



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ORIGINAL

Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México

Juan C. Delgado-Ortiz^a, Yisa M. Ochoa-Fuentes^{a,*}, Ernesto Cerna-Chávez^a, Mariana Beltrán-Beache^a, Raúl Rodríguez-Guerra^b, Luis A. Aguirre-Uribe^a y Otilio Vázquez-Martínez^c

^a Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México

^b Campo Experimental General Terán, INIFAP, General Terán, Nuevo León, México

^c Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Jesús María, Aguascalientes, México

Recibido el 6 de noviembre de 2015; aceptado el 12 de abril de 2016

PALABRAS CLAVE

Ajo;
Fusarium spp.;
Patogenicidad;
Identificación
molecular

Resumen El ajo en México es uno de los cultivos de hortalizas más rentables, más del 83% de esta superficie es aportada por los estados de Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Puebla, Baja California y Aguascalientes.

La pudrición basal ocasionada por *Fusarium* spp. se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial; esta enfermedad se ha convertido en una limitante en zonas productoras de cebolla y ajo, no solo en México, sino también en otros países. En México, se ha informado la presencia de *Fusarium oxysporum* en plantas en Guanajuato y en semillas de ajo en Aguascalientes. En el estado de Morelos se ha reportado la presencia de *Fusarium culmorum* en cultivares de cebolla. Asimismo, en Aguascalientes se tienen antecedentes de otras especies como *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* y *Fusarium acuminatum*. Para este trabajo se planteó como objetivo identificar las especies de *Fusarium* encontradas en los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes, y evaluar su patogenicidad. Se realizaron recolectas de plantas con síntomas de la enfermedad en los estados antes mencionados. De los muestreos realizados se identificaron las especies *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. acuminatum*; las cepas de Aguascalientes identificadas como AGS1A (*F. oxysporum*), AGS1B (*F. oxysporum*) y AGSY-10 (*F. acuminatum*) fueron las que presentaron bajo condiciones de invernadero un mayor índice de severidad.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: yisa8a@yahoo.com.mx (Y.M. Ochoa-Fuentes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.003>

0325-7541/© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: Delgado-Ortiz JC, et al. Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. Rev Argent Microbiol. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.003>

KEYWORDS

Garlic;
Fusarium spp.;
Pathogenicity;
Molecular
identification

Fusarium species associated with basal rot of garlic in North Central Mexico and its pathogenicity

Abstract Garlic in Mexico is one of the most profitable vegetable crops, grown in almost 5,451 ha; out of which more than 83% are located in Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Puebla, Baja California and Aguascalientes.

Blossom-end rot caused by *Fusarium* spp is widely distributed worldwide and has been a limiting factor in onion and garlic production regions, not only in Mexico but also in other countries. The presence of *Fusarium oxysporum* has been reported in Guanajuato and Aguascalientes. *Fusarium culmorum* has been reported in onion cultivars of Morelos; and *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* and *Fusarium acuminatum* have been previously reported in Aguascalientes. The goal of this work was identifying the *Fusarium* species found in Zacatecas, Guanajuato and Aguascalientes, to assess their pathogenicity. Plants with disease symptoms were collected from hereinabove mentioned States. The samples resulted in the identification of: *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* and *F. acuminatum* species; out of which Aguascalientes AGS1A (*F. oxysporum*), AGS1B (*F. oxysporum*) and AGSY-10 (*F. acuminatum*) strains showed higher severity under greenhouse conditions. © 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El ajo en México es uno de los cultivos de hortalizas más rentables, existen aproximadamente 5.451 de ha cultivadas; más del 83% de esta superficie es aportada por los estados de Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Puebla, Baja California y Aguascalientes²³. México se ubica como el vigésimo segundo país productor de ajo¹⁰.

Entre las principales enfermedades de origen fúngico que causan daños de importancia económica al cultivo se destacan la pudrición blanca (ocasionada por *Sclerotium cepivorum* Berk); sin embargo, también se presentan enfermedades causadas por cepas de *Botrytis* spp., *Sclerotium rolsfii*, *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp.²⁷; esta última ha tenido mayor incidencia durante los últimos años²⁶.

