale III, D.G. & G.C. Bergstrom. (2003). Fusarium head blight in wheat. *The Plant Health Instructor* DOI:10.1094/PHI-I-2003-0612-01
- SIAP. 2015. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>. (1 de agosto, 2015).
- Strange, R., Majer, J., & Smith, H. (1974). The isolation and identification of choline and betaine as the two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. *Physiological Plant Pathology* 4: 277–290. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0048405974900150>
- Walter, S., Nicholson, P., & Doohan, F. M. (2010). Action and reaction of host and pathogen during Fusarium head blight disease. *New Phytologist* (185): 54–66.
- Wang, J., Ndoye, M., Zhang, J., Li, H., & Liao, Y. (2011). Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins* 3: 1020–1037. Retrieved from <http://www.mdpi.com/2072-6651/3/8/1020/htm>

- Xu, X. (2003). Effects of environmental conditions on the development of Fusarium ear blight. *European Journal of Plant Pathology* 109: 683–689. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1026022223359>
- Yoshida, M., Kawada, N., & Tohnooka, T. (2005). Effect of row type, flowering type and several other spike characters on resistance to Fusarium head blight in barley. *Euphytica* 141(3): 217–227. doi:10.1007/s10681-005-7008-8

REVISIÓN DE LITERATURA

La identificación de la especie de *Fusarium* es una de las cuestiones preponderantes en la taxonomía de hongos, dado el número de especies reconocidas dentro del género y su importancia en la agricultura, industria y medicina. En el caso particular de la agricultura, la identificación de las especies se ha visto impulsada por la alta incidencia de estos patógenos en los cultivos de mayor importancia económica (Chandra *et al.*, 2011).

Muchas especies, aislados o subpoblaciones del género *Fusarium* exhiben una remarcable variación con respecto a sus características morfológicas, culturales y fisiológicas. Esta capacidad puede explicar en parte, la habilidad de *Fusarium* de colonizar diversos nichos ecológicos en distintas áreas geográficas de todo el mundo. No obstante, esto ha traído consigo considerables dificultades en el desarrollo de un sistema taxonómico estable y ampliamente aplicable para el género. Dado que la identificación morfológica fue por muchos años el criterio único de identificación de las especies de *Fusarium* y en general de todos los hongos fitopatógenos, existieron numerosas confusiones y descripciones de nuevas especies de forma errónea o deliberada. Ejemplo de ello es la taxonomía de la especie *F. graminearum* la cual durante más de 100 años ha sido descrita como una única morfoespecie, agrupando a lo que ahora se conoce como un complejo de más 15 especies de origen polifilético y con una variabilidad patogénica diferente (Boutigny *et al.*, 2014).

El concepto de especie morfológica, biológica y filogenética han contribuido a la definición de especie en *Fusarium*. Aunque el concepto de especie morfológica ha dominado, el concepto de especie filogenética ha provisto un enfoque nuevo esclareciendo los límites entre las especies y la diversidad del género.

1. Taxonomía del género *Fusarium*

La taxonomía del género *Fusarium* ha sido por mucho conflictiva, confusa y dinámica. Desde su descripción en 1809 como *Fususporium*; el género *Fusarium* ha llegado a tener más de 1000 especies diferentes dependiendo la autoridad taxonómica consultada y el tiempo o época de descripción realizada (Summerell & Leslie, 2011; Nelson *et al.*, 1994). En su mayoría descripciones basadas en pleomorfismos del género.

La necesidad de un sistema de clasificación taxonómica llegó a ser evidente a medida que muchas de las enfermedades más importantes en plantas eran causadas por especies del género *Fusarium*. Los primeros trabajos reestructurativos en la taxonomía del género fueron realizados por Wollenweber y Reinking (1935) proveyeron la primera guía de identificación independiente del hospedante y basada en los caracteres morfológicos de los aislados, lo que llevó al establecimiento de 16 secciones agrupando 65 especies y 77 variedades y formas. A partir de entonces, se han propuesto numerosos sistemas de clasificación como aquellos descritos por Snyder y Hansen (1945) donde se establecían únicamente 9 especies (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. lateritium*, *F. trincintum*, *F. nivale*, *F. rigidiuscula* y *F. episphaeria*). Para la década de los 80, con la publicación del primer atlas pictorial del género por Gerlach y Nirenberg (1982) se tenía uno de los principales adelantos hacia la estandarización de la taxonomía comparativa con el reconocimiento de cerca de 90 especies diferentes; mientras que Nelson *et al.*, (1983) publicaron un manual para reconocer 41 especies de *Fusarium*.

Aunque la descripción morfológica había llevado al reconocimiento de la mayoría de las especies hasta hoy conocidas. En 1970, la primera indicación de un cambio en el uso de especie morfológica en *Fusarium* se hizo evidente con el descubrimiento de las poblaciones de apareamiento (*mating population*) dentro de *F. solani* (Matuo & Snyder, 1973). Esto llevó al uso del concepto de especie biológica, el cual define a una especie como un grupo de individuos aislados reproductivamente (Mayr, 1942). La terminología utilizada para describir el sistema de apareamiento en hongos está basado en un número de *loci* y en el número de alelos dentro de esos *loci*. El sistema de apareamiento en *Fusarium* se describe como un sistema dimítico con un simple locus denominado MAT, el cual tiene dos alelos funcionales: *MAT-1* y *MAT-2* (Turgeon & Yoder, 2000). Aunque este sistema de clasificación ha sido exitoso para aquellas especies pertenecientes al complejo de *Giberlla zae*, no todas las especies de *Fusarium* tienen capacidades reproductivas sexuales. Aunado a que los alelos *MAT* pueden estar ausentes o ser no funcionales, lo que origina especies no compatibles o que no pueden formar peritecios (Leslie & Summerell, 2006).

Estas complicaciones y el desarrollo de las técnicas de biología molecular aplicadas a la taxonomía del género, eventualmente llevaron al uso del término de especie filogenética. Una especie filogenética hace referencia a un grupo de individuos descendientes de un ancestro en común, por lo que poseen un combinación de ciertos caracteres definidos o derivados y una única historia evolutiva. Es menos restrictivo que el concepto de especie biológica dado que la habilidad de cruzamiento o reproducción entre los miembros de diferentes especies no es un carácter limitante (Wheeler, 1999).

El concepto de especie filogenética está siendo ampliamente utilizado en *Fusarium* y puede ser especialmente útil para aquellas especies que no presentan un estado sexual, o que son principal o exclusivamente homotalicas (Leslie & Summerell, 2006). Este concepto está basado en el uso de marcadores moleculares que trascienden los problemas de caracteres morfológicos y de apareamiento asociados a los conceptos de especie morfológica y biológica respectivamente. No obstante, así como el concepto de especie morfológica (o tipológica) puede fallar debido a las alteraciones en las características morfológicas de las especies y el concepto de especie biológica es poco útil para aquellos aislados con que no presentan un estado de reproducción sexual, el concepto de especies filogenética puede errar si la hibridación entre las especies ocurre a una alta frecuencia dentro de un lapso de tiempo evolutivo corto (Leslie & Summerell, 2006). Por lo que el nuevo enfoque taxonómico está integrado por los tres conceptos de especies y con ello al uso de las herramientas de descripción clásica de especies y el uso de las técnicas moleculares (Leslie *et al.*, 2007).

1.1 Estado taxonómico actual del género *Fusarium* y la clasificación de los complejos de especies

A partir del año 2011, por acuerdo del Código Internacional de Nomenclatura Botánica, se declaró como correcto y preferible el uso del nombre científico del teleomorfo en comparación al anamorfo (Artículo 59.1). Sin embargo para el caso de *Fusarium* el anamorfo es de uso extensivo, en parte porque el estado sexual de muchas de las especies es hasta ahora desconocido y/o raramente observado en campo, tanto así que sólo del 20% de los teleomorfos de las especies se conoce (Aoki *et al.*, 2014). Ante tal problemática y aunado a

la aplicación de la biología molecular a la sistemática y taxonomía del género, en 2014 se propuso la denominación del anamorfo *Fusarium* como la más conveniente y correcta dentro de la comunidad científica, sin el uso adicional del estado sexual de las especies (Geiser *et al.*, 2013).

En ese mismo año se propuso el siguiente sistema de clasificación de las especies de *Fusarium* hasta ahora con mayor importancia económica en la agricultura en distintos complejos de especies con base en la filogenia del género (Aoki *et al.*, 2014):

- Complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Donde se agrupan las especies causales de la enfermedad Bakanae del arroz, la pudrición de la mazorca del maíz, el cáncer del pino y especies productoras de micotoxinas infectando maíz. Pruebas de habilidad reproductiva han permitido identificar al menos 13 especies biológicas: *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. sacchari* (E.J. Butler y Hafiz Khan) W. Gams, *F. fujikuroi* Nirenberg, *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach y Nirenberg, *F. subglutinans* (Wollenw. y Reinking) P.E. Nelson, Toussoun y Marasas, *F. thapsinum* Klittich, J.F. Leslie, P.E. Nelson y Marasas, *F. nygamai* L.W. Burgess y Trimboli, *F. circinatum* Nirenberg y O'Donnell, *F. konzum* Zeller, Summerell y J.F. Leslie, *F. xylarioides*, Steyaert, *F. musae* van Hove, Waalwijk, Logrieco y Ant. Moretti, *F. temperatum* Scaufl. y Munaut. y *F. tuiense* Lima, Pfenning y Leslie.

- Complejo de especies de *Fusarium sambucinum* (FSSC). Aquí se incluyen a los agentes causales del tizón de la espiga en trigo y cebada así como especies productoras de micotoxinas tipo tricotecenos A y B. Siete diferentes especies causales del tizón de la espiga han sido agrupados: *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *F. cerealis* (Cooke) Sacc. (syn. *F. crookwellense* L.W. Burgess, P.E. Nelson y Toussoun), *F. sambucinum* Fuckel, *F. sporotrichioides* Sherb., *F. poae* (Peck). *F. graminearum sensu stricto* Schwabe y 15 especies filogenéticas agrupadas en el complejo de especies de *F. graminearum* (FGSC).

- Complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOOSC). Especies causantes de enfermedad de marchitez vascular. Aunque sólo se adscribe a *F. oxysporum* en este complejo se agrupan sus más 100 *formae speciales* (ff. sp.) y razas de *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder y Hansen oficialmente reconocidas.
- Complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC). Con sus *formae speciales* causando pudriciones de pie y raíz en diversos hospedantes.
- Complejo de especies de *Fusarium tricinctum* (FTSC). Que incluye a algunas de las especies causales del tizón de la espiga también: *F. tricinctum* (Corda) Saccardo, *F. avenaceum* (Fries) Saccardo y *F. acuminatum* Ellis y Everhart.
- Complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC). Cuya importancia económica destaca *F. equiseti* (Corda) Saccardo.

2. Identificación de las especies de *Fusarium*

2.1 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica está basada principalmente en la descripción de las esporas asexuales micro y macroconidios y estructuras de resistencia (clamidosporas).

Los macroconidios son las esporas más importantes en la identificación morfológica de las especies de *Fusarium*. En algunos casos su morfología es suficiente para identificar especies o diferenciar entre algunas de ellas. La primera característica que se describe generalmente es el tamaño, así como el ancho y la curvatura. La longitud total de la espora debe ser considerada incluyendo la célula apical y la célula basal. Además es importante conocer el número de septos presentes en el macroconidio y determinar el rango y el promedio de septos por espora. Leslie & Summerell (2006) describen tres formas básicas de macroconidios: En la primera las esporas son rectas, delgadas con forma similar al de una aguja. En la segunda las esporas presentan una curvatura dorsiventral consistente a lo largo

de todo el macroconidio. En la tercera categoría presentan una curvatura prominente en el lado dorsal o superior en comparación al lado ventral.

Las células terminales del macroconidio son útiles en la taxonomía. La célula apical presenta una curvatura marcada. Se han identificado cuatro formas de las células apicales: roma (E), papilada (F), ganchuda (G) y estrecha (H). La célula terminal presenta una terminación delgada y estrecha que asemeja al pie de una bailarina de ballet (célula en forma de pie) con forma de pie (I), elongada (J), mellada (K) o ligeramente mellada (L) (Leslie & Summerell, 2006).

Los microconidios no son producidos por todas las especies de *Fusarium*, su producción es en sí un aspecto importante para la identificación. En la identificación morfológica clásica, los microconidios, la célula conidiógena de la cual surgen y su arreglo son caracteres importantes para el diagnóstico (Leslie & Summerell, 2006). Otras características de importancia son: tamaño, el número de septos que presentan y su forma. Con base en este último carácter se han descrito como: ovals (O), reniforme, (P), ovoide (Q), periforme (R), napiforme (S), globosa (T) y fusiforme.

Existen dos formas básicas de células conidiógenas: monifalides (U-V) y polifalides (W-X). Así mismo, los microconidios puede ser arreglados en fiálides simples (X), en cadenas (Y-Z), o en falsas cadenas (U-V) (Leslie & Summerell, 2006).

Las clamidosporas pueden ser simples, dobles, agrupadas o en cadenas. Como todas las estructuras de resistencia su formación requiere largos periodos de tiempo, normalmente más de seis meses.

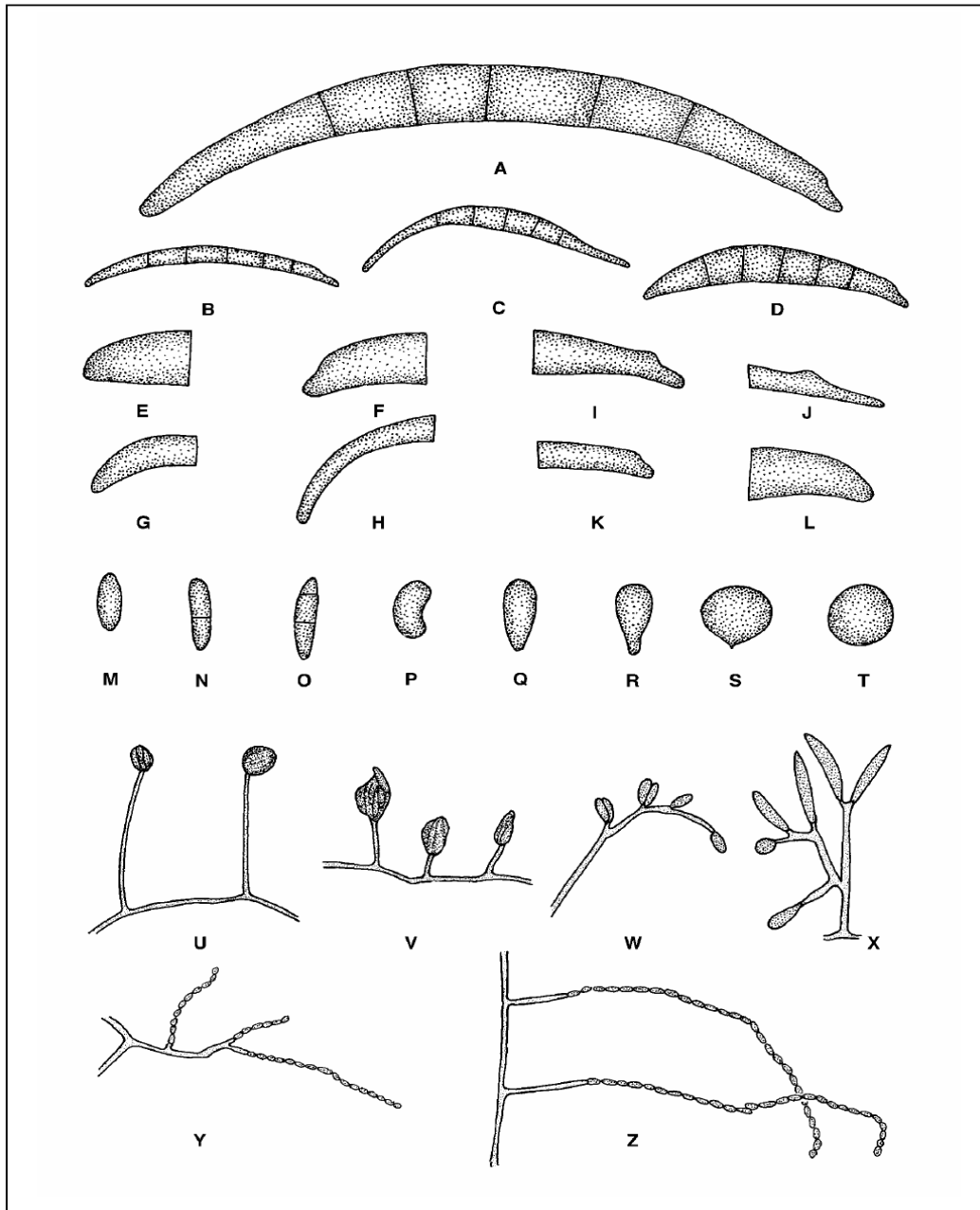


Figura 2. Caracterización morfológica de macroconidios de *Fusarium*. **A-D:** Formas de macroconidios. **A.** Macroconidio de *Fusarium* con una célula apical (izquierda) y la célula basal (derecha). **B.** Esporas delgadas en forma de ajuga. **C.** Macroconidio con curvatura dorsiventral. *F. equiseti*. **D.** Macroconidio con curvatura pronunciada en el lado dorsal. *F. culmorum*. **E-H:** Formas de la célula apical. **E.** Roma. **F.** Papilada. **G.** ganchuda. **H.** estrecha. **I-L:** Formas de la célula basal. **I.** Forma de pie. **J.** Elongada. **K.** Mellada. **L.** Ligeramente mellada. **M-T:** formas de microconidios. **M.** Ovalados. **N.** Ovalado bicelular. **O.** Ovalado a tricelular. **P.** Reniforme. **Q.** Ovoide. **R.** Periforme. **S.** Napiforme. **T.** Globosa. **U-X:** Morfología de las fiálides. **U.** Monofiálides. Ej. *F. solani*. **V.** Monifiálides. Ej. *F. oxysporum*. **W.** Polifiálides. Ej. *F. polyphialidicum*. **X.** Polifilides. **Y-Z:** Cadenas de microconidios. **Y.** Cortas. **Z.** largas. Modificado de Leslie & Summerell, 2006.

2.2 Identificación molecular

La caracterización molecular como su nombre lo indica se refiere a la descripción de las especies con base en el estudio de los ácidos nucleicos, macromoléculas que portan la información genética y proteínas. Su uso se ha incrementado gracias al avance en el desarrollo de las tecnologías de análisis de ADN. Se fundamenta en la variabilidad genética de las poblaciones cuantificada a través de secuencias génicas conservadas y marcadores moleculares. Los marcadores moleculares demuestran la variación en las secuencias de ADN dentro y entre las especies y proveen las bases para una identificación más precisa (Chandra *et al.*, 2011).

Las secuencias génicas comúnmente usadas son el factor de elongación 1- α (*EF-1- α*) (Geiser *et al.*, 2004), β -tubulina (*TUB2*) (O'Donnell *et al.*, 1998), calmodulina (*CAL*) (O'Donnell *et al.*, 2000), las regiones intergénicas 1 y 2 del gen ribosomal (*ITS1* e *ITS2*) (Waalwijk *et al.*, 1996; O'Donnell y Cigelnik, 1997), y la región del espacio intergénico (*IGS*) (Yli-Mattila & Gagkaeva, 2010). Sin embargo, no todas las secuencias son adecuadas para el análisis de todas las especies. Actualmente el gen *EF-1- α* es el más ampliamente utilizado dentro del género *Fusarium* para fines de identificación y filogenia (Chandra *et al.*, 2011; Leslie *et al.*, 2007) mientras que el gen *ITS* ha mostrado no ser el más adecuado dentro de la sección *Liseola* así como para otras especies tales como *F. avenaceum*, *F. arthrosporioides*/*F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*/*F. langsethiae* y los linajes de *F. graminearum* (O'Donnell *et al.*, 2000; Yli-Mattila *et al.*, 2002). Por lo que algunos otros genes (p ej. Histona H3, el locus *MAT*) o las combinaciones de múltiples secuencias han comenzado a ser utilizados para la caracterización molecular.

En el caso particular del Complejo de especies de *F. graminearum* (FGSC), la identificación ha estado basada en el uso de numerosos genes constitutivos integrados en un análisis de concordancia genealógica para el reconocimiento de especies filogenéticas (*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition GCPSR*) (Taylor *et al.*, 2000). Este involucra el uso de numerosos *loci* independientes como el factor de elongación (*EF-1 α*), α -tubulin (*α -TUB*), β -tubulin (*TUB2*), histona H3 (*HIS*), reductasa (*RED*), trichothecene 3-O-acetyltransferasa (*TRI101*), la región intergénica *ITS/28S* y los genes

MAT (*MAT1-1-3*, *MAT1-1-2*, *MAT1-1-1*, y *MAT1-2-1*) entre otros (O'Donnell *et al.*, 2004). El análisis GCPSR utilizando 12 genes reveló que aquellas especies productoras de micotoxinas tricoteceno tipo B podían ser agrupadas en un único clado (Clado B), el cual contiene a cinco especies heterotalicas: *F. cerealis*, *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc., *F. lunulosporum* Gerlach, *F. pseudograminearum* y *F. dactylis*, así como a 16 especies filogenéticas biogeográficamente estructuradas (Aoki *et al.*, 2012).

En 2008, Ward *et al.* desarrollaron el ensayo de genotipificación multilocus (*Multilocus Genotyping Test* MLGT) basado en el análisis de seis genes diferentes. Hasta ahora es uno de los métodos que ha permitido la identificación de numerosas especies filogenéticas. Este ensayo se basa en el uso de sondas de oligonucleótidos específicas para cada especie o variación químico-específica del tipo de micotoxinas. Estas sondas son específicas para los genes constitutivo *RED*, *MAT* y *EF-1 α* y los genes responsables de la biosíntesis de tricotecenos (*TRI101*, *TRI12*, *TRI3*) (Ward *et al.*, 2008).

Tanto GCPSR como MLGT han permitido el reconocimiento de especies filogenéticas dentro de *F. graminearum* que comprende por lo menos 15 diferentes especies biogeográficamente estructuradas que se agrupan en lo que se define como el **Complejo de especies de *F. graminearum*** (FGSC) (Sarver *et al.*, 2011; Starkey *et al.*, 2007). Hasta ahora han sido identificadas y formalmente descritas 16 especies homotalicas dentro del FGSC las cuales son: *F. graminearum*, *F. gerlachii*, *F. louisianense*, *F. asiaticum*, *F. ussurianum*, *F. nepalense*, *F. vorosii*, *F. acaciae-mearnsii*, *F. aethiopicum*, *F. boothii*, *F. mesoamericanum*, *F. austroamericanum*, *F. cortaderiae*, *F. brasilicum* y *F. meridionale* (Aoki *et al.*, 2012; Boutigny *et al.*, 2014; Sarver *et al.*, 2011; Starkey *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011).

Debido a que muchas de las filoespecies del FGSC exhiben una distribución biogeográfica particular se ha hipotetizado la ocurrencia de diversos eventos de especiación alelopátrica (especiación por aislamiento geográfico) en Asia, Norte y Sudamérica, Centroamérica, Australia y África (Aoki *et al.*, 2012). Al analizar cada una de las filoespecies del complejo, es evidente su regionalización o distribución definida. No obstante, esta se ha visto modificada por actividades humanas como el movimiento comercial de granos entre otros. Por ejemplo, *F. asiaticum* se ha reportado en las regiones del sur de China (Qu *et al.*, 2007) y Japón (Suga *et al.*, 2008). *F. ussurianum* en el este de Rusia, *F. vorosii* parece ser

restricto a Japón (Starkey *et al.*, 2007; Yli-Mattila *et al.*, 2009) y *F. louisianense* en EUA (Sarver *et al.*, 2011). Solo *F. graminearum sensu stricto* se considera la única especie del complejo con una distribución cosmopolita (Cuadro 1).

Las especies agrupadas en FGSC son productoras de micotoxinas tipo tricotecenos, por lo que el estudio de las especies y perfiles tóxicos es de gran importancia. La identificación de las especies dentro del complejo *F. graminearum* es útil para definir la evolución del género (Gagkaeva & Yli-Mattila, 2004) y el desarrollo de estrategias de diagnóstico o de control más específicas y convenientes. Por ejemplo la vigilancia de especies del FGSC productoras de nivalenol debido a su gran toxicidad para humanos en comparación deoxinivalenol y sus derivados acetilados.

Cuadro 1. Distribución geográfica y quimiotipos de tricotecenos producidos por las filoespecies agrupadas en el complejo *Fusarium graminearum* (FGSC). Modificado de Aoki *et al.*, 2012.

Complejo de especies de <i>Fusarium graminearum</i> (FGSC)		
Especie	Distribución	Tricoteceno producido
<i>Fusarium acaciae-mearnsii</i>	Australia, Sudáfrica	NIV, 3-ADON
<i>Fusarium aethiopicum</i>	Etiopia	15-ADON
<i>Fusarium asiaticum</i>	Asia (China, Nepal, Japón, Corea), Brasil, EUA	NIV, 3-ADON, 15-ADON
<i>Fusarium austroamericanum</i>	Sudamérica (Brasil, Venezuela)	NIV, 3-ADON
<i>Fusarium boothii</i>	Sudáfrica, México, Guatemala, Nepal, Corea, EUA	15-ADON
<i>Fusarium brasiliicum</i>	Brasil	NIV, 3-ADON
<i>Fusarium cortaderiae</i>	Sudamérica (Argentina, Brasil), Oceanía (Australia, Nueva Zelanda)	NIV, 3-ADON
<i>Fusarium gerlachii</i>	EUA	NIV
<i>Fusarium graminearum</i>	Norteamérica, Sudamérica, Europa, Asia (Japón, China, Corea), Sudáfrica	NIV, 3-ADON, 15-ADON
<i>Fusarium louisianense</i>	EUA	NIV
<i>Fusarium meridionale</i>	Sudamérica (Brasil), Centroamérica (Guatemala), Sudáfrica, Australia, Nueva Caledonia, Nepal, Corea, EUA.	NIV
<i>Fusarium mesoamericanum</i>	Centroamérica (Honduras), EUA	NIV, 3-ADON
<i>Fusarium nepalense</i>	Nepal	15-ADON
<i>Fusarium ussurianum</i>	Este de Rusia	3-ADON
<i>Fusarium vorosii</i>	Japón	3-ADON, 15-ADON

NIV=Nivalenol, 3-ADON = 3 Acetildeoxinivalenol, 15-ADON= 15 Acetildeoxinivalenol.

