

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL DE LA SECADERA DEL GLADIOLO (*Gladiolus grandiflorus* HORT)

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE CAUSAL AGENT OF THE GLADIOLUS DRIER (*Gladiolus grandiflorus* HORT)

Olalde-Lira, G.G.<sup>1</sup>; Vargas-Sandoval, M.<sup>1</sup>; Ávila-Val, T. Del C.<sup>1</sup>; Raya-Montaño, Y.A.<sup>1</sup>; Delgado-Valerio, P.<sup>1</sup>; Lara-Chávez, Ma. B.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Lázaro Cárdenas, esquina con Berlín, Col. Revolución. 60090, Uruapan, Michoacán, México.

\*Autor de correspondencia: [chavez12001@yahoo.com.mx](mailto:chavez12001@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue la caracterización molecular del agente causal de la secadera en gladiola (*Gladiolus grandiflorus* Hort). En Villa Guerrero, Estado de México, se recolectaron plantas de gladiola enfermas y obtuvieron aislamientos del género *Fusarium*, para producir cultivos monospóricos; los conidios se almacenaron en glicerol 25 % a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y para su caracterización molecular se hizo la extracción de ácidos nucleicos con el protocolo de Cenis (1992). Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó el gen factor de elongación y el gen que codifica para calmodulina. Las secuencias obtenidas se compararon con *F. sterilihyphosum*, *F. circinatum*, *F. pseudocircinatum* y *F. mexicanum*; por ser las que comparten el carácter de hifas enrolladas. *F. oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* se utilizaron por sus antecedentes en el cultivo. El análisis filogenético se hizo para máxima parsimonia y máxima verosimilitud, observando que la especie de *Fusarium* aislada de gladiola no se asoció con ninguna de las otras especies, las cuales se agruparon de acuerdo a sus características morfológicas y moleculares, sugiriendo que organismo aislado es una nueva especie de *Fusarium* no reportada.

**Palabras clave:** *Fusarium*; nueva especie; enfermedades fungosas

### ABSTRACT

The objective of this study was the molecular characterization of the causal agent of the gladiolus drier (*Gladiolus grandiflorus* Hort). In Villa Guerrero, Estado de México, sick gladiolus plants were collected and isolates of the *Fusarium* genus were obtained to produce monospore cultures; the conidia were stored in glycerol 25 % at  $-70^{\circ}\text{C}$ , and for their molecular characterization the extraction of nucleic acids was made with the Cenis (1992) protocol. For the polymerase chain reaction, the elongation factor gene and the gene that codifies for calmoduline were used. The sequences obtained were compared with *F. sterilihyphosum*, *F. circinatum*, *F. pseudocircinatum* and *F. mexicanum*, because they share the character of rolled hyphae. *F. oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* were used because of their antecedents in the crop. The phylogenetic analysis was carried out for maximum parsimony and maximum authenticity, observing that the *Fusarium* species isolated from gladiolus was not associated with any of the other species, which were grouped according to their morphological and molecular characteristics, suggesting that the organism isolated is an unreported new species of *Fusarium*.

