

ISBN: 970-27-0770-6

**ESTUDIO DE LAS POBLACIONES DE *Fusarium* (SECCIÓN *Liseola*) AISLADAS DE HÍBRIDOS DE MAÍZ CULTIVADOS EN PARCELAS EXPERIMENTALES DEL CUCBA.
CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS Y GENÉTICAS**

**Reynoso, Maria Marta; Figueroa Gómez Rosa Marina; Castro Zambrano César Enrique; González Castellanos Barbara; Reyes Velázquez Waldina Patricia.
Laboratorio de Residuos Tóxicos II, Depto de Salud Pública, CUCBA, UDG. Correo: waldinar@cucba.udg.mx**

Introducción

El maíz es uno de los cultivo de mayor importancia en México, representa el 43 % de la superficie cultivada y es el alimento básico para la población, correspondiendo al estado de Jalisco el primer lugar en producción, en el año 2002 se obtuvo 3,029,144 toneladas en una superficie de 651,077 hectáreas (SAGAR 2003).

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (= *Gibberella fujikuroi* población de apareamiento A; teleomorfo *G. moniliformis*) es la especie de *Fusarium* dominante en maíz, aunque *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (= *G. fujikuroi* población de apareamiento D; teleomorfo, *G. intermedia*) y *F. subglutinans* (Wollenweber and Reinking) Nelson, Tousson and Marasas (= *G. fujikuroi* población de apareamiento E; teleomorfo, *G. subglutinans*) también pueden aparecer en frecuencias significantes. Todas estas especies son heterotálicas típicas y tienen sistemas de apareamiento dimítico. Los metabolitos tóxicos producidos por estas especies son química y biosintéticamente diversos e incluyen compuestos tales como fumonisinas (FBs), ácido fusárico, moniliformina, fusaproliferina y beauvericina (Bottalico, 1998). Las FBs son las más predominates de dichas toxinas y son producidas principalmente por *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Nelson et al. 1983).

Comparar las poblaciones de campo puede ser difícil. El número efectivo de la población (N_e) es un concepto que se aplica a las poblaciones que se reproducen sexualmente, siendo un parámetro crítico usado para estimar los efectos del flujo genético e “inbreeding” entre los miembros de dicha población. En los ascomycetes heterotálicos, la frecuencia absoluta de cepas fértiles femeninas y la frecuencia relativa de cepas de diferentes tipos de apareamiento determinan el N_e . La evaluación de la frecuencia de hermafroditas junto con los cruzamientos sexuales es de valor para determinar la importancia en el ciclo de vida del hongo, de la reproducción sexual y asexual (Leslie y Klein, 1996). Nosotros hipotetizamos que las especies de *Fusarium* (sección *Liseola*) tienen una distribución cosmopolita en maíz, pero desde el punto de vista genético y de estudios de poblaciones tiene particularidades en región geográfica evaluada.

Los objetivos de este estudio fueron (i) determinar la frecuencia de infección de las especies de *Fusarium* en diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco, (ii) caracterizar las especies biológicas a través del análisis del número efectivo

de la población (N_e) en base al tipo de apareamiento y fertilidad femenina, (iii) determinar el perfil de producción de FBs de las especies biológicas.

Materiales y métodos

Muestreo. Las muestras se obtuvieron a partir de parcelas experimentales del CUCBA (Departamento de Producción Agrícola) ubicadas en el Km 15 de la carretera a Nogales pertenecientes a la cosecha agrícola 2003. Las muestras se obtuvieron con un diseño completamente al azar con una intensidad de muestreo del 0.7% (Delp et al. 1986). Las mazorcas de cada uno de los 7 híbridos de maíz se desgranaron y se formó una muestra compuesta, a partir de la cual se obtuvieron 4 submuestras de cada híbrido.

Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium*. De cada una de las submuestras se tomaron cien granos y se colocaron en el medio de Nash –Snyder para su aislamiento. La identificación morfológica de las cepas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Nelson *et al.* (1983).

