

## Abundancia y diversidad genética de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* sp. en musa AAB

Carmela Hernández Domínguez<sup>§</sup>  
José Andrés Vázquez Benito  
Fabián Vázquez Moreno  
Raúl Berdeja Arbeu  
Sigfrido David Morales Fernández  
Delfino Reyes López

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-Facultad de Ingeniería Agrohídrica. Av. Universidad s/n, San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. CP. 73965. Tel. 595 9528969. (Delfino\_reyes2001@yahoo.com.mx; moralesuno1@hotmail.com; raulberdeja@yahoo.com.mx; titanmj96@hotmail.com; fabianvm24@hotmail.com).

<sup>§</sup>Autora para correspondencia: carmela.hernandezd@correo.buap.mx.

### Resumen

Se estudió la ocurrencia y diversidad de especies de *Fusarium* y *Trichoderma* en 29 puntos de una parcela de plátano (Musa AAB) en Veracruz, México, durante noviembre de 2017 y abril 2018. La parcela se dividió en dos partes; en la primera se realizó barbecho y eliminación de maleza (procedimiento en cultivo 1) mientras que en la segunda no se realizaron estas actividades (procedimiento en cultivo 2). Se aislaron hongos del suelo colectado en estos sitios usando papa dextrosa y agar (PDA) y K2. Al momento de colectar las muestras se registró la temperatura, precipitación y radiación solar. Los resultados del análisis mostraron 68% más presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) en suelos donde no se realizaron labores de cultivo usando K2 a diferencia de suelos donde sí se realizaron éstas usando PDA (32%). También se observó poca cantidad de UFC cuando los valores de temperatura, precipitación y radiación fueron altos. Los análisis moleculares mostraron 65% más abundancia de especies en suelos sin labor comparado con suelos cultivados (35%), seis de 16 aislados de *Fusarium* fueron *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* y seis de 13 aislados de *Trichoderma* fueron *Trichoderma longibrachiatum* en el primer muestreo mientras que nueve de 14 aislados de *Trichoderma* fueron *Trichoderma spirale* en el segundo muestreo. El análisis de la diversidad intrapoblacional de siete aislados de *Trichoderma spirale*, mostraron bandas de 75 a 500 bp en tres locis del genoma en el aislado VB28IT1 con cinco ISSR.

**Palabras clave:** plátano, poblaciones, UFC.

Recibido: junio de 2019

Aceptado: octubre de 2019

## Introducción

*Fusarium* es un género de hongos que incluye una gran cantidad de especies patógenas de plantas. Su alta capacidad coevolutiva con plantas cultivadas le ha conferido mayor variabilidad genética e incrementar su diversidad de especies. Tan solo el grupo de *Fusarium oxysporum* incluye 120 formas especiales que causan enfermedad en plantas hospedantes específicas (Bentley *et al.*, 1998; Leong, *et al.*, 2010; Benaouali *et al.*, 2014). De estas formas especiales *F. oxysporum* Schlechtend f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyd y Hans, fue causa de una de las enfermedades más catastróficas a nivel mundial en plátanos y bananos (Ploetz, 2015).

Se estima que entre 1960 y 1970 en México, cerca de 40 000 hectáreas de plátano de la variedad manzano o Silk (Musa AAB) fueron destruidas por esta enfermedad (Orozco *et al.*, 2009) y la mayoría de los suelos de las zonas productoras de plátano quedaron infestados con *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Orozco *et al.*, 2009) lo que hizo difícil la producción de variedades susceptibles como Silk o manzano.

*Fusarium* es un patógeno que forma estructuras de resistencia denominadas clamidosporas que le confieren la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, y sus principales formas de dispersión son por movimiento del suelo infestado y agua de escorrentía (Retana *et al.*, 2018); sin embargo, su abundancia y diversidad en el suelo también depende de otros factores tales como variedad del cultivo, características físico-químicas del suelo, condiciones climáticas y actividad humana (Bateman y Murray 2001; Bernhoft *et al.*, 2012).

Toda esta interacción de factores, hacen necesario el estudio del comportamiento, abundancia y diversidad de las diferentes razas y formas especiales *Fusarium oxysporum* con el cultivo y especies de *Trichoderma*, que han mostrado propiedades en su control (Maina *et al.*, 2016), así como el impacto de las prácticas culturales que pueden alterar este comportamiento.

En la actualidad la mayoría de los estudios realizados directamente con diversidad de especies muestran la historia y el potencial evolutivo de una población o infieren en aspectos prácticos como el flujo génico de virulencia hacia otras zonas geográficas tanto de hongos (McDonald y Linde, 2002); sin embargo, pocos trabajos han estudiado el impacto de las prácticas culturales en diferentes épocas del año y condiciones climáticas sobre la abundancia y diversidad genética de especies de *Fusarium* en el suelo (Bernhoft *et al.*, 2012) y su interacción con especies de *Trichoderma*, por lo que existe poco entendimiento en éste aspecto (Maina *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior, se planteó el presente estudio con el objetivo de conocer el efecto de las labores culturales (barbecho y el control de malezas) y condiciones climáticas (temperatura, humedad relativa y precipitación) en la abundancia y diversidad genética de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* sp., en el cultivo de plátano AAB, utilizando los medios de cultivo PDA y K2 para su aislamiento y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para su identificación.

