



Artículo Científico

Diversidad y taxonomía de *Fusarium solani* aislado de plantas marchitas de *Agave tequilana* var azul

Viviana Montaña-Becerra¹, Norma Alejandra Mancilla-Margalli², Cristina Chávez-Sánchez¹, Martín Eduardo Avila-Miranda^{1*}. ¹Laboratorio de Fitopatología, ²Laboratorio de Bioquímica Vegetal. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 carretera a San Miguel Cuyutlán, Talajomulco de Zuñiga, Jalisco, México, CP. 45640.

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. El objetivo del trabajo fue identificar 24 cepas de *F. solani* aisladas de agave con marchitez, respecto a las nuevas especies filogenéticas; determinar su semejanza molecular con f. spp. de *F. solani*; determinar su diversidad genética y su capacidad patogénica en agave, frijol (*Phaseolus vulgaris*) y maíz (*Zea mays*).

Materiales y Métodos. Secuencias del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de 24 aislados de agave y de las f.spp. de *F. solani*, se compararon con el GenBank y FUSAROID-ID. Secuencias amplificadas del 18S rRNA, se alinearon con secuencias reportadas de *F. solani* f. spp. *phaseoli* y *batatas*, definiendo presencia de intrones. Se determinó diversidad genética con el marcador de DNA RepPCR. Cepas representativas se confrontaron con plántulas de agave, frijol y maíz, evaluando su patogenicidad como severidad de pudrición radicular.

Resultados. Aislados morfológicamente identificados como *F. solani*, el GenBank los ubicó como *F. solani* o incluidos en el FSSC, tres cepas se identificaron como *Xenoacremonium* sp. FUSAROID-ID definió que las secuencias de *F. solani* eran altamente similares a las de *Neocosmospora martii*, *N. pseudoradicicola*, *N. solani* y *N. falciformis*. Las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 y ausencia de intrones en su SSU, indicó que ninguno es *F. solani* f.sp. *phaseoli*. Aislados obtenidos de agave fueron patogénicos a *A. tequilana* y a un cv de maíz criollo, pero no a maíces con resistencia a *Fusarium*. Ningún aislado de agave fue patogénico a frijol.

*Autor de
correspondencia:
Martín Eduardo
Avila-Miranda
martin.am@tlajomulco.
tecnm.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
30 Noviembre, 2023

Aceptado:
16 Septiembre, 2024

Publicado:
25 Octubre, 2024
Adelantada, 2025

Cita:
Montaña-Becerra V,
Mancilla-Margalli NA,
Chávez-Sánchez C y
Avila-Miranda ME. 2025.
Diversidad y taxonomía de
Fusarium solani aislado de
plantas marchitas de *Agave
tequilana* var azul.
Revista Mexicana de
Fitopatología 43(1): 36.
[https://doi.org/10.18781/R.
MEX.FIT.2310-5](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2310-5)



Conclusiones. Cuatro especies filogenéticas del FSSC provocan pudrición radicular en agave; aislados de *F. solani* de agave no afectaron a maíces resistentes a *Fusarium*. Es seguro intercalar frijol en el cultivo de agave.

Palabras clave: *Neocosmospora*, Rep-PCR, f. sp., *phaseoli*.

INTRODUCCIÓN

El tequila es considerado la bebida alcohólica mexicana por excelencia. En 2022, se utilizaron 2.61 millones de toneladas de “piñas” de agave tequilero (*Agave tequilana* var. azul), su materia prima imprescindible, alcanzándose un volumen histórico de producción de 651 millones de litros de tequila, de los cuales el 64% fue exportado (CRT, 2023). El cultivo requiere seis años para madurar y en ese lapso es susceptible a la marchitez del agave, enfermedad en la que *Fusarium oxysporum* provoca una marchitez vascular o *Fusarium solani* induce una pudrición radicular, letales a la madurez, reducen drásticamente la producción (Aceves, 2003; Avila-Miranda *et al.*, 2010; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2017). *F. solani* es un hongo necrotrófico, que forma monofialides largas con microconidios apicales no catenulados y macroconidios tipo *Fusarium*. (Leslie y Summerell 2006; Schroers *et al.*, 2016), pero análisis filogenéticos indicaban que integrantes de esta especie, conformaba el complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC), diverso y sin tipificación específica (Coleman *et al.*, 2009; Nalim *et al.*, 2011; O’Donnell, 2000; O’Donnell *et al.*, 2008; Short *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2006). Por lo que recientemente, para estabilizar la taxonomía y nomenclatura del FSSC, se reconocieron especies filogenéticas que se incluyeron en el género *Neocosmopora* (Sandoval-Denis *et al.*, 2019, Crous *et al.* 2021) o en el género *Fusarium* (Geiser *et al.* 2021). Sin embargo, la patogenicidad vegetal del FSSC, continua ambigua, ya que si bien, durante más de 50 años, se han descrito once formas especiales (f. spp.) con capacidad patógena específica a un grupo estrecho de especies hospederas denominadas: *phaseoli*, *pisi*, *cucurbitae*, *batatas*, *radicicola*, *robiniae*, *mori*, *piperis*, *eumartii*, *xanthoxyli* and *glycines* (Snyder y Hansen, 1941; McClure, 1951; Sakurai y Matuo, 1959; Sakurai y Matuo, 1961; Matuo y Sakurai, 1965; Roy *et al.*, 1989), pero en 2017 se reportaban más de 1,000 relaciones patogénicas de *F. solani*, con más de 500 especies de plantas hospederas (Farr y Rossman, 2017).