Tipo de apareamiento y fertilidad femenina. Se determinó la población y tipo de apareamiento a través de cruzamientos sexuales siguiendo la metodología propuesta por Klittich y Leslie (1988). En los cruzamientos sexuales se utilizaron como parentales femeninas cepas testigos: M-0999 (*MATA-2*) y M-0149 (*MATA-1*); M-6992 (*MATD-2*) y M-6993 (*MATD-1*); M-3693 (*MATE-2*) y M-3696 (*MATE-1*) y como parentales masculinos, las cepas aisladas de los diferentes híbridos. La fertilidad femenina de las cepas pertenecientes a la población A se determinó realizando los cruzamientos sexuales recíprocos. Para estimar el N_e se usaron las ecuaciones propuestas por Leslie y Klein (1996). La frecuencia de hermafroditas observada se utilizó para estimar la longitud en generaciones asexuales del ciclo de vida en equilibrio (Leslie y Klein, 1996).

Producción de fumonisinas. Se evaluó la capacidad de producir FBs de cepas de *Fusarium*, población de apareamiento A (92), población de apareamiento D (7) y población de apareamiento E (25). Para la detección y cuantificación de las FBs se siguió la metodología propuesta por Shephard *et al.* (1990) modificada por Doko *et al.* (1995).

Análisis estadístico. Para analizar todos los datos obtenidos en el presente estudio se usó el programa estadístico Sigma Stat Versión 2.03 para Windows 95.

Resultados

La evaluación del grado de contaminación con especies de *Fusarium*, de las muestras de los siete diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco (Centro de Producción de Semillas del CUCBA), mostró un porcentaje de infección promedio en el medio Nash-Snyder del 52% (rango 39 – 63%) considerando granos dañados y asintomáticos (Tabla 1). *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, fue la especie predominante en todos los híbridos evaluados con un porcentaje promedio del 65% (rango 44 – 80%), seguida por *F. subglutinans* (Wallenweber and Reinking) Nelson, Tousson and Marasas (15 – 37%) y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (2 – 16%) (Tabla 1).

Entre las cepas de *Fusarium*, población de apareamiento A aisladas de maíz, los tipos de apareamiento *MATA-1* y *MATA-2* se distribuyeron en una proporción 7:110, mientras que en una proporción 13:1 y 20:3 para las poblaciones D y E, respectivamente. De las 117 cepas de la población A, se eligieron al azar 53 cepas para determinarles la fertilidad femenina, de las cuales 28 fueron hermafroditas. La proporción de los tipos de apareamiento *MATA-1* y *MATA-2* de las cepas fue diferente significativamente de 1:1 ($p < 0.05$), dando como resultado una disminución del $N_{e(mt)}$ al 23% mientras que el $N_{e(f)}$ fue 91%. En dicha población se observa una tasa de mutación de 0.63 de cepas fértiles femeninas a estériles femeninas por generación.

El rango de frecuencia de hermafroditas fue del 28 al 73% (valor observado: 53%), dicha frecuencia fue utilizada para estimar la longitud, en generaciones asexuales, y el rango de frecuencias de hermafroditas que podrían encontrarse en un ciclo en equilibrio. El número medio de generaciones asexuales por generación sexual fue de 16 a 62. Si la población recién ha completado la porción sexual del ciclo, la frecuencia de hermafroditas esperada variaría entre el 53 y el 73% antes del próximo ciclo de reproducción sexual, por el contrario, si la población fuera hacia la reproducción sexual, el número de hermafroditas podría incrementarse del 28 al 53%.

Tabla 1. Incidencia de *Fusarium* (Sección *Liseola*) en muestras de diferentes híbridos cosechados en una localidad del estado de Jalisco.