Fusarium es un género que cuenta con especies patógenas y especializadas, responsables de enfermedades en cultivos específicos¹⁴. La pudrición basal ocasionada por *Fusarium* spp. se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial y se ha convertido en una limitante en zonas productoras de cebolla y ajo¹³. Los muestreos en parcelas cultivadas con ajo perla y ajo morado permitieron concluir que *Fusarium* spp. fue el agente causal de la pudrición basal. Esta afección se manifiesta con coloraciones café en las puntas de las hojas, las que se van tornando rojizas o púrpuras cuando el patógeno logra extenderse hasta la base de las hojas. También puede haber enanismo en la planta, los bulbos esponjosos y tallos de consistencia blanda y raíces con coloraciones de color café a rojo²⁶. Algunas de las sintomatologías antes mencionadas han sido reportadas en plantas infectadas con *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani* y *Fusarium acuminatum* en Estados Unidos, Turquía, Venezuela, Uruguay, Países Bajos, Japón, Serbia, España y México^{3,4,6,9,11,15,17,19,21,25}. La pudrición basal del bulbo de cebolla (agente causal: *F. oxysporum* f. sp. *cepae*) y del

ajo (agente causal: *F. culmorum*)²⁴ pueden manifestarse en forma de daños por *damping-off* o una reducción en la germinación de la semilla⁶; los daños causados pueden llevar a una merma de rendimientos del 40%²⁴.

En muestreos de semillas de ajo originarias de Aguascalientes, México, Ochoa et al.¹⁹ identificaron morfológica y molecularmente —mediante ITS— *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. acuminatum* y *F. verticillioides*, mas no se evaluó la patogenicidad de las cepas encontradas. Para este trabajo se plantearon como objetivos identificar las especies de *Fusarium* halladas en los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes, así como evaluar la patogenicidad de cada una de las especies encontradas.

Materiales y métodos

Muestreo

La recolecta del material se realizó en los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes; en este último se realizó en el mes de enero del 2013 y en los 2 primeros en marzo de ese año (tabla 1). Se recolectaron de cada una de las parcelas 12 plantas con síntomas de la enfermedad y 3 aparentemente sanas, para descartar que existieran plantas asintomáticas.

Aislamiento

Se realizaron pequeños cortes de la zona de avance de la infección, donde el patógeno podría encontrarse en activo desarrollo (raíces con tejido con coloración café o rojiza), el material muestreado se desinfectó con hipoclorito sodio al 1% durante 3 min, se enjuagó en 3 ocasiones con agua destilada estéril y se sembró en placas de Petri con medio PDA (Bioxon®) adicionado con ácido láctico (200 µl de ácido

Tabla 1 Origen de las muestras

Número de localidad	Estado	Municipio	Coordenadas	
			Norte	Este
1	Zacatecas	Veta Grande	22° 53' 383	102° 25' 304
2	Zacatecas	Guadalupe 1	22° 56' 526	102° 21' 593
3	Zacatecas	Guadalupe 2	23° 00' 057	102° 19' 060
4	Zacatecas	Villa de Cos 1	23° 00' 556	102° 18' 384
5	Zacatecas	Villa de Cos 2	23° 10' 657	102° 25' 627
6	Zacatecas	Panuco	23° 02' 626	102° 27' 085
7	Zacatecas	Fresnillo	23° 08' 913	102° 43' 126
8	Zacatecas	Calera 1	23° 06' 413	102° 39' 503
9	Zacatecas	Calera 2	22° 57' 725	102° 43' 405
10	Zacatecas	Gral. Enrique Estrada	23° 02' 770	102° 42' 256
11	Guanajuato	Comonfort	20° 42' 232	100° 49' 981
12	Guanajuato	Celaya	20° 34' 839	100° 49' 400
13	Guanajuato	Cortazar 1	20° 26' 972	101° 00' 732
14	Guanajuato	Cortazar 2	20° 27' 871	100° 59' 220
15	Aguascalientes	Rincón de Romos	22° 14' 071	102° 17' 135
16	Aguascalientes	Rincón de Romos	22° 12' 098	102° 15' 977
17	Aguascalientes	Rincón de Romos	22° 13' 235	102° 15' 439

láctico al 85%). Las placas fueron incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días. Los cultivos puros en PDA fueron incubados a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Identificación a nivel de género

Esta se basó en la estructura y la composición de las conidias, las filídes y las clamidosporas descritas en las claves de Barnett y Hunter², y Nelson et al.¹⁸.