3. Micotoxinas en *Fusarium*

El género *Fusarium* contiene una gran cantidad de especies productoras de micotoxinas. Los tricotecenos, la zearalenona (ZEN) y las fumonisinas son los mayores grupos de micotoxinas que contaminan cereales en todo el mundo (D'Mello *et al.*, 1999)

Las fumonisinas son producidas principalmente por *F. verticillioides* (conocido formalmente como *F. moniliforme*), *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. globosum* (Desjardins, 2006; Scott, 2012). La similitud de las fumonisinas con los esfingolípidos, compuestos fundamentales en la membrana celular, hace que sean potentes inhibidores de la síntesis de esfingolípidos en mamíferos (Wang *et al.*, 1991). Se asocian a leucoencefalomalacia en equinos, edema pulmonar en porcinos y hepatotoxicidad y efectos cancerígenos en hígado de roedores (D'Mello *et al.*, 1999). En humanos se han reportado como probables inductores de cáncer de esófago (Glenn, 2007) por lo que la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC por sus siglas en inglés) ha designado a la fumonisina B1 (FB1) como un posible agente carcinogénico para humanos (Waśkiewicz *et al.*, 2012).

Las zearalenonas son compuestos no esteroideos con actividad estrogénica que han sido asociados a severos problemas en reproducción y fertilidad en porcinos, hepatotoxicidad, hematoxicidad y genotoxicidad en roedores (Desjardins, 2006; Zinedine *et al.*, 2007). No han sido asociadas a micotoxicosis en humanos. La zearalenona es una micotoxina producida por *F. graminearum*, su nombre deriva del teleomorfo o estado sexual del mismo (*Gibberella zea*), aunque su producción también han sido reportada en *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. equiseti* y *F. semitectum* (Desjardins, 2006).

El ácido fusarico, beauvericina, clamidosporol, culmorina, ciclonerodiol, eniatinas, equisetina, fusarinas, fusaproliferinas, fusarocromanonas, moniliformina y sambutoxina son otras toxinas producidas por *Fusarium* (Desjardins, 2006; Summerell & Leslie, 2011) (Cuadro 2). Los tricotecenos son el tipo de micotoxinas más común en cereales y por ello las más estudiadas, siendo asociadas directamente a micotoxicosis en humanos (Desjardins & Proctor, 2007; Wannemacher & Wiener, 1997).

Cuadro 2. Principales micotoxinas producidas por algunas de las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en trigo. Modificado de Desjardins, 2006.

Especie	Micotoxinas reportadas
<i>F. avenaceum</i>	Aurofusarina, beauvericina, clamidosporol, eniatinas, fusarinas y moniliforminas.
<i>F. cerealis</i>	Aurofusarina, butenolidos, culmorina, cicloneodiol, ácido fusarico, fusarinas, tricotecenos , zearelenona.
<i>F. culmorum</i>	Aurofusarina, butenolidos, clamidosporol, culmorina, cicloneodiol, cicloneotriol, ácido fusarico, fusarinas, moniliformina, tricotecenos , zearelenona.
<i>F. equiseti</i>	Bauvericina, equisetina, fusarocromanona, moniliformina, tricotecenos , zearelenona.
<i>F. graminearum</i>	Aurofusarina, butenolidos, clamidosporol, culmorina, cicloneodiol, fusarinas, tricotecenos , zearelenona.
<i>F. oxysporum</i>	Eniatinas, fumonisinas, ácido fusarico, moniliformina, naftazarina, sambutoxina.
<i>F. poae</i>	Aurofusarina, beauvericina, butenolidos, culmorina, cicloneodiol, eniatinas, fusarinas, tricotecenos .
<i>F. proliferatum</i>	Beauvericina, enitianinas, fumonisinas, ácido fusarico, fusaproliferina, moniliformina.
<i>F. pseudograminearum</i>	Tricotecenos , zearelenona.
<i>F. sporotrichioides</i>	Aurofusarina, beauvericina, butenolidos, culmorina, eniatinas, fusarinas, moniliformina, tricotecenos .

3.1 Tricotecenos

Los tricotecenos son sesquiterpenos tricíclicos que contienen un anillo 12,13 epoxido y un doble enlace en el carbón 9 y 10 por lo que químicamente son descritos como toxinas triciclicas 12,13 epoxitricotec-9 enos (EPT) (Figura 1) (Desjardins, 2006). Su nombre deriva del hongo *Trichotecium roseum* del cual fueron aislados por primera vez en 1984 (Desjardins

et al., 1993). Sus efectos están relacionados a la inhibición de la biosíntesis de proteínas en eucariontes por la alteración en la conformación peptídica de la subunidad ribosomal 60S. Esta inhibición afecta el proceso de traducción de proteínas en sus etapas de iniciación y elongación (Cundliffe & Davies, 1977). Dado su bajo peso molecular y naturaleza anfipática, los tricotecenos pueden moverse pasivamente a través de la membrana celular y con ellos ser fácilmente absorbidos por el sistema tegumentario y gastrointestinal (McCormick *et al.*, 2011). En humanos, la ingestión de granos contaminados con este tipo de micotoxinas provoca náuseas, vómito, anorexia y convulsiones, síntomas que se atribuyen a enfermedades conocidas como la toxicosis de Akakabi y la toxicosis alimenticia aleukia (Goswami & Kistler, 2004). Su ingestión prolongada puede llegar a provocar inmunodepresión y desórdenes neurológicos (Bennett & Klich, 2003). Sus efectos tóxicos en animales están relacionados a anormalidades y degeneración del sistema reproductivo, atrofia del sistema digestivo, hemorragias y en casos extremos la muerte (Bennett & Klich, 2003; Wannemacher & Wiener, 1997). En el caso particular del Desoxinivalenol (DON) o vomitoxina, sintetizado principalmente por *F. graminearum sensu stricto* su efecto no sólo está limitado a animales. Concentraciones tan pequeñas (1-10 μM) son suficientes para inhibir la germinación de las semillas y reducir el crecimiento de plántulas (Desjardins, 2006; Yoshida & Nakajima, 2010). En los granos puede llegar a destruir los gránulos de almidón y afectar la síntesis de proteínas en los ribosomas, lo que resulta en un producto de mala calidad y poca comercialización (Desjardin, 2006).

Los tricotecenos de mayor importancia en cereales son el diacetoxiscirpenol, la toxina T-2, el nivalenol y desoxinivalenol (Desjardins & Proctor, 2007). La sustitución de uno de sus carbonos determina cuatro tipos de tricotecenos denominados A, B C y D. Los tricotecenos tipo A y B son producidos por especies de *Fusarium* (Desjardin, 2006; McCormick *et al.*, 2011). Siendo la única característica distintiva entre estos la posición del grupo funcional acetilo en la posición C-8.

En el caso particular de las micotoxinas producidas por *Fusarium graminearum*, los tricotecenos tipo B son los más estudiados. El deoxynivalenol (DON) y nivalenol (NIV) con sus derivados acetilados conforman este grupo de micotoxinas. Hasta hoy se ha descrito tres distintos quimiotipos o perfiles diferenciados en la posición de un grupo acetilo: el

quimiotipo NIV, que incluye especies que producen NIV y su derivado acetilado 4-acetilnivalenol (4-NIV); el quimiotipo 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) y el quimiotipo 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) (Miller *et al.*, 1991). Aunque ambos quimiotipos son producidos por diferentes aislamientos de *F. graminearum*, parece ser más frecuente la producción de DON que NIV (Nicholson *et al.*, 2003).

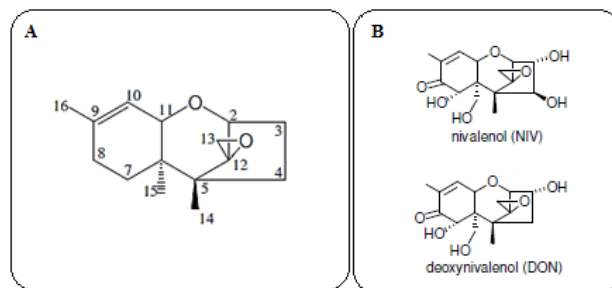


Figura 2. Estructura química de los tricotecenos. A. Estructura básica de los tricotecenos. B. Tricotecenos tipo B. Modificado de McCormick *et al.*, 2011.

A nivel molecular, la biosíntesis de tricotecenos en *F. graminearum* reside en la expresión de un grupo de más de 10 genes denominados *TRI* localizados en cuatro loci diferentes (Desjardins, 2006). El primer grupo (cóntigo genómico 1.159) es caracterizado por la presencia del gen codificante para la enzima tricodin sintasa (*TRI5*), responsable de la catalización de ciclización de *trans, trans* farnesil pirofosfato a tricodin, el primer compuesto precursor de tricotecenos (Desjardins & Proctor, 2007). Adyacente a este se encuentran los genes *TRI6* y *TRI10*. La proteína codificada por *TRI6* es un factor transcripcional cuya expresión a su vez se encuentra regulada por el gen maestro *TRI10*. La disrupción de alguno de estos tres genes resulta en la reducción de la producción de tricotecenos. Dentro de este mismo grupo se encuentra el gen *TRI12* el cual codifica para un transportador de eflujo; tres genes codificantes de citocromos P450, los cuales catalizan las oxigenaciones en los carbonos de C-1, C-3, C-12, C-13 (*TRI4*), C-15 (*TRI11*), y C-4 (*TRI13*) y los genes *TRI3*, *TRI7* y *TRI8* los cuales codifican para enzimas capaces de remover grupos éster. Los genes *TRI9* y *TRI14* no tienen una función clara (Figura 2). Aunque la mayoría de los genes de biosíntesis de tricotecenos se localizan en el *cluster TRI5*, existen cuatro genes adicionales que han sido

localizados en tres diferentes *loci*. En un locus (cóntigo genómico 1.4) se encuentran los genes *TR11* y *TR116*, los cuales codifican para las enzimas que catalizan la oxigenación del C-8 y la transferencia del grupo acetilo respetivamente. En los otros dos *loci* se encuentran los genes *TR1101* (cóntigo genómico 1.321) el cual codifica para la enzima C-3 O-acetil transferasa y *TR115* (cóntigo genómico 1.457) el cual codifica para un factor transcripcional cuya estructura secundaria corresponde a un dedo de zinc y funciona como un regulador negativo en la biosíntesis de tricotecenos (Desjardins, 2006; Desjardins & Proctor, 2007).

Lee *et al.*, (2002) y Brown *et al.*, (2002) identificaron los genes *TR113* y *TR17* como los responsables de la conversión de DON a NIV (*TR113*) y de la acetilación de NIV a 4-acetilnivalenol (4-NIV) (*TR17*). Mientras que diferencias en la expresión de *TR13* y *TR18* son responsables de la acetilación del DON en 3ADON o 15ADON (Kimura *et al.*, 2003).

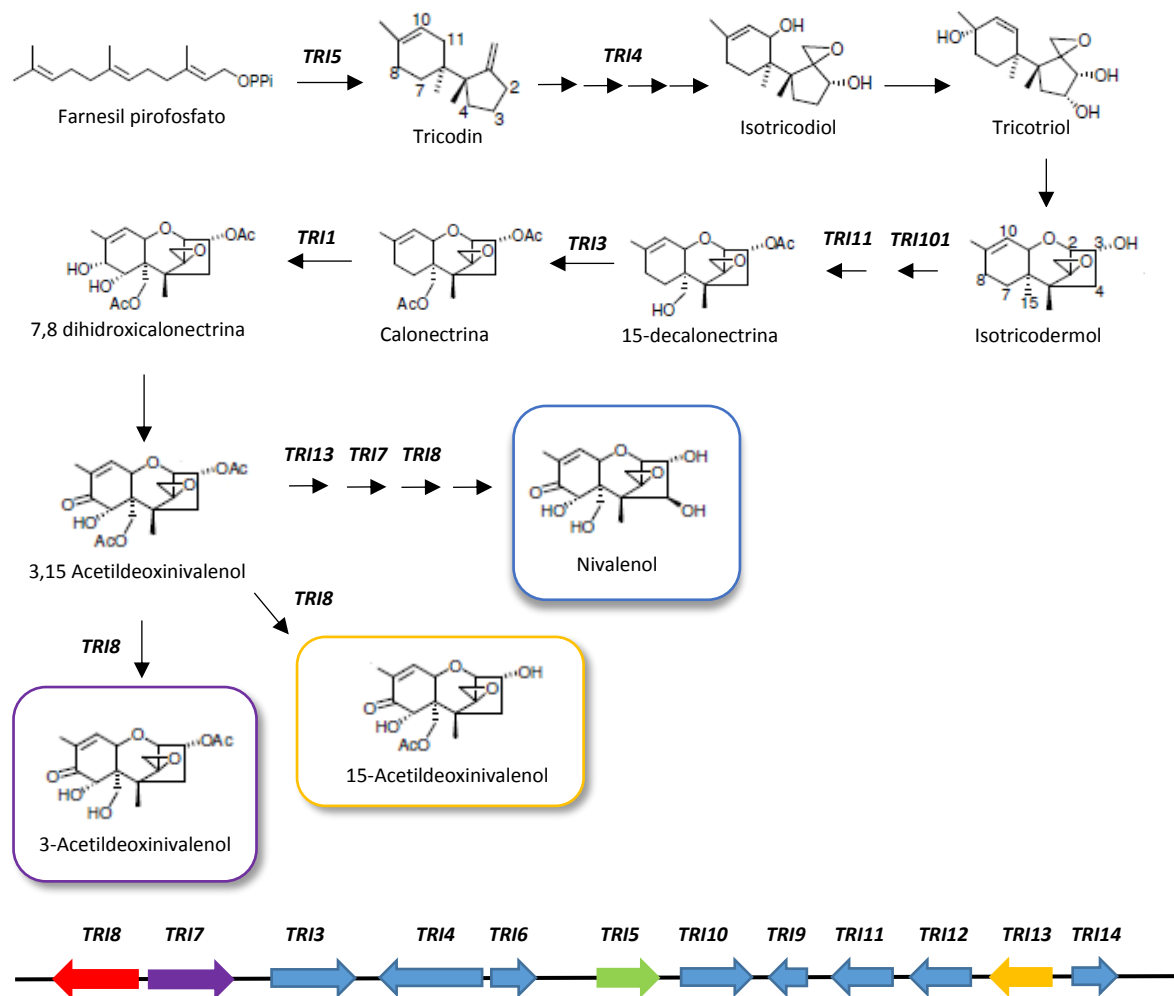


Figura 3. Vía de biosíntesis de tricotecenos en *F. graminearum* y mapa genético del cluster *TRI5*. Dentro del cluster el gen *TRI5* (verde) es el centro organizador, *TRI13* (amarillo), *TRI7* (morado) y *TRI8* (rojo) son los genes responsables de la producción de NIV o DON. Modificado de McCormick *et al.*, 2011.

REFERENCIAS

- Aoki, T., Ward, T., Kistler, H., & O'Donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Mycotoxins*, 62(2), 91–102. Retrieved from http://www.ncaur.usda.gov/SP2UserFiles/ad_hoc/36400500Publications/HCK/FGSC_review_pdf.pdf
- Aoki, Takayuki, O'Donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189–201. doi:10.1007/s10327-014-0509-3
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews.*, 16(3), 497–516. doi:10.1128/CMR.16.3.497
- Boutigny, A., Ward, T., & Ballois, N. (2014). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European journal of plant ...*, (138), 133–148. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-013-0312-6>
- Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., & Desjardins, A. E. (2002). Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 36(3), 224–233. doi:10.1016/S1087-1845(02)00021-X
- Chandra, N. S., Wulff, E. G., Udayashankar, a C., Nandini, B. P., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N., & Prakash, H. S. (2011). Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(5), 1625–39. doi:10.1007/s00253-011-3209-3
- Cundliffe, E., & Davies, J. (1977). Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 11(3), 491–499. Retrieved from <http://aac.asm.org/content/11/3/491.short>
- D'Mello, J., Placinta, C., & Macdonald, A. (1999). *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80, 183–205. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840199000590>
- Desjardins, A., E. (2006). *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology*. St Paul, MN, USA, APS Press.

- Desjardins, a E., & Proctor, R. H. (2007). Molecular biology of Fusarium mycotoxins. *International journal of food microbiology*, *119*(1-2), 47–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024
- Desjardins, A., Hohn, T., & McCormick, S. P. (1993). Trichothecene biosynthesis in Fusarium species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *57*(3), 595–604. Retrieved from <http://mmbr.asm.org/content/57/3/595.short>
- Gagkaeva, T., & Yli-Mattila, T. (2004). Genetic diversity of Fusarium graminearum in Europe and Asia. *European Journal of Plant Pathology*, *110*, 551–562. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-2285-2_10
- Geiser, D. M., Aoki, T., Bacon, C. W., Baker, S. E., Bhattacharyya, M. K., Brandt, M. E., ... Coleman, J. J. (2013). One Fungus , One Name : Defining the Genus Fusarium in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use. *Phytopathology*, *103*, 400–408.
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., ... O'donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying Fusarium. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(5/6), 473–479. doi:10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0
- Gerlach W., & Nirenberg, H. (1982). The genus Fusarium: A pictorial atlas. Mitt Biol Bundesanstalt Land-Forstwirtschaft Berl-Dahl, *209*:1–405.
- Glenn, A. E. (2007). Mycotoxigenic Fusarium species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, *137*(3-4), 213–240. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.003
- Goswami, S. R., & Kistler, H. C. (2004). Pathogen profile Heading for disaster : Fusarium graminearum on cereal crops, *5*, 515–525. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00252.X
- Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T. J., Fujimura, M., Hamamoto, H., ... Yamaguchi, I. (2003). The trichothecene biosynthesis gene cluster of Fusarium graminearum F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters*, *539*(1-3), 105–110. doi:10.1016/S0014-5793(03)00208-4
- Lee, T., Han, Y., Kim, K., Yun, S.-H., & Lee, Y.-W. (2002). Tri13 and Tri7 Determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of Gibberella zeae. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(5), 2148–2154. doi:10.1128/AEM.68.5.2148-2154.2002

- Leslie, J. F., Anderson, L. L., Bowden, R. L., & Lee, Y.-W. (2007). Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International journal of food microbiology*, *119*(1-2), 25–32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.059
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (p. 388). United States of America: Blackwell Publishing.
- Matuo, T., & Snyder, W. (1973). Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. *Phytopathology*, *63*, 562–565. Retrieved from http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1973Articles/Phyto63n05_562.PDF
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*, Columbia Univ. Press, New York, EUA.
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. a, & Alexander, N. J. (2011). Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, *3*(7), 802–14. doi:10.3390/toxins3070802
- Miller, D. J., Greenhalgh R., Wang, Y., & Lu, M. (1991). Trichothecene Chemotypes of Three *Fusarium* Species. *Mycologia*. *83* (2), 121-130
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. (1983) *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Nelson, P., Dignani, M., & Anaissie, E. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology ...*, *7*(4), 479–504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc358338/>
- Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R., Gosman, N., Simpson, D., Thomsett, M., & Wilson, A. H. (2003). Molecular tools to study epidemiology and toxicology of *Fusarium* head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology*, *109*, 691–703. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-1452-5_4
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, I. H. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Giberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. *90*(3), 465-493.
- O'Donnell, K, Nirenberg, H., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, *41*, 61–78. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02464387>

- O'Donnell, Kerry, Ward, T. J., Geiser, D. M., Corby Kistler, H., & Aoki, T. (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: FG & B*, *41*(6), 600–23. doi:10.1016/j.fgb.2004.03.003
- Qu, B., Li, H. P., Zhang, J. B., Xu, Y. B., Huang, T., Wu, a. B., ... Liao, Y. C. (2007). Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology*, *57*, 15–24. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01711.x
- Sarver, B., Ward, T., Gale, L., Broz, K., Corby Kistler, H., Aoki, T., ... O'Donnell, K. (2011). Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and ...*, *48*, 1096–1107. doi:10.1016/j.fgb.2011.09.002
- Scott, P. M. (2012). Recent research on fumonisins: a review. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, *29*(2), 242–8. doi:10.1080/19440049.2010.546000
- Snyder, W.C. & Hansen, H.N. (1945). The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*, *32*:657–666.
- Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R., Kistler, H. C., Geiser, D. M., ... O'Donnell, K. (2007). Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal genetics and biology: FG & B*, *44*(11), 1191–204. doi:10.1016/j.fgb.2007.03.001
- Suga, H., Karugia, G. W., Ward, T., Gale, L. R., Tomimura, K., Nakajima, T., ... Hyakumachi, M. (2008). Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology*, *98*(2), 159–66. doi:10.1094/PHYTO-98-2-0159
- Summerell, B. A., & Leslie, J. F. (2011). Fifty years of *Fusarium* how could nine species have ever been enough. *Fungal Diversity*, *50*, 135–144.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., & Fisher, M. C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal genetics and biology: FG & B*, *31*(1), 21–32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228
- Turgeon, B. G., & Yoder, O. C. (2000). Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, *31*(6): 1-5.

- Waalwijk, C., de Koning, J.R.A., Baayen, R.P., & Gams, W. (1996). Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola*, and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia*, 88:361–368.
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., & Merrill, A. H. (1991). Inhibition of Sphingolipid Biosynthesis by Fumonisin. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22), 14486–14490.
- Wang, J.-H., Ndoye, M., Zhang, J.-B., Li, H.-P., & Liao, Y.-C. (2011). Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins*, 3(8), 1020–37. doi:10.3390/toxins3081020
- Wannemacher, R., & Wiener, S. (1997). Trichotecene mycotoxins. In F. Sidell, E. Takafuji, & D. Franz (Eds.), *Medical aspects of chemical and biological warfare* (pp. 655–676). Washington, DC.: TMM Publications. Retrieved from <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA398241>
- Ward, T. J., Clear, R. M., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., ... Nowicki, T. W. (2008). An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 45(4), 473–84. doi:10.1016/j.fgb.2007.10.003
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., & Goliński, P. (2012). Occurrence of fumonisins in food – An interdisciplinary approach to the problem. *Food Control*, 26(2), 491–499. doi:10.1016/j.foodcont.2012.02.007
- Wheeler, Q. (1999). Why the phylogenetic species concept?—Elementary. *Journal of Nematology*, 31(2), 134–141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2620362/>
- Wollenweber, H. W. & Reinking O.A (1935). Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Yli-Mattila, T., & Gagkaeva, T. (2010). Molecular chemotyping of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis* isolates from Finland and Russia. In: Gherbawy Y, Voigt K (eds). *Molecular identification of fungi* (pp 159-177), Berlin, Springer.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T. J., Aoki, T., Kistler, H. C., & O'Donnell, K. (2009). A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 101(6), 841–852. doi:10.3852/08-217

- Yli-Mattila, Tapani, Paavanen-Huhtala, S., Bulat, S. A., Alekhina, I. A., & Nirenberg, H. I. (2002). Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex –a polyphasic approach. *Mycological Research*, 106(6), 655–669. doi:10.1017/S0953756202006020
- Yoshida, M., & Nakajima, T. (2010). Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. *Phytopathology*, 100(8), 763–73. doi:10.1094/PHYTO-100-8-0763
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(1), 1–18. doi:10.1016/j.fct.2006.07.030

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA EN TRIGO EN TRES REGIONES DE MÉXICO

RESUMEN

El tizón de la espiga es una enfermedad que afecta a cereales de grano pequeño causada por varias especies del género *Fusarium*. La enfermedad ocasiona severas pérdidas en la producción, reducción en la calidad del grano y contaminación con micotoxinas. Más de 15 especies de *Fusarium* han sido reconocidas como agentes causales de la enfermedad, siendo *F. graminearum* la de mayor importancia en todo el mundo. Muchas especies de *Fusarium* son capaces de producir micotoxinas tales como los tricotecenos. En nuestro país, el conocimiento de la diversidad de especies que causan el tizón de la espiga en trigo es un prioritario para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad. Los objetivos de este estudio fueron: 1) Aislar *Fusarium* de granos de trigo con síntomas evidentes de tres regiones del país; 2) Identificar morfológica y molecularmente los aislados de *Fusarium*; 3) Determinar las relaciones filogenéticas entre los aislados. Durante los ciclos de cultivo de 2013-2014, se colectaron semillas de trigo de diversas variedades en el Bajío, Mixteca y Valles Altos de México. Los aislamientos se identificaron molecularmente con base en la secuenciación parcial del gen factor de elongación 1- α (*EF-1 α*). La relación filogenética entre los aislados se determinó con el alineamiento del gen de la subunidad grande la ARN polimerasa II (*RPB2*) usando el método de máxima verosimilitud (ML-BS). Se obtuvieron 116 aislados, de los cuales el 56% pertenecen al complejo de especies de *F. tricinctum* (FTSC) y el 30% al complejo de especies de *F. graminearum* (FGSC), mientras que un pequeño número de los aislados fueron identificados como especies de los complejos de *F. sambucinum*, (FSSC), *F. fujikuroi* (FFSC), *F. incarnatum/F. equiseti* (FIESC), y *F. oxysporum* (FOSC).

Palabras clave: *Fusarium*, tizón de la espiga, análisis filogenético, México.

CHAPTER I. MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Fusarium* SPECIES CAUSING FUSARIUM HEAD BLIGHT OF WHEAT IN MEXICO

ABSTRACT

Fusarium Head Blight (FHB) is a destructive disease of all small grain cereals, and is caused by several species of *Fusarium*. Epidemics in wheat result in severe yield losses, reduction in crop quality and mycotoxin contamination of grains. Although more than 15 different species are associated with FHB, *F. graminearum* is the major causal agent worldwide. Several FHB species are able to produce trichothecene mycotoxins. In our country the knowledge of FHB population is a crucial survey to determine management. The objectives of this study were: 1) to isolate *Fusarium* strains from tombstones kernels from three regions of Mexico; 2) to conduct morphological and molecular identification of *Fusarium* strains causing FHB in three regions of Mexico; 3) to determine the phylogenetic relationships among FHB strains. During the growing season of 2013-2014, wheat heads with symptoms of FHB were collected in three different regions: Bajío, Mixteca and Highlands of Mexico. *Fusarium* strains were identified to species level using a combination of morphological (SNA medium) and molecular characters translation elongation factor 1- α (*EF1- α*) and RNA polymerase II second largest subunit (*RPB2*) sequence analyses. One hundred and sixteen *Fusarium* isolates were characterized, most of them belong to the *F. tricinctum* species complex (FFSC) (56%) and the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) (30%), although a small number of isolates belonged to the *F. sambucinum*, *F. fujikuroi*, *F. incarnatum/F.equiseti*, and *F. oxysporum* species complexes.