**Keywords:** *Fusarium*, new species, fungi diseases.

**Agroproductividad:** Vol. 10, Núm. 12, diciembre. 2017. pp: 85-90.

**Recibido:** agosto, 2016. **Aceptado:** septiembre, 2017.



## INTRODUCCIÓN

**La gladiola** (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es uno de los principales cultivos ornamentales del Estado de México, sin embargo, en la floricultura, las enfermedades y su manejo son un reto, ya que pueden generar pérdidas importantes. En el caso de la gladiola (*Gladiolus grandiflorus* Hort), la enfermedad denominada "Secadera" causada por un hongo del género *Fusarium* puede provocar daños hasta del 100% (Leszczyńska y Borys, 1994). Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en el suelo y en sustratos orgánicos; abundan en suelos cultivados en regiones templadas y tropicales (Booth, 1986). Como muchos hongos del suelo, está dotado con formas de supervivencia, y uno de sus mecanismos es la capacidad de cambio rápido tanto del hospedero como de su morfología y comportamiento (Booth, 1986; Alves-Santos *et al.*, 2007; Katan y Di Primo, 1999; Ortoneda *et al.*, 2003). La diferenciación de este género se basa en características fisiológicas y morfológicas, tales como la forma y tamaño de macroconidios, presencia o ausencia de microconidios, clamidosporas y morfología de las colonias. Las diferencias sutiles en una sola característica pueden delinear especies (Llorens *et al.*, 2006). En fitopatología, la identificación de hongos fitopatógenos se ha basado tradicionalmente en la observación de caracteres morfológicos. Sin embargo, en cada uno de los niveles de especie, subespecie, variedad, *forma specialis* y raza, existen pocos caracteres morfológicos que distingan un patógeno de otro (Coddington y Gould, 1992). Para superar los problemas asociados al método convencional de clasificación racial, se ha comenzado a hacer uso de la variación natural presente en el ADN de cualquier especie. Así, la aparición de técnicas basadas en el análisis de polimorfismos en los ácidos nucleicos, ha revolucionado los aspectos de detección e identificación de organismos fitopatógenos y sus variantes patogénicas y por consiguiente, el control y prevención de los mismos, dado su gran poder resolutivo y aplicabilidad a una gran variedad de éstos (Henson y French, 1993; Martin *et al.*, 2000). De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo, caracterizar molecularmente el agente causal de la secadera del gladiolo *Gladiolus grandiflorus* Hort.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento se hizo de bulbos afectados por el patógeno recolectados en Villa Guerrero, Estado de México (18° 57' 36" N y 99° 38' 24" O), con clima templado sub-

húmedo y régimen de lluvias en verano, precipitación de 651 mm, temperatura media anual de 18.8 °C y altitud de 2,160 m (INEGI, 2011).

**Extracción de ADN.** Se hizo la extracción de ADN de micelio monoconidial en base al protocolo de Cenís (1992) se almacenó a -20 °C hasta su uso. La calidad se valoró mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio a 120 volts por 20 minutos y se observó en un transiluminador. La concentración y pureza se midió en un espectrofotómetro Smart Spec® de BioRad®.

**Caracterización molecular de *Fusarium* sp.** Los aislados de *Fusarium* spp. se caracterizaron con ayuda de los primers calmodulina 3-4 (GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC) y Factor de Elongación. (ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC) utilizados por Knutsen *et al.*, (2004) y Bétancourt *et al.*, (2012) para la caracterización de especies de *Fusarium*.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Para la amplificación de secuencias se utilizó una mezcla de reacción de PCR compuesta por 1M Tris pH 9.0 2.5 µL, dNTPs 2 µL, Primer forward 0.5 µL, Primer reverse 0.5 µL, dH<sub>2</sub>O 11.3 µL, 50mM MgCl<sub>2</sub> 3 µL, Taq polimerasa 0.2 µL y 2.5 µL del ADN extraído. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Thermal Cycler C1000® de BIORAD® bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 95 °C por cuatro minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por un minuto, alineación a 55 °C por un minuto y extensión a 72 °C por dos minutos; la extensión final se llevó a cabo a 72 °C durante 10 minutos. Las muestras de las amplificaciones se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% TBEX a 120 volts por 25 minutos. Los fragmentos amplificados se purificaron con el kit comercial (Pure Link™ Quick PCR Purification Kit, Invitrogen™).

**Secuenciación.** El ADN purificado se envió al laboratorio de MacroGen Inc. en Seúl, Corea, para su secuenciación en ambas direcciones del gen (3' a 5' y viceversa). Las secuencias obtenidas de los aislamientos fueron comparadas en homología con secuencias de bases de datos del banco de genes (NCBI Gen Bank) mediante el software BLAST, posteriormente se realizó el análisis filogenético en base a las inferencias de Neighbor-joining, Máxima parsimonia y máxima verosimilitud en el programa MEGA 6.0. Se seleccionaron las secuencias para el gen Factor de elongación, así como para el gen que codifica para calmodulina en base a la caracteriza-

ción morfológica observada, se utilizaron las que compartían caracteres de importancia y aquellas que tenían un antecedente en la zona y en el cultivo de acuerdo a la literatura citada.

