TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR (*Fusarium* spp) AISLADO DE TRIGO Y VALUACIÓN DE SU QUIMIOTIPO

José Gómez-Espinoza[1,2], Miguel Ángel Guzmán-Altamirano[3], Alda Alejandra Arratia Castro[4] y María Guadalupe Gómez-Espinoza[5*]

[1]Campo Experimental Bajío-INIFAP, Carretera Celaya San Miguel de Allende Kilómetro 6.5, Celaya, Guanajuato, [2]Departamento de Posgrado, TecNM-Roque, carretera Celaya-Juventino Rosas Km 8, Roque, Celaya Guanajuato, México, [3]Departamento de Ing. mecatrónica, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico superior de Irapuato, carretera Irapuato-Silao km 12.5, Col. El Copal, Irapuato, Guanajuato MÉXICO [4]Departamento de Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica de Pénjamo. Carretera Irapuato-La piedad km 44, predio El Derramadero, Pénjamo, Guanajuato, México CP 36921. [5]Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Pénjamo. Carretera Irapuato-La piedad km 44, predio El Derramadero, Pénjamo, Guanajuato, México CP 36921 Correo para correspondencia: *g.gomez@uppenjamo.edu.mx

RESUMEN

En México, el trigo, es un cereal de importancia comercial, sin embargo, se han presentado problemas de secadera, la cual se atribuye al género *Fusarium*, aunado a ello este género es productor de micotoxinas, las cuales pueden afectar la salud humana e incrementar la virulencia del patógeno. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente una cepa de *Fusarium* spp aislada de trigo y evaluar su quimiotipo. Para ello la cepa de *Fusarium* spp se creció en medio PDA y el micelio obtenido se empleó para la extracción de ADN, este se amplifico con los primers ITS para determinar el género y especie, así como con los primers para identificar el quimiotipo, los productos de PCRs amplificados con los ITS obtenido se secuenciaron y la secuencia se comparó con la base de datos de NCBI mostrando un 99 % de identidad con *Fusarium proliferatum*, el mismo ADN se amplifico con diversos primers para identificar el quimiotipo y se identificó que la cepa es 15-Ac-DON. Esto nos indica el potencial toxigenico de las especies que infectan el trigo en la región de Guanajuato.

Palabras clave: *Fusarium proliferatum, quimiotipo, virulencia*

ABSTRACT

In Mexico, wheat is a cereal of commercial importance; however, drying issues have been reported, which are attributed to the *Fusarium* genus. In addition, this genus is known to produce mycotoxins, which can affect human

health and increase the pathogen's virulence. Therefore, the objective of this study was to molecularly characterize a strain of *Fusarium* spp. isolated from wheat and to evaluate its chemotype. To this, the *Fusarium* spp. strain was grown on PDA medium, and the resulting mycelium was used for DNA extraction. The DNA was amplified using ITS primers to determine the genus and species, and with specific primers to identify the chemotype. The PCR products amplified with ITS primers were sequenced, and the resulting sequence was compared with the NCBI database, showing 99% identity with *Fusarium proliferatum*. The same DNA was then amplified with various primers to determine the chemotype, identifying the strain as 15-Ac-DON. This indicates the toxigenic potential of the species infecting wheat in the Guanajuato region.