Como estrategia de manejo de la marchitez del agave cuando incrementa a niveles antieconómicos, se realiza rotación de cultivos, siendo el maíz (*Zea mays*) el principal cultivo alternante, aunque existe reportes de epidemias severas, aun después de años de rotación. Así mismo, se recomienda sembrar frijol (*Phaseolus vulgaris*) como cultivo entre hileras en los primeros años, para mejorar el manejo

de maleza y anticipar un beneficio económico en el largo ciclo del agave (Herrera-Pérez, 2017). Considerando la escasa información de *F. solani* como fitopatógeno del agave tequilero, este estudio tuvo como objetivos: Definir la taxonomía de 24 cepas identificadas morfológicamente como *F. solani*, obtenidas de plantas de agave tequilero con marchitez y síntomas de pudrición de raíz y corona, secuenciando el fragmento conservado del ADNr ITS1-5.8S-ITS2 y comparando estas secuencias en la base de datos FUSAROID-ID para ubicarlas taxonómicamente considerando su similitud de secuencias con las nuevas especies filogenéticas reportadas a partir de complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC); con estas mismas secuencias, se buscó relacionar 24 cepas de agave, con las 11 f. spp. de *F. solani*, y definir con base a la presencia de intrones en la subunidad 18S del ADNr (SSU), su similitud molecular con la f. sp. *phaseoli* que es patogénica a frijol. Adicionalmente, se buscó definir la diversidad genética del genoma completo, utilizando huellas génicas de amplificación de fragmentos repetidos Rep-PCR y a partir del análisis de su diversidad, determinar la capacidad patogénica de cepas representativas, sobre plantas de agave, maíz y frijol, para constatar o definir su condición de hospederos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de plantas de Agave con síntomas

Se muestrearon campos comerciales de nueve municipios de Jalisco, México y un campo cultivado de *A. americana* con síntomas similares en Comitán, Chiapas, México. Los muestreos estaban encaminados a obtener plantas de agave tequilero con síntomas de marchitez y necrosis rojiza en la base del tallo y corona (Figura 1 A y B), con la finalidad de obtener aislamientos de *Fusarium solani*.

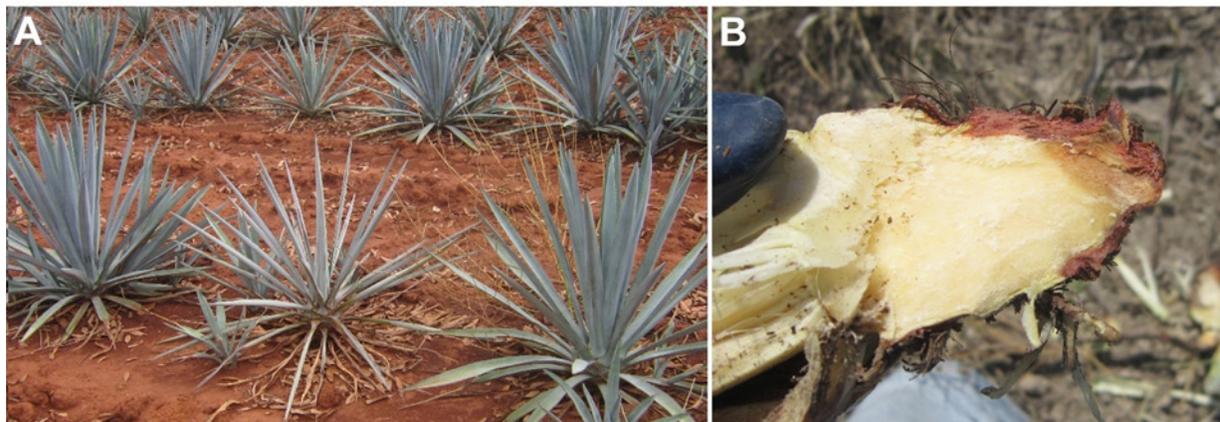


Figura 1. Apariencia de las plantas de las que se obtuvieron los aislados *Fusarium solani* A) Planta de *Agave tequilana* var. azul, con síntomas de marchitez del agave. B) Tejido necrótico rojizo típico en la corona y base del tallo.

Se obtuvieron fragmentos de tejido interno sano, contiguo a tejido necrótico de la base del tallo o la corona (Figura 1B). Los fragmentos se desinfectaron en una mezcla cloro, alcohol y agua estéril (1:1:8, v/v/v) por 1.5 min. y se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) incubando a 28 °C por siete días. Se seleccionaron hongos con conidióforos largos con un solo microconidio en el ápice, preferentemente con macroconidios tipo *Fusarium* (Figura 2 A y B) (Booth, 1971; Leslie y Summerell, 2006).

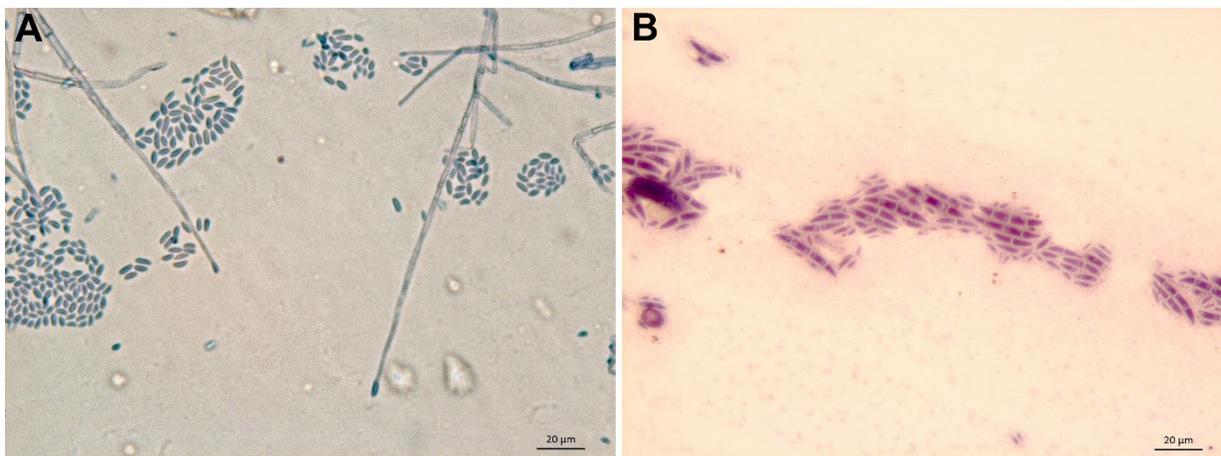


Figura 2. Microfotografía de las principales características morfológicas usadas para identificar aislados de *Fusarium solani* obtenidos de tejido necrótico en corona o base del tallo de plantas de *Agave tequilana* var. azul. A). Conidioforos largos con solo un microconidio. B) Macroconidios tipo *Fusarium*.

Para generar micelio, los aislados se sembraron sobre círculos de celofán dulce estéril, colocado sobre PDA, incubando diez días a 27 °C. El micelio se criofracturó en nitrógeno líquido, extrayéndole el ADN utilizando el protocolo de Zymo Research Plant/Seed DNA MiniPrep®, Cat. No. D6020. Su integridad y pureza se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBER® safe Invitrogen DNA gel stain, evidenciada con un transiluminador de luz azul Dark Reader®.