Híbrido	Infección con <i>Fusarium spp</i> ^a	Distribución de las especies ^a			
		<i>F. verticillioides</i> (número) ^b	<i>F. subglutinans</i> (número) ^b	<i>F. proliferatum</i> (número) ^b	Otros ^b (número) ^{b,c}
Lince	60 (45)	80 (36)	13 (6)	2 (1)	5 (2)
UDG 600	39 (40)	68 (27)	23 (9)	2 (1)	7 (3)
Alsa 036W	63 (43)	65 (28)	16 (7)	14 (6)	5 (2)
Lucero 801	60 (54)	74 (40)	15 (8)	11 (6)	-
Lucero 807	40 (27)	63 (17)	22 (6)	11(3)	4 (1)
Lucero 808	42 (32)	44 (14)	37 (12)	16 (5)	3 (1)
Lucero 901	63 (68)	59 (40)	26 (18)	9 (6)	6 (4)
Total de cepas	309	202	66	28	13

^a Los datos son expresados en porcentaje, son la media de 3 submuestras evaluadas; ^b Número total de cepas aisladas; ^c Especies de *Fusarium* no pertenecientes a la sección *Liseola*, incluyen *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. semitectum*.

Las 92 cepas de *Fusarium*, población de apareamiento A, evaluadas fueron capaces de producir FBs en niveles que variaban entre 17 y 4,956 $\mu\text{g/g}$ (media= 1,224 $\mu\text{g/g}$) (Tabla 2). No se observó diferencias significativas entre los niveles de FBs totales producidos por las cepas de *Fusarium*, población de apareamiento A, aisladas a partir de los diferentes híbridos. Las 7 cepas de *Fusarium*, población de apareamiento D, evaluadas produjeron FBs en niveles que variaron entre 248 y 4,001 $\mu\text{g/g}$ (media= 3,139 $\mu\text{g/g}$), mientras que de las 25 cepas de *Fusarium*, población de apareamiento E, 24 produjeron FBs (Tabla 2).

Discusión

La evaluación de los diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco presentó un alto porcentaje de infección con especies de *Fusarium*. *F. verticillioides* fue la especie predominante en todas las muestras evaluadas, seguida por *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. La alta incidencia de *F. verticillioides*, coincide con los pocos estudios realizados en México. Desjardins et al. (1994) analizaron cuatro muestras de maíz a cosecha del estado de Nuevo León (noreste de México) y aislaron a *F. verticillioides* como especie dominante, no encontrando ninguna otra especie perteneciente al género. Reyes (2001) analizó muestras de 3 variedades de maíz cosechadas en el estado de Jalisco (Huejotitán y Ameca) y también encontró que la incidencia de *F. verticillioides* (media=90%) fue elevada en ambas localidades independientemente de la variedad de maíz y del daño visual de las mazorcas.

Tabla 2. Producción de fumonisinas por cepas de *Fusarium*, población de apareamiento A, D y E, aisladas de maíz.

PA ^a (número) ^b	FB ₁ rango (µg/g) (media ± SD)	FB ₂ rango (µg/g) (media ± SD)	FB totales rango (µg/g) (media ± SD)
A (92/92)	14 – 3,997 (958 ± 879)	3 – 1,091 (301 ± 339)	17 – 4,956 (1,224 ± 1,189)
D (7/7)	209 – 4,175 (2,179 ± 1,312)	39 – 1,873 (1,120 ± 708)	248 – 4,001 (3,139 ± 2,052)
E (25/24)	68 – 699 (372 ± 130)	2 – 301 (41 ± 92)	68 – 1,000 (389 ± 171)

^a PA: Terminología propuesta por Leslie (1991), la letra A, D y E indican la población de apareamiento (especie biológica) dentro del complejo *Gibberella fujikuroi* a la cual pertenecen las cepas; ^b Cepas productoras/total de cepas evaluadas. SD: desviación estándar. Límite de detección para FBs: <1 µg/g.