Obtención de cultivos monoconidiales

Luego de la identificación a nivel de género, se elaboraron cultivos monoconidiales con una suspensión de conidios, que fue dispersada en placas con medio PDA. A las 24 h, 4 conidios germinados fueron transferidos a PDA. Las colonias monoconidiales fueron transferidas al medio de cultivo Spezieller Nährstoffmarmar 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 20 g de agar en un litro de agua destilada) y mantenidas para su conservación bajo las condiciones antes mencionadas. A partir de estas colonias se llevó a cabo la identificación de especies.

Identificación a nivel de especie

Se realizó a partir de las colonias obtenidas en las placas de SNA mediante la observación de sus características microscópicas. La identificación se basó en lo indicado por el manual de laboratorio de Leslie y Summerell¹⁴.

Identificación molecular

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Doyle y Doyle modificado⁸. Se raspó el micelio de *Fusarium* spp. de una caja de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar. Se pesaron 0,2 g de micelio, que se

maceraron con una varilla esmerilada con 500 μl de regulador de extracción (Tris-HCl pH 8, 100 mM; EDTA pH 8,5, 50 mM; NaCl 50 mM y SDS 2%), se agitó en un vórtex durante 30 s y se dejó reposar en hielo 15 min. Se agregaron luego 500 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó en un vórtex; posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se le adicionó el mismo volumen de isopropanol, se dejó reposar por 15 min en hielo para posteriormente centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se recuperó la pastilla, la cual fue resuspendida en 50 μl de agua desionizada estéril. Se agregaron 10 μl de ARNasa y se incubó a 37°C durante 1 h. Finalmente se determinó la concentración de ADN y se diluyó hasta obtener la concentración adecuada para la reacción de PCR.

Se utilizaron iniciadores específicos para cada una de las especies de *Fusarium* identificadas morfológicamente; los iniciadores para *F. oxysporum* fueron CLOX1 (5'-GCAAAGCATCAGACCACTATACTC-3') y CLOX2 (5'-TTGTCAAGTAAGTGGACGTTGGTACT-3')¹², para *F. acuminatum* fueron FACF (5'-GGGATATCGGGCCTCA-3') y FACR (5'-GGGATATCGGCAAGATCG-3')¹, para *F. verticillioides* se emplearon los iniciadores VERT 1 y VERT2 (5'-GTCAGAATCATGCCAGAACG-3' y 5'-CACCCGAGCAATCCATCAG-3', respectivamente)⁶, mientras que para *F. proliferatum* se empleó PRO1 (5'-CTTCCGCCAAGTTTCTTC-3')²² y en el caso de *F. solani* se emplearon los primers TEF-Fs4f (5'-ATCGGCCACGTCGACTCT-3') y TEF-Fs4r (5'-GGCGTCTGTTGATTGTTAGC-3'), bajo las condiciones señaladas por Mohammad et al.¹⁶. Las PCR se realizaron en el termociclador modelo MaxyGen (Axygen®/EE. UU.).

Pruebas de patogenicidad en invernadero

La producción de plantas en invernadero se llevó a cabo en el Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; semillas de ajo variedad Ensenada