Utilización de marcadores moleculares de ADN

Como marcadores moleculares de ADN se utilizaron: El fragmento ITS1-5.8S-ITS2, que se obtuvo con los iniciadores ITS1 (5'-TCCTCCGCTTATYGATATGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), y la subunidad pequeña del ADN_r (SSU) amplificando con los iniciadores NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTG-TCTC-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (White *et al.*, 1990). La reacción de PCR se llevó a cabo en un cóctel de 50 µL que contenía: 30 µL de agua

desionizada, 10 µL de buffer de reacción 5X MyFi® (1 mM de dNTPs y 3 mM de MgCl₂), 2 µL (1 µL por cada iniciador a 20 µM), 2 µL de MyFi® ADN polimerasa Boline™ y 6 µL del ADN templado. La amplificación se realizó en un termociclador Gradient Palm (Corbett Life Sciences™) con el programa de amplificación siguiente: Una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, anillamiento a 61 °C durante 2 min y extensión a 72 °C durante 2 min y una extensión final a 72 °C por 6 min. Las amplificaciones se evidenciaron en gel de agarosa al 1% teñido con SYBER®safe y foto documentando con una cámara Canon Powershot A620. El tamaño de los amplificadores se determinó comparándolos con el marcador de ADN HyperLadder 100bp plus de Boline®. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV (Irapuato, Guanajuato, México).

Para definir la ubicación taxonómica molecular de las cepas, el fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de cada cepa, se comparó con la colección de nucleótidos (nr/nt) del GenBank, obteniendo reportes de secuencias altamente semejantes con la herramienta Mega BLAST. Adicionalmente, se obtuvieron las secuencias de este mismo fragmento, que fueron agregadas al GenBank por O'Donnell *et al.* (2008), Lombard *et al.* (2015), Rupe *et al.* (2001), Suga *et al.* (2000b) y Zaccardelli *et al.* (2008) de las 11 f. spp. de *F. solani* reportadas a la fecha: *batatas*, *cucurbitae*, *eumartii*, *glycines*, *mori*, *phaseoli*, *piperis*, *pisi*, *radicicola*, *robiniae* y *xanthoxyli*. Todas las secuencias mencionadas, se compararon en la base de datos FUSARIOID-ID (<https://www.fusarium.org/page/Pairwise%20ID>) para asociarlas a especies filogenéticas definidas a partir del FSSC (Crous *et al.*, 2021). Con el programa Mega 11, se obtuvo un árbol filogenético agrupado por el método UPMGA, definiendo su distancia evolutiva por el método de Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2021).

Para analizar el fragmento SN5-SN8 incluido en la secuencia de la SSU de las cepas aisladas de agave, estas se alinearon con el programa Mega 11 (Tamura *et al.*, 2021), alineando con ellas a las secuencias del fragmento SN5-SN8 de tres cepas de la f. sp. *phaseoli* con los números de acceso en el Gen Bank AF150481, AF150482, AF150483 y de la f. sp. *batatas* con el número de acceso AF150485 (Suga *et al.*, 2000a). Esta estrategia se realizó con el fin de corroborar en las alineaciones, la presencia de intrones en este fragmento de la SSU en la f. sp. *phaseoli*, y determinar su ausencia en la f. sp. *batatas* considerando que este es un rasgo conservado en f. spp. de *F. solani*, que ayuda a su identificación molecular (Suga *et al.*, 2000a) y de esta forma se podría determinar la presencia de intrones y la longitud del inserto en pb, en las cepas de *F. solani* obtenidas de *A. tequilana*.

Para determinar la diversidad del genoma completo de las cepas, se generaron huellas génicas de fragmentos repetidos con el marcador de ADN Rep-PCR, utilizando los iniciadores 1R (5'- IIIIC GICGICATCIGGC-3') y REP 2I- (5' IC-GICTTATCIGGCCTAC-3') (Versalovic *et al.*, 1991) y el protocolo de Rademaker

y de Brujin (1998) para amplificar, con algunas modificaciones. El cóctel de PCR (25 μ L) contenía 2.5 μ L de buffer10X (500 mM KCl y 100 mM Tris-HCl [pH 8.3], 100 μ L de gelatina, 1% de Tritón, 1.5 mg/mL de BSA), 2.5 μ L de dNTPs 2 mM, 1.25 μ L de MgCl₂ 1,5 mM, 2 μ L de 0.25 μ M de cada iniciador, 0.5 μ L de 5U de Taq ADN polimerasa Amplificasa® (BioTecMol) y 3 μ L del DNA. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización a 95 °C por 6 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 6 min, anillamiento a 40 °C durante 1 min, extensión a 65 °C durante 8 min y una extensión final a 65 °C durante 16 min. Las huellas génicas se evidenciaron en geles de agarosa al 2.1%, con electroforesis a 4 °C, 40V y 40 mA durante 20 h. La diversidad determinó en base a matrices estandarizadas de presencia–ausencia de fragmentos amplificados de diferente número de pb, con relación al marcador de peso molecular HyperLadder100bp plus de Bioline®. Se generó un árbol filogenético de coeficiente de disimilaridad del promedio de distancias Manhattan, mediante el método de Neighbor-Joining, utilizando el programa NTSYSpc versión 2.21 (Rohlf, 2009).

Pruebas de patogenicidad

Con el fin de evaluar la patogenicidad de cepas representantes de la diversidad genética de *F. solani*, en tres bioensayos independientes, plantas de *Agave tequilana*; Plántulas de maíz de los híbridos Magno (Aspros®), Ocelote y Faisán (Asgrow®) reportadas como resistentes a pudrición radicular por *Fusarium* y una variedad tradicional de maíz “Morado”; además de plántulas de frijol “Flor de Mayo”, fueron inoculadas con las cepas FsH, FsC1, FsC7 y FsCA. Adicionalmente se desarrollaron plantas de las tres especies que no fueron inoculadas y se evaluaron como control no inoculado (NI). Las confrontaciones se evaluaron mediante un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las plantas se establecieron en invernadero, en macetas con sustrato de turba y suelo arenoso, esterilizado en horno a 100 °C por 24 h. El inóculo de cada cepa se creció en PDA durante 10 días, pregerminando una suspensión de conidios, agitándola en medio sintético mínimo (Okon *et al.*, 1973) a 150 rpm y 28 °C durante 12 h. Se inoculó el sustrato con 4 x 10⁵ conidios/mL, colocando 1 ml de la suspensión en tres puntos equidistantes de la planta, sin herir raíces. La severidad de pudrición radicular se cuantificó como porcentaje de la longitud necrosada internamente, de diez fragmentos de raíz de 10 cm de longitud por planta. Los tratamientos se evaluaron 90 días después de la inoculación (DDI) en plantas de agave y 42 DDI días en plantas de maíz y frijol. El análisis estadístico se realizó con Proc ANOVA y prueba de medias de Duncan a un nivel de significancia de P ≤ 0.05 con el programa SAS versión 9.0 (The SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 24 aislados identificados morfológicamente como *F. solani* (Cuadro 1). Todos aislados de plantas de agave con marchitez. Las colonias de las cepas FsP1, FsDr y FsCA, tenían un diámetro claramente menor al crecerse en medio PDA después de 5 días (Figura 3 A), en comparación del diámetro alcanzado por el resto de las cepas (Figura 3 B).