## Materiales y métodos

### Localización y muestreo del terreno

Un total de 58 muestras de suelo con un peso de 500 g fueron colectadas en una parcela de plátano manzano o Silk (Musa AAB) en Platanozapan, Municipio de Tlapacoyan Veracruz, México, 29 fueron colectadas en el mes de noviembre de 2017 y el resto en abril de 2018. Para la colecta de muestras fueron georreferenciados sitios de muestreo en la parcela, la cual fue previamente dividida en dos partes, en una se realizó barbecho y control de maleza, mientras que en la otra no se realizó ningún tipo de labor. Cada sitio, fue marcando con estacas de madera a cada cinco metros, y en cada uno de ellos a 0.2 m de profundidad fue tomada una muestra de suelo la cual fue analizada en el laboratorio de la facultad de Ingeniería Agrohídrica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Méx.

### Aislamiento y caracterización morfológica de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*

Se tomaron 10 g de suelo de cada muestra los cuales fueron diluidos en 90 mL de Tween 80 al 0.05%, de la dilución obtenida, 1 mL fue depositado en 9 mL de Tween 80 al 0.05% para obtener una segunda dilución. De ambas diluciones 100  $\mu$ L fueron extendidos con un triángulo de vidrio sobre medio de cultivo Komana (K2) y papa dextrosa y agar (PDA). De cada dilución y medio de cultivo se realizaron tres repeticiones las cuales fueron incubadas a 30 °C por 48 y 72 h en oscuridad. Trascurrido este tiempo todas y cada una de las colonias con características morfológicas de trichoderma y *Fusarium* fueron contada y aislada en medio nuevo (Chaverri *et al.*, 2003; García-Núñez *et al.*, 2016; Sánchez-López *et al.*, 2012).

### Cuantificación de *Fusarium* y *Trichoderma*

Cantidad de UFC  $g^{-1}$  de suelo en medio PDA y K2: antes del aislamiento en medio nuevo y para facilitar el conteo *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum* de cada repetición hecha y por cada medio de cultivo usado (PDA y K2), se dividió cada una de las cajas Petri en 4 partes iguales y en cada cuadrante se contaron las colonias existentes, posteriormente se realizó el cálculo de UFC por caja y evaluó la eficacia de cada uno de los medios.

Cantidad de UFC  $g^{-1}$  de suelo con respecto a las labores culturales: la cantidad de colonias aisladas también se analizó con respecto a las labores culturales hechas (barbecho y control de maleza) contra ninguna labor realizada.

Cantidad de UFC  $g^{-1}$  con respecto a las temporadas de colecta de muestras y las condiciones climáticas: se eligió el mes de diciembre como primera temporada de colecta de muestras y el mes de abril como segunda temporada con la finalidad de comparar el efecto de las condiciones climáticas, precipitación, temperatura, humedad relativa y radiación solar presentes en estas dos temporadas sobre la cantidad de UFC existentes en suelo en cada una de las partes muestreadas de la parcela. Para el análisis de resultados obtenidos de UFC  $g^{-1}$  en cada caso se hizo una prueba de comparación de medias con un análisis de varianza (Anova) usando el paquete estadístico SAS 9.0 para Windows.

## Determinación de la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Para corroborar la presencia la raza 1 de *Fusarium oxysporum*, se inocularon plantas de plátano manzano (AAB) por cada aislado con  $1 \times 10^6$  UFC. Las plantas fueron resguardadas en invernadero, 7 días después de infección fueron evaluadas de manera cualitativa en una escala de 1-5 (1= sin daño; 2= puntos aislados en el tejido vascular; 3= decoloración hasta de un tercio del tejido vascular; 4= decoloración mayor a un tercio del tejido; y 5= decoloración total del tejido (Dita *et al.*, 2011), para lo cual se cortó trasversal la base del cormo y observó en la decoloración de los tejidos vasculares.

## Identificación molecular y determinación de diversidad de *Trichoderma* y *Fusarium* entre especies y dentro de la especie más abundante

Para la identificación, determinar la abundancia y diversidad de los géneros estudiados se inició con la extracción de ADN de los aislados de 14 días de edad, sembrados en disco de celofán sobre medio ADS, e incubados a 30 °C, el micelio obtenido fue almacenado en tubos eppendorf de 2 mL y liofilizado en un liofilizador Labconco®.

Porciones de 0.05 g de micelio seco liofilizado fueron maceradas con un pistilo en tubos enfriados con nitrógeno líquido. Posteriormente, se procedió de acuerdo con las instrucciones del Kit Dneasy plant mini kit de la marca Qiagen. La calidad de ADN obtenido de cada aislado fue determinada con un nanodrop Thermoscientific, modelo Nanodrop 2000C, visualizado mediante un gel de agarosa en un transiluminador UVP, modelo: 3UV-LMS26 y fue almacenado en un congelador a -7 °C, para la amplificación por PCR.

El ADN obtenido de cada aislado de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* sp. fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen factor de elongación EF1- $\alpha$ . Para el caso de *Fusarium oxysporum* se usaron los primers: TEF1 y TEF2, con un kit para amplificación de PCR de la marca GoTaq®, Promega Corporation, Madison, WI, USA, para lo cual se utilizaron 9.5  $\mu$ L de trealosa al 10%, 5  $\mu$ L de Buffer 5x, 10 mM de dNTPs, 2.5 mM  $\mu$ L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M de cada primer, 5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq DNA polimerasa y 15 a 20 ng mL<sup>-1</sup> de ADN, para un volumen final de mezcla de 25  $\mu$ L, la cual se amplificó a 1 ciclo de 95 °C por 2 min, 10 ciclos de 94 °C por 30 s, 66 °C (Touchdown -1 °C → 56 °C) 30 s y 72 °C por 1 min, 36 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 36 s y 72 °C por 1 min y un ciclo de 72 °C por 10 min.