Tabla 2 Cepas empleadas en la prueba de patogenicidad en invernadero

Estado	Cepa ^a	Especie
Zacatecas	ZAC 1A	<i>F. proliferatum</i>
Zacatecas	ZAC 21B	<i>F. proliferatum</i>
Zacatecas	ZAC54A	<i>F. proliferatum</i>
Zacatecas	ZAC 124A	<i>F. verticillioides</i>
Zacatecas	ZAC75 A-2	<i>F. verticillioides</i>
Zacatecas	ZAC 43B	<i>F. verticillioides</i>
Zacatecas	ZAC13A	<i>F. oxysporum</i>
Zacatecas	ZAC54B	<i>F. oxysporum</i>
Zacatecas	ZAC66C	<i>F. oxysporum</i>
Zacatecas	ZAC52A	<i>F. solani</i>
Zacatecas	ZAC23A	<i>F. acuminatum</i>
Zacatecas	ZAC119A	<i>F. acuminatum</i>
Guanajuato	GTO 13 A-1	<i>F. proliferatum</i>
Guanajuato	GTO 10 A-2	<i>F. proliferatum</i>
Guanajuato	GTO 1 B-1	<i>F. proliferatum</i>
Guanajuato	GTO 1A	<i>F. verticillioides</i>
Guanajuato	GTO 10B	<i>F. verticillioides</i>
Guanajuato	GTO 58A	<i>F. verticillioides</i>
Guanajuato	GTO 1D	<i>F. oxysporum</i>
Guanajuato	GTO6B	<i>F. oxysporum</i>
Guanajuato	GTO 2D	<i>F. oxysporum</i>
Guanajuato	GTO 37B	<i>F. solani</i>
Guanajuato	GTO 12A	<i>F. solani</i>
Guanajuato	GTO 54A	<i>F. solani</i>
Aguascalientes	AGS 4C	<i>F. proliferatum</i>
Aguascalientes	AGS 9 A-1	<i>F. proliferatum</i>
Aguascalientes	AGS 8A	<i>F. proliferatum</i>
Aguascalientes	AGS 31 B-1	<i>F. verticillioides</i>
Aguascalientes	AGS 32 B-2	<i>F. verticillioides</i>
Aguascalientes	AGS 8B	<i>F. verticillioides</i>
Aguascalientes	AGS 1A	<i>F. oxysporum</i>
Aguascalientes	AGS 4A	<i>F. oxysporum</i>
Aguascalientes	AGS 1B	<i>F. oxysporum</i>
Aguascalientes	AGS 8 C-1	<i>F. solani</i>
Aguascalientes	AGS Y-10 ^b	<i>F. acuminatum</i>

^a Clave usada para denominar a las cepas aisladas, las 3 primeras letras identifican el estado, el número identifica a la muestra de la cual se aisló y la siguiente letra (o letra-número) designa la cepa por caja Petri después de la purificación.

^b Cepa proporcionada por la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (3%) durante 3 min y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Luego fueron sembradas en bolsas con sustrato estéril, 4 plantas por tratamiento. Los tratamientos consistieron en 12 cepas del estado de Guanajuato, 10 del estado de Aguascalientes, 12 del estado de Zacatecas y un testigo que fue inoculado con agua destilada estéril bajo condiciones controladas; al estudio se incluyó la cepa AGS Y-10, la cual fue aislada en semillas de ajo procedentes del estado de Aguascalientes por la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la cual fue usada para comparar la patogenicidad de la cepa ZAC119A. Estas cepas fueron seleccionadas aleatoriamente para representar a cada una de las especies encontradas en los 3

estados de México en estudio. En la [tabla 2](#) se muestra una lista de las cepas empleadas.

Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó de la siguiente manera: al micelio de las diferentes cepas se les agregó 50 ml de agua destilada estéril y se licuó, posteriormente se ajustó la suspensión de conidias a una concentración de 10⁶ conidias/ml, esto se realizó con la ayuda de un hematocitómetro.

Inoculación de las plantas

La inoculación se llevó a cabo cuando las plantas presentaron 3 hojas completamente abiertas, cada planta fue tratada alrededor del cuello (la zona donde cambia de color blanco a verde) y dicho inóculo fue cubierto con sustrato estéril, al testigo se le adicionó agua destilada estéril.

Se evaluó la reacción cada 24 h después de la inoculación, con la finalidad de describir la severidad de la enfermedad se recurrió a la escala utilizada por Velásquez y Medina²⁶, la cual consistió en 3 puntos: punto 1, planta sana; punto 3, planta con hojas amarillas o rojas, puntas púrpuras y/o daño en el cuello de la planta, y punto 5, planta muerta. Los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza para determinar los efectos de los aislados y se realizó una comparación de medias de Tukey al 0,05.