Cuadro 1. Denominación de las cepas de *F. solani* y *Xenoacremonium* spp. y la ubicación de los campos comerciales de *Agave tequilana* var azul, de donde se obtuvieron los aislados de *Fusarium solani*, ordenada por municipio y zona productora en Jalisco, México.

Cepa de <i>F. solani</i>	Municipio, Estado	Zona productora de agave
FsF, FsG, FsH, FsP1, FsP2, FsP4	Acatic, Jal.	Altos Sur
FsP	Tototlán, Jal.	Ciénega
FsC	Tepatitlán, Jal.	Altos Sur
FsQ	Atotonilco, Jal.	Ciénega
FsO	Tecolotlán, Jal.	Sierra de Amula
FsA, FsK	Tala, Jal.	Valles
FsC7	Comitán, Chis.	
FsDr	San Gabriel, Jal.	Sur
FsCR, FsM, FsI	Teuchitlán, Jal.	Valles
FsA3, FsCA, FsC1, FsD2, FsM1, FsSub, F3	Zapotlanejo, Jal.	Centro

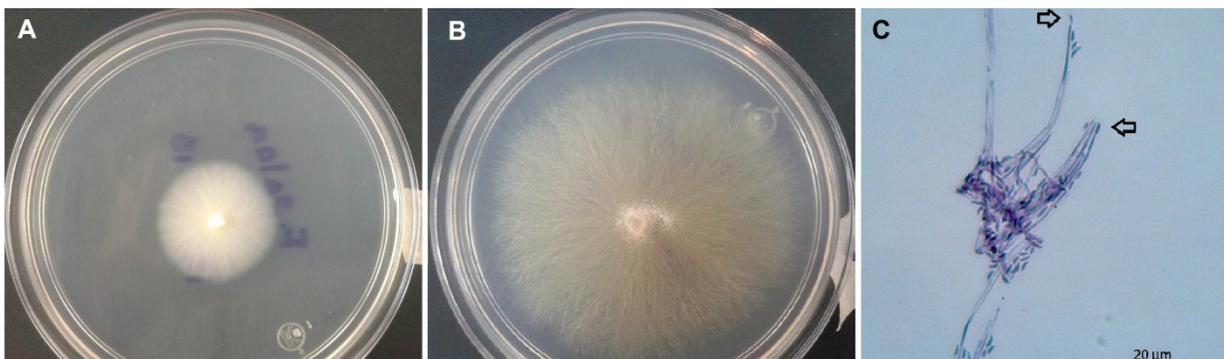


Figura 3. Apariencia de colonias fúngicas después de cinco días de crecimiento en PDA a 28 °C. A) Cepa FsDr molecularmente identificada como *Xenoacremonium* sp. y B) Cepa FsP de *Fusarium solani*. C) Microfotografía de micelio y conidios de la cepa FsDr con ausencia de macroconidios.

Se secuenció el fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de los aislados obtenidos de plantas de *Agave tequilana* y estas secuencias se integraron a la base datos del GenBank con las claves de acceso: FsCR MK027255; FsP2 MK027256; FsC1 MK027257;

FsM MK027258; FsSub MK027259; FsA3 MK027260; FsD2 MK027261; FsM1 MK027262; FsP4 MK027263; FsF3 MK027264; FsA KU878136; FsC KU878137; FsF KU878138; FsG KU878139; FsH KU878140; FsK KU878141; FsO KU878142; FsP KU878143; FsQ KU878144; FsC7 KU878145; XP1 MK027287; XCA MK027288; XDr MK027289. Al compararse estas secuencias con la colección de nucleótidos (nr/nt), se ratificó molecularmente la taxonomía de 21 aislados como *F. solani* e integrantes del FSSC, por coincidir con entre 47 y 242 reportes de secuencias altamente similares. Las cepas FsCA, FsDr y FsP1, con los mismos criterios de búsqueda, no fueron altamente similares con *F. solani* o el FSSC, en cambio sí lo fueron con el género *Xenoacremonium*, con 15 reportes y 17 de alta similitud con *Xenoacremonium falcatum* y *X. recifei*, que aunado a las características morfológicas antes descritas y a la descripción de Lombard *et al.* (2015) se consideró que taxonómicamente no eran *F. solani*. Cuando el fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de los aislados identificados como *F. solani*, se compararon con la base de datos FUSARIOID-ID, se ubicaron taxonómicamente en el género *Neocosmospora* de acuerdo con las nuevas especies filogenéticas (Sandoval-Denis *et al.*, 2019; Geiser *et al.*, 2021). Por lo que las 21 cepas de *F. solani*, se subdividieron en: *Neocosmospora falciformis* (syn de *Fusarium falciforme*) FsM1, FsP, FsD2, FsI, FsA3 y FsC1; *N. solani* (syn de *F. solani*) FsP4, FsF3; *N. martii* (syn de *F. martii*) FsQ, FsP2, FsC7, FsC, FsCr y *N. pseudoradicicola* (syn de *F. pseudoradicicola*) FsK, FsH, FsG, FsF, FsA, FsSub, FsO y FsM. Esta subclasificación taxonómica permitió una mayor definición de su diversidad, a diferencia de solo considerarlas como *F. solani*. El dendograma de distancia evolutiva generado con las secuencias del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de las 21 cepas (Figura 4), evidenció una distancia considerable con la mayoría de las f. spp., con excepción de f. sp. *eumartii* que se ubicó contigua a las cepas de *N. martii* y la f. sp. *radicicola* que se ubicó entre las cepas de *N. falciformis*. Todas las cepas aisladas de plantas de *Agave tequilana* estuvieron evolutivamente distantes de la f.sp. *phaseoli*. Según reportan O'Donnell *et al.* (2000); Suga *et al.* (2000b) y Zaccardelli *et al.* (2008), cepas de distintas f. spp. de *F. solani* tienden a agruparse cercanas, cuando se analizan filogenéticamente sus secuencias de ITSs y se consideran especies biológica y filogenéticamente distintas (Coleman, 2016). Sin embargo, las cepas obtenidas de agave, no se podrían considerar una forma especial, por ser de cuatro especies filogenéticas distintas, sin especificidad patogénica, ya que a su vez todas comparten al agave tequilero como hospedero, comportándose como necrotróficos de amplio rango de hospederos (Mengiste, 2012).