Para el caso de *Trichoderma* sp., se utilizaron los iniciadores EF1-728F y EF1-986R descritos por Carbone y Kohn (1999) utilizando una mezcla similar a la descrita para *Fusarium oxysporum*, con el programa de amplificación de 1 ciclo de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y un ciclo de 72 °C durante 10 min (Sánchez López *et al.*, 2012) Todas las muestras se amplificaron en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf®) y sus productos de PCR obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 2%, buffer TAE (1X) más 10  $\mu$ L de bromuro de etidio el cual fue expuesto a 80 V en una cámara de electroforesis Thermoscientific.

Los productos amplificados fueron monitoreados con un marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder®, Promega Corporation, Madison, WI, USA, purificados y secuenciados por los laboratorios Macrogen Inc. (Geumchen-gu, Seoul, Korea). Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit v 7.1.9 (Hall, 1999). Los árboles filogenéticos fueron generados mediante un

análisis de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) y vecino más cercano (Neighbor Joining) usando Mega v.5 (Tamura *et al.*, 2011), seguido por un análisis 'bootstrap' con 1 000 repeticiones.

El cálculo de las medias de diversidad interpoblacional así como la intrapoblacional fueron obtenidos con un bootstrap de 1 000 réplicas, incluyendo en el análisis 21 secuencias de nucleótidos para *Trichoderma* sp. y 20 para *Fusarium oxysporum* con el programa MEGA v.5. Para tener una aproximación molecular de la variabilidad genética dentro de la especie más abundante (*Trichoderma spirale*) se midió el polimorfismo de ocho de sus aislados: VB7IT1, VB28IT1, VB2IT2, VB8IT2, VB11IT2, VB24IT2, VB25IT2, VB29IT2, mediante la genotipificación de los marcadores ISSR: (GA)<sub>9</sub>C, (GA)<sub>9</sub>T, (CA)<sub>8</sub>RG, (ACC)<sub>9</sub> y (GTG)<sub>5</sub>, los cuales fueron seleccionadas previamente por su polimorfismo (66 a 100%) de acuerdo a Thangavelu *et al.* (2013); Nirmaladevi *et al.* (2016). Los marcadores ISSR fueron sintetizados por Integrated ADN Technologies.

Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen final de 25 µL de reacción, conteniendo 1X buffer para PCR, 0.2 mM de dNTPs, 1.5-2.5 mM de MgCl, 0.5 µM de cada primer, 1 unidad de Taq DNA Polimerasa (GoTaq<sup>®</sup>, Promega Corporation, Madison, WI, USA) con 20 ng de ADN genómico. Las condiciones térmicas de las reacciones fueron 94 °C por 5 min seguido por 40 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C y de 48 a 64 °C por 45 s de alineamiento, 1.3 min de extensión a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa grado molecular de alta resolución (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich Corporation, Inc.) al 3% mas 10 µL de bromuro de etidio a 45 V por 4 h, usando un marcador molecular de 50 bp (HyperLadder<sup>®</sup>, BioLine USA Inc. Tauton, Ma, USA).

## Resultados y discusión

### Aislamiento y caracterización morfológica de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*

Se lograron obtener 29 aislados en la primera temporada, 16 pertenecientes a *Fusarium* sp. y 13 pertenecientes a *Trichoderma* sp., mientras que en la segunda temporada de muestreo se logró un total de 20 aislados, seis pertenecientes a *Fusarium* sp., y 14 pertenecientes a *Trichoderma* sp., y una a *Hypocrea lixii* (Cuadro 3 y 4).

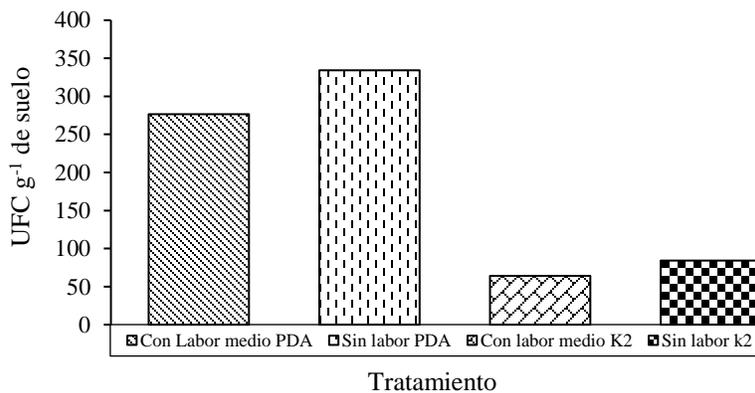
En los aislados de *Fusarium oxysporum* se observaron clamidosporas aisladas, conidióforos cortos en monofialides, los macroconidios con tres o cuatro septos trasversales fusiformes o en forma de canoa, microconidios abundantes en micelio aéreo, mientras que para el género *Trichoderma* conidióforos subglobosos, atenuados en la punta, las clamidosporas unicelulares de forma globosa encontradas en forma intercalar y terminal, conidios de forma elipsoidal y tonalidad verde. Característica que coinciden con las descrita por Chaverri *et al.*, (2003).

### Cuantificación de *Fusarium* y *Trichoderma*

Cantidad de UFC g<sup>-1</sup> de suelo en medio PDA y K2: se observó la presencia de *Trichoderma* sp. en las muestras tomadas en ambas temporadas y ambos medios; sin embargo, fue difícil su conteo debido a su rápido crecimiento, lo que provocó la pérdida de la forma de la colonia, generando duda si ésta provino de una o más esporas. Al respecto Al-Sadi *et al.* (2015) afirman que las

especies de *Trichoderma* sp., se caracterizan generalmente por su rápido crecimiento y capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales variables, además de variar su diversidad de especies de un sustrato a otro.