Key words: *Fusarium*, Fusarium Head Bight, phylogenetic analyses, Mexico.

1. INTRODUCCIÓN

La fusariosis, sarna o tizón de la espiga (*Fusarium head blight (FHB)*) es una enfermedad en trigo, cebada y avena causada por el género *Fusarium*. Fue descrita por primera vez en 1884 afectando cultivos de trigo y cebada en Inglaterra (Goswami & Kistler, 2004). Hasta ahora sigue siendo una de las enfermedades más comunes y limitantes en la producción de cereales en todo el mundo. Tan solo en Estados Unidos y Centro América se han calculado pérdidas de hasta el 2.7 billones de dólares durante los años 1998 a 2002 (McMullen *et al.*, 2012).

En los últimos años, el estudio del tizón de la espiga ha sido un tema de interés, esto relacionado a un repunte considerable en la incidencia de la enfermedad en países de todo el mundo. Reportes de Canadá (Tekauz *et al.*, 2000; Amarasinghe *et al.*, 2015) Estados Unidos de Norteamérica (McMullen *et al.*, 2012), Brasil (Del Ponte *et al.*, 2012), Argentina (Alvarez *et al.*, 2011; Sampietro *et al.*, 2011), Uruguay (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2013), China (Zhang *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012), Japón (Suga *et al.*, 2008) y países de la Unión Europea como Francia (Boutigny *et al.*, 2013), Italia (Infantino *et al.*, 2012), Bélgica (Audenaert *et al.*, 2009) entre otros, apuntan a un incremento en la afectación de cereales, principalmente trigo. Este hecho ha sido asociado a posibles cambios climáticos, pero más frecuentemente a la creciente adopción de sistemas de labranza conservacionistas (Dill-Macky & Jones, 2000; Leplat *et al.*, 2012; McMullen *et al.*, 1997) que no sólo permiten la disponibilidad de inóculo permanente sino que también favorecen en el ciclo reproductivo de *Fusarium*.

En México el tizón de la espiga se observó por primera vez en 1977 en el área del altiplano de Jalisco. Sin embargo, no fue hasta 1994 cuando el Centro de Investigaciones y Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) reportó la presencia de la enfermedad en los estados cuyo cultivo era de temporal, específicamente en los estados de Jalisco, Michoacán, México, Tlaxcala e Hidalgo; así como en trigo cultivado bajo condiciones de riego dentro del estado de Guanajuato (Ireta & Gilchrist, 1994). La Sierra Tarasca de Michoacán, la región de los Altos y la Sierra del tigre en Jalisco, fueron las áreas reportadas con mayor afectación, con una incidencia de un 10 al 90% (Ireta & Gilchrist, 1994; Gilchrist-Saavedra, 2000). Poca

información se ha generado respecto al diagnóstico, epidemiología y control de esta enfermedad y se desconoce el nivel de contaminación y afectación de la producción dentro de la industria de los cereales de grano pequeño en México. Fue hasta 2012 cuando Malihipour *et al.* reportó la presencia del tipo de micotoxinas producidas por *F. boothii* y *F. cerealis* en nuestro país. Este estudio ha sido de suma importancia en México pero se desconoce la diversidad de especies causantes del tizón de la espiga en trigo. El estudio de la población de *Fusarium* se relaciona al entendimiento del riesgo toxicológico, por lo que conocer la diversidad de especies puede ser útil en la predicción del principal tipo o tipos de micotoxinas contaminando los granos (Bottalico & Perrone, 2002; Xu & Nicholson, 2009) En este sentido los objetivos del presente capítulo fueron: 1) Asilar *Fusarium* de granos de trigo con síntomas evidentes en tres regiones diferentes del país; 2) Identificar morfológica y molecularmente los aislados de *Fusarium*; 3) Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies que conforman la población del tizón de la espiga en trigo.

2. METODOLOGÍA

2.1 Zona de estudio

Durante los ciclos de cultivo de 2013-2014, se colectaron semillas de trigo con síntomas evidentes de tizón de la espiga de diversas variedades de 53 localidades en tres regiones de estudio dentro de la República Mexicana. Las regiones de estudio fueron agrupadas de la siguiente manera:

- i. La región sur o Mixteca constituida por el estado de Oaxaca cuya entidad se caracteriza por presentar un clima cálido húmedo, con una temperatura media anual de 25°C y una precipitación media de 1 550 mm. El periodo anual de precipitaciones comprende casi seis meses (INEGI, 2013) (Figura 1).
- ii. La región oeste o del Bajío donde se muestreo la parte sur del estado de Guanajuato. En esta zona se presenta un clima cálido o templado subhúmedo. La temperatura media anual es de 18°C y la precipitación media anual es de aproximadamente 650 mm (INEGI, 2013) (Figura 2).

- iii. Los Valles Altos de México que comprende a los estados de Tlaxcala, Puebla y México. Esta región se caracteriza por tener un clima templado subhúmedo, cuyas temperaturas medias anuales corresponde a 14, 17.5 y 14.7°C respectivamente. Con un patrón de precipitaciones anuales de 1 270 mm, 720 mm, 1 270 mm y 900 mm. (INEGI, 2013) (Figura 3).

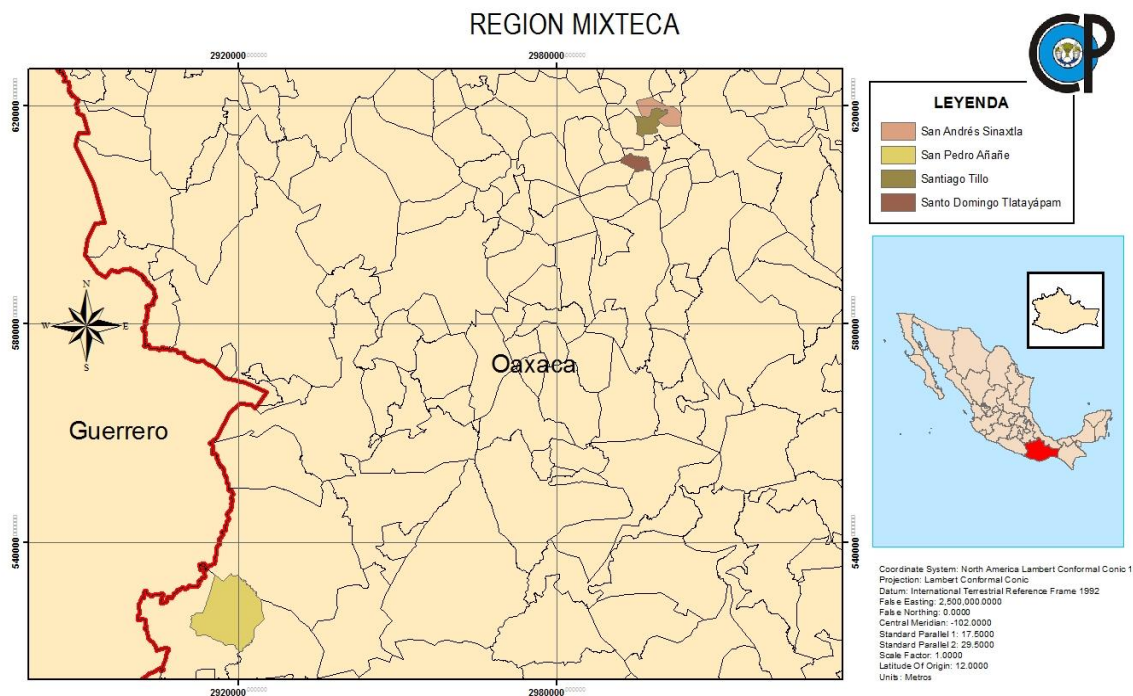


Figura 1. Localidades de muestreo en la región del sur o Mixteca durante el ciclo de cultivo de 2013.

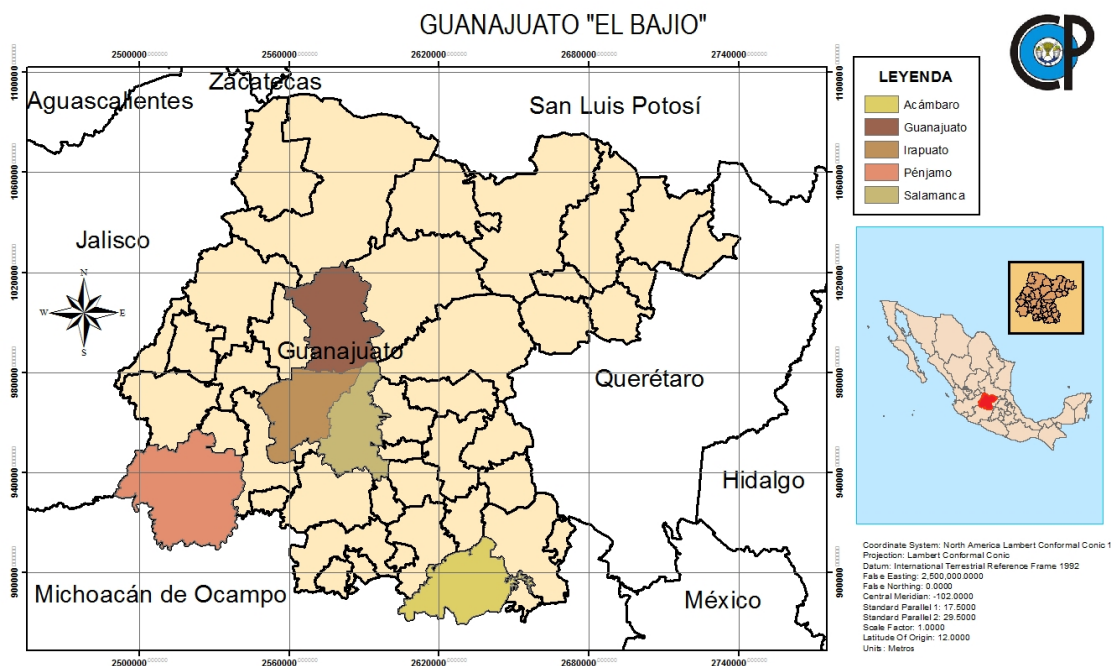


Figura 2. Localidades de muestreo en la región del este correspondientes al estado de Guanajuato durante el ciclo de cultivo de 2014.

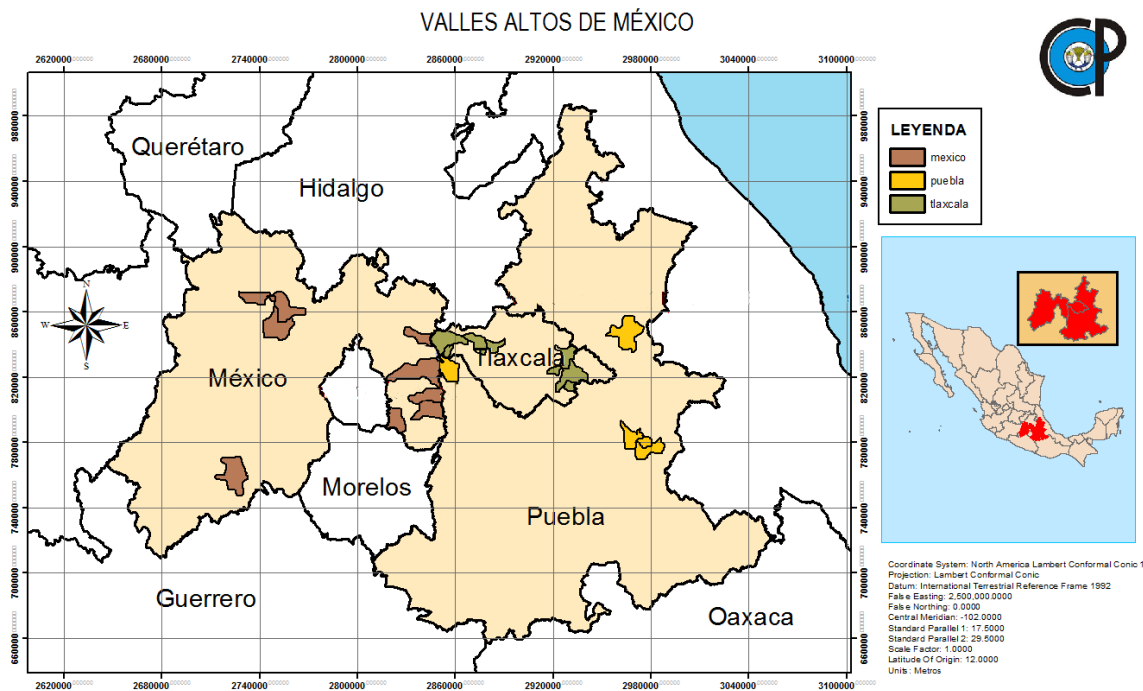


Figura 3. Localidades de muestreo en la región de los Valles Altos de México durante los ciclos de cultivo de 2013 y 2014.

2.2 Determinación del tamaño de muestra

El número de semillas a procesar de cada una de las 53 localidades (tamaño de muestra) se determinó con ayuda de un estadístico. A partir de un tamaño poblacional de 1000 semillas, con un nivel de confianza del 95% y un error del 13%, el tamaño muestral fue de 60 semillas por localidad de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$n = \frac{N Z^2_{\alpha/2} P_n Q_n}{N e^2 + Z^2_{\alpha/2} P_n Q_n}$$

2.3 Aislamiento y purificación

Para aislar y determinar la incidencia de *Fusarium* en semilla se utilizó el método de papel secante y congelamiento reportado por Neergaar en 1977 y estandarizado posteriormente por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (Warham *et al.*, 1997). Las semillas se desinfestaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos y se enjuagaron tres veces en agua bidestilada estéril. Posteriormente se colocaron en cámara húmeda en cajas plásticas de germinación de semillas con papel filtro estéril humedecido con 1 ml de agua bidestilada. Durante 48 horas se alternaron 12 horas luz y 12 horas oscuridad a temperatura ambiente y posteriormente las muestras se congelaron a -15 a -20 °C por 24 horas con la finalidad de matar el embrión y de ese modo obtener un sustrato para el desarrollo de los hongos (Warham *et al.*, 1997). Finalmente las cajas se incubaron a 20°C por un lapso de 6 días.

Con base en las características de color de micelio desarrollado sobre la semilla basados en Warham *et al.* (1997), se hicieron los aislamientos en agua-agar. La purificación se llevó a cabo por la técnica de cultivos monospóricos o de punta de hifa (dependiendo de las características de crecimiento y producción de esporas de cada uno de los hongos aislados) en cajas Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (BD Bioxon™). Todas las cepas fueron almacenadas en glicerol al 60%, v/v a -80 °C. Duplicados de cada uno de los aislados fueron almacenados en la colección internacional del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, Agricultural Research Service (ARS), en Peoria, IL.

2.4 Extracción de ácidos nucleicos

Asilamientos de 6-8 días de edad en medio V8 fueron utilizados para la extracción de ácidos nucleicos totales. La extracción de ADN se realizó con el kit comercial ZR Fugal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN se cuantificó mediante espectrofotometría usando un NanoDrop 2000UV-Vis (Thermo Scientific®, EUA), mientras que la calidad se comprobó al verificar que los valores de las relaciones de 260/280 y 230/260 fueran cercanos a 2. El ADN genómico se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.5 Identificación molecular de los aislados

Para la identificación se amplificó la región parcial del gen factor de elongación 1- α (*EF 1- α*). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L, para ello se agregó 50 mM de MgSO₄, 2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP's), 0.6 mM de cada primer, y 1 U de la enzima Platinum Taq High Fidelity polimerasa (Invitrogen™). Se utilizaron los oligonucleótidos EF1 (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') y EF2 (5'-GGAAGTACCAGTGATCATG-3'). (O'Donnell *et al.*, 1998) bajo las siguientes condiciones de PCR: 94°C por 1:30 min fase de desnaturalización, con 35 ciclos a 94°C por 30 s, 53°C por 30 s, 68°C por 45 s. Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1% para confirmar un amplicón de \approx 700 pares de bases (pb). Posteriormente fueron purificados en vacío con las placas de filtración MultiScreen-PCR₉₆ (Millipore).

La secuenciación de las muestras se llevó a cabo con el kit de secuenciación BigDye v3.1 Terminator (Applied Biosystems™) analizado en ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™). Cada una de las secuencias fueron editadas y manualmente alineadas usando el programa Sequencher (version 4.10, Gene Codes). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en las bases de datos *Fusarium* MLST (O'Donnell *et al.*, 2010) y *Fusarium* ID (Geiser *et al.*, 2004), desarrolladas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y la Universidad de Pensilvania respectivamente.

2.6 Análisis filogenético

Para analizar la diversidad filogenética de las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga se secuenció la región de la subunidad grande de la ARN polimerasa II (*RPB2*), debido a que su alta variabilidad intraespecífica en comparación al gen *EF1- α* (O'Donnell *et al.*, 2013). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L conteniendo 10 \times de buffer de reacción, 50 mM de MgSO₄, 1 U de la enzima Platinum Taq High Fidelity polymerase (Invitrogen™), 10 mM de dNTP's y 0.01 mM de oligonucleótidos. Los oligos utilizados fueron 5F2 (5'GGGGWGAYCAGAAGAAGGC3') y 11ar (5'GCRTGGATCTTRTCRTCSACC3') (O'Donnell *et al.*, 2013). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 96°C por 1:30 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 54°C por 35 s, 68°C por 2 min, y mantenidos a 4 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis para confirmar un tamaño de amplicón de \approx 1800 pb. Posteriormente los productos fueron purificados en vacío con las placas de filtración MultiScreen-PCR₉₆ (Millipore).

La secuenciación y edición de las secuencias de *RPB2* se llevó a cabo como se describió para las secuencias parciales del *EF1- α* . Las secuencias fueron alineadas por MUSCLE y las relaciones filogenéticas fueron inferidas usando el método de máxima verosimilitud (ML) mediante el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). La confiabilidad y soporte individual de los nodos fue estimado mediante el método de bootstrap no paramétrico con 1,000 réplicas de los datos. Se usó el método heurístico de Neighbor-joinig (NJ) utilizando el modelo general de tiempo reversible (*General time reversible* (GTR)) como método de sustitución de nucleótidos y distribución Gamma (+G).

2.7 Identificación morfológica y cultural

La identificación morfológica de los aislamientos fue realizada posterior a la identificación molecular, seleccionando tres aislamientos por especie (en el caso de las especies predominantes) o un aislamiento según su caso.

Para describir las características de las colonias, los aislamientos fueron crecidos en medio PDA (BD Bioxon™) por una semana a una temperatura de 23–25°C con intervalos

de cada 15 minutos de luz blanca y oscuridad. Para describir las características morfológicas, los aislados fueron crecidos en medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) (1 g de KH_2PO_4 , 1 g de KNO_3 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCl , 0.2 g de glucosa, 0.2 g de sacarosa y 14 g Agar en 1L de agua destilada) durante una semana en cámaras de incubación a una temperatura constante de 25°C alternando periodos de luz blanca y luz oscura (12h) ().

Una muestra de 20 micro y macroconidios fueron medidos (largo y ancho) por cada especie. Para el caso de los macroconidios se contó el número de septos y se describió la forma de las células terminales y apicales de acuerdo a lo descrito por Leslie & Summerell (2006). La obtención de fotomicrografías se llevó a cabo en un fotomicroscopio Olympus Modelo ProvisAX70 con cámara digital de 5 megas y sistema de iluminación de contraste de fases.

2.8 Pruebas de patogenicidad

Para corroborar la patogenicidad de los aislados del complejo de especies de *F. sambucinum* obtenidos en las tres diferentes regiones de la República Mexicana, se realizaron inoculaciones en espigas de trigo de 45 días de edad. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar y un tamaño de muestra de 10 plantas por cepa. Las cepas de *Fusarium* fueron crecidas en té *mung bean* durante 5 días a $28^\circ\text{C}/200$ rpm. Los floretes fueron inoculados inyectando $10 \mu\text{L}$ de una suspensión de conidios a una concentración de 10^5 esporas mL^{-1} en el florete central de la parte media de la espiga. Las espigas fueron cubiertas con bolsas de plástico para asegurar la infección. Se realizaron evaluaciones durante los primeros 6, 9, 13, 16 y 23 días después de la inoculación. Todas las cepas fueron comparadas con una cepa control de *F. graminearum s.s.* de agresividad moderada. La severidad de la enfermedad fue calculada como el porcentaje total de espiguillas infectadas con respecto al número total.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación molecular

Se obtuvieron 148 aislados de las muestras colectadas en 53 localidades durante los ciclos de cultivo de 2013 y 2014 de tres regiones de la República Mexicana. Con base en la amplificación parcial del gen *EF 1- α* y tomando en cuenta los valores más altos de identidad obtenidos en las bases de datos *Fusarium* MLST (O'Donnell *et al.*, 2010) y *Fusarium* ID (Geiser *et al.*, 2004), fue posible identificar los 116 aislados a nivel de especie.

A nivel nacional están presentes las siguientes especies: *F. avenaceum* (FTSC) (n= 65), *F. boothii* (FGSC) (n= 32), *F. cerealis* (FSSC) (n= 4), *F. meridionale* (FGSC) (n=3), *F. poae* (n= 1) (FSSC), *F. incarnatum/equiseti* (FEISC) (n= 3), *F. oxysporum* (FOSC) (n=2), y dos especies del complejo de *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (*F. temperatum* (n= 4) y *F. andiyazi* (n= 1)) y *F. sambucinum* (FSSC) (n=1) (Figura 4).

De la región Mixteca se lograron obtener 26 aislados, de los cuales el 92% correspondían a *F. boothii* (FGSC). Así mismo, se identificó un aislado como *F. avenaceum* (FTSC) y una especie perteneciente al complejo de *Fusarium incarnatum/equiseti* (FIESC). Por tanto, la diversidad de *Fusarium* como agentes causales del tizón de la espiga de trigo en Oaxaca se limitó a tres especies (Figura 5A).

En la región del Bajío se lograron obtener 4 aislados. Al igual que en la región del sur, la especie más frecuente fue *F. boothii*. Con dos aislamientos agrupados dentro del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC): *F. temperatum* y *F. andiyazi* (Figura 5B).

En los valles altos de México se lograron obtener 86 aislados, siendo más frecuente *F. avenaceum* (74.5%), seguido por *F. boothii* (6%), *F. cerealis* (5%), *F. meridionale* (3.5%), *F. temperatum* (3.5%), *F. icarcinum/equiseti* (3.5%), *F. oxysporum* (2%), *F. sambucinum* (1%) y *F. poae* (1%) (Figura 5C).

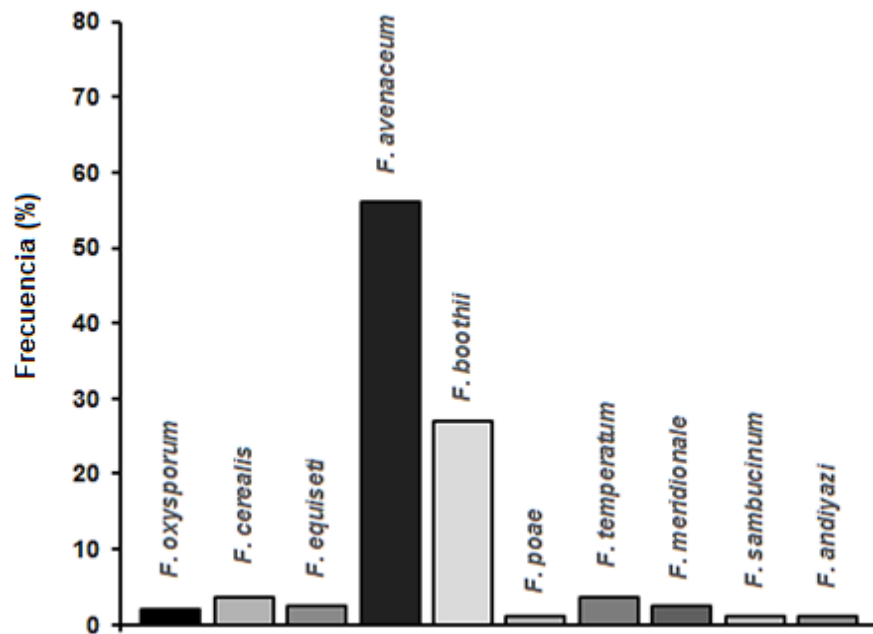


Figura 4. Distribución de frecuencias de las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en trigo en tres regiones de la República Mexicana aislados durante los ciclos de cultivo de 2013-2014

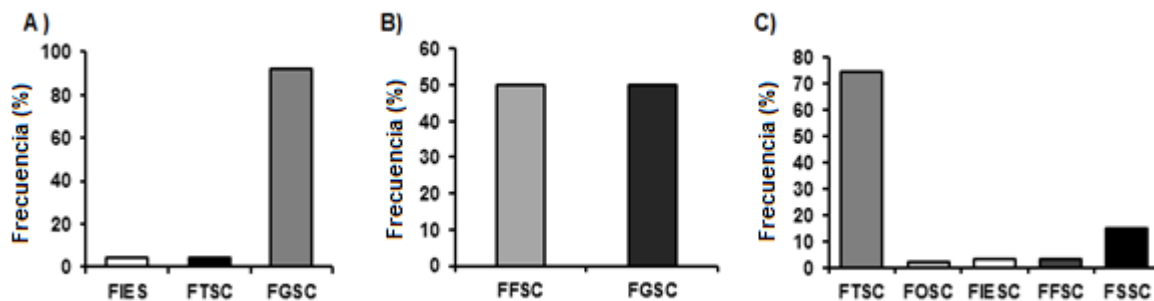


Figura 5. Distribución de frecuencias de las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en trigo en cada una de las regiones de estudio. A) Región Mixteca o del Sur. B) Región del Bajío. C) Valles Altos de México. Barras: FTSC: complejo de especies de *F. tricintum*. FOSC: complejo de especies de *F. oxysporum*, FEIS: complejo de especies de *F. incarnatum-equiseti*, FFSC: complejo de especies de *F. fujikuroi*, FSSC: complejo de especies de *F. sambucinum*, FGSC: complejo de especies *F. graminearum*.