Se obtuvieron las secuencias de la SSU del DNAr de las 21 cepas de *F. solani* y se incluyeron en la base de datos del GenBank con los siguientes números de acceso: FsC1 MK027267; FsA MK027268; FsA3 MK027269; FsH MK027270; FsO MK027271; FsG MK027272; FsF MK027273; FsF3 MK027274; FsD2 MK027275;

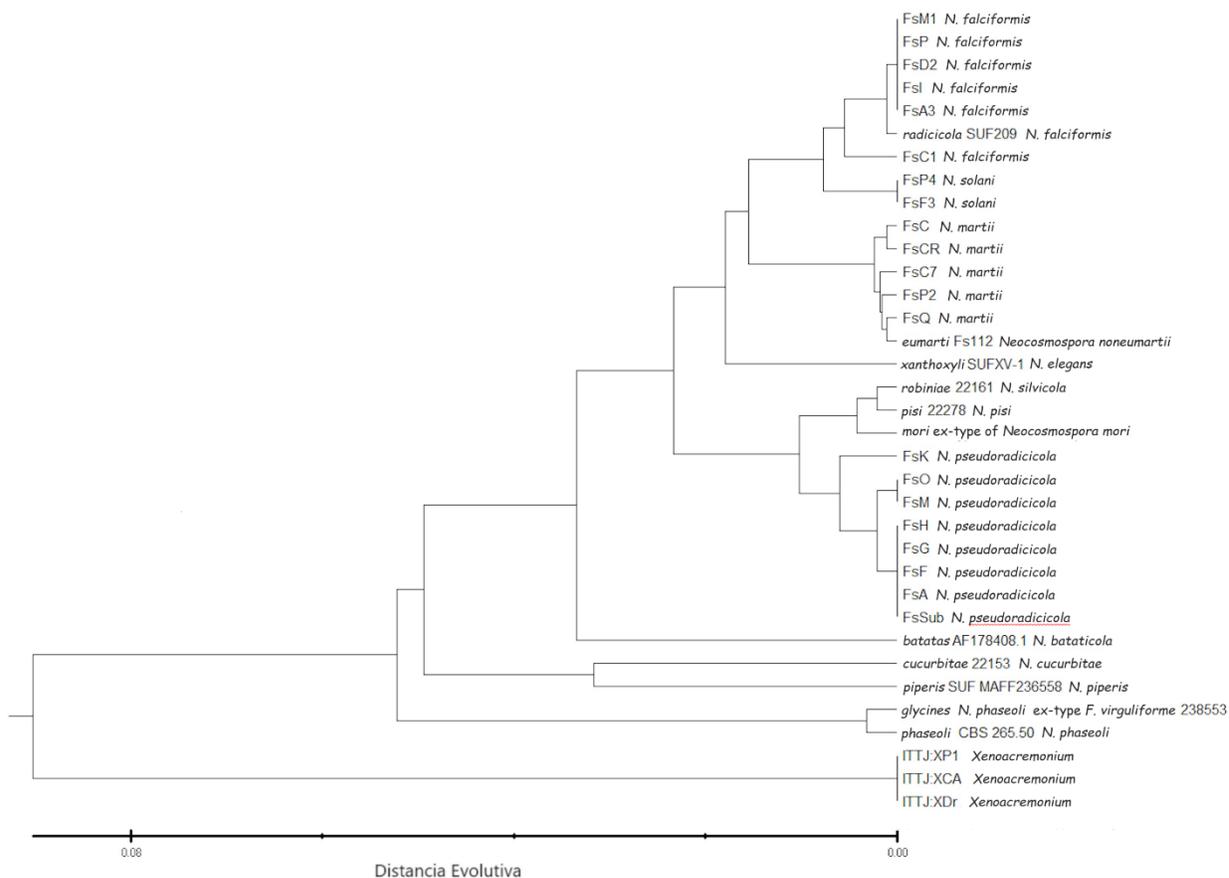


Figura 4. Árbol filogenético de historia evolutiva construido con el método UPGMA, de cepas identificadas en GenBank como *Fusarium solani* y clasificadas en la base de datos FUSARIOID-ID como especies filogenéticas de *Neocosmospora*, analizadas utilizando sus secuencias ITS1-5.8S-ITS2 junto con las de once f. spp. de *F. solani*.

FsM MK027276; FsM1 MK027277; FsC MK027278; FsC7 MK027279; FsCR MK027280; FsK MK027281; FsQ MK027282; FsP MK027283; FsP2 MK027284; FsP4 MK027285; FsSub MK027286.

Estas secuencias se cortaron de acuerdo con el inicio y final del fragmento NS5-NS8 (Suga *et al.*, 2000a) y al alinear estos fragmentos con las secuencias de la f. spp. *phaseoli* y *batatas*, se corroboró que la f. sp. *phaseoli* en la secuencia AF150481, tiene dos insertos y mide 1,457 pb; la secuencia AF150482 tiene un inserto y una longitud de 1,025 pb y la secuencia AF150483 tiene un inserto y 1048 pb de longitud, mientras la secuencia AF150484 de la f. sp. *batatas* no tiene insertos y tiene una longitud de 616 pb. Con estas secuencias como referencia se determinó que ninguna de las cepas de *Neocosmospora* obtenidas de agave, tiene insertos en el fragmento NS5-NS8 y todas tienen una longitud de 616 pb., por

lo que ninguna es similar a la f. sp. *phaseoli*, lo que respaldaría la sugerencia de intercalar el cultivo de frijol entre las hileras de agave en época de lluvias, o bien hacer rotación con este cultivo, cuando la marchitez del agave haya incrementado su incidencia, reduciendo el riesgo de incrementar el inoculo de *Neocosmopora* spp. al haber infectado y colonizado al frijol.