Por otra parte, el análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre los promedios obtenidos de los tratamientos. De acuerdo a la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) se identificó al PDA como el que mostró mejor resultado en el aislamiento en ambos muestreos (con y sin labor) en comparación con el medio K2 en cuanto a crecimiento y desarrollo de *Fusarium oxysporum*; es decir, existió un valor promedio mayor a 200 UFC g<sup>-1</sup> de suelo, mientras que los tratamientos con medio K2 el promedio fue de entre 50 y 100 UFC g<sup>-1</sup> de suelo (65% más alta en PDA que la cantidad encontrada en el medio K2) (Figura 1).



**Figura 1. Cantidad de UFC de acuerdo a las labores realizadas en el cultivo.**

Esto sugiere que el medio PDA proporciona los niveles apropiados de nutrientes, así como las condiciones adecuadas durante el desarrollo de ambos hongos (López *et al.*, 2004), mientras que el K2 a pesar de que cuenta con una gran cantidad de elementos nutritivos se ve afectado por otros factores tales como pH, fungicidas y antibióticos como lo menciona Komada (1975) limitando su desarrollo.

Sin embargo, aunque autores como Bragulat *et al.* (2004) mencionan que *Fusarium* sp., no tiene grandes limitaciones en el crecimiento en medio artificial existen componentes que afectan su esporulación característica (López *et al.*, 2004). En este caso la tonalidad de las colonias de *Fusarium* obtenidas en PDA fue muy similar entre géneros en las primeras 48 h de emergencia, lo que hizo difícil el conteo de UFC.

Estudios similares fueron obtenidos por Benaouali *et al.* (2014) al trabajar con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, quienes observaron un mejor crecimiento y pigmentación de esporas en el medio PDA en comparación con otros medios evaluados. De aquí la importancia del rápido crecimiento y esporulación en los medios de cultivo utilizados debido a que favorecen la temprana identificación de los hongos evitando que las UFC se unan.

Aunque en este estudio hubo fluctuación en el número de UFC aisladas por sitio muestreado, ésta se presentó en ambos medios usados durante el proceso de aislamiento. Estos resultados, sugieren que existen otros factores no analizados en el estudio que afectan las cantidades de UFC específicamente por sitio de suelo que no tienen relación alguna con el medio de cultivo. Resultados

similares fueron obtenidos por Jiménez-Fernández *et al.* (2010) quienes al hacer estudios de identificación y cuantificación de *Fusarium oxysporum* en suelo encontrando que, en muestras obtenidas directamente de suelos de campo, las poblaciones variaron en algunas de sus réplicas de aislamiento comparado con suelos infestados artificialmente.

Cantidad de UFC g<sup>-1</sup> de suelo con respecto a las labores culturales: el análisis estadístico mostró diferencias significativas ( $p= 0.0352$ ) entre los tratamientos, y al menos dos de ellos fueron diferentes (Cuadro 1). El tratamiento sin labor y con medio PDA obtuvo la mayor concentración de UFC g<sup>-1</sup> de suelo con una diferencia del 68% mayor al tratamiento cuatro.

**Cuadro 1. Análisis del efecto de labores culturales sobre la cantidad de UFC g<sup>-1</sup> de suelo.**

Tratamiento	(UFC g <sup>-1</sup> de suelo)
1. Sin labor +PDA	420 a
2. Sin labor +K2	270 ab
3. Con labor +PDA	270 ab
4. Con labor +K2	135 b
LSD	176.28

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, según la prueba LSD.

Sin embargo, aunque la concentración que se obtuvo en los tratamientos varió entre ellos, estadísticamente los tratamientos uno, dos, tres y dos, tres, cuatro fueron similares indicando la falta de valores que muestren la eficacia de las labores culturales. Se observó el efecto de prácticas de manejo agrícola, como reincorporación de residuos de plantas senescentes y aplicación de fungicidas cambiando la estructura y diversidad genética de las comunidades de *Fusarium*.

Las plantas en descomposición como fuente de nutrientes de *Fusarium*, el cual puede crecer saprofiticamente generando mayor abundancia y distribución de especies en el suelo. Sin embargo, es necesario mencionar, que en su estudio ellos muestrearon por cinco años estos suelos, a diferencia del presente estudio donde solo se muestrearon dos temporadas en un año, resultando diferencia en los datos obtenidos.

Cantidad de UFC g<sup>-1</sup> con respecto a las temporadas de colecta de muestras y las condiciones climáticas: la mayor cantidad de UFC en el suelo se detectó en el muestreo realizado en el mes de diciembre (primera temporada) en comparación del mes de abril donde se observa una disminución drástica de cantidad de UFC, e incluso en ésta última temporada no se encontraron esporas presentes en algunos puntos muestreados (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Cantidad UFC g<sup>-1</sup> presentes en medio PDA y variables climáticas del municipio.**

Características	Diciembre (2017)	Abril (2018)
UFC g <sup>-1</sup> de suelo (medio PDA)	1098.62	297.93
UFC g <sup>-1</sup> de suelo (medio K2)	180	74.48
Precipitación (mm mes <sup>-1</sup> )	116.2	276.8
Temperatura media (°C)	19.38	24.34
Humedad relativa (%)	86.09	86.83
Radiación (W m <sup>-2</sup> )	323.14	386.14

Estos resultados coinciden con el aumento de la temperatura, precipitación y radiación solar en la segunda temporada de recolección de muestras. La temperatura y precipitación presentes en las temporadas de muestreo pueden tener influencia significativa en la diversidad de especies de hongos en una determinada área.