Resultados

Identificación morfológica

De los muestras se pudieron recuperar 147 cepas del género *Fusarium*, entre las cuales se logró identificar cinco especies: 1) *F. acuminatum*, que presentó macroconidias grandes y delgadas con 3 septos; su célula apical era cónica, estrecha y elongada, la célula basal con forma de pie, pero no tan prominente como las de otras especies relacionadas, además presentó cadenas largas o grupos de clamidosporas; 2) *F. oxysporum*, esta presentó micelio de coloración blanco-violeta o coloraciones en el agar violetas, rosadas, amarillas, marrones y, en algunos casos, no mostró pigmentación en el agar. Conidios en falsas cabezas, con monofialides cortas, abundantes microconidias elípticas compuestas por una o 2 células, macroconidias con la célula apical cónica y en algunas ocasiones se observó una especie de gancho, y la célula basal en forma de pie o en ocasiones pobremente desarrollada y la célula apical redondeada y de 3 a 4 septos, con clamidosporas de textura lisa; 3) *F. solani* exhibió coloraciones blancas, crema y café en el micelio y pigmentaciones de color crema, rosadas y marrón, conidios en falsas cabezas, con monofialides largas, microconidias ovaladas a elípticas constituidas por una o 2 células, macroconidias con la célula basal y la célula apical redondeadas, de 3 a 4 septos; también se observó la presencia de clamidosporas con apariencia lisa o rugosa en forma individual o en pares; 4) *F. proliferatum* presentó micelio en una gama de colores del blanco-violeta, con coloraciones moradas en el agar, además mostró largas cadenas de conidias en monofialides y polifialides, las microconidias exhibieron forma