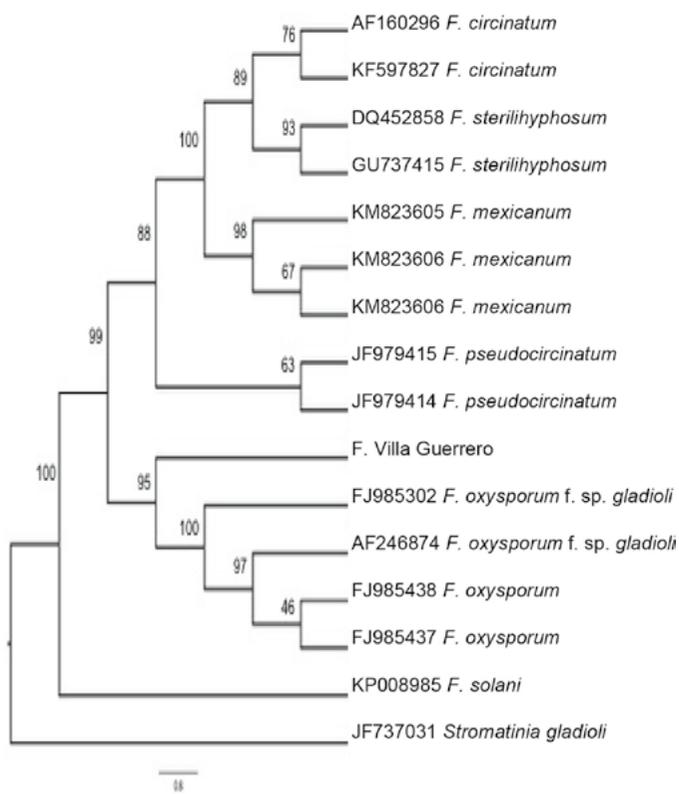
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis filogenético y taxonómico

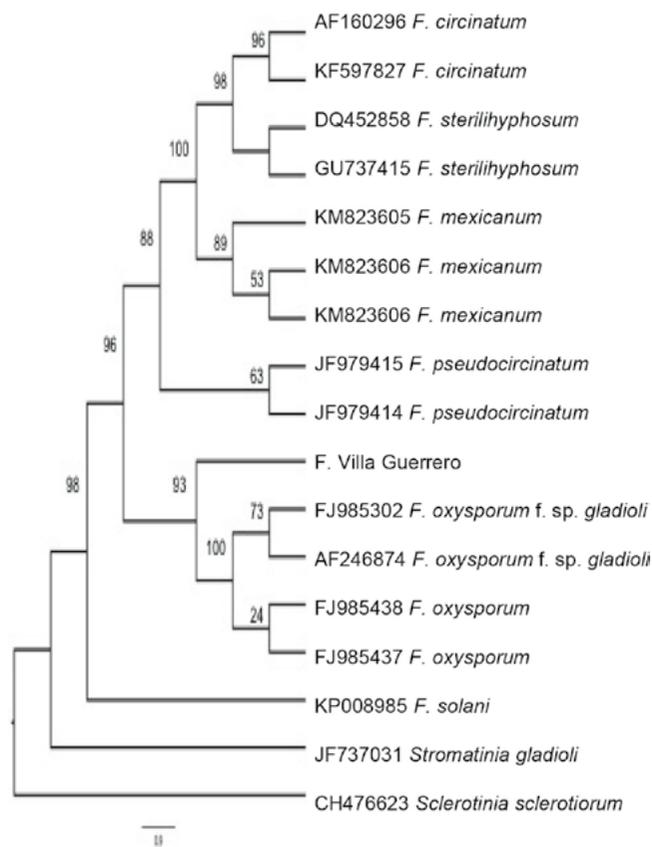
El ADN extraído se observó en gel de agarosa al 2% TAE, teñido con bromuro de etidio. La concentración del ADN fue de 5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y presentó una pureza de 1.8. La información generada por la secuenciación de los diferentes genes, así como la obtención de secuencias homólogas en el GenBank permitieron la construcción de árboles filogenéticos. Como se indica a continuación.