Los agentes causales del tizón de la espiga en las tres regiones de la República Mexicana fueron identificados en 10 especies (agrupadas en 6 complejos): *F. andiyazi*, *F. avenaceum*, *F. boothii*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. meridionale*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. temperatum* que pertenecen a los complejos FTSC (*F. avenaceum*) (56%), FGSC (*F. boothii*, *F. meridionale*) (29.5%), FSSC (*F. cerealis*, *F. poae*, *F. sambucinum*) (5.5%), FFSC (*F. temperatum*, *F. andiyazi*) (4.5%), FIESC (*F. equiseti*) (2.5%), y FOOSC (*F. oxysporum*) (2%) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diversidad de especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en trigo en las tres regiones de la República Mexicana.

Región	Especie (EF-1 α)	Complejo de especies	% de incidencia por región
Mixteca	<i>F. boothii</i>	FGSC	92
	<i>F. avenaceum</i>	FTSC	4
	<i>F. equiseti</i>	FIESC	4
Bajío	<i>F. boothii</i>	FGSC	50
	<i>F. andiyazi</i>	FFSC	25
	<i>F. temperatum</i>	FFSC	25
Valles altos	<i>F. avenaceum</i>	FTSC	74.4
	<i>F. boothii</i>	FGSC	5.8
	<i>F. cerealis</i>	FGSC	4.6
	<i>F. meridionale</i>	FGSC	3.4
	<i>F. temperatum</i>	FFSC	3.4
	<i>F. equiseti</i>	FIESC	3.4
	<i>F. oxysporum</i>	FOOSC	2.3
	<i>F. sambucinum</i>	FSSC	1.1
<i>F. poae</i>	FSSC	1.1	

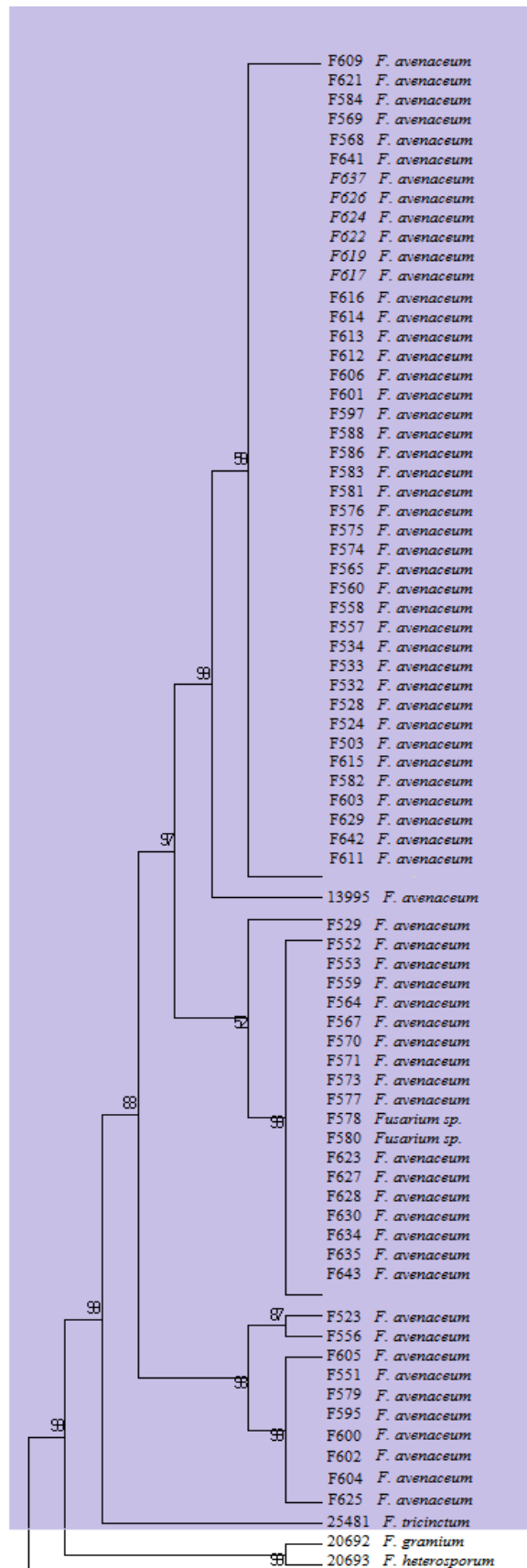
FGSC: complejo de especies de *F. graminearum*; FTSC: complejo de especies de *F. tricinctum*; FIESC: complejo de especies de *F. incarnatum-equiseti*; FFSC: complejo de especies de *Fusarium fujikuroi*; FOOSC: complejo de especies de *F. oxysporum*. FSSC: complejo de especies de *F. sambucinum*.

3.2 Análisis filogenético

La historia evolutiva de las especies del tizón de la espiga en trigo en México fue inferida a través del análisis de secuencias del gen *RPB2* utilizando el método de máxima verosimilitud-bootstraping (ML-BS). Del total de especies aisladas inicialmente, el análisis electroforético y de secuencias delimitó el número de unidades taxonómicas a 119 especies de *Fusarium* (Figura 5). Con la finalidad de obtener una filogenia consistente y eficiente, las

secuencias del gen *RPB2* de los aislados, fueron alineadas con secuencias de otras especies de *Fusarium* proporcionadas por el Dr. Kerry O'Donnell y Todd J. Ward. El árbol filogenético más parsimonioso presentó un 80% de clados o ramas soportados con valores mayores al 70% de bootstrap (Figura 6). La agrupación de las especies de *Fusarium* en complejos fue fuertemente soportada (>90% BS) en todos los casos. Los aislados de *F. avenaceum* de México junto con una secuencia de *F. tricinctum* fueron agrupados en un único clado (99% BS) corroborando el origen monofilético de estas especies (Figura 6.A). Los aislados de *F. temperatum* fueron agrupados junto a las especies *F. subglutinans* y *F. circinatum* (subclado Americano) (99% BS); mientras que *F. andiyazi* se agrupó junto a *F. verticillioides* (subclado Africano) (>90% BS) definiendo junto a las especies de *F. mangifera*, *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* (subclado Asiático) el FFSC, no obstante el soporte del clado agrupando a las ocho especies fue muy bajo (51% BS) (Figura 6.B). Esto puede estar relacionado a la falta de secuencias o unidades informativas que describan a los tres subclados descritos por O'Donnell *et al.* (2013) dentro del FFSC. Tanto los aislados de *F. oxysporum* como los de *F. equiseti*, fueron agrupados en dos únicos clados con valores de bootstrap mayores a 95% BS, corroborando su clasificación dentro de los grupos de especies FOFC y FEISC respectivamente (Figura 6.B).

El análisis de máxima parsimonia soportó (99% BS) la asociación de los taxones productores de tricotecenos tipo A y B dentro del complejo de especies de *F. sambucinum* (FSSC) (Figura 6.B). Los aislados de *F. poae* y *F. sambucinum*, ambas especies productoras de tricotecenos A/B conformaron un grupo monofilético con *F. sporotrichioides*, (especie productora de tricotecenos tipo A) ($\geq 70\%$ BS). Las especies *F. cerealis*, *F. meridionale* y *F. boothii* se agruparon con *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. asiaticum* y *F. graminearum* en un clado único cuyo estado de carácter único derivado (sinapomorfía) es la producción de tricotecenos tipo B. Dentro del complejo de FSSC, el clado de especies de *F. meridionale*, *F. boothii* y *F. asiaticum* constituyeron el complejo de especie de FGSC con un valor 84% BS (Figura 6.C). El clado conformado por las especies *F. phaseoli*, *F. ambrosium*, *F. falsiforme*, *F. solani* f sp. *pisi* y *Fusarium* sp. aislado 26790 enraizó el árbol con un valor de bootstrap del 99%.



FTSC

Figura 6. Análisis filogenético de los 116 aislados de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en trigo en tres regiones de la República Mexicana. La historia evolutiva de las especies fue inferida por el método de Máxima verosimilitud. El análisis se llevó a cabo en MEGA6 analizando 151 nucleótidos codificantes para el gen *RPB2*. Los valores de soporte se muestran en la base de los nodos **Sección A**. Agrupación de los aislados de *F. avenaceum* y *F. tricinatum* dentro del complejo de especies de *F. tricinatum* (FTSC) soportado con un valor de 99% BS.

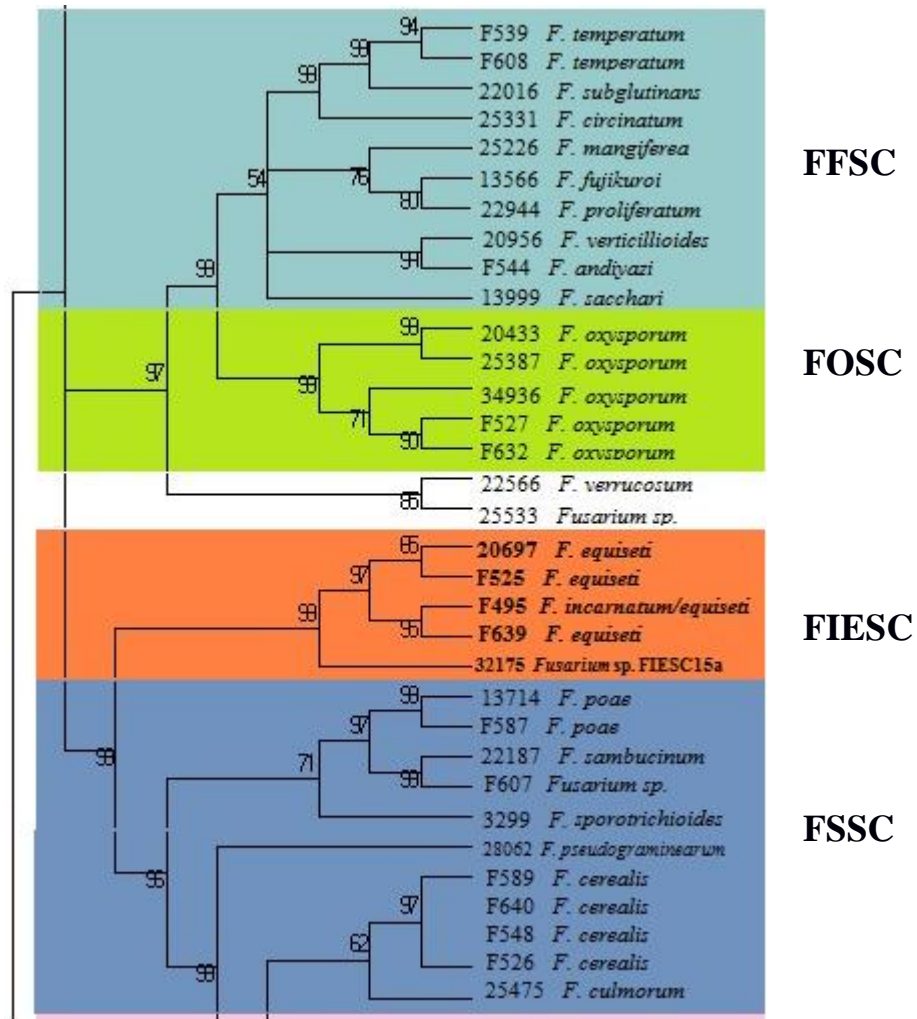


Figura 6. Sección B. Agrupación de las especies pertenecientes a los complejos de especies de *F. fujikuroi* (FFSC) (54% BS), *F. oxysporum* (FOOSC) (99% BS), *F. incarnatum/equiseti* (FIESC) (99% BS), *F. sambucinum* (FSSC) (96% BS).

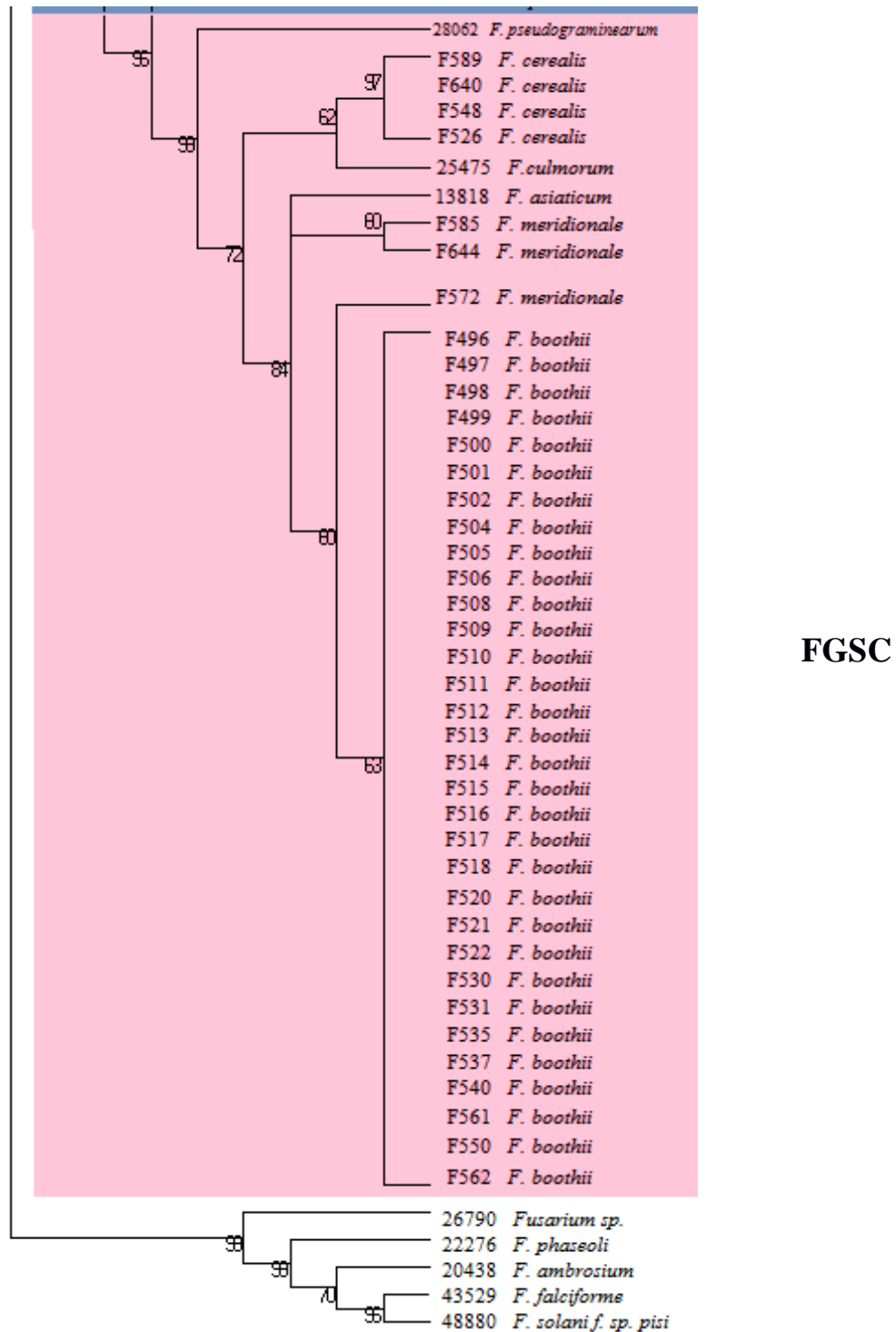


Figura 6. Sección B. Agrupación de las especies del complejo de *F. graminearum* (FGSC) (84% BS).

3.3 Caracterización morfológica

Identificación morfológica y cultural de especies del complejo de *F. fujikuroi* (FFSC)

F. andiyazi Marasas, Rheeder, Lamprecht, K. A. Zeller y J. F. Leslie produce después de siete días en medio PDA micelio flocoso a pulverulento, blanco que con el tiempo adquirió una tonalidad violeta o rosa pálido. Macroconidios no fueron observados. Microconidios hialinos, aseptados o con un solo septo, ovoides o clavados, de 1-3 x 1 μM . No se observó la presencia de macroconidios ni clamidosporas. Las características coinciden con las descritas por Leslie & Summerell (2006) para *F. andiyazi*.

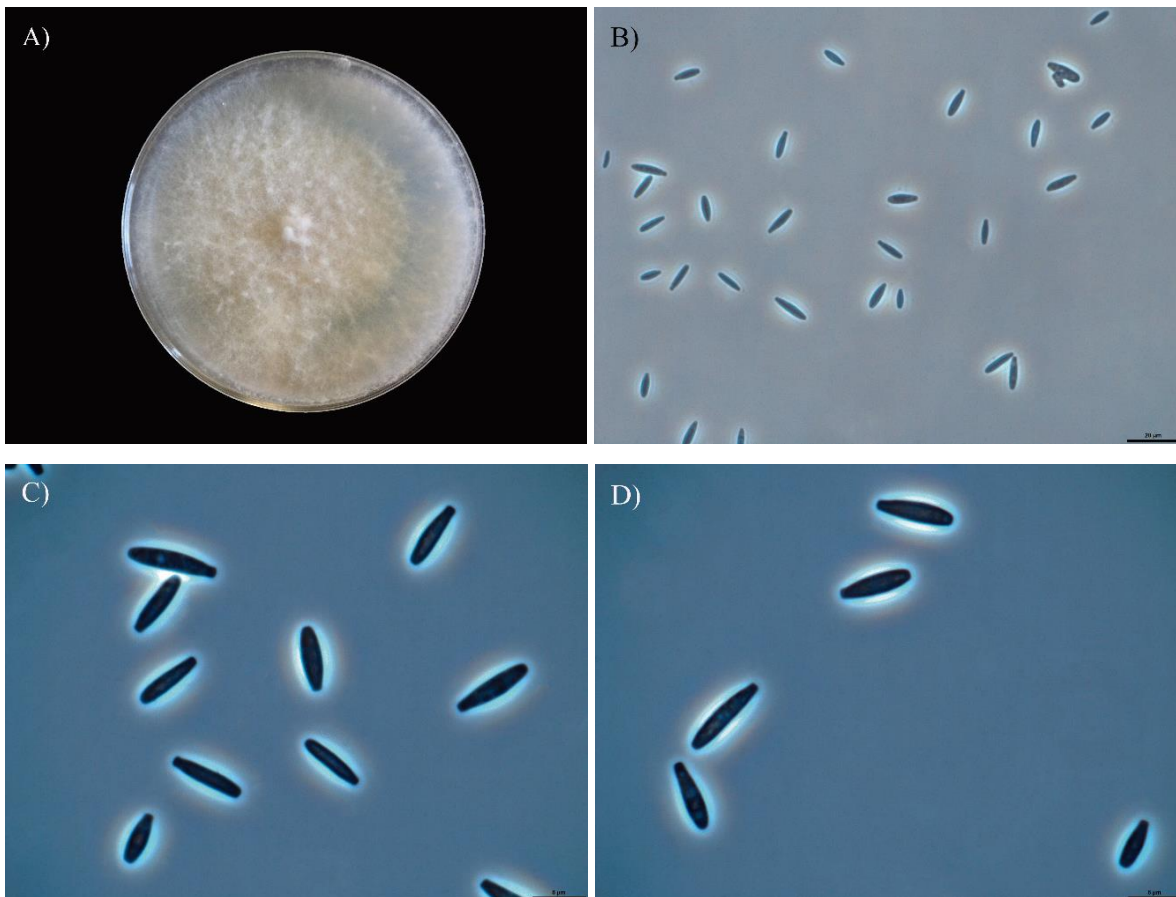


Figura 7. Caracterización cultural y morfológica de *F. andiyazi*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Microconidios producidos en medio SNA de colonias de 7 días de edad. Barra de escala de 20 μM . y 8 μM .

F. temperatum Scauflaire y F. Munaut produce colonias en PDA con micelio flocoso, inicialmente blanco que con el tiempo adquirió una tonalidad rosa y finalmente violeta. Macroconidios hialinos, con 4 a 5 septos, falcados, de 15- 20 x 2-3 μm . La célula apical en forma ganchuda y la célula basal en forma de pie. Microconidios hialinos, abundantes, aseptados, con 1-2 septos, elipsoides u ovalados cuando son aseptados o fusiformes cuando presentan septos, de 2-3 x 0.8-1 μm . Las características coinciden con las descritas por Scauflaire *et al.* (2012) para *F. temperatum*.

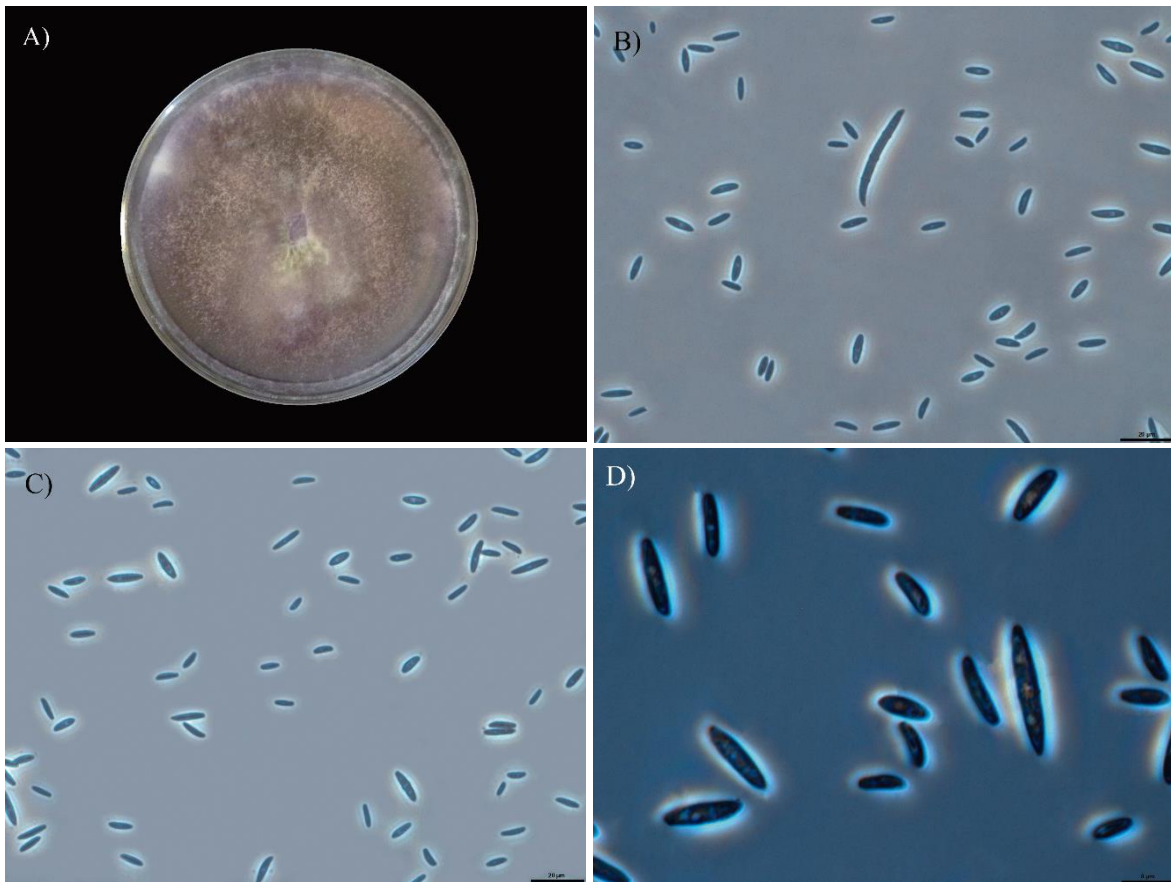


Figura 8. Caracterización cultural y morfológica de *F. temperatum*. A) Colonia en medio PDA. B) a D) Macro y microconidios producidos en medio SNA de colonias de 7 días de edad. Barra de escala de 20 μM . y 8 μM .

Identificación morfológica y cultural de especies del complejo de *F. graminearum* (FGSC)

F. boothii O'Donnell en medio PDA presentó un micelio aéreo abundante, inicialmente de color blanco hasta llegar a ser rosado. Posterior a los siete días, fue posible observar masas de esporas de color blanco o salmón distribuidas uniformemente en el medio. Macroconidios hialinos, con 4-7 septos, de 20-31 x 2 μm , con una curvatura pronunciada en el lado dorsal. La célula apical estrecha y la célula basal en forma de pie. No se observó la presencia de microconidios y clamidosporas. Las características coinciden con las descritas por Starkey *et al.* (2007) para *F. boothii*.

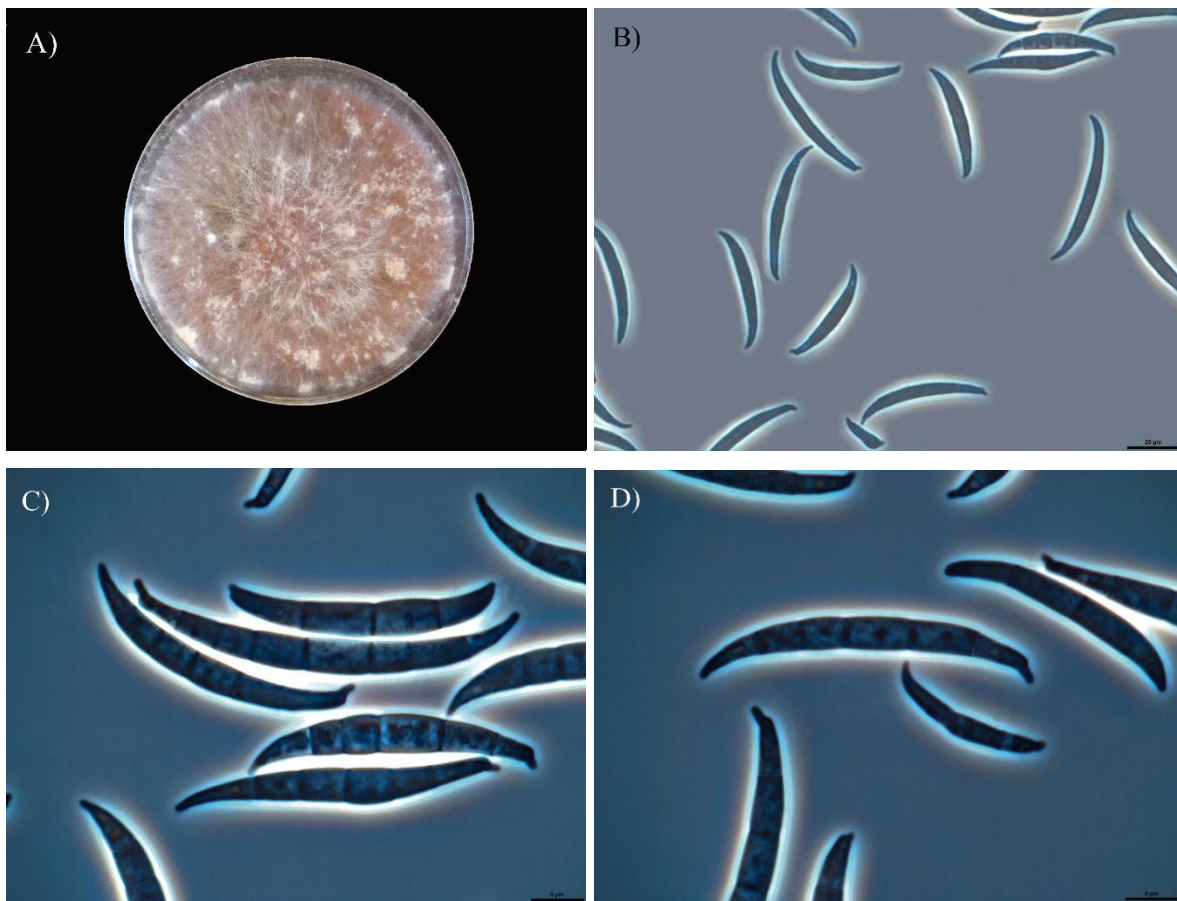


Figura 9. Caracterización cultural y morfológica de *F. boothii*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macroconidios producidos en medio SNA de colonias de 7 días de edad. Barra de escala de 20 μm , y 8 μm .