Al respecto, Benaouali *et al.* (2014), también recalca la importancia de la temperatura en el óptimo crecimiento de las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* en el suelo. No obstante, Aunque en ambas temporadas de estudio los cambios en la humedad relativa fueron casi nulos se presentó mayor radiación solar en la segunda temporada la cual coincidiendo también con una disminución de la cantidad de UFC, en este contexto Pinkerton (2000) mencionan que la cantidad de radiación solar absorbida reduce la densidad de población de hongos encontrados sobre los 30 cm de la superficie del suelo.

### Determinación de la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Se observaron tres plantas con los cormos ligeramente necrosados, una de éstas fue inoculada por *F. oxysporum* f. sp. *cubensis*, mientras que los dos restantes fueron inoculados con *F. oxysporum* f. sp. *melonis* de acuerdo a la identificación resultado de las pruebas PCR de éstos aislados. De acuerdo a Dita *et al.* (2018) los cultivares susceptibles como el grupo AAB muestran síntomas o daños más graves que las variedades con resistencia intermedia cuando se cultivan en condiciones ambientales similares y dependiendo de la presión del inóculo y las condiciones ambientales la enfermedad en la planta puede ser observada tempranamente.

### Identificación molecular y determinación de diversidad genética de *Trichoderma* y *Fusarium* entre especies y dentro de la especie más abundante

La amplificación de los productos de PCR permitieron visualizar en el gel de agarosa 700 bp para el género *Fusarium* sp. y 350 bp para *Trichoderma* sp. Las secuencias de especies identificadas se registraron en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Cuadro 3 y 4). Se observó mayor abundancia de especies en la primera temporada a diferencia de la segunda.

**Cuadro 3. Aislados obtenidos en la primera temporada de muestreo.**

Muestra	Aislado	Especie	NCBI
1	VB1IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> voucher	MK087011
2	VB2IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	MK087012
	VB2IIF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lisi</i>	MK087013
6	VB6IT1	<i>Trichoderma spirale</i>	MK086990
7	VB7IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	MK087014
	VB7IT1	<i>Trichoderma spirale</i>	MK086984
8	VB8IT1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MK086985
9	VB9IT1	<i>Trichoderma harzianum</i>	MK086986
10	VB10IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	MK087015
	VB10IT1	<i>Trichoderma parareesei</i>	MK086987
13	VB13IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	MK087031
14	VB14IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	MK087016

Muestra	Aislado	Especie	NCBI
15	VB15IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	MK087017
	VB15IIF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lisi</i>	MK087018
	VB15IT1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MK086988
16	VB16IT1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MK086989
19	VB19IF1	<i>Fusarium</i> sp.	MK087019
20	VB20IF1	<i>Fusarium</i> sp.	MK087020
21	VB21IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	MK087021
	VB21IT1	<i>Trichoderma orientale</i>	MK086997
22	VB22IF1	<i>Fusarium</i> sp.	MK087022
	VB22IIF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	MK087023
25	VB25IT1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MK086998
26	VB26IF1	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK087024
	VB26IT1	<i>Trichoderma andinense</i>	MK086991
27	VB27IF1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-cucumerinum</i>	MK087025
	VB27IT1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MK086992
28	VB28IT1	<i>Trichoderma spirale</i>	MK086999
29	VB29IT1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MK086993

National Center for Biotechnology Information (NCBI).

#### Cuadro 4. Aislados obtenidos en la segunda temporada de muestreo.

Muestra	Aislado	Especie	NCBI
2	VB2IT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK087001
	VB2IIT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK087002
3	VB3IF2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	MK087032
6	VB6IF2	<i>Fusarium</i> sp.	MK087026
	VB6IT2	<i>Hypocrea lixii</i>	MK087033
7	VB7IF2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	MK087027
8	VB8IF2	<i>Fusarium</i> sp.	MK087028
	VB8IT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK087003
9	VB9IF2	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK087029
10	VB10IT2	<i>Trichoderma parareesei</i>	MK087004
	VB10IIT2	<i>Trichoderma</i> sp.	MK087005
11	VB11IT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK087006
15	VB15IT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK086994
18	VB18IT2	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	MK086995
21	VB21IT2	<i>Trichoderma hamatum</i>	MK086996
22	VB22IF2	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK087030
	VB22IT2	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	MK087007
24	VB24IT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK087008
25	VB25IT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK087000
27	VB27IT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK087009
29	VB29IT2	<i>Trichoderma spirale</i>	MK087010

National Center for Biotechnology Information (NCBI).

La especie que se encontró en mayor abundancia en la primera temporada fue *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* con 20%, mientras que en la segunda no se encontró esta forma especial y solo se obtuvieron cuatro muestras con el género *Fusarium*, aislándose de una de ellas *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Figura 2 y 3). De acuerdo a Suárez-Estrella (2004), este hongo es capaz de sobrevivir en residuos de cosecha, en este caso se encontró en mayo, y en suelo donde no se realizaron labores de cultivo.

Sin embargo, en la segunda temporada de muestreo hubo una reducción tanto del género *Fusarium* como de las mencionadas especies (Figura 2 y 3) y se observó el mantenimiento de la densidad de población del género *Trichoderma* con 20% de presencia de *Trichoderma longibrachiatum* en la primera temporada y 40% de *Trichoderma spirale* en la segunda; es decir, dos veces más la presencia de ésta última especie. En este contexto, las especies del género *Trichoderma* tienen una alta capacidad saprofítica mientras que la mayoría de las especies de *Fusarium* son fitopatógenas por lo que su grado de adaptación es diferente (Maina *et al.*, 2016).