Key words: *Fusarium proliferatum, chemotype, virulence*

INTRODUCCIÓN

Los cereales son la fuente de alimentos más importante del mundo para el consumo humano, después del maíz y el frijol, el trigo es una de las tres fuentes más importantes de nutrientes de bajo costo en la dieta del mexicano, tanto el cultivo como su procesamiento y consumo, generan una importante derrama económica y un gran número de empleos (Acuayte-Valdés et al., 2018). Sin embargo, este cereal se ve afectado por la secadera, causada por las especies de *Fusarium* causan reducción de rendimiento y al mismo tiempo afecta a la calidad del grano, ya que frecuentemente lo contaminan con micotoxinas que resultan ser tóxicas para los humanos y los animales. En 1973 Takumi Yoshizawa determinó que los responsables de una toxicosis humana fueron los metabolitos secundarios de *F. graminearum* conocidos como 3-DON. En Canadá fue hasta en 1980 cuando se evaluó que las cepas de *F. graminearum* responsables de una epidemia producían 15-Ac-DON. Sin embargo, la región no delimita la producción de 3-AcDON o 15AcDON, debido a que en un estudio realizado en Estados Unidos en el 80% de las cepas produjo 15-AcDON y el 20% 3-AcDON (Meyer y Cols 2014). Las micotoxinas pueden afectar negativamente a la salud humana y animal, estos metabolitos pueden provocar diarrea, vómitos, leucocitosis y hemorragias gastrointestinales en dosis bajas, pero pueden causar cáncer, inmunosupresión, alteraciones endocrinas y la muerte en dosis altas y/o crónicas (Gómez-Espinoza et al., 2024a). Respecto con la contaminación del grano con micotoxinas, se relacionan con la virulencia de las cepas. Lo anterior debido a, que la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) HOG1 se encontró asociada con la agresividad y la producción de deoxinivalenol (DON) en *F. culmorum (Castiblanco et al., 2017).* Por otra parte, la producción de fumonisinas es asociada con el incremento de la capacidad de infección de *F. verticillioides* (de la Torre-Hernández et al., 2014). Las micotoxinas que se encuentran en los granos dependen de las especies de *Fusarium*; en este sentido, se ha informado de que las especies de *Fusarium* causantes de FHB pueden variar en función de la región, en el estado de Guanajuato una

especie con alta incidencia es *F. proliferatum* (11.53 %) y se encuentra en 11 de los 20 municipios productores (Gómez-Espinoza et al., 2024b). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente una cepa de *Fusarium* spp. aislada de trigo y la evaluar su quimiotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización molecular y de quimiotipo; La cepa denominada A11 fue obtenida de trigo, morfológicamente caracterizada como *Fusarium* spp., para la identificación molecular y del quimiotipo se creció la cepa aislada de *Fusarium* en medio PDA y a los 5 días se obtuvo el micelio, este se macero y se realizó la extracción del ADN con el método CTAB 3% (Zhang et al., 1998). Posteriormente con el ADN se realizó un PCR empleando los primers enlistados en la tabla 1. La reacción de PCR se llevó en un volumen total de 25 µL [50 mM KCl, 10 mM Tris HCL (pH 8.3), 0.2 mM de dNTP's y 1.5 mM de MgCl2, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, número de catalogo 10342053), 10 pmol de cada primer y aproximadamente 30 ng de ADN]. La calidad del ADN y de los productos de PCR fueron visualisados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y 2 % respectivamente. Los productos de PCR para la región ITS se secuenciaron mediante el método de didesoxinucleótidos marcados en un secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI (nucleotide blast).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización molecular. La amplificación del ADN con los ITS, se observó aproximadamente a 650 pb, al comparar la secuencia con la base de datos se observó un 99.43% de identidad con *Fusarium proliferatum*, estos resultados coinciden los de (Rangel-Castillo et al., 2017) (Leyva-Mir et al., 2017)(Mariscal-Amaro et al., 2017) reportan a *F. proliferatum* en el Bajío. Respecto al quimiotipo, para Fumonicina (FUM) no se observó amplificación, mientras que para verificar la precencia del quimiotipo DON/NIV, se amplificó mediante PCR con los primers ToxP1/P2 en los cuales si el quimiotipo es DON se espera un amplicon de 360 pb y si es NIV de 300 pb, mientras que con los primers GzTri7f1/r1 para don el amplicón es de 173 pb y para NIV de 327 pb. En la Figura 1, se puede observar un producto de 150 pb para los primes GZ y uno de 350 pb para Tox, lo que nos confirma el quimiotipo DON. Posteriormente para saber si es 15-AcDON o 3-acDON, se amplifico con los primers Tri303F/R donde se espera un amplicon de 586 pb y con los primers Tri315F/R se espera un amplicon de 860 pb en la figura 2, el

TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

quimiotipo mostrado fue 15-AcDON ya que se obtuvo un aproximado de 850 pb. En el cuadro 1, se puede observar el resumen de la amplificación.