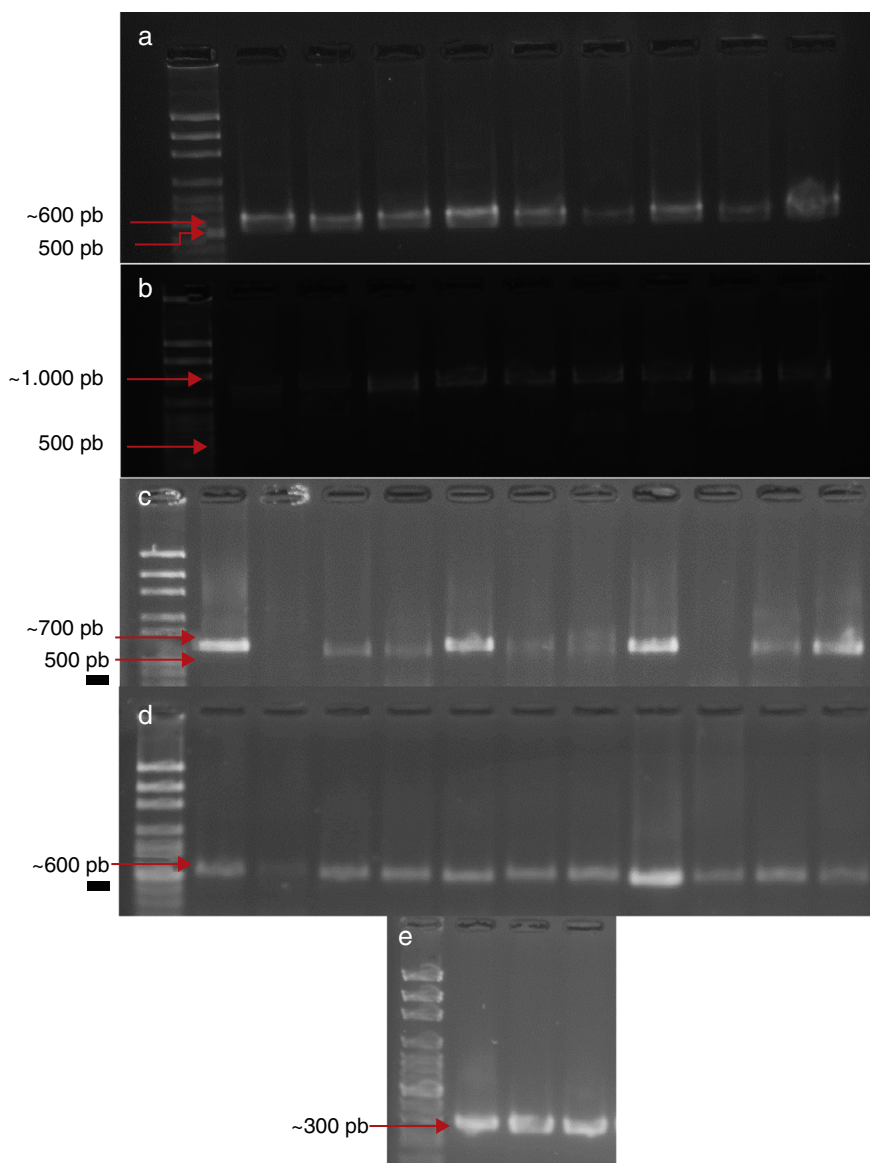


Figura 1 Productos de PCR para la identificación de *Fusarium* spp. Marcador de peso molecular de 100-3.000 pb. a) *F. proliferatum*. b) *F. verticillioides*. c) *F. solani*. d) *F. oxysporum*. e) *F. acuminatum*.

de mazo con la base aplanada y en algunas ocasiones se presentaron en forma de pera; además de presentarse en falsas cabezas, y 5) *F. verticillioides*, cuyo micelio presentó coloraciones blancas con amarillo y/o moradas; con pigmentaciones amarillas o moradas en el agar, microconidias en falsas cabezas y en largas cadenas de conidias en monofialides, en ocasiones se observó la presencia de hifas hinchadas con una apariencia similar a las clamidosporas^{2,7,14,19}.

La especie encontrada con mayor frecuencia fue *F. oxysporum* (36,05%), le siguió *F. proliferatum* (34,01%), *F. verticillioides* y *F. solani*, con 22,45% y 6,12%; respectivamente, y la menos frecuente fue *F. acuminatum* con un 1,36%.

Identificación molecular

De las 147 cepas obtenidas, 53 se alinearon con los iniciadores CLOX 1 y CLOX 2 para *F. oxysporum*; estas dieron un

producto de ~600 pb; 50 cepas con los iniciadores PRO1 y PRO2 para *F. proliferatum*, con un producto de ~600 pb; 33 cepas se identificaron como *F. verticillioides* con los iniciadores VERT 1 y VERT 2, con un producto de amplificación de entre 900-1.000 pb; 2 cepas se alinearon con los iniciadores FACH y FACR para *F. acuminatum*, dando como resultado un producto ~300 pb, y 10 cepas se identificaron como *F. solani*, con un producto ~700 pb (fig. 1).

Pruebas de patogenicidad

El análisis de varianza de los índices de severidad indicó que existe diferencia significativa (0,0439), con un coeficiente de variación de 51,56; las cepas AGS1A (*F. oxysporum*), AGS1B (*F. oxysporum*) y AGSY-10 (*F. acuminatum*) fueron las que manifestaron mayor severidad (tabla 3), mientras que el resto de las cepas evaluadas no mostraron diferencia significativa, a excepción del testigo, que presentó

Tabla 3 Comparación de medias del índice de severidad de los aislados de *Fusarium* spp

Cepa	Media	Agrupamiento ^a	
AGS1A	3,5	a	
AGS1B	3,5	a	
AGSY-10	3,5	a	
ZAC75A-2	3,0	a	b
AGS4A	3,0	a	b
GTO12A	3,0	a	b
GTO6B	3,0	a	b
AGS8B	3,0	a	b
GTO1B-1	3,0	a	b
GTO1D	3,0	a	b
AGS31B-1	3,0	a	b
ZAC52A	3,0	a	b
ZAC23A	3,0	a	b
ZAC54B	3,0	a	b
GT010B	2,25	a	b
GTO13A-1	2,25	a	b
AGS8C-1	2,25	a	b
GTO10A-2	2,25	a	b
GTO2D	2,25	a	b
GTO37B	2,25	a	b
ZAC21B	2,25	a	b
AGS4C	2,25	a	b
ZAC66C	2,25	a	b
GTO1A	2,25	a	b
ZAC199A	2,25	a	b
AGS9A-1	2,25	a	b
ZAC54A	2,25	a	b
GTO58A	2,25	a	b
ZAC124A	2,25	a	b
AGS8A	1,5	a	b
ZAC43B	1,5	a	b
ZAC1A	1,5	a	b
GTO54A	1,5	a	b
ZAC13A	1,5	a	b
AGS32B-2	0,75	a	b
TEST	0	a	b

^a Medias de índices de severidad con letra igual indican ausencia de diferencia significativa (Tukey 0,05).

diferencia significativa con el resto de las plantas en la prueba. Las primeras plantas en mostrar síntomas característicos de la enfermedad fueron las inoculadas con las cepas GTO54A (*F. solani*) y AGS1B (*F. oxysporum*); cabe mencionar que esta última fue una de las cepas que expresó mayor patogenicidad.