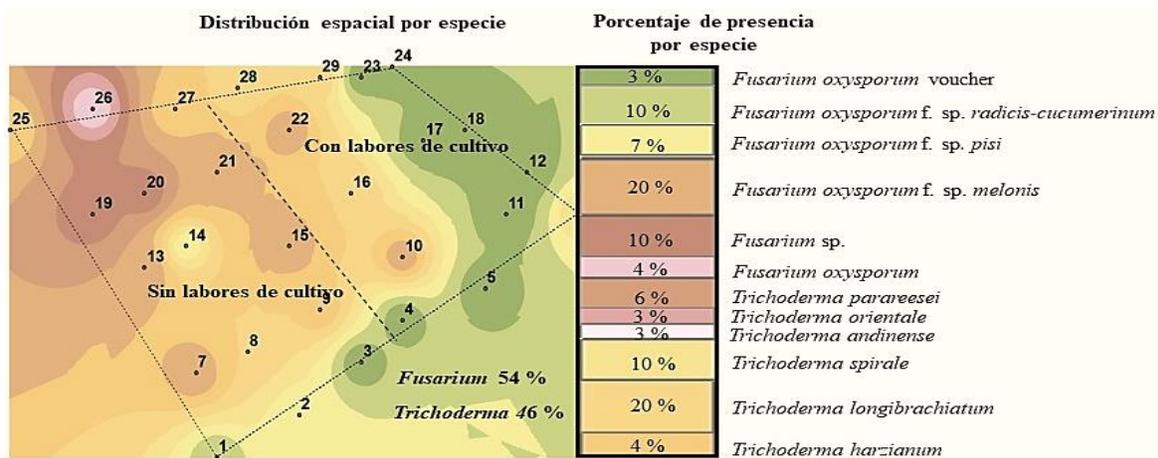


Figura 2. Especies de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* detectadas en el suelo en la primera temporada de muestreo.

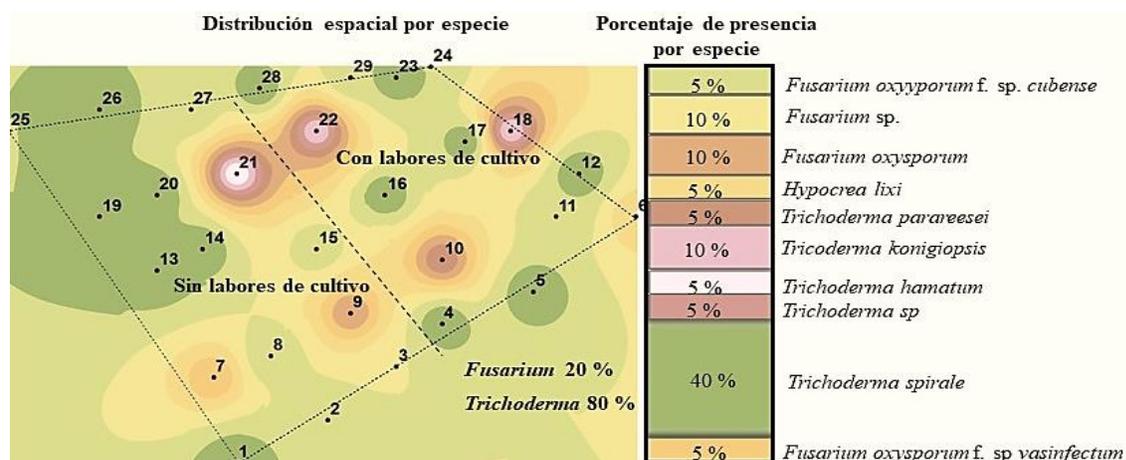
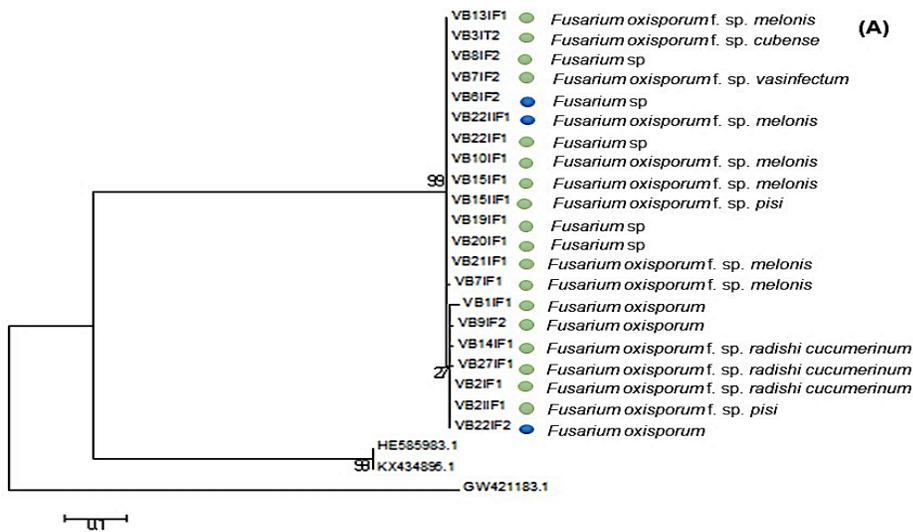
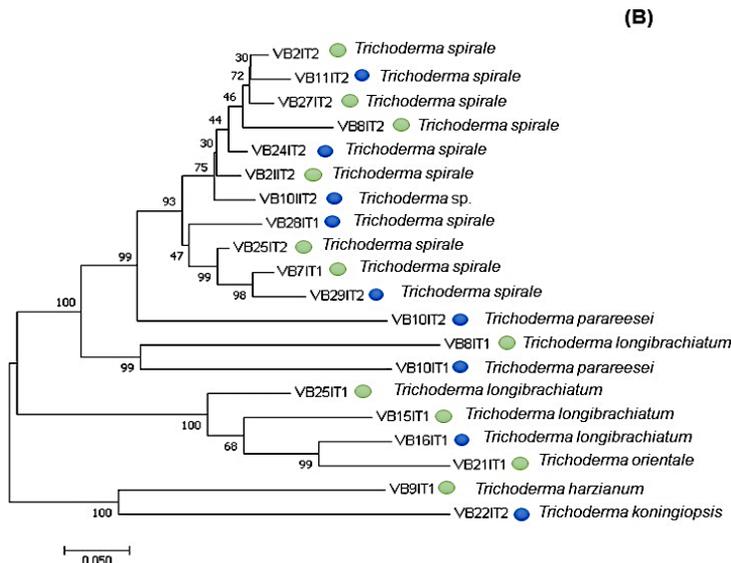