Cuadro 1. Primers empleados en el estudio y quimiotipo obtenido

Quimiotipo	Primer	Par de primers	secuencia	Amplicon obtenido	Amplicon esperado(pb)	Referencia
ITS	ITS	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	(+)		White et al., 1990
		ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'			
FUM	Rp	Rp32	5'-ACAAGTGTCCTTGGGGTCCAGG-3´	(-)	600	Zhou y cols 2018
		Rp33	5´-GATGCTCTTGGAAGTGGCCTACG-3			
DON/NIV	GzTri7	GzTri7f1	5´-GGCTTTACGACTCCTCAACAATGG-3´	(+) 150pb	173-327	Lee, 2001
		GzTri7r1	5´-AGAGCCCTGCGAAAGCACTGGTGC-3´			
NIV/DON	Tox	ToxP1	5´-GCCGTGGGGTAAAAGTCCAAA-3´	(+) 350 pb	300-360	Lee, 2001
		ToxP2	5´-TGACAAGTCCGGTCGCACTAGCA-3´			
3-AcDON	Tri3	Tri303F	5´-GATGGCCGCAAGTGGA-3´	(-)	586	Jennings, 2004
		Tri303R	5´-GCCGGACTGCCCTATTG-3´			
3-AcDON	MinusTri7	MinusTri7F	5´-TGGATGGATGACTTGAGTTGACA-3´	(-)	483	Ward, 2002
		MinusTri7R	5´-AAAGCCTTCATTCACAGCC-3´			
15-AcDON	Tri315	Tri315F	5´-CTCGCTGAAGTTGGACGTAA-3´	(+) 860 pb	864	Jennings, 2004
		Tri315R	5´-GTCTATGCTCTCAACGGACAAC-3´			

A nivel agroindustrial, el problema persiste, debido a que se ha demostrado que las micotoxinas, no se degradan por métodos convencionales de procesamiento de alimentos y resisten elevadas temperaturas. Diversos estudios muestran la presencia de estos metabolitos en diversos alimentos procesados, por ejemplo, se ha encontrado deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV) en cervezas (Pernica et al., 2019), al igual que sus formas modificadas [(deoxinivalenol-3-glucósido (DON-3G), nivalenol-3-glucósido (NIV-3G), 3-acetildesoxinivalenol (3-AcDON)] (Ksieniewicz-Woźniak et al., 2019). Por otra parte, las micotoxinas fumonisina B1, la zearalenona, el desoxinivalenol, la toxina T-2, asi como sus formas modificadas deoxinivalenol-3-glucósido, 3-acetil-deoxinivalenol, β-zearalenol, fumonisina B_1 hidrolizada y la toxina HT-), se detectaron en alimentos infantiles procesados (Chilaka et al., 2019). Asimismo, se detectó DON, en cereales comerciales (Omurtag & Beyoğlu, 2003), sin embargo, no solo la ingesta directa de alimentos producidos con el grano contaminado, resultan fuente de contaminación debido a que los animales que las ingieren, las almacenan en tejidos como musculo e hígado (Tardieu et al., 2019). Por tanto, resultan un potencial toxigenico, tanto los residuos forrajeros agrícolas, como el grano contaminado por especies del género *Fusarium*. Esto evidencia la necesidad de buscar métodos de control eficientes, para reducir el crecimiento del hongo y disminuir la concentración de micotoxinas en la segunda zona productora de trigo del país.