**Factor de elongación:** se obtuvieron fragmentos con un tamaño superior a los 600 pares de bases, los cuales fueron comparados en homología con análisis BLAST y se obtuvieron aquellas secuencias cuya similitud era superior al 97%. En el análisis por el método de Neighbor-Joining se resolvieron las especies *F. circinatum*, *F. sterilihyphosum*, *F. pseudocircinatum* y *F. mexicanum* agrupándose en clados monofiléticos, mientras que las

especies de *F. oxysporum* *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* se agruparon entre ellas. *F1 Villa Guerrero* a pesar de tener caracteres en común no fue resuelto, sin embargo se mantuvo junto a sus similares. Las especie de *F. solani* son un grupo sin resolver, y las especies del grupo externo *Stromantinia gladioli* y *Sclerotinia sclerotiorum* quedaron en clados aislados (Figura 1). En el caso del dendrograma que describe la relación de las secuencias del factor de elongación, obtenido por el método de máxima parsimonia, se encontró la formación de cinco clados. El clado I, contiene secuencias de especies *F. circinatum*, *F. sterilihyphosum*, *F. pseudocircinatum* y *F. mexicanum*, en el clado II se encuentra *F1 Villa Guerrero*, el tercer clado está conformado por *F. oxysporum* *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, en un cuarto clado sin resolver se encontró a *F. solani*, mientras que *Sclerotinia sclerotiorum* (grupo externo) se encontró en un quinto clado. Es importante resaltar que al igual que en el árbol obtenido por las secuencias del Factor de Elongación usando el método de Neighbor-Joining, no se evidenció relación de las agrupaciones resultantes con *F1 Villa Guerrero* a pesar de los caracteres en común que presentan (Figura 2).



**Figura 1.** Cladograma generado a partir de secuencias que codifican para el Factor de elongación mediante el análisis de Neighbor-joining con 500 repeticiones en bootstrap para 14 aislados de *Fusarium*, *Stromantinia gladioli* y *Sclerotinia sclerotiorum* representan grupos externos.



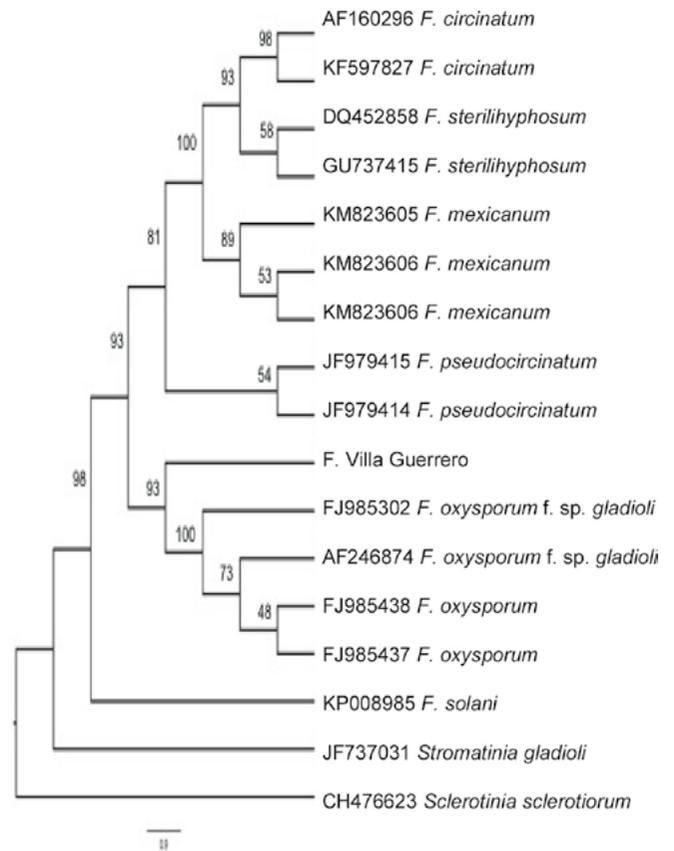
**Figura 2.** Cladograma generado a partir de secuencias que codifican para el Factor de elongación mediante el análisis de Máxima parsimonia con 500 repeticiones en bootstrap para 14 aislados de *Fusarium*, *Stromantinia gladioli* representa un grupo externo.

El cladograma producto del análisis de las secuencias que codifican para el Factor de Elongación con base en Máxima verosimilitud presentó a *F. circinatum*, *F. sterilihyphosum*, *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum* en un grupo monofilético, mientras que *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* y el aislado de *Fusarium* de Villa Guerrero se presentan en otro grupo, lo que hace suponer que estos comparten características moleculares que representan un alto porcentaje de similitud entre ellas (Figura 3).