F. meridionale T. Aoki después de siete días en medio PDA desarrolla un micelio aéreo abundante, inicialmente amarillo hasta adquirir una tonalidad café intenso. El medio adquirió una pigmentación café oscura. Macroconidios hialinos, con 4 septos, de 27-46 x 3-4 μm , con una curvatura pronunciada en el lado dorsal. La célula apical estrecha y la célula basal en forma de pie. No se observó la presencia de microconidios y clamidosporas. Las características coinciden con las descritas por Starkey *et al.* (2007) para *F. meridionale*.

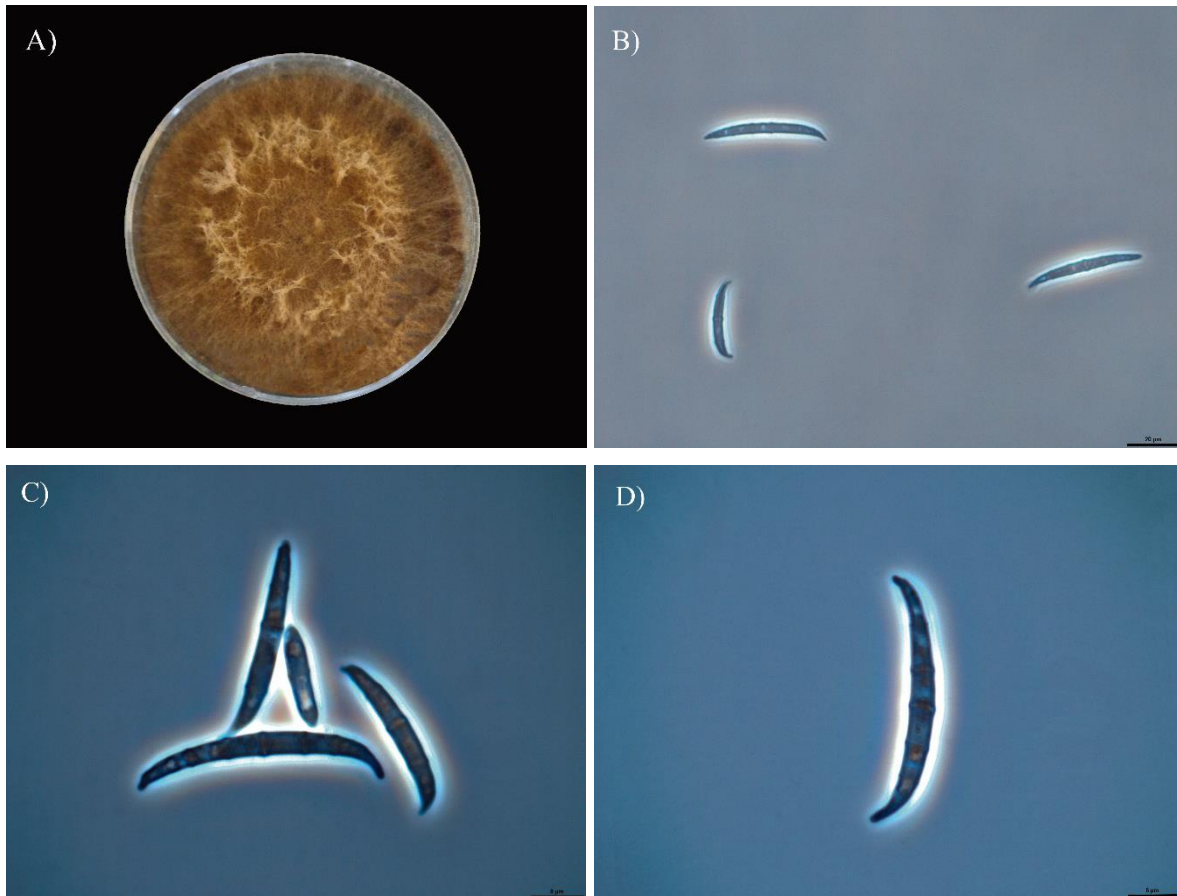


Figura 10. Caracterización cultural y morfológica de *F. meridionale*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μM . y 8 μM .

Identificación cultural y morfológica de especies del complejo de *F. incarnatum-equiseti* (FIESC)

F. equiseti (Corda) Saccardo después de siete días en medio PDA desarrollo micelio abundante de color blanco, que con el tiempo adquirió una tonalidad amarillenta hasta llegar a ser café. Macroconidios hialinos, con 4-5 septos, de 28-52 x 1-1.5 μm , delgados con una curvatura dorsiventral pronunciada. La célula apical en forma de látigo. La célula basal en forma de pie, con una prolongación terminal considerable. No se observaron clamidosporas. Las características coinciden con las descritas por Leslie & Summerell (2006) para *F. equiseti*.

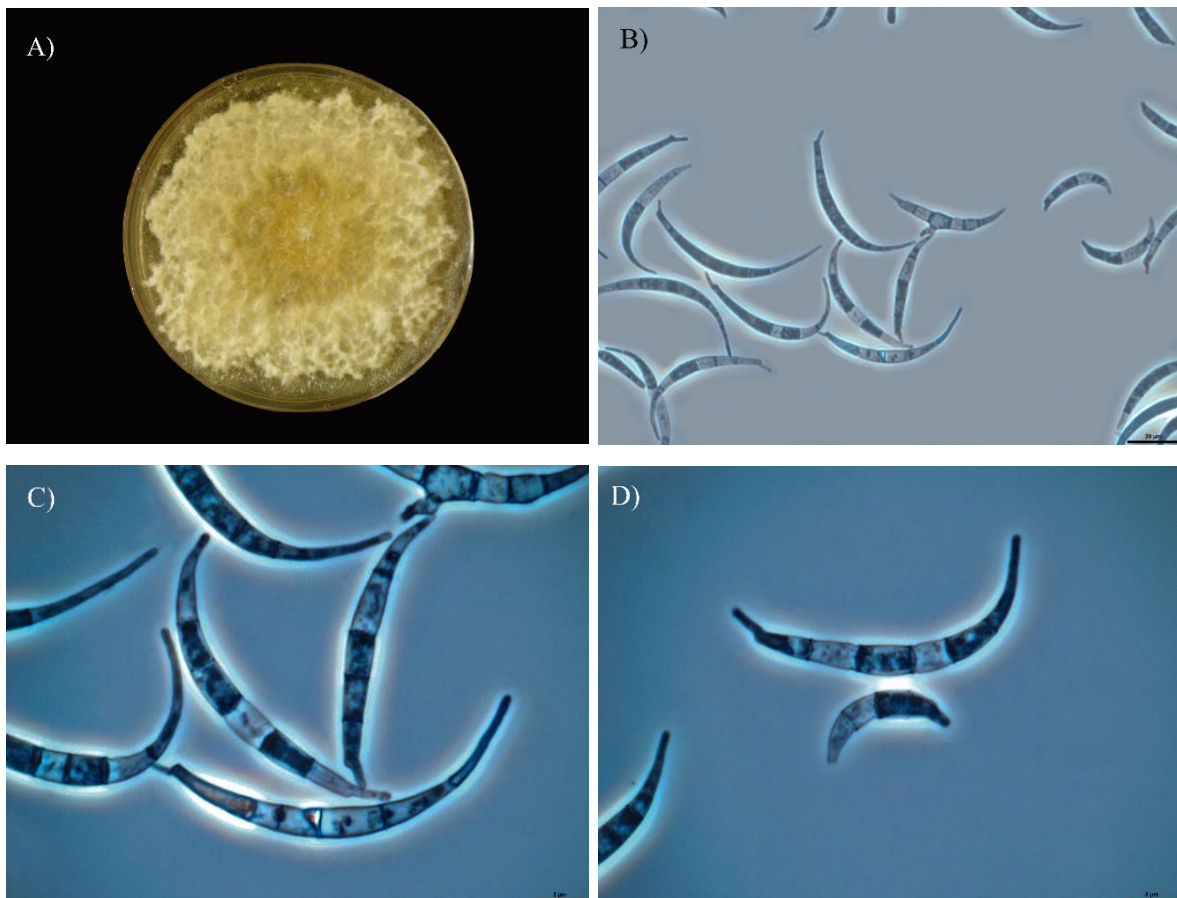


Figura 11. Caracterización cultural y morfológica de *F. equiseti*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μm . y 8 μm .

Identificación cultural y morfológica de especies del complejo de *F. sambucinum* (FSSC)

F. cerealis (Syn. *F. crookwellense*) Burgess, Nelson y Toussoun produce colonias en medio PDA con micelio amarillento que con el tiempo adquirió un color café con los bordes color marrón. La base del micelio roja completamente. Esporodochios fueron abundantes en medio PDA. Macroconidios de pared gruesa, delgados, en forma de ajuja, ligeramente angostos en la parte media, con 4-5 septos, de 20-54 x 2 μm . La célula apical ganchuda y la célula basal en forma de pie. No se observó la presencia de microconidios ni clamidosporas. Las características coinciden con las descritas por Leslie & Summerell (2006) para *F. cerealis*.

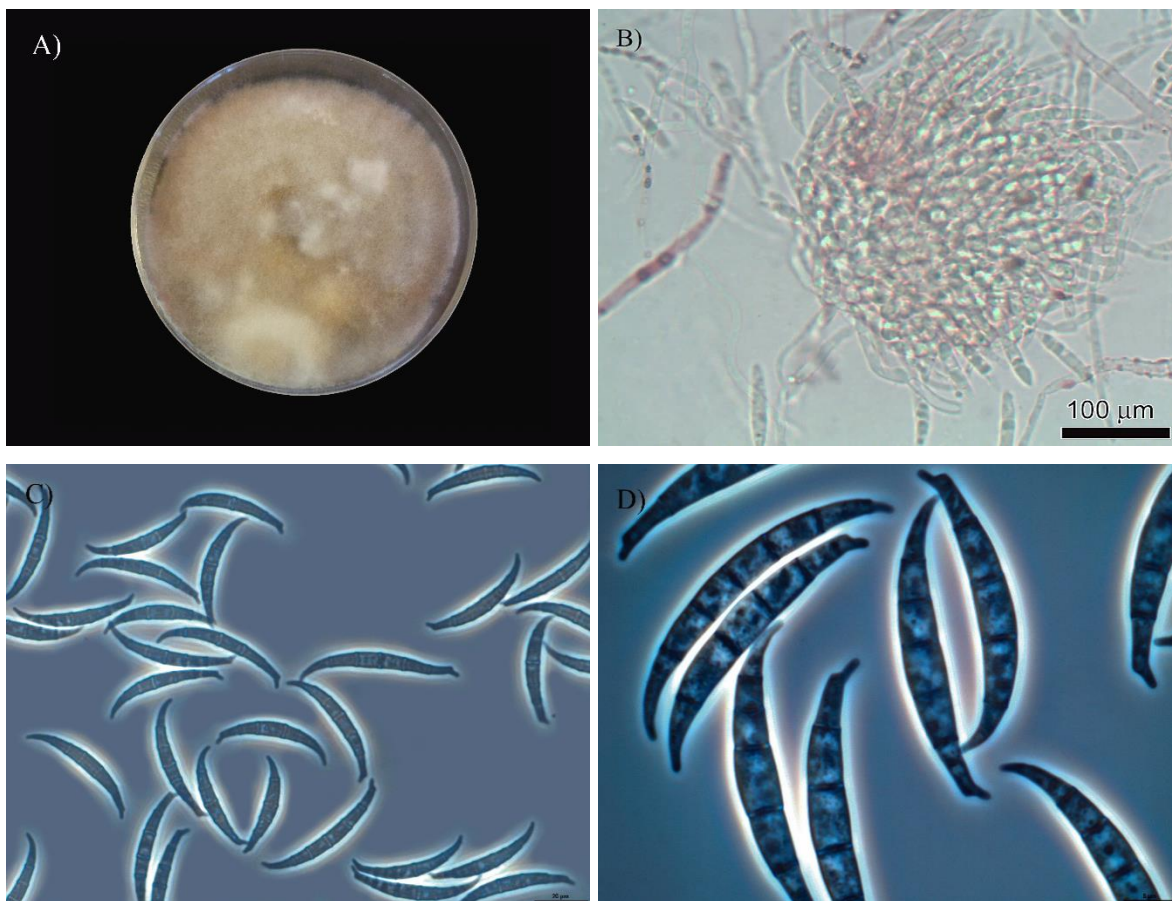


Figura 12. Caracterización cultural y morfológica de *F. cerealis*. A) Colonia en medio PDA. B) Esporodochios. Microscopía de luz C) y D) Microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μM . y 8 μM .

Identificación cultural y morfológica de especies del complejo de *F. sambucinum* (FSSC)

F. poae (Peck) Wollenweber en medio PDA después de siete días producen un micelio abundante, denso, de coloración blanca en un principio se tornó amarillento y finalmente café con el tiempo. Macroconidios hialinos, de pared gruesa, con tres septos generalmente, de 15-20 x 3 μm , ligeramente curvados o falcados, con la célula que limita el septo medio más anchas, la célula apical roma y la célula basal en forma de pie. Microconidios, hialinos, aseptados, globosos o napiformes, de 4-5 x 6-7 μm , abundantes. Las características coinciden con las descritas por Leslie & Summerell (2006) para *F. poae*.

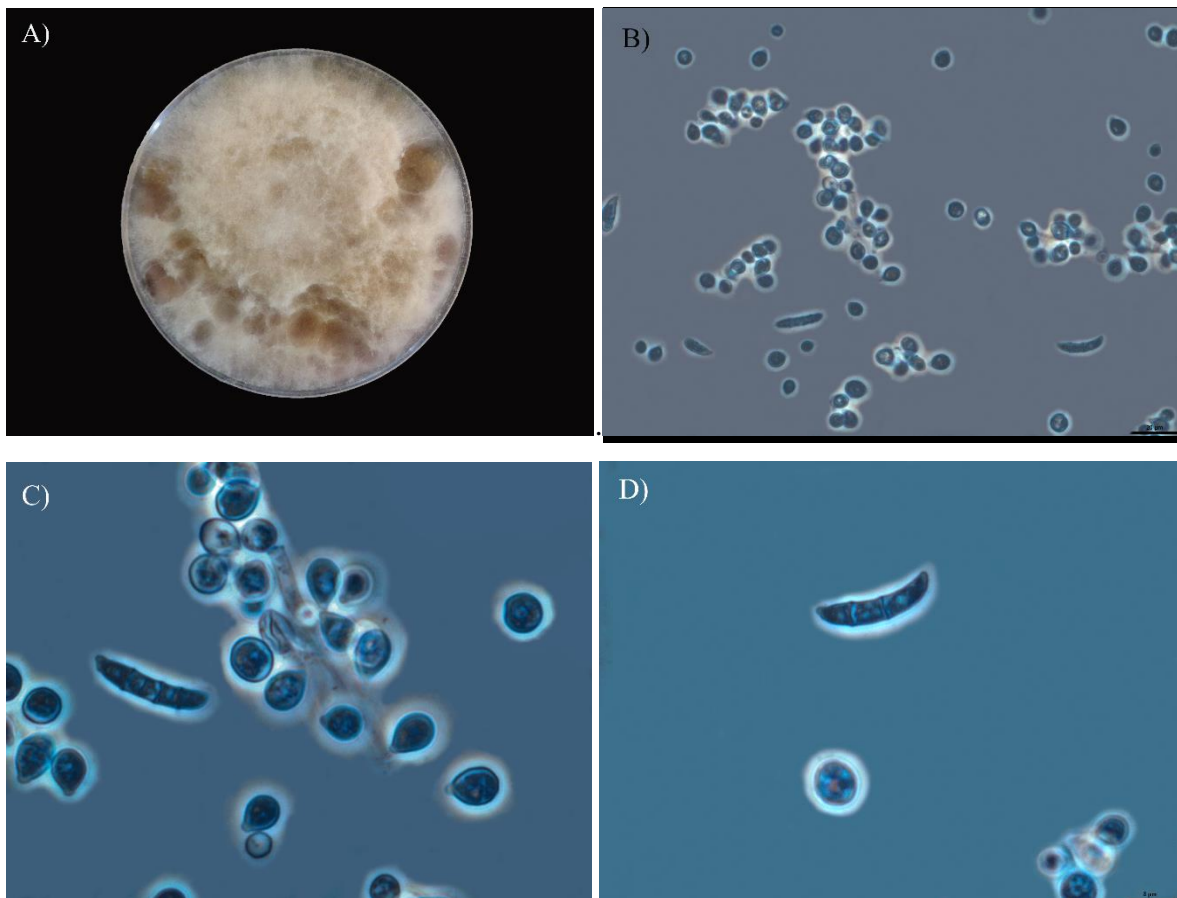


Figura 13. Caracterización cultural y morfológica de *F. poae*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macro y microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μM . y 8 μM .

Identificación cultural y morfológica de especies del complejo *F. sambucinum* (FSSC)

F. sambucinum Fückel después de siete días en medio PDA desarrollaron un micelio flocoso, blanco que con el tiempo adquirió una coloración amarilla o durazno. En el centro de la colonia fue evidente la masa de esporas de color durazno. Macroconidios falcados, hialinos, de 9-12 x 1 μm , con la célula basal papilada y la célula terminal en forma de pie, con tres a cinco septos. No se observó la presencia de microconidios y clamidosporas. Las características coinciden con las descritas por Leslie & Summerell (2006) para *F. sambucinum*.

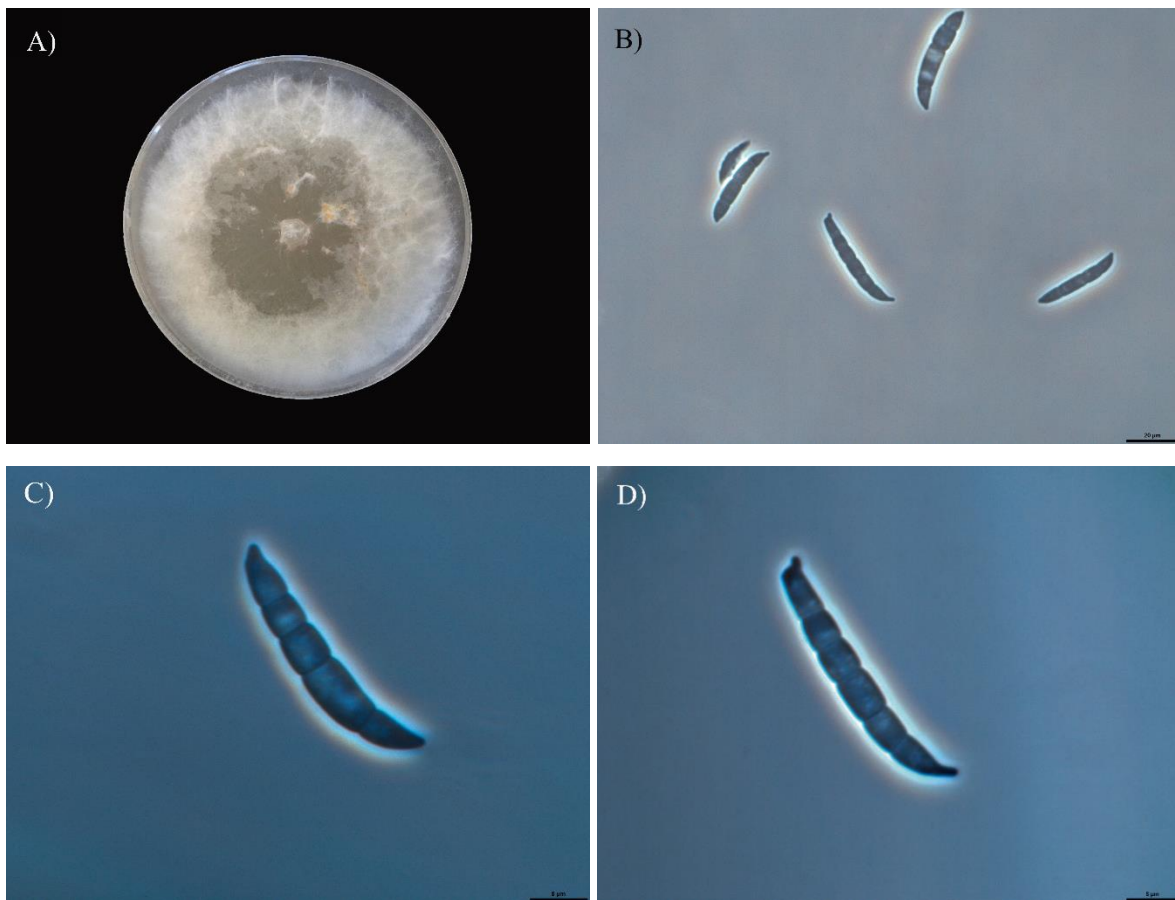


Figura 14. Caracterización cultural y morfológica de *F. sambucinum*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macroconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μM . y 8 μM .

Identificación cultural y morfológica de especies del complejo de *F. tricinctum* (FTSC)

F. avenaceum (Fries) Saccardo en PDA después de siete días desarrolla un micelio blanco amarillento con la base del micelio aéreo de color café marrón. Fue posible observar una amplia variación fenotípica de las colonias. Macroconidios abundantes, hialinos, en forma de ajuja, con cinco septos en promedio, de 50-91 x 5-7 μm , ligeramente curvados. La célula apical estrecha y la célula basal mellada, aunque en algunos conidios era evidente en forma de pie. No se observó la presencia de microconidios ni clamidosporas. Las características coinciden con las descritas por Leslie & Summerell (2006) para *F. avenaceum*.

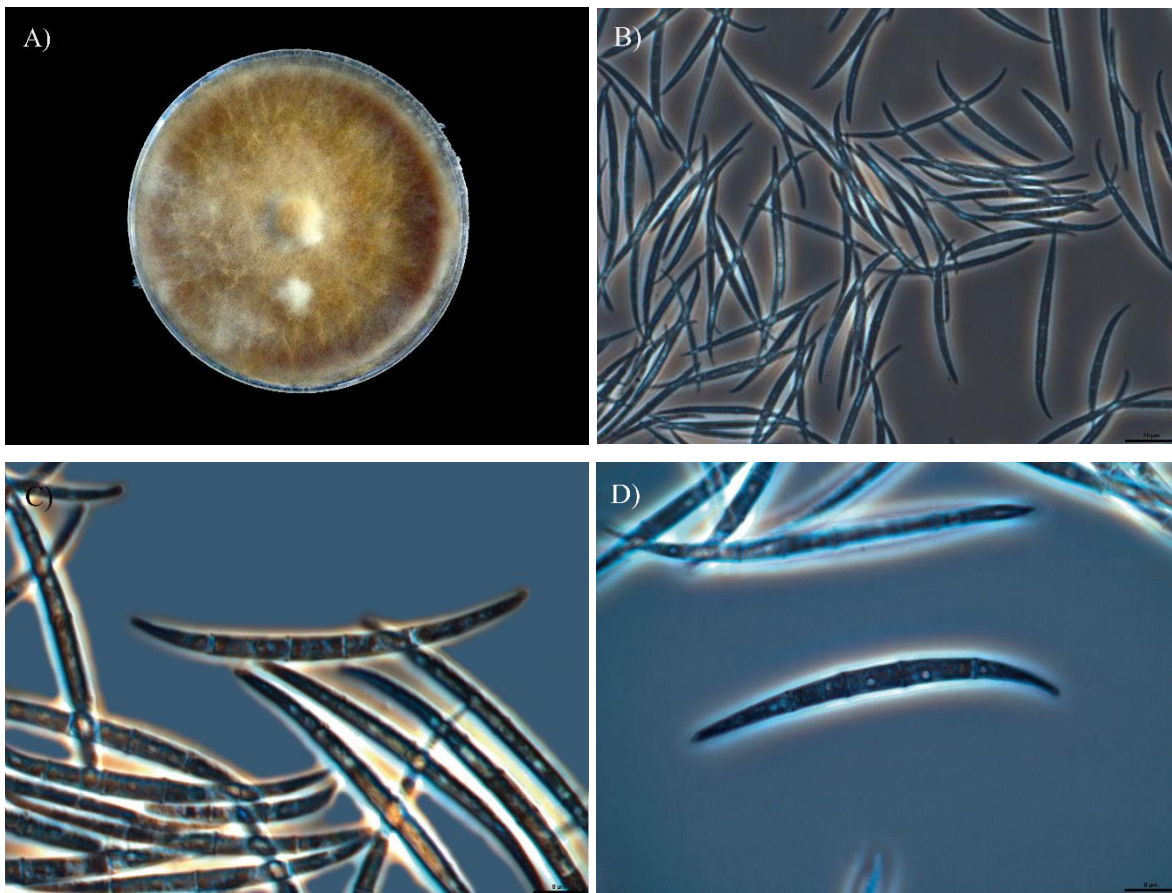


Figura 15. Caracterización cultural y morfológica de *F. avenaceum*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macroconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μM . y 8 μM .