TecNM/Roque, Celaya, Guanajuato, 12-14 mayo 2025 ISSN 2448-6620

CONCLUSIONES

La cepa aislada de trigo y caracterizada molecularmente como *Fusarium proliferatum*, muestra potencial toxigenico, aunado a que los reportes bibliográficos refieren esta especie como una de las más incidentes, se requiere un método de control eficiente para la inhibición del crecimiento del fitopatógeno, así como para la producción de micotoxinas por este.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuayte-Valdés E; Sandoval-Islas S; Carballo-Carballo A; Villaseñor-Mir E; Leyva-Mir SG; Vargas-Hernández M (2018). Áreas para producción de semilla de trigo en Valles Altos Centrales de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9(4): 737–746. https://doi.org/10.29312/remexca.v9i4.1391

Castiblanco V; Marulanda JJ; Würschum T; Miedaner T (2017). Candidate gene based association mapping in Fusarium culmorum for field quantitative pathogenicity and mycotoxin production in wheat. BMC Genetics, 18(1), 49. https://doi.org/10.1186/s12863-017-0511-9

Chilaka CA; De Boevre M; Atanda OO; De Saeger S (2019). Fate of Fusarium mycotoxins during processing of Nigerian traditional infant foods (ogi and soybean powder). Food Research International, 116, 408–418. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.055

De la Torre-Hernández MaE; Sánchez-Rangel D; Galeana-Sánchez E; Plasencia-de la Parra J (2014). Fumonisinas -Síntesis y función en la interacción Fusarium verticillioides-maíz. TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas, 17, 77–91.

Gómez-Espinoza MG; Arratia-Castro AA; Guzmán-Altamirano MÁ; Rodríguez-Guerra R (2024a). Frequency and pathogenicity of Fusarium Species in wheat spike: preliminary results. Agrociencia, 1–12. https://doi.org/10.47163/agrociencia.v58i6.2779

Ksieniewicz-Woźniak E; Bryła M; Waśkiewicz A; Yoshinari T; Szymczyk K (2019). Selected Trichothecenes in barley malt and beer from poland and an assessment of dietary risks associated with their consumption. Toxins, 11(12), 715. https://doi.org/10.3390/toxins11120715

Leyva-Mir SG; Vega-Portillo HE; Villaseñor-Mir H E; Tlapal-Bolaños B; Vargas-Hernández M; Camacho-Tapia M; Tovar-Pedraza JM (2017). Caracterización de especies de Fusarium causantes de pudrición de raíz del trigo en El Bajío, México. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, ahead, 0–0. https://doi.org/10.4067/S0719-38902017005000404

Mariscal-Amaro LA; Solís-Moya E; Leyva-Mir SG; Anaya-López JL; Villaseñor-Mir HE (2017). Micoflora asociada a manchas y tizones foliares en trigo (Triticum aestivum L.) de riego en El Bajío, México. Agrociencia, 51, 189–200. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000200189&lng= es&nrm=iso

Omurtag GZ; Beyoğlu D (2003). Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in processed cereals and pulses in Turkey. Food Additives and Contaminants, 20(4): 405–409. https://doi.org/10.1080/0265203031000082512

Pernica M; Piacentini KC; Benešová K; Čáslavský J; Běláková S (2019). Analytical techniques for determination of mycotoxins in barley, malt and beer: A review. KVASNY PRUMYSL, 65(2): 46–57. https://doi.org/10.18832/kp2019.65.46

Rangel-Castillo AE; Valadez-Moctezuma E; Saldaña HL (2017). Molecular characterization and pathogenesis of Fusarium associated to wheat yellowing. Revista Fitotecnia Mexicana, 40(4): 439–450. https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/40-4/8a.pdf

Tardieu TM; Le Bourhis; Guerre (2019). Fumonisin B1, B2 and B3 in Muscle and liver of broiler chickens and turkey poults fed with diets containing Fusariotoxins at the EU maximum tolerable level. Toxins, 11(10): 590. https://doi.org/10.3390/toxins11100590

White TJ; Bruns T; Lee S; Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Zhang YP; Uyemoto JK; Kirkpatrick BC (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. J Virol Methods, 71(1): 45–50. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0