Discusión

Identificación morfológica

Las especies obtenidas en este estudio habían sido reportadas anteriormente por Ochoa et al.^{19,20} en semillas de ajo en el estado de Aguascalientes.

Identificación molecular

La identificación morfológica fue ratificada mediante PCR empleando *primers* específicos para cada especie. Se obtuvieron las bandas esperadas con los pesos descritos en la literatura^{12,16,22}, a excepción de *F. verticillioides*, de la cual se obtuvieron bandas de ~1.000 pb, lo que resulta superior a lo reportado⁶, y de *F. acuminatum*, de la cual se obtuvieron bandas de ~300 pb, tamaño inferior a lo esperado de acuerdo con lo que informaba la literatura¹.

La frecuencia con la que fueron encontradas las diferentes especies de *Fusarium* coincide con lo comunicado por Dissanayake et al.⁶ y Rabiei-Motlagh et al.²², quienes hallaron a *F. oxysporum* como el agente de mayor incidencia en cultivos de cebolla en Irán y Japón, además estos autores informaron la presencia de *F. solani*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides*. Sin embargo, Stankovic et al.²⁵ documentan que fue *F. proliferatum* la especie predominante en cultivos de ajo y cebolla en Serbia, y que con menor frecuencia aislaron *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. acuminatum* y *F. equiseti*. Montes et al.¹⁷ comunicaron la presencia de *F. culmorum* en cultivares de cebolla en el estado de Morelos, México; cabe recalcar que esta especie no fue encontrada en los muestreos realizados en este trabajo.

Pruebas de patogenicidad

Todas las plantas inoculadas comenzaron a mostrar síntomas a los 15 días de la inoculación, como coloraciones café iniciando por la punta de las hojas, las cuales comenzaron a tornarse rojizas a moradas; en el punto de inoculación algunas plantas mostraron una coloración morada y los tallos presentaron consistencia blanda^{5,26}.

La comparación de medias de los índices de severidad otorgados en las pruebas de patogenicidad demuestran que hay variación patogénica entre los diversos aislados de la misma especie y dentro de la misma localidad, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de la especie para generar los síntomas de la enfermedad de acuerdo a la variedad del hospedero²⁵. Esto concuerda con lo reportado por Dissanayake et al.⁶, quienes señalan a algunos aislados de *F. oxysporum* como los agentes con mayor índice de severidad. Estos autores a su vez reportan aislados de *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. solani* con menor capacidad patogénica.

Los resultados de la investigación señalan que AGSY-10 fue una de las cepas que mostró mayor patogenicidad, siendo esta cepa más patogénica que la cepa aislada en este estudio (ZAC119A); cabe mencionar que Stankovic et al.²⁵ aislaron de cebolla y ajo las siguientes especies: *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. acuminatum*, pero solo evaluaron la patogenicidad de las cepas identificadas como *F. proliferatum*.