Identificación cultural y morfológica de especies del complejo de *F. oxysporum* (FOSC)

F. oxysporum Schlechtendahl emend. Snyder y Hansen en medio PDA produce un micelio blanco, flocoso a pulverulento, abundante, y de color rosa a violeta pálido. El medio presentó una coloración violeta clara y/o rosa. Los macronidios fueron producidos en masas de esporas de color blanco. Macroconidios hialinos, con tres setos principalmente, de 23-40 x 2-4 μm , rectos a ligeramente curvados, la célula basal en forma de pie. Microconidios hialinos, ovalados o elípticos, aseptados, de 6-7 x 1 μm , abundantes en el micelio aéreo. Las características coinciden con las descritas por Leslie & Summerell (2006) para *F. oxysporum*.



Figura 16. Caracterización cultural y morfológica de *F. oxysporum*. A) Colonia en medio PDA. B a D) Macro y microconidios de colonias de 7 días de edad producidos en medio SNA. Barra de escala de 20 μM . y 8 μM .

3.4 Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad de los aislados del complejo de especies de *F. sambucinum* se comprobó en espigas de trigo de 45 días de edad. Los primeros síntomas de enfermedad fueron observados a los 3 primeros días post inoculación (dpi). Así mismo, fue posible observar diferencias significativas ($p < 0.001$) en la severidad de la enfermedad causada por las diferentes especies del FSSC. El análisis de medias de la severidad valorada en términos del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) ($p < 0.001$) y el porcentaje de floretes infectados ($p < 0.001$) evidenció diferencias significativas entre los grupos de especies de *F. meridionale*, *F. boothii*, *F. graminearum* y *F. cerealis* (A) en comparación a *F. poae*, *F. avenaceum* y *F. sambucinum* (B). Estos resultados corroboraron la patogenicidad de las especies del complejo de *F. sambucinum* recuperadas en las tres distintas regiones de México. Siendo las especies del FGSC y *F. cerealis* más virulentas al infectar una proporción mayor de espiguillas. De particular interés es el hecho de que los aislados de *F. boothii* (ABCPE= 215.40) y *F. meridionale* (ABCPE= 200.65) indujeron una severidad similar a *F. graminearum s.s* (193.10).

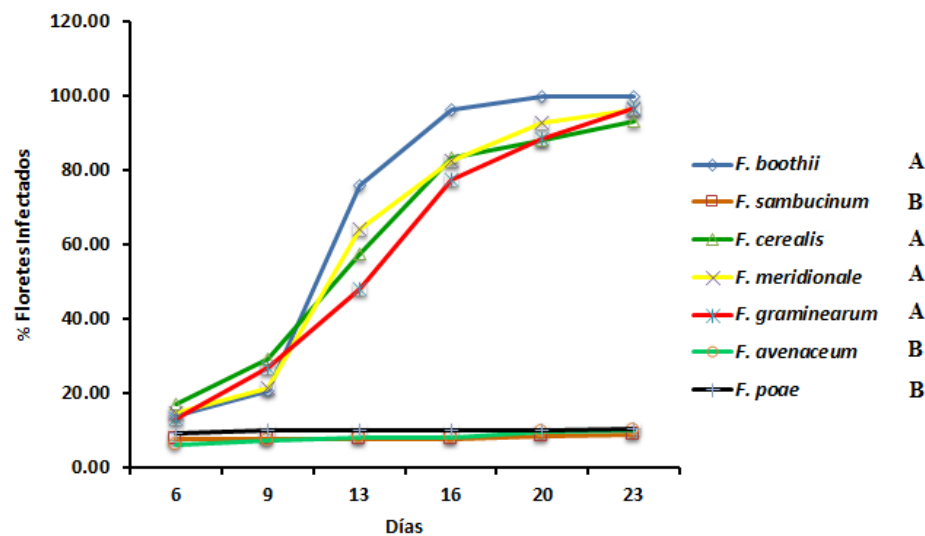


Figura 17. Porcentaje de floretes infectados de trigo con distintas especies de *Fusarium* aisladas de semilla de trigo infectadas en tres diferentes regiones de la República Mexicana.

4 DISCUSIÓN

Nuestro principal objetivo fue conocer la diversidad de especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en trigo en tres regiones de México. Con base en el análisis de secuencias parciales del gen *EF 1- α* , se determinó que la diversidad de agentes causales del tizón de la espiga en trigo está conformada por lo menos por 10 especies diferentes agrupadas en 6 complejos diferentes de especies de *Fusarium*. 56% de los aislados totales de las tres regiones de nuestro estudio fueron caracterizados como *F. avenaceum* (FTSC), siendo esta la especie más frecuente seguida por *F. boothii* (27%) (FGSC).

Una considerable diversidad de especies productoras de tricotecenos tipo B fue observada en las muestras de trigo colectadas durante los ciclos de 2013-2014 en México. Aislados de *F. boothii*, *F. cerealis* y *F. meridionale*, especies agrupadas en lo que se denomina el clado B (Aoki *et al.*, 2012), representaron casi el 30% de los aislados totales. Tanto *F. boothii* y *F. meridionale* corresponden a lo que se denomina el FGSC, especies que se caracterizan por producir tricotecenos tipo B como el 15-ADON y el NIV respectivamente (Starkey *et al.*, 2007). Esta frecuencia y tipo de tricoteceno nos ofrece un panorama del tipo de micotoxina más común afectando trigo, haciendo necesaria investigación futura en el área de la inocuidad de los alimentos.

De interés particular fue la identificación de *F. cerealis* (sinónimo *F. crookwellense* L.W. Burgess, P.E. Nelson et Toussoun) dentro de la población del tizón de la espiga en los Valles Altos de México. El papel de *F. cerealis* como uno de los agentes causales del tizón de la espiga en trigo y cebada ha sido preponderante durante los últimos años, sobre todo por su alta habilidad patogénica y su capacidad para producir nivalenol y zearalenona (Miller *et al.*, 1991). En el caso particular de México, el primer y único reporte oficial de la presencia de *F. cerealis* en trigo fue hecho en la región de Toluca, Estado de México y El tigre, Jalisco en 2012 (Malhipour *et al.*, 2012). Fuera de estas regiones, ningún reporte más ha sido realizado. Su distribución se relaciona frecuentemente a zonas templadas, aunque se ha encontrado en regiones de todo el mundo como Canadá (Amarasinghe *et al.*, 2015), Argentina (Castañares *et al.*, 2013), Rusia (Gagkaeva, 2010) y China (Zhang *et al.*, 2011). Anteriormente, había sido considerada ser una especie de menor importancia dentro de la población de especies del tizón de la espiga en cereales. Sin embargo, la habilidad toxigénica

hace de *F. cerealis* un candidato para monitoreo y control fitosanitario, debido a que el tipo de micotoxinas producidos por esta especie es mucho más nocivo para humanos en comparación a los producidas por otras especies como *F. avenaceum* y especies del complejo de *F. graminearum* (Visconti *et al.*, 1991)

Aunque en menor frecuencia, pero de considerable importancia fue la identificación de especies del complejo de *F. fujikuroi* (FFSC) representado por *F. temperatum* (3.5%) y *F. andiyazi* (1%) en las regiones del oeste y centro del país. El aislamiento y caracterización de *F. andiyazi* como agente causal del tizón de la espiga en trigo en este estudio es un caso particular. Este fue descrito por primera vez en el año 2001 infectando granos de sorgo en Etiopia, Nigeria, Sudáfrica y EUA (Marasas *et al.*, 2001); no obstante, hasta ahora no se ha relacionado como agente causal del tizón de la espiga en trigo. Así mismo, la descripción de *F. temperatum* dentro de la población de especies del tizón de la espiga en trigo también fue distintiva. A diferencia de *F. andiyazi*, el estudio y conocimiento de *F. temperatum* ha sido más reciente. Su aislamiento y descripción fue realizada en 2011 en muestras de maíz en Bélgica (Scauflaire *et al.*, 2012). Por lo que su patogenicidad en trigo ha sido un tema hasta ahora no estudiado y desconocido. Probablemente la infección en trigo por *F. temperatum* y *F. andiyazi* sea el resultado de la disposición de inóculo en el suelo, resultado de los ciclos de cultivo anteriores. Podría ser posible que en ausencia de los cultivos de maíz, ambas especies puedan ser oportunistas en la infección de trigo. Sin embargo, esta aseveración debe ser corroborada con estudios de patogenicidad en múltiples hospedantes.

Dentro de la diversidad de especies de *Fusarium*, se identificó un aislado de *F. poae* en la región de los Valles Altos de México. *F. poae* presenta una distribución amplia sobre todo en regiones de climas templados, ha sido aislado de un amplio rango de semillas, especialmente de gramíneas (Desjardins, 2006). Aunque es un patógeno relativamente débil en comparación a *F. graminearum* y *F. culmorum*, este produce una amplia variedad de micotoxinas, incluyendo tricotecenos tipo A y B (Stenglein, 2009). Así mismo, *F. poae* se ha categorizado por ser una especie auxiliar en el desarrollo de la enfermedad a través de la temprana colonización del hospedante, previo a otras como *F. culmorum* y *F. graminearum* (Stenglein, 2009). Durante la última década, la incidencia de *F. poae* afectando cereales ha incrementado drásticamente, siendo una de las especies principales infectando trigo en

diversos países de Europa (Bottalico & Perrone, 2002; Infantino *et al.*, 2012) Asia y Sudamérica (Stenglein, 2009). Es probable que la baja incidencia de *F. poae* en las muestras trabajadas en este estudio se relacione a su predominancia en partes externas del grano como las glumas (Stenglein, 2009). Dado que el análisis de la diversidad de especies realizado en este estudio fue hecho con semillas limpias o desnudas la recuperación de aislados de la superficie del grano fue poco probable, lo que aunado a su débil competencia contra otras especies responsables del tizón de la espiga como *F. avenaceum* y las especies del FGSC resultó en el bajo número de aislados recuperados.

Una proporción menor de aislados de *Fusarium* pertenecientes a los complejos de especies FOISC (2%) y FEISC (2.5 %) también conformó la población de especies de tizón de la espiga en México. Desde su descripción en 1824, *F. oxysporum* se ha sido categorizado como una de las especies fitopatógenas más agresivas y oportunistas, lo que aunado a su distribución cosmopolita lo ha llevado a ser considerado uno de los hongos fitopatógenos más peligrosos para la agricultura (Gordon & Martyn, 1997). Su papel como uno de los agentes causales del tizón de la espiga se reduce a un patógeno secundario, por lo que su aislamiento de granos de trigo infectados puede ser relacionado a su capacidad saprofita y de patógeno facultativo (Bottalico & Perrone, 2002). Al igual que las especies del FOISC, *F. equiseti* ha sido descrito como uno de los patógenos secundarios dentro de la población de especies causantes del tizón de la espiga en trigo (Bottalico & Perrone, 2002), siendo aislado en cereales de diversos países de Europa y Norte América (Xu & Nicholson, 2009). La importancia en la descripción y aislamiento de las especies de estos complejos reside en su habilidad de producir diversas toxinas como bauvericina, moniliformina, zearalenona y fumonisinas (Desjardins, 2006). Por lo tanto, el conocimiento del perfil micotoxigénico en trigo como en cualquier otro cereal, no debe ser deducido únicamente por el estudio de las especies dominantes, sino también por las especies oportunistas o secundarias que conforman la población de especies (Bottalico & Perrone, 2002).

La diversidad de *Fusarium* dentro de la población del tizón de la espiga en trigo puede ser explicada en términos de los distintos factores biológicos y ambientales requeridos por las especies (Osborne & Stein, 2007; Xu & Nicholson, 2009) La distribución y predominancia de una especie de *Fusarium* en una región está determinada por factores

climáticos (principalmente temperatura y humedad relativa), interacciones biológicas (competencia prioritariamente), el manejo del cultivo y el tipo de vegetación predominante principalmente (Doohan *et al.*, 2003). Esto puede explicar las diferencias observadas en la frecuencia de especies en las regiones analizadas en este estudio. En el caso particular del clima, los daños más severos en trigo y otros cereales causados por las especies del complejo de *F. graminearum*, han sido observados en regiones con climas cálidos o templados. Siendo *F. boothii* uno de los patógenos principales causantes del tizón de la espiga en trigo y pudrición de la mazorca en maíz en distintas regiones tropicales y subtropicales de Sudáfrica, Etiopía y México (Boutigny *et al.*, 2011; Malhipour *et al.*, 2012; O'Donnell *et al.*, 2008). Con base en el análisis de distintas variables climáticas Backhouse (2014) predijo la distribución de *F. boothii* en diversas regiones de África y México cuyas condiciones climáticas tienden a ser cálidas, con temperaturas casi constantes y una estacionalidad marcada en el periodo de lluvias. En el presente estudio, la mayor frecuencia de *F. boothii* como agente causal del tizón de la espiga se observó en los granos de la región sur o Mixteca. Región cuyo clima es cálido húmedo con una temperatura media anual de 25°C y una precipitación media de 1 550 mm (INEGI, 2015), caracterizada por ser una región donde la practica cultural de rotación trigo-maíz es frecuente.

En el caso particular de *F. avenaceum*, la mayoría de los aislados corresponden a las localidades de muestreo de los Valles Altos conformados por los estados de Tlaxcala, Puebla y Estado de México cuyas temperaturas medias promedio corresponde a 15°C. Estudios sobre la ecología y distribución de las especies del tizón han marcado la predominancia de *F. avenaceum* en regiones frías (Xu *et al.*, 2008; Xu & Nicholson, 2009) Al igual que las especies del complejo de *F. graminearum*, *F. avenaceum* es uno de los principales agentes causales del tizón de la espiga en todo el mundo. Aunque *F. avenaceum* no produce tricotecenos, tiene la capacidad de producir otras toxinas como la moniliformina y hexadepsipeptidos como las eniatinas y beauvericina (Desjardins, 2006; Logrieco *et al.*, 2002). Esta última en particular exhibe un efecto cardiocitotóxico en mamíferos y se cree es uno de las principales micotoxinas afectando cereales en Europa (Logrieco *et al.*, 2002). Aunque la agresividad de las especies del FGSC es por mucho mayor al de otras especies causantes del tizón de la espiga, el éxito de *F. avenaceum* como agente causal primario ya ha sido reportado anteriormente. Rossi *et al.* (2002) reportaron una mayor adecuación (éxito

reproductivo) *in vitro* de aislados de *F. avenaceum* en comparación a los de *F. graminearum* al producir una mayor cantidad de conidios. Así mismo, algunos aislados de *F. avenaceum* han mostrado ser más patogénicos comparados a otras especies de *Fusarium* causantes del tizón como *F. poae* (Vogelgsang *et al.*, 2008).

Las inferencias filogenéticas obtenidas a partir del análisis de la secuencia *RPB2*, permitieron corroborar el origen monofilético (98% ML-BS) de las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en México. La filogenia obtenida con las secuencias del *RPB2* ha provisto una perspectiva robusta de la historia evolutiva del género *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2013). Este análisis derivó en la agrupación de 119 especies aisladas en este estudio dentro de seis principales clados correspondientes a distintos complejos de *Fusarium* (Aoki *et al.*, 2014; O'Donnell *et al.*, 2013; Starkey *et al.*, 2007). El análisis de máxima verosimilitud dejó a ver que la población de especies causales del tizón de la espiga en México se encuentra compuesta por especies pertenecientes al FTSC (99% BS), FFSC (54% BS), FO SC (99% BS), FIESC (99% BS), FSSC (96% BS) y FGSC (60% ML-BS). La agrupación de los distintos linajes no sólo evidenció las relaciones ancestro-descendencia entre las distintas especies de *Fusarium*, sino también reveló la relación de caracteres derivados como la producción de un tipo determinado de micotoxinas. Ejemplo de ello fue la agrupación de las especies del FSSC, las cuales son capaces de producir tricotecenos tipo A, B o A/B.

La integración de las herramientas de identificación morfológica y molecular resultó en un entendimiento más fiable y completo sobre la diversidad de especies de *Fusarium* causales del tizón de la espiga en trigo. Aunque la caracterización morfológica de las especies corroboró la identidad de 6 de las 10 especies aisladas, los caracteres morfológicos para la detección e identificación de las especies utilizados en este estudio fue inadecuada para distinguir entre los aislados de *F. boothii*, *F. meridionale* y *F. cerealis*. Tales especies comparten caracteres morfológicos similares, tales como el ancho y la forma de la célula apical, así como el número promedio de septos (Leslie & Summerell, 2006). Por tanto, esto ratifica el hecho de que la caracterización morfológica puede llegar a ser indicativa, más no definitiva, particularmente en el caso de las especies agrupadas en el FGSC. Así mismo, una herramienta fundamental en la identificación y corroboración de las especies fue el análisis filogenético de la población, al agrupar las distintas especies en clados o ramas determinados.

5 CONCLUSIONES

EL tizón de la espiga en trigo en las regiones del Bajío, Mixteca y Valle Altos de México está asociado a 10 especies diferentes agrupadas en 6 complejos de especies de *Fusarium*: **FFSC** (*F. andiyazi*, *F. temperatum*), **FTSC** (*F. avenaceum*), **FGSC** (*F. boothii*, *F. meridionale*), **FSSC** (*F. cerealis*, *F. poae* y *F. sambucinum*), **FIESC** (*F. equiseti*) y **FOSC** (*F. oxysporum*).

Las especies causales del tizón de la espiga en trigo predominantes en las tres regiones de la República Mexicana pertenecen a los complejos FTSC (*F. avenaceum*) (56%) y FGSC (*F. boothii*, *F. meridionale*) (29.5%), con una proporción menor de las especies de los complejos FSSC (5.5%), FFSC (4.5%), FIESC (2.5%) y FOSC (2%).

Las inferencias filogenéticas obtenidas a partir del análisis de la secuencia *RPB2*, permitieron corroborar el origen monofilético de las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en México.

REFERENCIAS

- Alvarez, C. L., Somma, S., Proctor, R. H., Stea, G., Mulè, G., Logrieco, A. F., ... Moretti, A. (2011). Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins*, 3(10), 1294–309. doi:10.3390/toxins3101294
- Amarasinghe, C. C., Tittlemier, S. A., & Fernando, W. G. D. (2015). Nivalenol-producing *Fusarium cerealis* associated with fusarium head blight in winter wheat in Manitoba, Canada. *Plant Pathology*, 64(4), 988–995. doi:10.1111/ppa.12329
- Aoki, T., Ward, T., Kistler, H., & O'Donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Mycotoxins*, 62(2), 91–102. Retrieved from http://www.ncaur.usda.gov/SP2UserFiles/ad_hoc/36400500Publications/HCK/FGSC_review_pdf.pdf
- Aoki, Takayuki, O'Donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189–201. doi:10.1007/s10327-014-0509-3
- Audenaert, K., Broeck, R. Van, Bekaert, B., De Witte, F., Heremans, B., Messens, K., ... Haesaert, G. (2009). *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European journal of plant pathology*, 125, 445–458. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-009-9494-3>
- Backhouse, D. (2014). Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. *European Journal of Plant Pathology*, 139(1), 161–173. doi:10.1007/s10658-013-0374-5
- Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611–624. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1020635214971>
- Boutigny, A.-L., Ward, T. J., Ballois, N., Iancu, G., & Ioos, R. (2013). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1), 133–148. doi:10.1007/s10658-013-0312-6
- Boutigny, A.-L., Ward, T. J., Van Coller, G. J., Flett, B., Lamprecht, S. C., O'Donnell, K., & Viljoen, A. (2011). Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 48(9), 914–20. doi:10.1016/j.fgb.2011.05.005

- Castañares, E., Dinolfo, M. I., Moreno, M. V., Berón, C., & Stenglein, S. A. (2013). *Fusarium cerealis* Associated with Barley Seeds in Argentina. *Journal of Phytopathology*, *161*(7-8), 586–589. doi:10.1111/jph.12097
- Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology*. St Paul, MN, USA, APS Press.
- Dill-Macky, R., & Jones, R. (2000). The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant disease*, *84*, 71–76. Retrieved from <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2000.84.1.71>
- Doohan, F., Brennan, J., & Cooke, B. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, *109*(7), 755–768. doi:10.1023/A:1026090626994
- Gagkaeva, T. Y. (2010). Phytopathogenic fungus *Fusarium cerealis* in Russia. *Microbiology*, *79*(4), 553–560. doi:10.1134/S0026261710040211
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., ... O'donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(5/6), 473–479. doi:10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0
- Gilchrist-Saavedra, L.I. (2000). Problemas fitosanitarios de los cereales de grano pequeño en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *18*, 132-137
- Gordon, T. R., & Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology*, *35*, 111–28. doi:10.1146/annurev.phyto.35.1.111
- Goswami, S. R., & Kistler, H. C. (2004). Pathogen profile Heading for disaster : *Fusarium graminearum* on cereal crops, *Molecular Plant pathology*, *5*, 515–525. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00252.X
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, consultado el 16 de agosto del 2015 <http://www.inegi.org.mx>
- Infantino, A., Santori, A., & Shah, D. (2012). Community structure of the *Fusarium* complex on wheat seed in Italy. *European journal of plant pathology*, *(132)*, 499–510. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-011-9892-1>
- Ireta J. M. & Gilchrist S. (1994). Roña o tizón de la espiga del trigo. Informe especial de trigo No. 20. México, CIMMYT.

- Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., & Steinberg, C. (2012). Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(1), 97–111. doi:10.1007/s13593-012-0098-5
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (p. 388). United States of America: Blackwell Publishing.
- Logrieco, A., Rizzo, A., Ferracane, R., & Ritieni, A. (2002). Occurrence of Beauvericin and Enniatins in Wheat Affected by *Fusarium avenaceum* Head Blight. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 82–85. doi:10.1128/AEM.68.1.82-85.2002
- Malihipour, A., Gilbert, J., Piercey-Normore, M., & Cloutier, S. (2012). Molecular Phylogenetic Analysis, Trichothecene Chemotype Patterns, and Variation in Aggressiveness of *Fusarium* Isolates Causing Head Blight in Wheat. *Plant Disease*, 96(7), 1016–1025. doi:10.1094/PDIS-10-11-0866-RE
- Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P., Lamprecht, S. C., Zeller, K. A. & Leslie, F. L. (2001). *Fusarium andiyazi* sp. nov., a New Species from Sorghum. *Mycologia*, 93(6), 1203-1210
- McMullen, M, Jones, R., & Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant disease*, 81(12), 1340–1348. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/19981001829.html>
- McMullen, Marcia, Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., & Van Sanford, D. (2012). A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease*, 96(12), 1712–1728. doi:10.1094/PDIS-03-12-0291-FE
- Miller, D. J., Greenhalgh R., Wang, Y., & Lu, M. (1991). Trichothecene Chemotypes of Three *F.* Species. *Mycologia*. 83(2), 121-130.
- Neergaard, P. (1977). *Seed Pathology*. John Wiley & Sons, New York.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, I. H. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Giberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90(3), 465-493.
- O'Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. H., Brown, D. W., McCormick, S. P., Ward, T. J., ... Geiser, D. M. (2013). Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 52, 20–31. doi:10.1016/j.fgb./dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004
- O'Donnell, K., Sutton, D. a, Rinaldi, M. G., Sarver, B. a J., Balajee, S. A., Schroers, H.-J., ... Geiser, D. M. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying

- fusaria from human and animal infections. *Journal of clinical microbiology*, 48(10), 3708–18. doi:10.1128/JCM.00989-10
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Aberra, D., Kistler, H. C., Aoki, T., Orwig, N., ... Klemsdal, S. S. (2008). Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 45(11), 1514–22. doi:10.1016/j.fgb.2008.09.002
- Osborne, L. E., & Stein, J. M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International journal of food microbiology*, 119(1-2), 103–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.032
- Pan, D., Calero, N., Mionetto, A., & Bettucci, L. (2013). Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *International journal of food ...*, (162), 120–123. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513000123>
- Sampietro, D. A., Díaz, C. G., Gonzalez, V., Vattuone, M. A., Ploper, L. D., Catalan, C. A. N., & Ward, T. J. (2011). Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International journal of food microbiology*, 145(1), 359–64. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.021
- Scauflaire, J., Gourgue, M., Callebaut, A., & Munaut, F. (2012). *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. *European Journal of Plant Pathology*, 133(4), 911–922. doi:10.1007/s10658-012-9958-8
- Shen, C., Hu, Y., Sun, H., Li, W., Guo, J., & Chen, H. (2012). Geographic Distribution of Trichothecene Chemotypes of the *Fusarium graminearum* Species Complex in Major Winter Wheat Production Areas of China. *Plant Disease*, 96(8), 1172–1178. doi:10.1094/PDIS-11-11-0974-RE
- Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R., Kistler, H. C., Geiser, D. M., ... O'Donnell, K. (2007). Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 44(11), 1191–204. doi:10.1016/j.fgb.2007.03.001
- Stenglein, S. (2009). *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 25–36. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/41998571>
- Suga, H., Karugia, G. W., Ward, T., Gale, L. R., Tomimura, K., Nakajima, T., ... Hyakumachi, M. (2008). Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology*, 98(2), 159–66. doi:10.1094/PHYTO-98-2-0159

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tekauz, A., McCallum, B., & Gilbert, J. (2000). Review: Fusarium head blight of barley in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(1), 9–16. doi:10.1080/07060660009501156
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, a, Ward, T. J., & Vero, S. (2013). Regional differences in species composition and toxigenic potential among Fusarium head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International journal of food microbiology*, 166(1), 135–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.029
- Visconti, A., Minervini, F., Lucivero, G., & Gambatesa, V. (1991). Cytotoxic and immunotoxic effects of Fusarium mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia*, 113(3), 181–186. doi:10.1007/BF00436128
- Vogelgsang, S., Sulyok, M., Hecker, A., Jenny, E., Krska, R., Schuhmacher, R., & Forrer, H.-R. (2008). Toxigenicity and pathogenicity of Fusarium poae and Fusarium avenaceum on wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 122(2), 265–276. doi:10.1007/s10658-008-9279-0
- Warham, E.J, Butler, L.D. & Sutton, R.C. (1997). Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. México, DF. CIMMYT. 84 pp.
- Xu, X., & Nicholson, P. (2009). Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual review of phytopathology*, 47, 83–103. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081737
- Xu, X.-M., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Cooke, B. M., Doohan, F. M., ... Edwards, S. G. (2008). Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*, 98(1), 69–78. doi:10.1094/PHYTO-98-1-0069
- Zhang H, Chen WQ, Xu J, Xu JS, Feng J. (2011) First report of F. cerealis causing F. head blight on barley in China. *Plant Dis* 95:774
- Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Xu, J., ... Feng, J. (2012). Population analysis of the Fusarium graminearum species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PloS one*, 7(2), e31722. doi:10.1371/journal.pone.0031722

CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN DE QUIMIOTIPOS DE TRICOTECENOS DE LAS ESPECIES DEL CLADO B CAUSANTES DEL TIZÓN DE LA ESPIGA EN TRIGO EN TRES REGIONES DE MÉXICO

RESUMEN

El tizón de la espiga es una de las principales enfermedades del trigo en todo el mundo. Esta enfermedad no sólo afecta la calidad y cantidad del grano, sino también lo contamina con micotoxinas. Todas las especies de *Fusarium* causales del tizón tienen la capacidad de producir al menos 10 tipos de micotoxinas, de las cuales los tricotecenos son los más frecuentes. En humanos, la ingestión de granos contaminados con tricotecenos provoca náuseas, vómito, anorexia y convulsiones. A pesar de su importancia, el conocimiento epidemiológico y toxicológico de los tricotecenos en México ha sido un tema de poco estudio. El objetivo del presente estudio fue determinar el quimiotipo de tricotecenos tipo B producido por las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga de trigo en tres regiones de la República Mexicana. De los 116 aislados de *Fusarium* identificados previamente se determinó el quimiotipo de aquellas especies pertenecientes al FSSC mediante el ensayo de genotipificación multilocus (MLGT) utilizando sondas específicas para los genes *RED*, *MAT EF1- α* , *TRI101*, *TRI12* y *TRI3*. Cuarenta y dos especies pertenecientes al clado B fueron identificadas. 82% de los aislados presentaron un quimiotipo 15-ADON y el 17% NIV. Ningún aislamiento presentó el quimiotipo 3ADON. Este estudio provee el primer registro de los quimiotipos de tricotecenos tipo B producidos por *Fusarium* en México.