**Calmodulina**

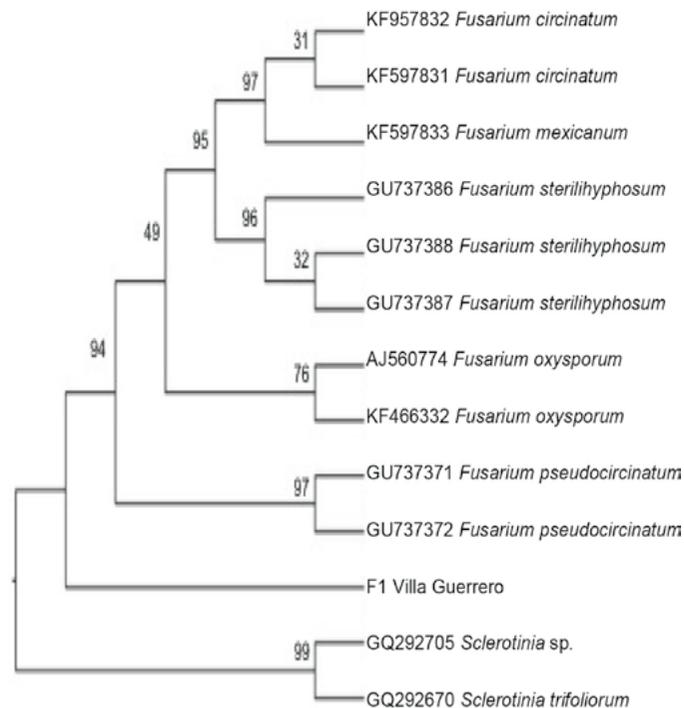
Se obtuvieron fragmentos superiores a los 600 pares de bases, los cuales fueron comparados en homología con análisis BLAST, y se obtuvieron aquellas secuencias cuya similitud era superior al 95%. Los análisis de neighbor-joining (Figura 4), máxima parsimonia (Figura 5) y máxima verosimilitud (Figura 6) para calmodulina presentaron topología similar, pero distinta a los observado para Factor de Elongación.

Las secuencias de *Fusarium* con hifas enrolladas (*F. circinatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. sterilihyphosum*) se agruparon entre ellas sin discriminar a *Fusarium oxysporum*, mientras que el aislado de *Fusarium* de Villa Guerrero quedó en un clado distante. En los tres análisis



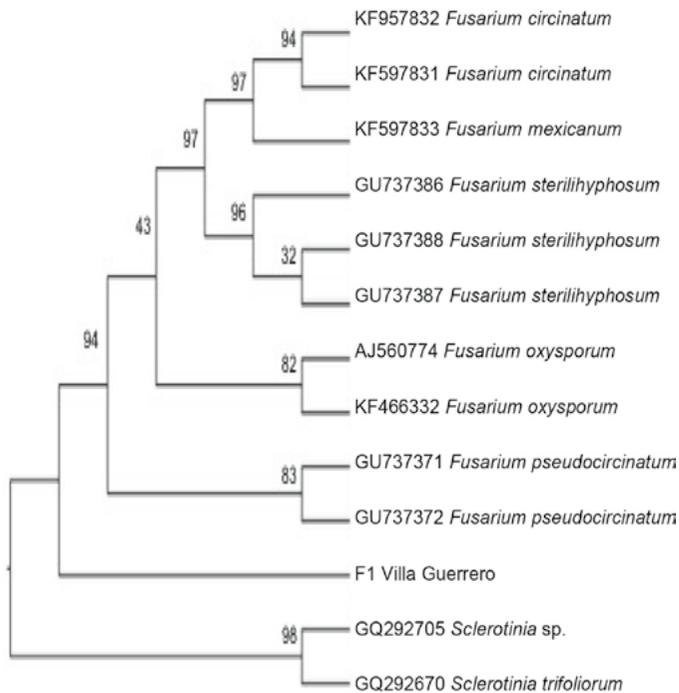
**Figura 3.** Cladograma generado a partir de secuencias que codifican para el Factor de elongación mediante el análisis de Máxima verosimilitud con 500 repeticiones en bootstrap para 14 aislados de *Fusarium*, *Stromatinia gladioli* y *Sclerotinia sclerotiorum* representan grupos externos.

se agrupa a *Sclerotinia* sp y *Sclerotinia trifoliorum* funcionando como grupo externo.



**Figura 4.** Cladograma generado a partir de secuencias que codifican para calmodulina mediante el análisis de Neighbor-joining con 500 repeticiones en bootstrap para 11 aislados de *Fusarium*, *Sclerotinia* sp. y *Sclerotinia trifoliorum* representan grupos externos.