Al analizar las huellas génicas Rep-PCR obtenidas con el genoma completo de las cepas obtenidas de agave, no se aprecia una clara asociación entre sí, de las especies filogenéticas *N. falciformis*, *N. martii*, *N. solani* y *N. pseudoradicicola* (Figura 5), como la que se apreció con la diversidad mostrada en el dendograma con solo la secuencia ITS1-5.8S-ITS2. Sin embargo, si se consideran cinco grupos a un coeficiente de disimilaridad de 0.30, la mayor parte de las cepas de tres especies filogenéticas se mantienen en un mismo grupo de diversidad genética, pero a su vez, se conformó un grupo de diversidad, conformado con cepas de las cuatro especies filogenéticas, incluidas las cepas de *Xenoacremonium*. Lo anterior puede explicar que si bien en genes conservados ITSs y Factor de elongación 1α , estas especies filogenéticas son muy similares, su genoma completo tiene un mayor grado de diversidad, pero existe afinidad entre algunas cepas.

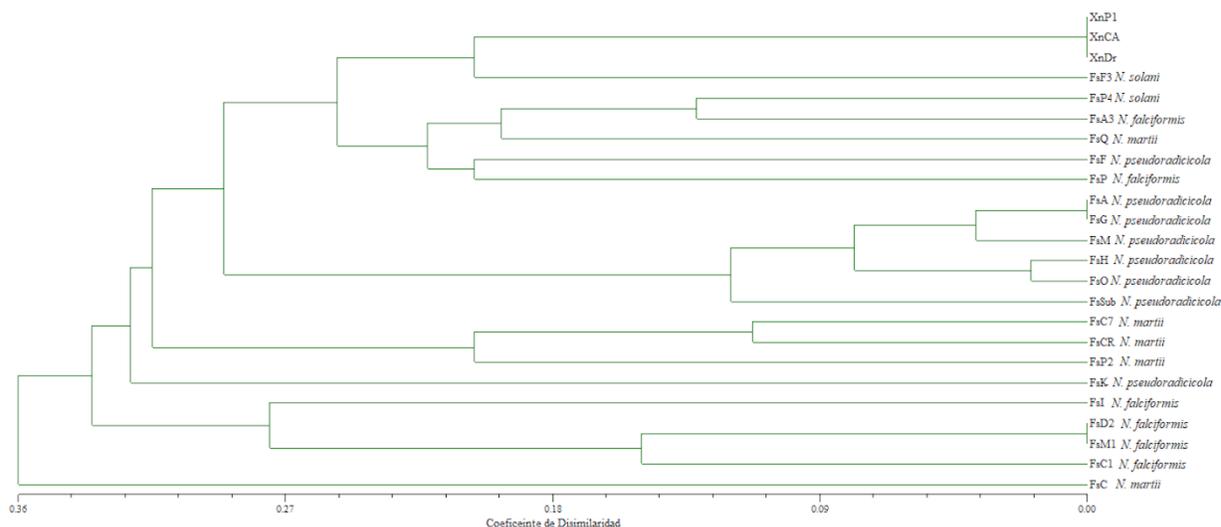


Figura 5. Análisis de diversidad de huellas génicas obtenidas con el marcador molecular de ADN Rep-PCR, de cepas de *Fusarium solani* identificadas como cuatro especies filogenéticas de *Neocosmospora* y de *Xenoacremonium* spp. aisladas de plantas de *Agave tequilana* var azul con marchitez del agave.

Al inocularse cuatro cepas representativas de grupos de diversidad y evaluarse su patogenicidad como severidad de tejido necrótico en raíz, se determinó que las cepas FsH, FsC1 y FsC7 inoculadas en agave, provocaron una severidad del 16.35, 15.10 y 14.65% respectivamente, sin diferencia estadísticas entre ellas. Sin embargo,

las plantas inoculadas con la cepa FsCA, no evidenciaron mayor severidad de necrosis en tejido radicular respecto al control no inoculado (Cuadro 2). De esta forma se corrobora la patogenicidad de las cepas FsH, FsC1 y FsC7 en agave, como previamente reportó Ramírez-Ramírez *et al.* (2017) con la cepa FsG.

Cuadro 2. Severidad (%) de pudrición radicular in plantas de agave inoculadas con cepas de *Neocosmospora pseudoradicicola*, *N. falciformis*, *N. martii* y *Xenoacremonium* sp. obtenidas de tejido necrótico de la corona en plantas de agave tequilero con marchitez.

Cepas de <i>F. solani</i>	Severidad (%)	PRMD ^z
FsH <i>N. pseudoradicicola</i>	16.35	A
FsC1 <i>N. falciformis</i>	15.10	A
FsC7 <i>N. martii</i>	14.65	A
FsCA <i>Xenoacremonium</i> sp.	8.45	B
NI	8.33	B

^zMedias seguidas por la misma letra no difieren significativamente (prueba de rango múltiple de Duncan (PRMD) (* ≤ 0.05).

Al inocular las cepas FsC7, FsC1 y FsH y FsCA, sobre cuatro variedades de maíz, las cepas FsC7 y FsH, indujeron necrosis más severas en plantas de maíz “Morado”, promediando 9.9 y 8.1% respectivamente. En un segundo nivel de significancia la cepa C1 provocó necrosis radicular de un 4.8 y 4.7% en maíz Magno y “Morado” respectivamente. Sin embargo, las cepas FsH, FsC7 y FsC1, cuando se inocularon en los híbridos Ocelote® y Faisán®, que se comercializan como resistentes a pudrición radicular inducida por *Fusarium* en maíz, no evidenciaron mayor severidad de pudrición de raíz que el control no inoculado (Cuadro 3). Considerando que aun cuando este bioensayo fue breve, en invernadero y solo incluyó cuatro materiales genéticos de maíz, evidencia que, entre los materiales de maíz evaluados, hay diversidad en susceptibilidad a las cepas de *Neocosmospora* spp. aisladas de *A. tequilana*. Esto es importante, si se considera que la rotación con cultivos no hospederos, es una de las estrategias más económicas para manejar fitopatógenos radiculares en campo, buscando reducir con el tiempo su nivel de inóculo en suelo. Pero si esta rotación no se realiza adecuadamente, el inóculo del patógeno no se reduce y la enfermedad y pérdidas del cultivo que se quiere proteger se mantienen o incluso se incrementan, como en la rotación maíz – soya realizada como estrategia de manejo de *Fusarium virguliforme* (*F. solani* f. sp. *glycines*), causante de la muerte súbita en soya (SDS), que al efectuarla por varios ciclos, no redujo la severidad de la enfermedad en soya, debido a que los materiales de maíz utilizados, se evaluaron como susceptibles a la infección por *F. virguliforme*, aunque esta infección no reducía su producción (Xing and Westphal, 2009).