En este trabajo se identificaron morfológicamente y molecularmente las especies *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. acuminatum*, esta última se halló solo en los estados de Zacatecas y Aguascalientes. Las cepas que mostraron mayor patogenicidad fueron AGS1A y AGS1B, pertenecientes a la especie *F. oxysporum*.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Abedi M, Kazem S. Morphological and molecular identification of *Fusarium* head blight isolates from wheat in north of Iran. *Australian Journal Crop Science*. 2012;6:1356–61.
2. Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Saint Paul, Minnesota: APS Press; 1998.
3. Bayraktar H, Türkkán M, Sara F. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* from onion in Turkey based on vegetative compatibility and rDNA RFLP analysis. *J Phytopathol*. 2010;158:691–7.
4. Cramer CS. Breeding and genetics of *Fusarium* basal rot resistance in onion. *Euphytica*. 2000;115:159–66.
5. Delgadillo SF. Enfermedades: descripción y tratamiento. En: Heredia E, Delgadillo F, editores. *El ajo en México. Origen, mejoramiento genético, tecnología de producción*. Libro Técnico Núm. 3. León, Gto., México: Campo Experimental Bajío-INIFAP; 2000. p. 102–71.
6. Dissanayake MLMC, Kashima R, Tanaka S, Ito S. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J Gen Plant Pathol*. 2009;75:37–45.
7. Domsch KH, Gams W, Anderson H. *Compendium of soil fungi*. New York. 1980. p. 1–2.
8. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12:13–5.
9. Dugan FM, Hellier BC, Lupien SL. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology*. 2003;52:426.
10. FAOSTAT [Faostat.fao.org]. Producción mundial de ajo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. [actualizado 2013; consultado 10 Nov 2013]. Disponible en: <http://faostat.fao.org>.
11. Galván GA, Koning CFS, Koopman WJM, Burger K, González PH, Waalwijk C, Kik C, Scholten OE. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*. 2008;121:499–512.
12. Gómez E. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis doctoral ingeniero agrónomo 2008. ANLIS «Rosa María Montes Estellés» y Universidad Politécnica de Valencia.
13. Kiehr M, Delhey R. *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. XII Congreso Latinoamericano-XXVIII Congreso Argentino de Horticultura, Argentina, 2005, p. HV13.Ciudad General Roca, Argentina.
14. Leslie JF, Summerell BA. *Species descriptions*. En: Leslie JF, Summerell BA, editores. *The Fusarium laboratory manual*. 11st edition Iowa: Blackwell Publishing; 2006, 388–121.
15. Martínez GE, Albarracín N, Arcia A, Subero L, Albarracín M. Pudrición basal del ajo causado por *Fusarium oxysporum*. *Agro-nomía Tropical*. 1995;46:265–73.
16. Mohammad A, Shilpi C, Zaidi NW, Rayar JK, Variar M, Singh US. Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. *Afri J Biotechnol*. 2012;11:444–7.
17. Montes R, Nava RA, Flores HE, Mundo M. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el estado de Morelos, México. *Rev Mex Fitopatol*. 2003;21:300–4.
18. Nelson P, Toussoun T, Marasas W. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. Universidad de Pensilvania; 1983. p. 40.
19. Ochoa YM, Cerna E, Gallegos G, Landeros J, Delgado JC, Hernández S, Rodríguez R, Olalde V. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo, en Aguascalientes, México. *Rev Mex Micol*. 2012;36:27–31.
20. Ochoa YM, Delgado JC, Cerna E, Hernández FD, Flores A, Gallegos G, Vázquez O, Rodríguez R. The first report of *Fusarium proliferatum* causing garlic bulb rots in Mexico. *Afr J Agric Res*. 2013;8:570–3.
21. Palmero D, Cara M, Nosir W, Gálvez L, Cruz A, Woodward S, González MT, Tello JC. *Fusarium proliferatum* isolated from garlic in Spain: Identification, toxigenic potential and pathogenicity on related *Allium* species. *Phytopathol Mediterr*. 2012;51:207–18.
22. Rabiei E, Falahati M, Rouhani H, Jafarpour B, Jahanbakhsh V. Root diseases of onion caused by some root colonizing fungi in Northeast of Iran. *American-Eurasian J Agric and Environ Sci*. 2010;7:484–91.
23. SAGARPA-SIAP. Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Sistema de información agroalimentaria y pesquera. Estadística pecuaria [actualizado 1 Ago 2012; consultado 10 Nov 2013]. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>.
24. Schwartz HF, Mohan K. *Compendium of onion and garlic diseases*. San Diego, California: Academic Press; 1995. p. 54.
25. Stankovic S, Levic J, Petrovic T, Logrieco A, Moretti A. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *Eur J Plant Pathol*. 2007;118:165–72.
26. Velásquez R, Medina MM. Características vegetativas y susceptibilidad de variedades de ajo (*Allium sativum* L.) infectadas por *Fusarium* spp. *Rev Mex Fitopatol*. 2004;22:435–8.
27. Velásquez R, Medina MM. Pudrición por *Fusarium*. En: Velásquez R, Medina MM, editores. *Guía para conocer y manejar las enfermedades más comunes de la raíz de ajo en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto para productores No 34. Campo Experimental Pabellón-CIRNOC-INIFAP. Aguascalientes, Aguascalientes, México, 2004.*