Actualmente una de las regiones más utilizadas para la identificación de *Fusarium* a nivel de especie es el gen del factor de elongación de la traducción, otras regiones también estudiadas con este mismo fin incluyen, genes de apareamiento (MAT), genes que codifican para la Celobiosa-C y la Topoisomerasa II, el gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina, Calmodulina, entre otros (Atkins y Clark, 2004; Hatsch et al., 2004; Hinojo et al., 2004; Wilson et al., 2004; Bogale et al., 2006; Dyavaiah et al., 2007; Alustrey-Izquierdo et al., 2008). Sin embargo, se ha logrado demostrar la poca utilidad de las regiones ribosomales para la identificación de *Fusarium* a nivel de especie, debido a que son demasiado conservadas y por ende tienen menor capacidad de resolución lo que han generado taxonomías y filogenias erróneas además de poca confiabilidad en procesos de identificación (Sakai et al., 2006; Dyavaiah et al., 2007; Zaccardelli et al., 2008). En este estudio el análisis BLAST

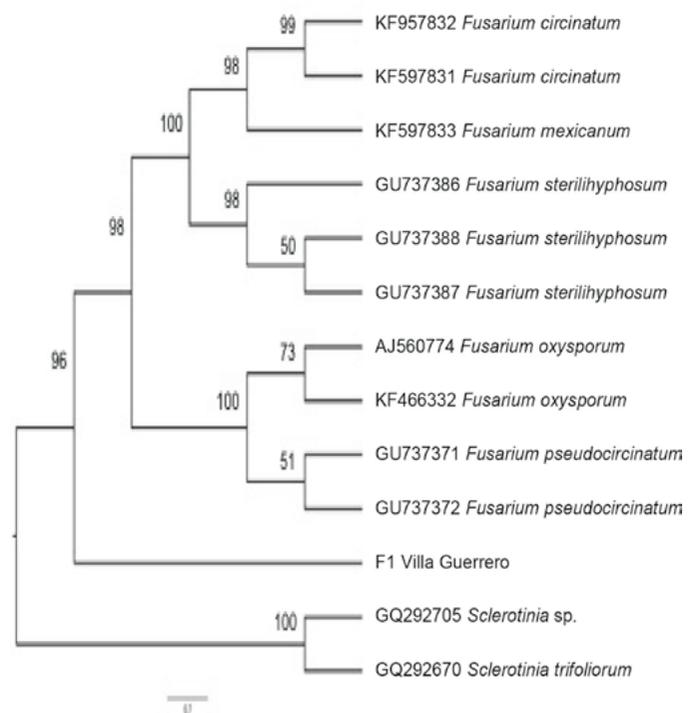


**Figura 5.** Cladograma generado a partir de secuencias que codifican para calmodulina mediante el análisis de Neighbor-joining con 500 repeticiones en bootstrap para 11 aislados de *Fusarium*, *Sclerotinia* sp. y *Sclerotinia trifoliorum* representan grupos externos.

de las secuencias del gen de factor de elongación en la base de datos de *Fusarium*, permitió identificar que en todos los aislamientos se trató de una especie de *Fusarium* cuyas características moleculares no coinciden con las reportadas para otras especies patógenicas en gladiolo. Las secuencias codificantes para calmodulina al ser analizadas por la herramienta BLAST en la base de datos de referencia *Fusarium*, no lograron identificar los aislamientos como miembros de especies reportadas para gladiolo.

## CONCLUSIONES

Las pruebas moleculares indican que hay una similitud de 96% a 99% con otras especies que presentan el carácter de hifas enrolladas, sin embargo, el análisis filogenético indicó que no hay similitud entre ellas. El análisis filogenético ubicó al aislado en estudio de *Fusarium* dentro de un grupo monofilético junto con las especies de *Fusarium oxysporum*, sin embargo, y de acuerdo a lo reportado por otros autores, estas carecen de hifas enrolladas. Con base en el análisis filogenético molecular se propone que es una nueva especie de *Fusarium* como agente causal de la secadera del gladiolo en Villa Guerrero, Estado de México.