Cuadro 3. Severidad (%) de pudrición radicular en cuatro variedades comerciales y un material criollo de maíz (*Zea mays*) inoculadas con las cepas FsH (*Neocosmospora pseudoradicicola*), FsC7 (*N. falciformis*), FsC1 (*N. martii*) y FsCA (*Xenoacremonium* sp.), obtenidas de tejido necrótico de la corona en plantas de agave tequilero con marchitez.

Cultivar de maíz	Cepa inoculada	Severidad (%)	PRMD ^a
Morado	FsC7	9.9	A
Morado	FsH	8.1	AB
Magno	FsC1	4.8	BC
Morado	FsC1	4.7	BC
Morado	FsCA	4.2	CD
Magno	FsC7	3.3	CD
Magno	FsH	2.9	CD
Faisán	FsH	2.8	CD
Faisán	FsCA	2.8	CD
Ocelote	FsC7	2.5	CD
Magno	FsCA	1.7	CD
Faisán	FsC7	1.7	CD
Ocelote	FsC1	1.5	CD
Ocelote	FsH	1.4	CD
Faisán	FsC1	1.1	CD
Ocelote	FsCA	1.0	CD
Ocelote	NI	0.7	CD
Morado	NI	0.7	CD
Faisán	NI	0.5	D
Magno	NI	0.5	D

^aMedias seguidas por la misma letra no difieren significativamente prueba de rango múltiple de Duncan (PRMD) (* ≤ 0.05).

En las plantas de frijol “Flor de Mayo”, la inoculación de las cepas FsC1, FsC7 y FsH, no indujeron más necrosis radicular, que la observada en el tratamiento control no inoculado, ni la cuantificada con la inoculación de la cepa FsCa de *Xenoacremonium* sp de 0.28 y 0.17% de severidad respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Severidad (%) de pudrición radicular en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* cv. Flor de mayo) inoculadas con cepas de *Neocosmospora pseudoradicicola*, *N. falciformis*, *N. martii* y *Xenoacremonium* sp., obtenidas de tejido necrótico de la corona en plantas de agave tequilero con marchitez.

Cepa inoculada	Severidad (%)	PRMD ^z
FsC1 <i>N. falciformis</i>	0.43	A
NI	0.28	AB
FsC7 <i>N. martii</i>	0.21	AB
FsCA <i>Xenoacremonium</i> sp.	0.17	AB
FsH <i>N. pseudoradicicola</i>	0.03	B

^zMedias seguidas por la misma letra no difieren significativamente prueba de rango múltiple de Duncan (PRMD) (* ≤ 0.05).

CONCLUSIONES

De plantas de agave tequilero con síntomas de marchitez y necrosis en la base del tallo y corona, se aislaron principalmente cepas identificadas morfológicamente como *F. solani*.

Al comparar sus secuencias ITS1-5.8S-ITS2 de cepas obtenidas de *Agave tequilana*, en la base de datos del GenBank, se identificaron molecularmente como *Fusarium solani* y se incluían en el complejo de especies *F. solani* (FSSC).

Al comparar estas mismas secuencias con la base de datos FUSAROID-ID se determinó alta similitud con las de las especies filogenéticas *Neocosmospora martii*, *N. pseudoradicicola*, *N. solani* y *N. falciformis*, que se reportan como sinónimas de *Fusarium martii*, *F. pseudoradicicola*, *F. solani* y *F. falciformis*, evidenciando su variabilidad genética.

Secuencias del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de los aislados obtenidos de *Agave tequilana* fueron molecularmente diferentes de las f. spp. de *F. solani*, excepto de las f. spp. *eumartii* que es muy similar a *N. martii* y la f. sp. *radicicola* que es muy similar *N. falciformis*. Esta información, adicionada a la ausencia de intrones en la secuencia de la fracción 18S (SSU), soporta que entre las cepas obtenidas de *A. tequilana* ninguna es de la f. sp. *phasioli*.

Cepas representativas de *Neocosmospora* aisladas de *A. tequilana*, fueron fitopatógenas a agave, a maíz morado y a maces sin resistencia a *Fusarium*. En cambio, maíces resistentes a *Fusarium*, no fueron susceptibles

En pruebas de patogenicidad, ninguna de las cepas fue patogénica a las plantas de frijol inoculadas lo que parece confirmar los hallazgos moleculares al respecto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Casa Cuervo S.A. de C.V. su apoyo para realizar el muestreo de campo. Parte de este proyecto fue apoyado por el Tecnológico Nacional de México (TecNM) a través del proyecto número 5434.14-P. VMB agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) por su beca de Maestría en Ciencias.