La proporción de los tipo de apareamiento *MATA-1:MATA-2* fue diferente significativamente de 1:1 ($p < 0.05$). En teoría, en los Ascomycetes filamentosos el tipo de apareamiento está controlado por un único locus con dos alelos y, la distribución de los alelos debería ser 1:1 (Leslie y Klein, 1996). Una desviación de dicha relación estaría influenciando el proceso de reproducción sexual, dicho efecto puede evaluarse a través del estudio del número efectivo de la población basado en el tipo de apareamiento, $N_{e(mt)}$. El valor de $N_{e(mt)}$ fue muy diferente a los valores obtenidos para otras especies pertenecientes a la población A aisladas de maíz de Costa Rica, USA y Argentina (Chulze et al. 2000, Danielsen et al. 1998, Leslie y Klein, 1996; Reynoso et al. 2005). Por el contrario, la alta frecuencia de cepas hermafroditas (53%), favorecería a dicha población ya que estaría aportando gametas femeninas y una fracción de las gametas masculinas de la próxima generación. La alta frecuencia de hermafroditas y la presencia de ambos tipos de apareamiento, sugiere que la reproducción sexual en esta población estaría favorecida en condiciones de campo, obteniendo dicha población diversidad genotípica por

recombinación sexual y mayores ventajas de adaptación a las presiones de selección. El número efectivo de la población en base a la frecuencia de hermafroditas indicaría que dicha población estaría establecida en condiciones de campo.

Una variabilidad similar en la producción de FBs ha sido observada por otros autores (Desjardins *et al.*, 1994; Leslie *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1991; Reynoso *et al.*, 2002) entre cepas de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* aisladas de varios sustratos de diferentes regiones (España, México, USA, África, Asia, Australia y Argentina). Los bajos niveles de FBs producidos por *F. subglutinans* concuerdan con los datos obtenidos por cepas aisladas en USA, México, Sudáfrica, Europa, Nepal, Argentina y España. Sin embargo, la presencia de *F. subglutinans* en las muestras de maíz no debería ser desestimada, considerando la potencialidad de dicha especie de producir otras toxinas como moniliformina (MON) y beauvericina (BEA) (Logrieco *et al.* 1998).

Bibliografía

- Bottalico, A. (1998). *J. Plant Pathol.* **80**: 85-103.
- Chulze, S.N.; Ramírez, M.L.; Torres, A.; Leslie, J.F. (2000). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5312-5315.
- Danielsen, S; Meyer, U.M.; Funk Jensen, D. (1998). *Plant Pathology* **47**: 615-622.
- Delp, B. R.; Stwell, L. J.; Marois, J. (1986). *Phytopathology* **76**:1299-1305.
- Desjardins, A.E.; Plattner, R.D.; Nelson, P.E. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1695-1697.
- Doko, B.; Rapior, S.; Visconti, A.; Schjoth, J. (1995). *J. Agric. Food Chem.* **43**: 429-434.
- Klittich, C.J.R.; Leslie, J.L (1988). *Genetics* **118**: 417-423.
- Leslie, J. F.; Doe, F. J.; Plattner, R. D.; Shackelford, D. D.; Jonz, J. (1992). *Mycopathologia* **117**: 27-45.
- Leslie, J.F.; Klein, K.K. (1996). *Genetics* **144**: 557-576.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; KostECKI, M.; Golinski, P; Ritieni, A.; Chelkowski, J. (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3084-3088.
- Nelson, P. E.; Plattner, R. D.; Shackelford, D. D.; Desjardins, A. E. (1991). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2410-2412.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium species An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State. University Press. University Park.
- Reyes V., W. P. (2001). Detección del hongo *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz y efecto de la nixtamalización sobre la producción de sus hidrolizados. Tesis Doctoral, Universidad de Guadalajara. Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México.
- Reynoso, M.M.; Torres, A.M.; Chulze, S.N. (2005). *Plant Pathol J.*. En prensa.
- Reynoso, M. M.; Torres, A. M.; Chulze, S. N. (2004). *Mycol. Res* **108**: 154-160.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2003). <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Shephard, G.S.; Sydenham, E.W.; Thiel, P.G.; Gelderblom, W.C.A. (1990). *J. Liq. Chromatogr* **13**: 2077-2080.