Figura 3. Especies de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* detectadas en el suelo en la segunda temporada de muestreo.

Las secuencias de ADN analizadas para un Bootstrap arriba de 80% inferidas de máxima parsimonia (MP), máxima Likelihood (ML) y Neighbour Joining (NJ) mostraron un arreglo filogenético para ambos géneros (Figura 4 y 5) el cual agrupó secuencias de aislados de ambas temporadas con 99% de similitud; sin embargo, no mostró la relación entre el parentesco y su presencia por temporada o con las labores de cultivo.



**Figura 4. Filogenia de especies de *Fusarium oxysporum* como resultado del análisis de datos de EF1- $\alpha$ .** Valores de bostrap arriba de 80% inferencia de máxima parsimonia (MP), máxima likelihood (ML) y Neighbour Joining (NJ). El círculo azul es el aislado se obtuvo del área con labores de cultivo, mientras que el verde indica que el aislado fue obtenido de suelo sin labores de cultivo.



**Figura 5. Filogenia de especies de *Trichoderma* sp. como resultado del análisis de datos de EF1- $\alpha$ .** Valores de bostrap arriba de 80% inferencia de máxima parsimonia (MP), máxima likelihood (ML) y Neighbour Joining (NJ). El círculo azul indica que el aislado se obtuvo de área donde se realizaron labores de cultivo, mientras que el círculo verde indica que el aislado fue obtenido de suelo sin labores de cultivo.

Estos resultados también mostraron una mayor diversidad genética de especies del género *Trichoderma* con una media de la diversidad interpoblacional de 5.75 obtenidos de 20 secuencias de siete poblaciones del género *Trichoderma* y un coeficiente de diferenciación de 4.27 obtenidos de un bootstrap de 1 000 réplicas. Mientras que para *Fusarium* la diversidad interpoblacional tuvo una media de 2.14 con un coeficiente de diferenciación de 4.66 obtenido de 21 secuencias de ocho poblaciones pertenecientes al género.

De acuerdo a estudios realizados por Maina *et al.* (2016) encontraron una correlación negativa entre la ocurrencia y diversidad de *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp., en áreas no disturbadas observaron una alta abundancia de *Trichoderma* sp. y baja ocurrencia de *Fusarium* y contrariamente en áreas disturbadas donde hubo mayor ocurrencia de *Fusarium* que *Trichoderma* sp. En este sentido nosotros observamos una mayor cantidad de especies tanto de *Fusarium* como de *Trichoderma* sp. en suelos sin realizar labores de cultivo habiendo una reducción para el género *Fusarium* al hacer labores de cultivo y poca influencia de esas labores en la cantidad de especies de *Trichoderma* (Figura 4 y 5).

Los resultados de diversidad de los ocho aislados de *Trichoderma spirale*, que fue la especie que presentó mayor abundancia mostraron una baja diversidad intrapoblacional observada en la expresión de los locis, debido a que sólo en el aislado VB28IT1 obtenido del sitio 33 se amplificaron bandas las cuales mostraron un tamaño entre 75 a 500 bp.

En este aislado un total de siete bandas fueron amplificadas de cinco ISSR; una del fragmento GA9T, cinco del fragmento ACC6 y una del GA9C mientras que los fragmentos CA<sub>8</sub>RG y GTG<sub>5</sub> no presentaron amplificación en ninguna de los aislados. Dos poblaciones o más que desciende de un ancestro en común, presentan frecuencias alélicas idénticas a su ancestro. Esto es posible al analizar poblaciones viviendo en espacios medianamente pequeños en los cuales existe poca incidencia de factores o barreras que influyan en la presión de selección genética dentro de la especie.

## Conclusiones

En este estudio se reitera la importancia del uso adecuado del medio de cultivo para el aislamiento de especies de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* en suelo, debido a que de éste depende en gran medida la veracidad de resultados al hacer estudios de densidad poblacional, así como de abundancia y diversidad de especies. Sin embargo, en estudios a campo abierto el efecto de los factores climáticos, así como el de las labores culturales y las épocas de extracción de muestras, también influyen en este tipo de estudios.