Palabras clave: *Fusarium*, tricotecenos, 15-ADON, NIV, trigo.

CHAPTER II. DETERMINATION OF TRICHOHECENE CHEMOTYPE OF CLADE B *Fusarium* SPECIES CAUSING FUSARIUM HEAD BLIGHT OF WHEAT IN THREE REGIONS OF MEXICO

ABSTRACT

Fusarium head blight (FHB) is a destructive disease of wheat worldwide. FHB consequences are not only related to reduction in crop quality, this can result in contamination of grain with mycotoxins. A wide variety of mycotoxins are produced by *Fusarium*, being trichothecenes the most frequent. In humans ingestion of trichothecene infected kernels produces sickness, vomit, anorexia and seizures. In spite of this, the epidemiological and toxicological knowledge about trichothecenes in Mexico is poor. The goal of this study was to determine the trichothecene chemotype of *Fusarium* species causing FHB in three regions of Mexico. Population of trichothecene-producing *Fusarium* isolates belonging the B clade of the *F. sambucinum* species complex (FSSC) was identified previously. *Multilocus Genotyping Test* (MLGT) was used to determine the trichothecene chemotype through specific probes to *RED*, *MAT*, *TEF-1*, *TRI101*, *TRI12* y *TRI3* genes. The 15 ADON chemotype was predominant (82%) followed by NIV (17%). No isolate was identified as 3ADON producer. This study provides overview about the distribution of trichothecene-producing *Fusarium* species and their chemotype in Mexico.

Key words: *Fusarium*, trichothecenes, 15-ADON, NIV, wheat.

1. INTRODUCCIÓN

A partir de la década de los 90s, la contaminación de los cereales con micotoxinas ha sido uno de los temas de mayor interés en la producción e inocuidad de los alimentos (Champeil *et al.*, 2004). Las micotoxinas son compuestos derivados del metabolismo secundario producidos por diversos géneros y/o especies de hongos que tienen efectos tóxicos en plantas y animales (Desjardins, 2006). Se han llegado a conocer más de 300 tipos de micotoxinas, de los cuales aproximadamente una docena son de particular interés (Bennett & Klich, 2003).

El género *Fusarium*, es capaz de producir 3 de las toxinas más importantes en la industria agroalimentaria (D'Mello *et al.*, 1999). De estas, los tricotecenos son el tipo de toxinas más frecuentes en cereales de grano pequeño, asociadas directamente a toxicosis crónicas y mortales en humanos y animales (Desjardins, 2006). Cerca de 150 compuestos descritos como tricotecenos han sido identificados, incluyendo al deoxinivalenol (DON) (Woloshuk & Shim, 2013). El deoxinivalenol o vomitoxina, es una de los tricotecenos mejor conocidos y más comunes contaminando cereales. Su ocurrencia en alimentos derivados como harinas y pastas representa más del 90% del número total de muestras (Sobrova *et al.*, 2010). Algunos de los efectos en la salud humana provocados por la ingestión de alimentos contaminados con DON son náuseas, diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, escalofríos y fiebre (Wannemacher & Wiener, 1997). En el caso particular de humanos, una concentración de 300-800 µg/kg de DON es suficiente para inducir un efecto nocivo en la salud (Bottalico, 1998)

Las especies agrupadas en el FGSC causantes del tizón de la espiga en todo el mundo, son capaces de producir NIV, DON y sus derivados acetilados 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) o 15-deoxinivalenol (15-ADON) (Miller *et al.*, 1991). Aunque estos tres quimiotipos no son linaje-específicos, han sido mantenidos por múltiples eventos de especiación por selección balanceadora, lo que posiblemente indica que su producción es adaptativa (Ward *et al.*, 2002). Dentro del contexto biológico y evolutivo, su papel en la infección de trigo ha sido relacionado a factores de virulencia (Desjardins *et al.*, 2006; Goswami & Kistler, 2004) y compuestos producidos en presencia de otras especies de *Fusarium* (Xu *et al.*, 2007).

El monitoreo y control de las especies productoras de tricotecenos, ha sido uno de los temas de mayor interés en los países de América Latina. En el caso particular de México, el estatus epidemiológico y toxicológico de los tricotecenos ha sido escaso. En 2012, Malhipour *et al.* reportaron por vez primera el quimiotipo de tricotecenos producidos por algunas de las especies de *Fusarium* causando el tizón de la espiga en la región del Bajío (específicamente los estados de Jalisco y Michoacán) y estado de México, determinando la presencia de 15-ADON y NIV en semillas de trigo. Posteriormente el estudio de las especies productoras de tricotecenos ha sido inexistente. El conocimiento sobre la producción de tricotecenos por las especies del complejo de especies de *F. sambucinum* (FSSC) es necesario para delimitar la distribución de determinado grupo de micotoxinas. Esta información podría soportar programas de cuarentena con el objetivo de prevenir la introducción de especies no presentes en México o la movilización de granos a países vecinos. Con base en estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue determinar el quimiotipo de tricotecenos tipo B producidos por las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga de trigo en tres regiones de México.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Origen y aislamiento de cepas de *Fusarium*

Ciento cuarenta y ocho aislamientos de *Fusarium* fueron utilizados para este estudio. Los aislamientos fueron confirmados como agentes causales del tizón de la espiga en las regiones de Mixteca, del Bajío y los Valles Altos de México (capítulo 1).

La caracterización molecular y el análisis filogenético de las especies permitieron identificar a 42 especies dentro del clado B, caracterizadas por su habilidad de producción de tricotecenos como NIV y DON. Estos aislados correspondieron a las especies: *F. boothii* (n=32), *F. cerealis* (n= 4) y *F. meridionale* (n=3). Con la finalidad de corroborar dicha aseveración, la capacidad de producción de tricotecenos fue evaluada a través del MLGT.

2.2 Determinación de quimiotipos de tricotecenos a partir del ensayo de genotipificación multilocus (MLGT)

Para determinar el quimiotipo de tricotecenos producidos por cada una de las especies del clado B, se realizó el ensayo de genotipificación multilocus (MLGT) reportado por Ward *et al.*, (2008). El ensayo de genotipificación multilocus consta de tres fases. La primera de ellas es una PCR múltiple para la cual se utilizan oligonucleótidos específicos a los genes constitutivos reductasa (*RED*), mating type (*MAT*), *EF1- α* y tres genes involucrados en la biosíntesis de tricotecenos (*TRI101*, *TRI12*, *TRI3*). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 10 μ l con 10X Buffer de reacción (Invitrogen), 2 mM MgSO₄ [50 mM], 0.2mM de cada dNTP [10 μ M], 0.2mM de cada oligonucleótido, 0.5 U de enzima Platinum Taq High Fidelity polimerasa (Invitrogen) y aproximadamente 100 ng DNA genómico. Se utilizó una mezcla de siete oligonucleótidos diferentes cuyos productos de amplificación variaban de 450 pb a 1 kb (Anexo 2). Las condiciones de amplificación fueron: 96°C por 1:30 min fase de desnaturalización, con 35 ciclos a 94°C por 30 s, 53°C por 30 s, 68°C por 1:30 min.

La amplificación de los productos se verificó en un gel de agarosa al 1%. Aquellas reacciones cuyos amplicones eran del tamaño esperado fueron purificadas con una membrana de filtración Millipore MultiScreen-PCR₉₆ (Millipore). Posteriormente se prosiguió con la segunda etapa del MLGT: la extensión primer-alelo específica (*Allele Specific Primer Extension ASPE*).

La extensión primer-alelo específica (ASPE) tiene como objetivo identificar los polimorfismos de nucleótido simple (SNP's por sus siglas en inglés) dentro de aquellas regiones génicas amplificadas previamente. Este método utiliza oligonucleótidos alelo-específicos cuyo extremo terminal 3' es complementario a un SNP, Así mismo, cada primer también tiene ligado en el extremo 5' una secuencia de 24 pares de bases (tag) que permite que el producto de la extensión hibride con las microesferas marcadas fluorescentemente debido a que estas tienen acoplada una secuencia complementaria (anti-tag). Hasta ahora, se se disponen de 52 sondas específicas para identificar los tres tipos diferentes de tricotecenos (15 ADON, 3-ADON y NIV) y 20 especies agrupadas en el clado B (Anexo) (Ward *et al.*,

2008). Para dicha extensión se utilizan los desoxinucleótidos GTP, ATP, TTP y el desoxinucleótido CTP unido a biotina. La extensión o síntesis de la nueva cadena de ADN resulta en la incorporación del CTP marcado el cual es necesario para la detección de las secuencias. La reacción ASPE se llevó a cabo en un volumen total de 20 μl con 10X Buffer de reacción (Invitrogen), 2 mM de MgCl_2 [50 mM], 5 μM de dNTP's (-dCTP) [100 μM], 5 μM de Biotin-dCTP (Invitrogen) [400 μM], 500 nM de cada sonda, 0.75 U de Platinum® Genotype *Tsp*Taq polimerasa (Invitrogen) y 15 μl de los productos de la PCR múltiple.

La detección de los productos de extensión biotinilados se logró a través de su hibridación con microesferas fluorescentes. Para la reacción de hibridación se utilizó un concentración de 48.0 microesferas/ μl y un total de 1000 microesferas por set. El volumen fue calculado por dividir 1000 microesferas entre 48.0/ μl multiplicado por el número de muestras. El tubo conteniendo la mezcla de las 52 microesferas fue agitado en vortex durante un minuto y centrifugado a 13 000 g durante cinco minutos. Se removió el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con amortiguador 1X TE (7.2 μl 1X TE buffer/reacción) (1 M Tris y 0.5M EDTA, pH 8).

La placa de hibridación se preparó con 10 μl de agua, 5 μl de productos de la reacción ASPE, 7.2 μl de microesferas resuspendidas en amortiguador TE y 10 μl de buffer de hibridación 1.5X TMAC (Cloruro de metilamonio). Previamente la solución de microesferas fue mezclada por inversión, sonificada por 60 segundos y agitada en vortex para asegurar la concentración uniforme de microesferas en la solución. La placa de hibridación se colocó a 96°C por 1:30 min y 45°C por 45 min. Posteriormente, la placa fue centrifugada por 2 min a 2250 g y colocada sobre la placa magnética Luminex durante 4 minutos. Se removió el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 75 μl de buffer 1X TMAC durante 4 minutos. La placa de hibridación se removió de la placa magnética y se realizó un último lavado con 75 μl 1X TMAC contiendo 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SAPE, resuspendiendo por pipeteo cada una de las muestras. La placa fue colocada en el instrumento Luminex 100 (Luminex Corporation) a 45°C por 15 min. Finalmente la hibridación entre los productos biotinilados y las microesferas se detectó por citometría de flujo en el Luminex 100 (Luminex Corporation).

3. RESULTADOS

Para determinar el quimiotipo de tricotecenos producido por las especies del FSSC causantes del tizón de la espiga en las regiones de Mixteca, del Bajío y los Valles Altos de México, cada uno de los aislados fue sometido al ensayo de genotipificación multilocus (MLGT). En su primera etapa, se realizó la amplificación múltiple de los genes *RED*, *MAT*, *EF1- α* , *TRII01*, *TRII2* y *TRI3* de los 148 aislamientos. El análisis de los amplicones por electroforesis identificó a 39 aislamientos como productores de tricotecenos, todos ellos anteriormente identificados como miembros del clado B.

A través del ensayo de MLGT, se identificaron 32 de 39 aislamientos (82%) como productores de 15-ADON y solo 7 aislamientos como productoras de NIV (18%) (Figura 2). Debido al diseño especie-específico de las sondas, la identificación directa de las especies de *Fusarium* pudo ser realizada, corroborando los resultados de identidad determinados con la secuencia parcial del *EF1- α* . Todos los aislados productores de 15-ADON fueron identificados como *F. boothii* (n=32), dentro de las tres diferentes regiones; mientras que los aislados productores de NIV fueron identificados como *F. meridionale* (n=3) y *F. cerealis* (n=4).

El quimiotipo 15-ADON fue observado en cinco estados de la República Mexicana, siendo el quimiotipo más frecuente en dos de las tres regiones muestreadas durante los ciclos de cultivo de 2013-2014. Sin embargo, se observaron diferencias regionales en su frecuencia (Figura 3). El 75% de los aislados productores de 15-ADON e identificados como *F. boothii* fueron obtenidos de la región Mixteca o del sur, seguidos por una proporción menor de la región de los Valles Altos (19%) y el Bajío (6%). Los productores de NIV identificados como *F. cerealis* y *F. meridionale* fueron recuperados de la región de los Valles Altos de México. Específicamente en los estados de Puebla, Tlaxcala y México, corroborando la presencia de especies productoras de NIV en este último estado reportada en 2012 (Malhipour *et al.*, 2012). Ningún aislado productor de 3-ADON fue identificado (Figura 4).

En la región Mixteca o del Sur el quimiotipo 15-ADON fue el único tricoteceno tipo B detectado en las muestras correspondientes al ciclo de cultivo de 2013, caso similar a lo observado en la región del Bajío donde *F. boothii* fue la especie predominante infectando

trigo. Contrario a estos resultados, en los Valles Altos de México el quimiotipo predominante fue el NIV (54%) en comparación al 15-ADON (46%). Esto debido a que en esta región existe una mayor diversidad de especies productoras de tricotecenos representadas por *F. boothii*, *F. meridionale* y *F. cerealis*.

Cuadro 1. Determinación de quimiotipos de tricoteceno e identificación de especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en trigo por el ensayo de genotipificación multilocus.

Aislado	Localidad	Quimiotipo	Especie Luminox
F496	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F497	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 -ADON	<i>F. boothii</i>
F498	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F499	San Andrés Sinaxtla, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F500	Santo Domingo Yanhuitlán, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F501	San Andrés Sinaxtla, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F502	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F504	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F505	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 -ADON	<i>F. boothii</i>
F506	San Mateo Yoloxochitlán, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F508	San Mateo Yoloxochitlán, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F509	San Pedro Añãñe, Oaxaca	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F510	Santiago Tillo, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F511	Santiago Tillo, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F512	San Andrés Sinaxtla, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F513	Santiago Tillo, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F514	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F515	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F516	Santiago Tillo, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F517	San Mateo Yoloxochitlán, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F518	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F520	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F521	Santiago Tillo, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F522	San Pedro Añãñe, Oaxaca.	15 - ADON	<i>F. boothii</i>
F526	Juchitepec, Estado de México.	NIV	<i>F. cerealis</i>
F530	Tenango del Aire, Estado de México.	15-ADON	<i>F. boothii</i>
F531	Santa Lucia, Estado de México.	15-ADON	<i>F. boothii</i>
F535	Santa Lucia, Estado de México.	15-ADON	<i>F. boothii</i>
F537	San Cayetano, Guanajuato.	15- ADON	<i>F. boothii</i>

F540	Abasolo, Guanajuato.	15- ADON	<i>F. boothii</i>
F548	Xaltocan, Tlaxcala	NIV	<i>F. cerealis</i>
F550	Xaltocan/Muñoz, Tlaxcala	15-ADON	<i>F. boothii</i>
F561	Recova, Tlaxcala	15-ADON	<i>F. boothii</i>
F562	Recova, Tlaxcala	15-ADON	<i>F. boothii</i>
F572	Km 31 Acatzingo-Zacatepec, Puebla	NIV	<i>F.meridionale</i>
F585	Rancho la soledad, Tlaxcala	NIV	<i>F.meridionale</i>
F589	Km 13 Acatzingo-Zacatepec, Puebla	NIV	<i>F.cerealis</i>
F640	Coatepec, Estado de México.	NIV	<i>F.cerealis</i>
F644	Tlalmanalco, Estado de México.	NIV	<i>F.meridionale</i>

15-ADON: 15-acetildeoxinivalenol. NIV: nivalenol

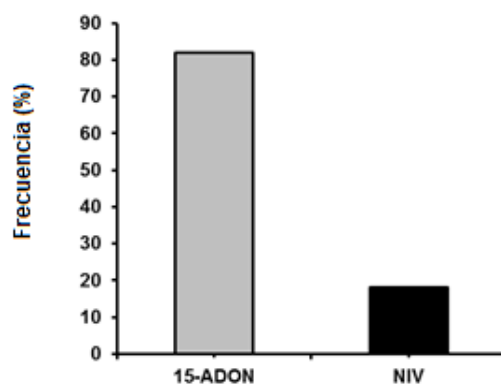


Figura 1. Distribución de frecuencias de quimiotipos de tricotecenos tipo B en las tres regiones de la República Mexicana. Barras: 15-ADON: 15 acetildeoxynivalenol, NIV: nivalenol.

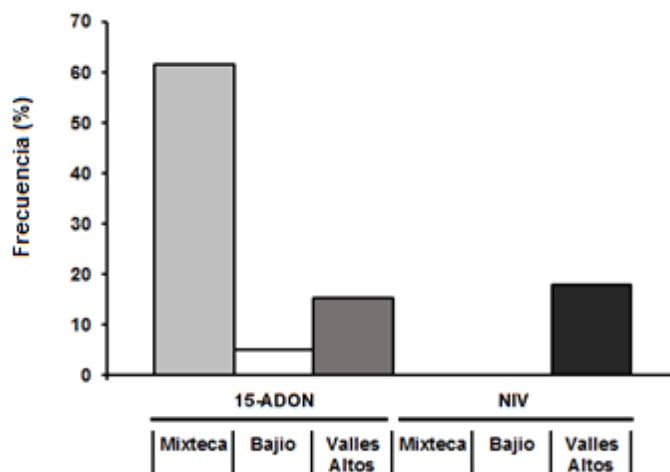


Figura 2. Distribución de frecuencias de quimiotipos de tricotecenos tipo B por región. Barras: 15-ADON: 15 acetildeoxynivalenol, NIV: nivalenol.



Figura 3. Distribución geográfica de los quimiotipos de tricotecenos tipo B en México Barras: 15-ADON: 15 acetildeoxynivalenol, NIV: nivalenol.

4. DISCUSIÓN

De acuerdo al análisis multilocus de los genes *RED*, *MAT EF1- α* , *TRI101*, *TRI12* y *TRI3*, tres especies productoras de tricotecenos tipo B fueron identificadas en la región Mixteca, del Bajío y los Valles Altos de México. Actualmente el ensayo de genotipificación multilocus es uno de los métodos de mayor fiabilidad para el reconocimiento de las especies productoras de tricotecenos y la identificación específica de las mismas (Ward *et al.*, 2008). Con base en este ensayo, se identificaron 39 aislados de tres diferentes especies pertenecientes al FSSC de un total de 116 aislados del estudio de diversidad de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga. *F. boothii* fue la especie más frecuente en las regiones Mixteca, del Bajío y los Valles Altos de México. Todos los aislamientos fueron positivos a

la producción de 15-ADON, confirmando el quimiotipo producido por esta especie (O'Donnell *et al.*, 2004). Otras especies encontradas en menor proporción fueron *F. cerealis* y *F. meridionale* ambas productoras de NIV.

F. meridionale y *F. boothii* junto con otras especies pertenecientes al FGSC, fueron originalmente descritas con base en la exclusividad genealógica observada en los análisis filogenéticos (O'Donnell *et al.*, 2004; Starkey *et al.*, 2007). En el caso particular de *F. meridionale*, su habilidad de producción de tricotecenos se reduce al quimiotipo NIV. *F. meridionale* se ha reportado en Sudamérica, Centroamérica (Guatemala), Sudáfrica, Australia, Nueva Caledonia, Nepal, Corea y EUA afectando trigo y maíz (Aoki *et al.*, 2011). Aunque parece tener una distribución cosmopolita, el análisis filogenético del complejo de especies de *F. graminearum* ha dejado ver que su distribución geográfica original corresponde a Sudamérica (Starkey *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2004). Así mismo, todos los aislamientos de *F. boothii* hasta ahora estudiados sólo producen 15-ADON. Mientras que su distribución geográfica original se define a Centroamérica, aunque se ha detectado infectando maíz en Sudáfrica (Boutigny *et al.*, 2011) y Argentina (Sampietro *et al.*, 2011) y trigo en México (Malhipour *et al.*, 2012), así como otras regiones de Europa y Asia las cuales tienden a ser cálidas, con épocas de precipitación marcadas y condiciones de sequía (Backhouse, 2014).

El análisis de genotipificación multilocus determinó que el quimiotipo predominante en las regiones de México muestreadas en este estudio fue el 15-ADON (82%, 32/39). Análisis de toxicidad de los derivados acetilados del DON: 15-ADON y 3-ADON realizado en células intestinales de porcinos han demostrado que el efecto toxicológico del 15-ADON es mayor en comparación a 3-ADON. 15-ADON tiene un efecto considerable en la proliferación celular, provocando alteraciones en la permeabilidad celular y la función enzimática de las claudinas (proteínas de unión celular) y MAP cinasas (proteínas involucradas en la proliferación y mitosis celular) lo que induce un mayor daño a las células intestinales. Las alteraciones histológicas causadas por la ingesta de dietas contaminadas con 15-ADON como atrofia, necrosis y fusión de microvellosidades intestinales son mayores a las provocadas por 3-ADON (Pinton *et al.*, 2012). Por tanto la alta frecuencia de este

quimiotipo en las muestras de trigo analizadas en este estudio, anteponen la importancia en el monitoreo de granos infectados.

La predominancia de quimiotipos producidos por las especies del clado B infectando trigo fue diferente en dos de las tres regiones de la República Mexicana. En la región del Sur o Mixteca el quimiotipo prevalente fue el 15-ADON producido por *F. boothii*. La alta proporción (92%, 24/26) de aislados de *F. boothii* conformando la población del tizón de la espiga en trigo en las localidades de San Pedro Añãe, Santo Domingo Yanhuitlán, San Andres Sinaxtla y Santiago Tillo en Oaxaca evidencia un alto riesgo toxicológico. Este quimiotipo también fue el único detectado en la región del Bajío. Históricamente el Bajío ha sido una de las regiones del país más afectadas por el tizón de la espiga en cereales de grano pequeño. Cuando se realizó el primer reporte de la enfermedad se encontró que la Sierra Tarasca de Michoacán, la región de los Altos y la Sierra del tigre en Jalisco fueron las áreas con mayor afectación e incidencia (Ireta & Gilchrist, 1994; Gilchrist-Saavedra, 2000). Debido a que Guanajuato fue el único estado del Bajío analizado en esta investigación, estos resultados sólo representan un ligero avance en el conocimiento de diversidad de especies productoras de tricotecenos en esta región. Más estudios necesitan ser realizados para el mejor entendimiento de la población toxigénica de *Fusarium* en el país.

La presencia conjunta de los quimiotipos 15-ADON y NIV fue registrada exclusivamente en la región de los Valles Altos de México, en proporciones del 46% y 54% para 15-ADON y NIV respectivamente. Aunque la coexistencia de aislados de dos quimiotipos diferentes dentro de una región podría sugerir que el cruzamiento entre poblaciones, fenómenos de hibridación no han sido hasta ahora reportados. La característica de homotalidad de las especies dentro del FGSC parece refutar esta teoría y pensar que la fijación local de alelos o quimitipos conserva y define a las filoespecies del complejo (Zhang *et al.*, 2012).

En contraste, una proporción importante de aislados productores de NIV fue recuperada de la región de los Valles Altos de México. A pesar de ser clasificado dentro del mismo grupo de micotoxinas; el NIV es más tóxico en comparación al DON para humanos y animales domésticos. Tanto así que los límites de ingesta tolerables de NIV en Europa son

más austeros (0.7 µg/kg) en comparación a los permitidos de DON (1 µg/kg) (Schothorst & van Egmond 2004).

El análisis de genotipificación de las especies del FGSC ha permitido regionalizar la incidencia de tricotecenos a nivel global, lo que ha permitido definir los perfiles tóxicos de las especies y con ello la producción potencial de determinado tipo de toxinas. En Europa parece haber una prevalencia de aislados productores de DON en comparación a NIV. En el Noroeste de Rusia y Finlandia todos los aislamientos de *F. graminearum* producen 3-ADON (Yli-Mattila *et al.*, 2009), mientras que en el Sureste de Rusia, Inglaterra, Holanda, Francia e Italia predomina el quimiotipo 15 ADON (Boutigny *et al.*, 2014; Jennings *et al.*, 2004; Prodi *et al.*, 2009). En Asia, específicamente en países Corea, China y Japón, la determinación de quimiotipos de las especies del FGSC causando tizón de la espiga en trigo y cebada han demostrado que el quimiotipo más frecuente es NIV producido principalmente por *F. asiaticum* (Lee *et al.*, 2012; Suga *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). La identificación de DON como el principal quimiotipo producido por las especies del FGSC en México se correlaciona con los resultados reportados en distintos países de América. El quimiotipo 15-ADON es prevalente en Norteamérica (Gale *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008), así como en distintas regiones de Sudamérica como Brasil (Del Ponte *et al.*, 2012), Argentina (Alvarez *et al.*, 2011; Sampietro *et al.*, 2011) y Uruguay (Umpiérrez-Failache *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2013). Aunque desplazamientos de la población de 15-ADON a 3-ADON han sido observados en Canadá (Ward *et al.*, 2008) y una importante proporción de aislados 3-ADON han sido encontrados en EUA (Gale *et al.*, 2007), ningún aislado productor de 3-ADON fue identificado en México.