**Figura 6.** Cladograma generado a partir de secuencias que codifican para calmodulina mediante el análisis de Neighbor-joining con 500 repeticiones en bootstrap para 11 aislados de *Fusarium*, *Sclerotinia* sp. y *Sclerotinia trifoliorum* representan grupos externos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos el apoyo económico proporcionado por el P/PROFOCIE-2014-16MSU0014T-04 (PIFI) y Proyecto 2014/2015 de la Coordinación de la Investigación científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

## LITERATURA CITADA

- Alastruey-Izquierdo A., Cuenca-Estrella M., Monzón A., Mellado E. 2008. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 805-809.
- Alves-Santos F.M., Martínez-Bermejo D., Rodríguez-Molina M.C., Díez J.J. 2007. Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Spain. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 26-32.
- Atkins S., Clark I. 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics* 45: 3-15.
- Bogale M., Wingfield B., Wingfield M., Steenkamp E. 2006. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR, and DNA sequence analyses. *Fungal Diversity* 23: 51-66.
- Betancourt R. I., Velázquez M. J., Montero C. J., Fernández P. S., Lozoya S. H., Rodríguez A. G. 2012. *Fusarium mexicanum*, agente causal de la malformación de Mango en Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:115-127.
- Booth C. 1986. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Reino Unido. 237 p.
- Cenis J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20: 2380.

- Coddington A., Gould D.S. 1992. Use of RFLPs to identify races of fungal pathogens. In: Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens. J. M. Duncan & L. Torrance, eds. British Society for Plant Pathology. Blackwell Science Publications, Oxford, Gran Bretaña. pp 162-176.
- Dyavaiah M., Ramani R. Chu D., Ritterband D., Shah M., Samsonoff W., Chaturvedi S., Chaturvedi V. 2007. Molecular characterization, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium* isolates from recent cases of fungal keratitis in New York State. BMC Ophthalmology 7: 1.
- Hatsch D., Phalip V., Jeltsch J.M. 2004. Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium*. Research in Microbiology 155: 290-296.
- Henson J.M., French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology 31: 500-504.
- Hinojo M., Llorens A., Mateo R., Patiño B., González-Jaén M., Jiménez M. 2004. Utility of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the intergenic spacer region of the rDNA for characterizing *Gibberella fujikuroi* isolates. Systematic and Applied Microbiology 27: 681-688.
- INEGI. 2011. Catálogo General de localidades. Unidad de microrregiones dirección general adjunta de planeación microrregional derechos reservados. <http://mapserver.inegi.org.mx>.
- Katan T., Di Primo P. 1999. Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Supplement Phytoparasitica 27:1-5.
- Leszczńska B.H., Borys W.M. 1994. Gladiolo. EDAMEX. México, Distrito Federal. 61 p.
- Knutsen A. K., Torp M., Holst-Jensen A. 2004. Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene, International Journal of Food Microbiology 95: 287-295.
- Llorens A., Hinojo M.J., Mateo R., Valle-Algarra F.M., González-Jaén M.T., Jiménez M. 2006. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). International Journal of Food Microbiology 106: 297-306.
- Martin R.R., Delano J. & Levesque C.A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. Annual Review of Phytopathology 38: 207-239.
- O'Donnell K., Gueidan C., Sink S., Johnston P.R., Crous P.W., Glenn A., Riley R., Zitomer N.C., Colyer P., Waalwijk C., van der Lee T., Moretti A., Kang S, Kim H.S., Geiser D.M., Juba J.H., Baayen R.P., Cromey M.G., Bithell S., Sutton D.A., Skovgaard K., Ploetz R., Kistler H.C., Elliott M., David M., Sarver B.A. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genetics and Biology 46: 936-948.
- Ortoneda M., Guarro J., Madrid M., Caracuel Z., Roncero M. I., Mayayo E., Di Pietro A. 2003. *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. Infection and immunity 72: 1760-1766.
- Sakai A., Ozeki Y., Sasaki Y., Suzuki C., Masui Y., Aihara M., Kikuchi Y., Takatori K. 2006. Identification of fungi using DNA sequences: an approach to identify *Fusarium* species isolated from domestic unpolished rice. Shokuhin Eiseigaku Zasshi 47: 268-76.
- Wilson A., Simpson D., Chandle E., Jennings P., Nicholson P. 2004. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. FEMS Microbiology Letters 233: 69-76.
- Zaccardelli M., Vitale S., Luongo L., Merighi M., Corazza L. 2008. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* isolates. Journal of Phytopathology 156: 534-541.