Encontrando en estos resultados una mayor diversidad y abundancia de especies de ambos géneros en suelos donde no se realizan labores de cultivo, además de la escasa influencia de esas labores en la cantidad de especies de género *Trichoderma*, el cual mostró una sucesión de *T. longibrachiatum* por *T. spirale* de la primera a la segunda temporada. Esta sucesión y dominio exponen la actividad de biocontrol, la cual puede mantener la estabilidad de las poblaciones del género *Fusarium*, especialmente *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en plátano.

## Agradecimiento

A la Dirección General de Estudios Superiores SEP que; a través, de la dirección de superación académica (DSA) y programa para el desarrollo profesional docente para el tipo superior (PRODEP) financió este trabajo.

## Literatura citada

- Bateman, G. L. and Murray, G. 2001. Seasonal variation in population of *Fusarium* species in wheat-field soil. *Appl. Soil Ecol.* 18(2):117-128.
- Benaouali, H.; Hamini, N.; Bouras, A.; Benichou, S. L.; Mebrouk, K. and Henni, J. E. 2014. Isolation, pathogenicity test and physicochemical studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *Adv. Environ. Biol.* 8(10):36-49.
- Bentley, S.; Pegg, K. G.; Moree, N. Y.; Davis, R. D. and Buddenagen, I. W. 1998. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Analyzed by DNA. *Fingerprintin.* 88(12):1283-1293.
- Bernhoft, A.; Torp, M.; Clasen, P. E.; Loes, A. K. and Kristoffersen, A. B. 2012. Influence of agronomic and climatic factors on *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. *Food Additives y Contaminants.* 29(7):1129-1140.
- Bragulat, M.; Martínez, E.; Castellá, G. and Cabañes, F. 2004. Selective efficacy of culture media recommended for isolation and enumeration of *Fusarium* spp. *J. Food Protec.* 67(1):207-11.
- Carbone, I. and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 91(3):553-556.
- Chaverri, P.; Castlebury, L. A.; Overton, B. E. and Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia.* 95(6):1100-1140.
- Dita, M. A.; Waalwijk, C.; Paiva, L. V.; Souza, Jr. M. T. and Kema, G. H. J. 2011. A greenhouse bioassay for the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* x 'Grand Naine' (Musa, AAA, Cavendish subgroup) interaction. V International Bananas Symposium: ISHS-ProMusa Symposium on Global Perspectives on Asian Challenges, Guangzhou, China. *Acta Hortic.* 897:377-380.
- Dita, M.; Barquero, M.; Heck, D.; Mizubuti, E. S and Staver, C. P. (2018) *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers Plant Sci.* 9:1-21. doi: 10.3389/fpls.2018.01468.
- García-Núñez, H. G.; Martínez-Campos, A. R.; Hermosa-Prieto, M. R.; Monte-Vázquez, E.; Aguilar-Ortigoza, C. J. and González-Esquível, C. E. 2016. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 35(1):58-79.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41(1):95-98.
- Jiménez-Fernández, D.; Montez-Borrego, M.; Navas-Cortés Juan, A.; Jiménez-Díaz, R. M.; Landa, B.; B. 2010. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. *Appl. Soil Ecol.* 46(3):372-382.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Plant Prot. Res.* 8(3):114-125.
- Leong, S. K.; Latiffah, Z. and Baharuddin, S. 2010. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* isolates from Malaysia. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4(11):1026-1037.

- López, D. and López, M. O. 2004. Influencia de los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del género *Fusarium* en Cuba. *Fitosanidad*. 8(3):7-11.
- Maina, P. K.; Wachira, P. M.; Okoth, S. A.; Kimenju, J. W. and Mwangi, J. M. 2016. Co-occurrence and Diversity of Soil *Trichoderma* and *Fusarium* species from different land use intensities in Machakos County, Kenya. *Arch. Current Res. Inter*. 4(1):1-13.
- McDonald, B. A. and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Rev. Phytopathol.* 40(1):349-379.
- Nirmaladevi, D.; Venkataramana, M.; Srivastava, R. K.; Uppalapati, S. R.; Gupta, V. K.; Yli-Mattila, T. and Chandra, N. S. 2016. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Nature*. 6:1-14. <https://www.nature.com/articles/srep21367.pdf>.
- Orozco Santos, M.; García Mariscal, K. y Vázquez Jiménez, J. L. 2009. Estado actual del mal de panamá en musáceas en México. *In: Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de Fusarium, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América Latina y El Caribe*. San Salvador, El Salvador. Resúmenes. Bioversity. 71 p.
- Pinkerton, J. N. 2000. Effect of soil solarization and cover crops on populations of selected soilborne plant pathogens in Western Oregon. *Plant Dis*. 84(9):952-96.
- Ploetz, R. C. 2015. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology*. 105(12):1512-1521
- Retana, K.; Ramírez-Coché, J. A.; Castro, O. y Blanco-Meneses, M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en costa rica. *Agron. Costarric*. 42(1):115-126.
- Sánchez-López, V.; Martínez-Volañoz, L.; Zavala-González, E. A. y Ramírez-López, M. 2012. Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. *Rev. Mex. Micol*. 36(2):17-26.
- Suárez-Estrella, F.; Vargas García, M.; López, M. and Moreno, J. 2004. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* on plant waste. *Crop Protection*. 23(2):127-133. 10.1016/j.cropro.2003.07.006.
- Tamura, K.; Paterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*. 28(10):2731-2739.
- Thangavelu, R.; Muthu, M. and Mustaffa, M. 2011. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Isolates (Foc) of India by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis. *Mol. Biotechnol*. 51:203-11.