Aunque la prevención de la contaminación por micotoxinas es uno de los objetivos prioritarios en la industria de los cereales en todo el mundo, la infección por hongos productores de micotoxinas es inevitable. Por lo tanto, el conocimiento del status toxicológico de tricotecenos es prioritario en el desarrollo de estrategias de control y manejo. Este estudio provee el primer registro de los quimiotipos de tricotecenos tipo B producidos por las especies *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en tres diferentes regiones de la República Mexicana. Estos resultados demuestran que la diversidad de especies productoras de tricotecenos en trigo está conformada por *F. boothii*, *F. meridionale* y *F. cerealis*

produciendo, 15-ADON y NIV respectivamente. Estos resultados tienen implicaciones importantes para el control del tizón de la espiga y el manejo y monitoreo para la reducción en la acumulación de tricotecenos en trigo.

5. CONCLUSIONES

15-ADON y NIV son los quimiotipos de tricotecenos tipo B que contaminan trigo en las las regiones del Sur o Mixteca, el Bajío y los Valles Altos de México muestreadas durante los ciclos de cultivo de 2013-2014.

El quimiotipo de tricoteceno predominante en México es el 15-ADON (82%, 32/39) específicamente en las regiones del Sur y el Bajío, con un riesgo potencial de contaminación por NIV (18%, 7/39) en las localidades de los Valles Altos de México.

Las especies productoras de tricotecenos tipo B fueron identificadas como *F. boothii*, *F. meridionale* y *F. cerealis*. Los aislados de *F. boothii* presentaron el quimiotipo 15-ADON, mientras que *F. cerealis* y *F. meridionale* fueron reconocidas como especies productoras de NIV.

Los resultados de este estudio se correlacionan con la designación del quimiotipo 15-ADON como el quimiotipo de tricoteceno tipo B prevalente contaminando trigo en Norteamérica.

REFERENCIAS

- Alvarez, C. L., Somma, S., Proctor, R. H., Stea, G., Mulè, G., Logrieco, A. F., ... Moretti, A. (2011). Genetic diversity in *Fusarium graminearum* from a major wheat-producing region of Argentina. *Toxins*, 3(10), 1294–309. doi:10.3390/toxins3101294
- Aoki, T., Ward, T., Kistler, H., & O'Donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Mycotoxins*, 62(2), 91–102. Retrieved from http://www.ncaur.usda.gov/SP2UserFiles/ad_hoc/36400500Publications/HCK/FGSC_review_pdf.pdf
- Backhouse, D. (2014). Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. *European Journal of Plant Pathology*, 139(1), 161–173. doi:10.1007/s10658-013-0374-5
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews.*, 16(3), 497–516. doi:10.1128/CMR.16.3.497
- Bottalico A. 1998. *Fusarium* disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles. *European Journal of Plant Pathology* 80:85–103.
- Boutigny, A., Ward, T., & Ballois, N. (2014). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European journal of plant ...*, (138), 133–148. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-013-0312-6>
- Boutigny, A.-L., Ward, T. J., Van Coller, G. J., Flett, B., Lamprecht, S. C., O'Donnell, K., & Viljoen, A. (2011). Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 48(9), 914–20. doi:10.1016/j.fgb.2011.05.005
- Champeil, a, Doré, T., & Fourbet, J. . (2004). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*, 166(6), 1389–1415. doi:10.1016/j.plantsci.2004.02.004
- Cundliffe, E.; Davies, J.E. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977, 11, 491–499.
- Desjardins, A., E. (2006). *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. St Paul, MN, USA, APS Press.

- D'Mello, J., Placinta, C., & Macdonald, A. (1999). Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80, 183–205. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840199000590>
- Del Ponte, E. M., Garda-Buffon, J., & Badiale-Furlong, E. (2012). Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chemistry*, 132(2), 1087–1091. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.108
- Gale, L. R., Ward, T. J., Balmas, V., & Kistler, H. C. (2007). Population Subdivision of *Fusarium graminearum* Sensus Stricto in the Upper Midwestern United States. *Phytopathology*, 97(11), 1434–9. doi:10.1094/PHYTO-97-11-1434
- Goswami, S. R., & Kistler, H. C. (2004). Pathogen profile Heading for disaster : *Fusarium graminearum* on cereal crops, *Molecular Plant Pathology*, 5, 515–525. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00252.X
- Gilchrist-Saavedra, L.I. (2000). Problemas fitosanitarios de los cereales de grano pequeño en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18, 132-137
- Ireta J. M. & Gilchrist S. (1994). Roña o tizón de la espiga del trigo. Informe especial de trigo No. 20. México, CIMMYT.
- Jennings, P., Coates, M. E., Walsh, K., Turner, J. A., & Nicholson, P. (2004). Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology*, 53(5), 643–652. doi:10.1111/j.0032-0862.2004.01061.x
- Lee, J., Kim, H., Jeon, J.-J., Kim, H.-S., Zeller, K. a, Carter, L. L. a, ... Lee, Y.-W. (2012). Population structure of and mycotoxin production by *Fusarium graminearum* from maize in South Korea. *Applied and environmental microbiology*, 78(7), 2161–7. doi:10.1128/AEM.07043-11
- Malihipour, A., Gilbert, J., Piercey-Normore, M., & Cloutier, S. (2012). Molecular Phylogenetic Analysis, Trichothecene Chemotype Patterns, and Variation in Aggressiveness of *Fusarium* Isolates Causing Head Blight in Wheat. *Plant Disease*, 96(7), 1016–1025. doi:10.1094/PDIS-10-11-0866-RE
- Miller, J. D., Greenhalgh, R., Wang, Y. Z., Lu, M. 1991. *Trichothecene chemotype of three Fusarium species*. *Mycologia*, 83, 121-130.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Corby Kistler, H., & Aoki, T. (2004). Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct. *Fungal genetics and biology*, 41,

- 600–623. Retrieved from
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184504000428>
- Pan, D., Calero, N., Mionetto, A., & Bettucci, L. (2013). Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *International journal of food ...*, (162), 120–123. Retrieved from
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513000123>
- Pinton, P., Tsybulskyy, D., Lucioli, J., Laffitte, J., Callu, P., Lyazhri, F., ... Oswald, I. P. (2012). Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogen-activated protein kinases. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 130(1), 180–90. doi:10.1093/toxsci/kfs239
- Prodi, A., Tonti, S., Nipoti, P., Pancaldi, D., & Pisi, A. (2009). SHORT COMMUNICATION IDENTIFICATION OF DEOXYNIVALENOL AND NIVALENOL PRODUCING CHEMOTYPES OF FUSARIUM GRAMINEARUM ISOLATES FROM DURUM WHEAT IN A RESTRICTED AREA OF NORTHERN ITALY. *Journal of Plant Pathology*, 91(3), 727–731.
- Sampietro, D. A., Díaz, C. G., Gonzalez, V., Vattuone, M. A., Ploper, L. D., Catalan, C. A. N., & Ward, T. J. (2011). Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International journal of food microbiology*, 145(1), 359–64. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.021
- Schothorst RC, van Egmond HP. 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 ‘collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states’. Subtask: trichothecenes. *Toxicol Lett.* 153:133–143.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., & Kizek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary toxicology*, 3(3), 94–9. doi:10.2478/v10102-010-0019-x
- Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R., Kistler, H. C., Geiser, D. M., ... O’Donnell, K. (2007). Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 44(11), 1191–204. doi:10.1016/j.fgb.2007.03.001
- Suga, H., Karugia, G. W., Ward, T., Gale, L. R., Tomimura, K., Nakajima, T., ... Hyakumachi, M. (2008). Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology*, 98(2), 159–66. doi:10.1094/PHYTO-98-2-0159
- Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez-Haralambides, a, Ward, T. J., & Vero, S. (2013). Regional differences in species composition and toxigenic

- potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International journal of food microbiology*, 166(1), 135–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.029
- Wannemacher, R., & Wiener, S. (1997). Trichothecene mycotoxins. In F. Sidell, E. Takafuji, & D. Franz (Eds.), *Medical aspects of chemical and biological warfare* (pp. 655–676). Washington, DC.: TMM Publications. Retrieved from <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA398241>
- Ward, T. J., Bielawski, J. P., Kistler, H. C., Sullivan, E., & O'Donnell, K. (2002). Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9278–83. doi:10.1073/pnas.142307199
- Ward, T. J., Clear, R. M., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., ... Nowicki, T. W. (2008). An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 45(4), 473–84. doi:10.1016/j.fgb.2007.10.003
- Woloshuk, C. P., & Shim, W.-B. (2013). Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. *FEMS microbiology reviews*, 37(1), 94–109. doi:10.1111/1574-6976.12009
- Xu, X.-M., Monger, W., Ritieni, A., & Nicholson, P. (2007). Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathology*, 56(6), 943–956. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01650.x
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T. J., Aoki, T., Kistler, H. C., & O'Donnell, K. (2009). A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 101(6), 841–852. doi:10.3852/08-217
- Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Xu, J., ... Feng, J. (2012). Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PloS one*, 7(2), e31722. doi:10.1371/journal.pone.0031722

CONCLUSIONES GENERALES

EL tizón de la espiga en trigo en las regiones del Bajío, Mixteca y Valle Altos de México está asociado a 10 especies diferentes agrupadas en 6 complejos de especies de *Fusarium*: **FFSC** (*F. andiyazi*, *F. temperatum*), **FTSC** (*F. avenaceum*), **FGSC** (*F. boothii*, *F. meridionale*), **FSSC** (*F. cerealis*, *F. poae* y *F. sambucinum*), **FIESC** (*F. equiseti*) y **FOSC** (*F. oxysporum*).

Las especies causales del tizón de la espiga en trigo predominantes en las tres regiones de la República Mexicana pertenecen a los complejos FTSC (*F. avenaceum*) (56%) y FGSC (*F. boothii*, *F. meridionale*) (29.5%), con una proporción menor de las especies de los complejos FSSC (5.5%), FFSC (4.5%), FIESC (2.5%) y FOSC (2%).

Las inferencias filogenéticas obtenidas a partir del análisis de la secuencia *RPB2*, permitieron corroborar el origen monofilético de las especies de *Fusarium* causantes del tizón de la espiga en México.

15-ADON y NIV son los quimiotipos de tricotecenos tipo B que contaminan trigo en las las regiones del Sur o Mixteca, el Bajío y los Valles Altos de México muestreadas durante los ciclos de cultivo de 2013-2014.

El quimiotipo de tricoteceno predominante en México es el 15-ADON (82%, 32/39) específicamente en las regiones del Sur y el Bajío, con un riesgo potencial de contaminación por NIV (18%, 7/39) en las localidades de los Valles Altos de México.

Las especies productoras de tricotecenos tipo B fueron identificadas como *F. boothii*, *F. meridionale* y *F. cerealis*. Los aislados de *F. boothii* presentaron el quimiotipo 15-ADON, mientras que *F. cerealis* y *F. meridionale* fueron reconocidas como especies productoras de NIV.

Los resultados de este estudio se correlacionan con la designación del quimiotipo 15-ADON como el quimiotipo de tricoteceno tipo B prevalente contaminando trigo en Norteamérica.

ANEXO 1

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial del gen factor de elongación 1- α (*EF1- α*).

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia</i>
EF1	5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3'
EF2	5'-GGAAGTACCAGTGATCATG-3'

Cuadro 2. Reactivos y condiciones en la amplificación parcial del gen factor de elongación 1- α (*EF1- α*).

<i>Reactivos</i>	<i>IX</i>	<i>Condiciones de PCR</i>	
ddH ₂ O	15.8 μ l		
Amortiguador 10X	2.5 μ l	96°C	1:30 min
MgSO ₄ ,	1.0 μ l	94°C	30 s
dNTP's	0.5 μ l	53°C	30 s
Oligo EF1	1.5 μ l	ciclos	} 35
Oligo EF2	1.5 μ l	68°C	
Platinum Taq High Fidelity polimerasa	0.2 μ l	4°C	
ADN genómico	2.0 μ l		

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen codificante para la subunidad grande la ARN polimerasa II (*RPB2*).

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia</i>
5F2	5'GGGGWGAYCAGAAGAAGGC3'
11ar	5'GCRTGGATCTTRTCRTCSACC3'

Cuadro 5. Amplificación del gen codificante para la subunidad grande la ARN polimerasa II (*RPB2*) de los 148 aislados obtenidos de las tres regiones diferentes del país.

<i>Reactivos</i>	<i>IX</i>	<i>Condiciones de PCR</i>	
ddH ₂ O	15.8 μ l		
Amortiguador 10X	2.5 μ l	96°C	1:30 min
MgSO ₄ ,	1.0 μ l	94°C	30 s
dNTP's	0.5 μ l	53°C	30 s
Oligo 5F2	1.5 μ l	ciclos	} 35
Oligo 11ar	1.5 μ l	68°C	
Platinum Taq High Fidelity polimerasa	0.2 μ l	4°C	
ADN genómico	2.0 μ l		

ANEXO 2

1. MLGT: Amplificación múltiple

Cuadro 6. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación múltiple de los genes *RED*, *MAT*, *EF1- α* , *TRI101*, *TRI12* y *TRI3* de *Fusarium*.

<i>Locus</i>	<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño</i>
Acetiltransferasa	TRI101-f TRI101-r	CAAGATACAGCTCGACACC CTGGGTAGTTGTTTCGAGA	911
Reductasa	RED-f RED-r	AGACTCATTCCAGCCAAG TCGTGTTGAAGAGTTTGG	702
<i>TRI12</i>	TRI12-f TRI12-r	TCGTGTTGAAGAGTTTGG AAGCATCAGCCTCTGCTC	1163
<i>TRI3</i>	TRI3-f TRI3-r	AACCTGAGCCCTCCAGT TGGCAAAGACTGGTTCAC	912
<i>MAT</i>	MAT-f MAT-r	TTCTCAGGAACGACTCAAC TGTCGGTTCAGACGATCA	1040
<i>EF1-α</i>	EF1-f EF1-r	CGACCACTGTGAGTACCA GTCAAGAACCCAGGCGTA	456

Cuadro 7 Reactivos y condiciones de PCR en la etapa de amplificación múltiple del MLGT.

<i>Reactivos</i>	<i>IX</i>	<i>Condiciones de PCR</i>
ddH ₂ O	4.1 μ l	
Amortiguador 10X	1.0 μ l	96°C 1:30 min
Mg ²⁺	0.4 μ l	94°C 30 s
dNTP's	0.2 μ l	50°C 30 s
Mezcla de oligonucleótidos	0.2 μ l	ciclos
Platinum Taq High Fidelity polimerasa	0.1 μ l	68°C 1:30 min
ADN genómico	4.0 μ l	4°C

2. MLGT: Extensión primer-alelo específica (ASPE)

Cuadro 8 Reactivos y condiciones de PCR en la etapa de Extensión primer-alelo específica del MLGT.

<i>Reactivos</i>	<i>IX</i>	<i>Condiciones de PCR</i>	
Amortiguador 10X	2.0 μ l		
Mg ²⁺	0.5 μ l	96°C	2:00 min
dNTP (-dCTP)	1.0 μ l	94°C	30 s
Biotin-14-dCTP	0.25 μ l	55°C	1:00 min
Mezcla de sondas	1.0 μ l	74°C	2:00 min
<i>Tsp</i> Taq	0.15 μ l	4°C	
Productos de la PCR múltiple	15.1 μ l		

} 40 ciclos

3. MLGT: Hibridación

Cuadro 9. 52 sondas utilizadas en las fases de ASPE e hibridación del MLGT para la identificación de las especies de *Fusarium* pertenecientes al clado B .

Sonda	Tag	SNP-Secuencia	Secuencia total de la sonda
Tri12-15ADON(7)	TACACAAACAATCTTT CACAATTT	TACAGCGGTCGCAACTTC	TACACAAACAATCTTTTACAATTTTACAGCGGTCGCAACTTC
Tri3-15ADON(8)	AAATAACTCACTATTT CACTTACA	ACTGACCCAAGCTGCCATC	AAATAACTCACTATTTCACTTACAACCTGACCCAAGCTGCCATC
Tri12-3ADON(9)	CACATCTAATACTTTAT ACAATTC	CTTTGGCAAGCCCGTGCA	CACATCTAATACTTTTATACAATTCCTTTGGCAAGCCCGTGCA
Tri3-3ADON(12)	CATAATCAATTTCAAC TTTCTACT	CGCATTGGCTAACACATG	CATAATCAATTTCAACTTTCTACTCGCATTGGCTAACACATG
Tri12-Niv(13)	CAAATACATAATCTTA CATTCACT	TGGTCTCCTCGTTGTATCT GG	CAAATACATAATCTTACATTCATTGGTCTCCTCGTTGTATCTGG
Tri3-Niv(14)	AATTTCTTCTTTCTT TCACAAT	GACAAGTGCACAGAATAT ACG	AATTTCTTCTTTCTTTTACAATGACAAGTGCACAGAATATACG
AT-B-clade(15)	TACTTCTTTACTACAAT TTACAAC	ACGGTGCTATGGATATGG	TACTTCTTTACTACAATTTACAACACGGTGCTATGGATATGG
EF-G-clade(18)	ACACTTATCTTTCAATT CAATTAC	TCATCATCACGTGTCAAC	ACACTTATCTTTCAATTCAATTACTCATCATCACGTGTCAAC
AT-G-clade(19)	ATACTTTACAAACAAA TAACACAC	CCATTCACCGAAGAGGAA AT	ATACTTTACAAACAAAATAACACACCCATTCACCGAAGAGGAAAT
EF- austroameri(36)	ATTAAACAACCTTTAA CTACACAA	GTCAACCAGTCACTAACT	ATTAAACAACCTTTAACTACACAAGTCAACCAGTCACTAACT
AT- austroameri(37)	TACAACATCTCATTAA CATATACA	ATCCCTCTCAATATCCCG	TACAACATCTCATTAAACATATACAATCCCTCTCAATATCCCG
AT-meridionale(39)	ACAAATATCTAACTAC TATCACAA	CTCGTGTGTAGTGAAAGA T	ACAAATATCTAACTACTATCACAACCTCGTGTGTAGTGAAAGAT
RED-meridionale(42)	CACTACACATTTATCA TAACAAAT	CAGTATTGATCATGAGGCT A	CACTACACATTTATCATAACAAATCAGTATTGATCATGAGGCTA
RED-boothii(44)	TCATCACTTTCTTTACT TTACATT	ATTGGTGTTCCTTCGCC	TCATCACTTTCTTTACTTTACATTATTGGTGTTCCTTCGCC
AT-boothii(45)	TACACAATATTCATCA TAACCTAAC	AAGGTCTTAAGCGCTTCG	TACACAATATTCATCATAACTAACAAGGTCTTAAGCGCTTCG

RED-mesoameri(47)	TCTCTTTAAACACATTC AACAAATA	GTTGTCATTACGGGTGGT	TCTCTTTAAACACATTCAACAATAGTTGTCATTACGGGTGGT
AT-mesoameri(48)	AATCAACACACAATAA CATTCATA	CGAGGGAAACACAGGAAT	AATCAACACACAATAACATTTCATACGAGGGAAACACAGGAAT
EF-acaciae-mearnsii(51)	CAATTTACATTTCACTT TCTTATC	GTCTCATTTTCTCGATCG CC	CAATTTACATTTCACTTTCTTATCGTCTCATTTTCTCGATCGCC
AT-acaciae-mearnsii(52)	TTCTTCATTAACCTTCTA ATCTTAC	GGTCTTAAGCGCTTCTCG	TTCTTCATTAACCTTCTAATCTTACGGTCTTAAGCGCTTCTCG
MAT-asiaticum(54)	TTAATACAATTCTCTCT TTCTCTA	GGCTACTTTTCTGAGTACT CT	TTAATACAATTCTCTCTTTCTCTAGGCTACTTTTCTGAGTACTCT
AT-asiaticum(55)	ACATCAAATTCTTTCA ATATCTTC	AAGCTGGGCGTTCTTCAA	ACATCAAATTCTTTCAATATCTTCAAGCTGGGCGTTCTTCAA
EF-graminearum(57)	ACTTACAATAACTACT AATACTCT	ACTCGAGCGACAGGCGTC	ACTTACAATAACTACTAATACTCTACTCGAGCGACAGGCGTC
AT-graminearum(58)	CAATAAACATTCTTTA CATTCTCA	ATAGTTTCCTTACCTTGAAA ACTAT	CAATAAACATTCTTTACATTCTCAATAGTTTCCTTACCTTGAAA ACT
EF-cortaderiae(61)	AATCTCTACAATTTCTC TCTAATA	GACTTGGCGGGGTAGTT TT	AATCTCTACAATTTCTCTAATAGACTTGGCGGGGTAGTTTT
AT-cortaderiae(62)	CTAAACATACAAATAC ACATTTCA	GGGTATGAGAAAGGCGGA	CTAAACATACAAATACACATTTTCAGGGTATGAGAAAGGCGGA
RED-brasilicum(64)	TTCAATTCAAATCAAA CACATCAT	GGCTTACAAAGGTGAGTG	TTCAATTCAAATCAAACACATCATGGCTTACAAAGGTGAGTG
MAT-brasilicum(25)	CTTTCTTAATACATTAC AACATAC	CAGATTTCTGATCGCTGATG AA	CTTTCTTAATACATTACAACATACCAGATTTCTGATCGCTGATGAA
RED-gerlachii(67)	ATCTCAATTACAATAA CACACAAA	GAAGTAGAAGTCAAT GCC	ATCTCAATTACAATAACACACAAAGAACTAGAAGTCAATGCC
AT-gerlachii(68)	ACTTCTTCATTCTCTTA TCAAATA	TGACGATGCTCTTTCGGCC	ACTTCTTCATTCTCTTATCAAATATGACGATGCTCTTTCGGCC
RED-vorosii(70)	CTCTATTACTACTAAAT ACTAATC	CAAAGGTGAGTATGAGTA T	CTCTATTACTACTAAATACTAATCCAAAGGTGAGTATGAGTAT
MAT-vorosii(73)	CTTTATCAAATTCTAAT TCTCAAC	TAAGTCCGAATGAAGCCC CGG	CTTTATCAAATTCTAATTCTCAACTAAGTCCGAATGAAGCCCCGG
EF-lunulo(74)	ACACTCATTTAACACT ATTTTCATT	CCCTCTTCCCACAAACCAT TT	ACACTCATTTAACACTATTTTCATTCCCTCTTCCCACAAACCATTT
MAT-lunulo(75)	CATAAATCTTCTCATTC TAACAAA	GCCCTATTTCGGTCTGATT AT	CATAAATCTTCTCATTTCTAACAAGCCCTATTTCGGTCTGATTAT

AT-cerealis(77)	AATAACAAC TACTAT ATCATAAC	GAGGTAGATCATCAGATT GTT	AATAACAAC TACTATATCATAACGAGGTAGATCATCAGATTGTT
RED-cerealis(78)	TTTACAAATCTAATCA CACTATAC	GTTGCAGACACTACACAA A	TTTACAAATCTAATCACACTATACGTTGCAGACACTACACAAA
RED-culmorum(80)	TACTCAATACTTACTAT ATTTCATC	GAAGAAACGCTTGTATCG AA	TACTCAATACTTACTATATTTCATCGAAGAAACGCTTGTATCGAA
AT-culmorum(81)	TAACATAACTTCTTCAT TATTTCAC	AGGACGTTCTCTCGTGTTA	TAACATAACTTCTTCATTATTTCACAGGACGTTCTCTCGTGTTA
AT-pseudo(83)	ACAATATACATCACTT AAACTTTC	TGCAGCTCAACTTCATCG	ACAATATACATCACTTAAACTTTCTGCAGCTCAACTTCATCG
RED-pseudo(84)	CACAACAAATTCTTAT TCAATTCA	CAAGCCGATGCCAAGTCC	CACAACAAATTCTTATTCAATTCACAAGCCGATGCCAAGTCC
EF-sporo(86)	TAAATACTTCATTACT AATCACAC	GTAGTTTCACATTTCCGAT GTA	TAAATACTTCATTACTAATCACACGTAGTTTCACATTTCCGATGTA
AT-sporo(87)	ATATACTTTACACTTTC AACAAAC	TGTTCTCTCGTCTGTAGC	ATATACTTTACACTTTCAACAAACTGTTCTCTCGTCTGTAGC
AT-aethiopicum(43)	AACTTTCTCTCTCTATT CTTATTT	GGCCAGCTACCAGGCCTG	AACTTTCTCTCTCTATTCTTATTTGGCCAGCTACCAGGCCTG
RED-aethiopicum(90)	ATTACACACTTATCAA CTAATCTA	CGGAAGAAACATGATGGG T	ATTACACACTTATCAACTAATCTACGGAAGAAACATGATGGGT
EF-louisianense(93)	TTTATACATATACACA AACTCTCT	TACTACACAATATACTCA TCAAT	TTTATACATATACACAAACTCTTTACTACACAATATACTCATCA AT
AT-louisianense(94)	ATACTAAACAATTCTC TTTACTAC	AAACAAACTTCACATCTCA ATAAT	ATACTAAACAATTCTCTTTACTACAAACAAACTTCACATCTCAATA AT
EF-nepalense(96)	CTAACTATAATCTTCAT ACACATA	ATTCTTTTTACATTCATTAC TTAC	CTAACTATAATCTTCATACACATAAATCTTTTTACATTCATTACTTA C
AT-ussarianum(97)	TACTATAATCTCACTTC TATTTC	CTTTTCAATTACTTCAAAT CTCA	TACTATAATCTCACTTCTATTTCACTTTTCAATTACTTCAAATCTTC A
RED-ussarianum(99)	ATCTAACTCTATATAC ATTCTAAC	CTTTTCAAATCAATACTCA ACTTT	ATCTAACTCTATATACATTCTAACCTTTTCAAATCAATACTCAACT TT
MAT-12a(100)	ACTCTCATATACAATT CTTCTTAA	GAATTCATTTACCAATTTA CCAAT	ACTCTCATATACAATTCTTCTTAAGAATTCATTTACCAATTTACCA AT