LITERATURA CITADA

- Aceves, RJJ. 2003. Prevención y manejo integral de la marchitez del *Agave tequilana* Weber var azul en Jalisco. Folleto técnico Núm. 1. Campo Experimental Altos de Jalisco. CIRPAC. INIFAP. Jalisco, México.
- Avila-Miranda ME, Zazueta-López JG, Arias-Castro C and Peña-Cabriaes JJ. 2010 Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). Journal of the Professional Association for Cactus Development 12:166-180. <https://www.jpacd.org/jpacd/article/view/106>
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Kew, Commonwealth Mycological Institute, pp. 237.
- Coleman JJ. 2016. The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. Molecular Plant Pathology 17:146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Coleman JJ, Rounsley SD, Rodríguez-Carres M, Kuo A, Wasmann CC, Grimwood J, Schmutz J, Taga M, White GJ, Zhou S, Schwartz DC, Freitag M, Ma LJ, Danchin E G, Henrissat B, Coutinho PM, Nelson DR, Straney D, Napoli CA, Barker BM, Gribskov M, Rep M, Kroken S, Molnar I, Rensing C, Kennell JC, Zamora J, Farman ML, Selker EU, Salamov A, Shapiro H, Pangilinan J, Lindquist E, Lamers C, Grigoriev IV, Geiser DM, Covert SF, Temporini E and Vanetten HD. 2009. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. PLoS Genetics 5(8) e1000618. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000618>.
- Crous PW, Lombard L, Sandoval- Denis M, Eifert KA, Schroers HJ, Chaverri P, Gené J, Guarro J, Hirooka Y, Bensch K, Kema GHJ, Lamprecht SC, Cai L, Rossman AY, Stadler M, Summerbell RC, Taylor JW, Ploch S, Visagie CM, ... Thines M. (2021). *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. Studies in Mycology 98. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>
- CRT, Consejo Regulador del Tequila. 2023. Información Estadística. Internet Resource: <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRT-web/> (verificado 01/oct/2023).
- Farr DF and Rossman AY. 2017. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Verified March 2, 2018, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>
- Geiser DM, Al-Hatmi AMS, Aoki T, Arie T, Balmas V, Barnes I, Bergstrom GC, Bhattacharyya MK, Blomquist CL, Bowden RL, Brankovics B, Brown DW, Burgess LW, Bushley K, Busman M, Cano-Lira JF, Carrillo JD, Chang HX, Chen CY, ... Zhang X. 2021. Phylogenomic analysis of a 55.1-kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* species complex. Phytopathology 111:1064–1079. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0330-LE>
- Herrera-Pérez L, Valtierra-Pacheco E, Ocampo-Fletes I, Tornero-Campante MA. Hernández-Plascencia JA y Rodríguez-Macias R. 2017. Prácticas agroecológicas en *Agave tequilana* Weber bajo dos sistemas de cultivo en Tequila, Jalisco. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Pub. Esp. Núm. 18:3711-3724
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Hoboken, Wiley-Blackwell Publishing. Ames I. A.
- Lombard L, van der Merwe NA, Groenewald JZ and Crous PW. 2015. Generic concepts in *Nectriaceae*. Studies in Mycology 80:189–245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>
- Matuo T and Sakurai Y. 1965. *Fusarium solani* f. *robiniae* n. f., one of the causal fusaria of the twig blight of *Robinia pseudoacacia*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 36(1): 31-36. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/30/1/30_1_31/_article/-char/ja/
- McClure TT. 1951. *Fusarium* foot rot of sweet-potato sprouts. Phytopathology 41:72–77. <https://worldveg.tind.io/record/7653/>

- Mengiste T. 2012. Plant Immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology* 50:267–294. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172955>
- Nalim FA, Samuels GJ, Wijesundera RL and Geiser DM. 2011. New 4 species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the old world tropics. *Mycologia* 103:1302-1330. <https://doi.org/10.3852/10-307>
- O'Donnell K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92:919–938. <https://doi.org/10.2307/3761588>
- Okon Y, Chet I and Henis Y. 1973. Effects of lactose, ethanol and cycloheximide on the translocation pattern of radioactive compounds and on sclerotia formation in *Sclerotium rolfsii*. *Journal of General Microbiology* 74:251-258. <https://doi.org/10.1099/00221287-74-2-251>
- Rademaker JLW and de Bruijn FJ. 1998. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprints and computer assisted pattern analysis. Pp. 151–171. In: Caetano-Anollés G and Gresshoff PM (eds.). *DNA markers protocols, applications, and overviews*. Wiley-VCH, USA. Pp 364.
- Ramírez-Ramírez MJ, Mancilla-Margalli NA, Meza-Álvarez L, Turincio-Tadeo R, Guzmán-de Pena D and Avila-Miranda ME. 2017. Epidemiology of *Fusarium* agave wilt in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Protection Science* 53:144–152. <https://doi.org/10.17221/142/2016-PPS>
- Rohlf FJ. 2009. NTSYSpc: numerical taxonomy system. ver. 2.21c. Exeter Software: Setauket: New York.
- Roy KW, Lawrence GW, Hodges HH, McLean KS and Killebrew JF. 1989. Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant and relation of *Heterodera glycines* to Disease Severity. *Phytopathology* 72:191-197. <https://doi.org/10.1094/phyto-79-191>
- Rupe JC, Correll JC, Guerber JC, Becton CM, Gbur Jr. EE, Cummings MS and Yount PA. 2001. Differentiation of the sudden death syndrome pathogen of soybean, *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, from other isolates of *F. solani* based on cultural morphology, pathogenicity, and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorph. *Canadian Journal of Botany*. 79:829–835. <https://doi.org/10.1139/cjb-79-7-829>
- Sakurai Y and Matuo T. 1959. On the form name and race of *Hypomyces solani* (Rke. st Berth.) Snyder. et Hans. which is pathogenic to mulberry trees. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 24: 219–223. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.24.219>
- Sakurai Y and Matuo T. 1961. Taxonomy of the causal fungus of trunk-blight of *Xanthoxylum piperitum* and heterothallism in this fungus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 26: 112–117. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/26/3/26_3_112/_pdf
- Sandoval-Denis M, Lombard L and Crous PW. 2019. Back to the roots: A reappraisal of *Neocosmospora*. In *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* (Vol. 43). <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.04>.
- Schroers HJ, Samuels GJ, Zhang N, Short DPG, Juba J and Geiser DM. 2016. Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 108:806–819. <https://doi.org/10.3852/15-255>
- Short DPG, O'Donnell K, Thrane U, Nielsen KF, Zhang N, Juba JH and Geiser DM. 2013. Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genetics and Biology* 53:59–70. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.01.004>
- Snyder WC and Hansen HN. 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section Martiella. *American Journal of Botany*. 28:738-742. <https://doi.org/10.2307/2436658>
- Suga H, Hasegawa T, Mitsui H, Kageyama K and Hyakumachi M. 2000b. Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycological Research* 104:1175–1183. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002719>
- Suga H, Oyabu K, Ito M, Kageyama K and Hyakumachi M. 2000a. Detection of intron-like sequences in the small subunit rDNA 3' region of *Fusarium solani*. *Mycological Research* 104:782–787. <https://doi.org/10.1017/S0953756299002208>
- Tamura K, Stecher G and Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis. *Molecular biology and evolution* 38:3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

- Versalovic J, Koeuth T and Lupski JR. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823–6831. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC329316/pdf/nar00104-0140.pdf>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp 315-322. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, Calif. Pp 482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Xing L and Westphal A. 2009. Effects of crop rotation of soybean with corn on severity of sudden death syndrome and population densities of *Heterodera glycines* in naturally infested soil. *Field Crops Research* 112:107–117. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.02.008>
- Zaccardelli M, Vitale S, Luongo L, Merighi M and Corazza L. 2008. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* isolates. *Journal of Phytopathology* 156:534–541. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01403.x>
- Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA and Geiser DM. 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology* 44:2185–2190. <https://doi.org/10.1128/JCM.00120-06>