

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum***  
**AISLADO DE CULTIVOS COLOMBIANOS DE TOMATE (*Solanum***  
***lycopersicum*) CON MARCHITEZ VASCULAR.**

**ANGIE TATIANA ALMONACID SUAREZ**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**  
**BOGOTÁ D.C**  
**2018**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum*  
AISLADO DE CULTIVOS COLOMBIANOS DE TOMATE (*Solanum  
lycopersicum*) CON MARCHITEZ VASCULAR.**

**Angie Tatiana Almonacid Suárez**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de:**

**BIÓLOGO**

**Director:**

**Diana Marcela Vinchira Villarraga**

**Bacterióloga, MSc. en ciencias-Microbiología**

**Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional de Colombia**

**Codirector:**

**Silvia Bustamante Rodríguez**

**Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional de Colombia**

**Universidad El Bosque**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
BOGOTÁ  
2018**

## NOTA DE APROBACIÓN

---

DIANA VINCHIRA VILLARRAGA  
DIRECTOR

---

JURADO  
IBONNE AYDE GARCIA ROMERO

---

JURADO  
SANDRA MILENA GONZALEZ SAYER

---

JURADO  
JUAN PABLO HERNANDEZ

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres Miguel Antonio Almonacid y Diana Esperanza Suarez por todo su apoyo brindado, por su colaboración, empeño, paciencia, amor, por esforzarse cada día para que yo obtuviera un mejor futuro y lograra alcanzar una de mis primeras metas, a mi hermanita Katherine Almonacid por estar siempre conmigo y enseñarme que en la vida las cosas se logran con esfuerzo y dedicación. A mi sobrina Luciana Prada porque mientras yo labraba mi camino ella llevo para poner un poco más de Voluntad y seguridad en mi camino y así conseguir lo anhelado, a Jehison Prada, Yolanda Suarez y Gloria Suarez por los consejos dados.

Agradezco a cada una de las personas que se aparecieron en mi camino, compañeras que se convirtieron en amigas, amigas que se convirtieron en hermanas, con las que compartes incluso mucho más tiempo que con tu familia, que se encuentran contigo en momentos difíciles, siempre brindando lo mejor de ellas.

A mis docentes por su acompañamiento, apoyo, paciencia, Lecciones y por transmitir todos sus conocimientos, dejando una gran recompensa personal, abriendo el camino para ser una excelente profesional.

Un agradecimiento muy especial a mí Directora Diana Vinchira por su guía, apoyo y enseñanza. A Elizabeth Méndez por enseñarme y acompañarme en mi proceso de aprendizaje. Por último, a todos los miembros del Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional, por recibirme de la mejor manera y aportarme conocimientos dentro del ámbito de la Biología Molecular

“La universidad el bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por el Investigador en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

Dedicado a mis padres, hermana y a todas  
las personas que contribuyeron en mí  
Formación académica y personal.

## Contenido

1. Introducion.....	1
2. Marco Conceptual.....	4
2.1 Marco de Referencia.....	4
2.1.1 El cultivo de Tomate en colombia.....	4
2.1.2 Fusairum ocysporum f. sp. lycopersici y la marchitez vascular.....	6
2.1.3 Caracteristicas generales de las razas fisiologicas de Fusarium oxysporum Lycopersici y su relacion con la resistencia a la marchitez vascular.....	11
2.1.4 Proteínas secretadas por patógenos.....	13
2.1.5 Metodos de indentificacion molecular de fitopatogenos del genero Fusarium oxysporum asociados a PCR convencional.....	17
2.2 Marco Legal.....	20
2.2.1 Marco legal a nivel Nacional.....	20
3. Pregunta de investigacion.....	22
4. Justificacion.....	23
5. Objetivos.....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos especificos.....	25
6. Metodologia.....	26
6.1 Aislamiento y purificacion de hongos fitopatogenos del genero Fusarium a partir de tejido vegetal afectado con marchitez.....	26
6.2 Caracterizacion macroscopica y microscopica de los aislamientos fungicos obtenidos.....	28

6.3 Identificación molecular mediante amplificación del gen ITS.....	29
6.3.1 Extracción del DNA genómico.....	29
6.3.2 Amplificación por PCR de la región ITS.....	30
6.3.3 Secuenciamiento y análisis filogenético de las secuencias ITS obtenidas.....	31
6.4 Tipificación a nivel de forma especial y raza fisiológica de los aislamientos pertreñecientes a <i>Fusarium Oxysporum</i> .....	32
6.4.1 Pruebas de patogenicidad en Tomate.....	32
6.4.2 Identificación de Razas Fisiológicas mediante PCR convencional.....	35
7. Resultados y análisis de Resultados.....	37
7.1 Aislamiento y caracterización fenotípica de <i>Fusarium Oxysporum</i> .....	37
7.2 Identificación taxonómica de los aislamientos por secuenciamiento del gen ITS.....	42
7.3 Pruebas de patogenicidad in vivo.....	48
7.4 Tipificación de los aislamientos de <i>Fusarium Oxysporum</i> obtenidos por PCR.....	53
8. Conclusiones.....	60
9. Referencias Bibliográficas.....	61
10. Anexos.....	69

## **Lista de Figuras**

<b>Figura .1</b> Departamentos productores de tomate en Colombia.....	<b>Pag.4</b>
<b>Figura .2</b> Ciclo productivo del cultivo de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	<b>Pag.5</b>
<b>Figura .3</b> Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	<b>Pag.9</b>
<b>Figura .4</b> Síntomas clásicos de la Marchitez vascular.....	<b>Pag.10</b>
<b>Figura .5</b> Planta de tomate con síntomas de marchitez vascular.....	<b>Pag.26</b>
<b>Figura .6</b> Esterilización y ubicación de los fragmentos de la planta de tomate.....	<b>Pag.27</b>
<b>Figura .7</b> Inóculos de los aislamientos fúngicos.....	<b>Pag.33</b>
<b>Figura .8</b> Proceso de inoculación de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> en variedades Manglober bajo condiciones controladas.....	<b>Pag.34</b>
<b>Figura.9</b> Características macroscópicas de los aislamientos .....	<b>Pag.39</b>
<b>Figura .10</b> Características microscópicas de los aislamientos .....	<b>Pag.40</b>
<b>Figura. 11</b> DNA genómico obtenidos por el método de extracción fenol-cloroformo de los aislamientos evaluados.....	<b>Pag. 43</b>
<b>Figura. 12</b> Amplificación de la región ITS.....	<b>Pag. 44</b>
<b>Figura.13</b> Extracción de DNA y amplificación del gen ITS del aislamiento 8H.....	<b>Pag. 45</b>
<b>Figura 14</b> Árbol filogenético de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> en evaluación.....	<b>Pag. 46</b>
<b>Figura.15</b> Síntomas presentes en los tratamientos infectados con las cepas fúngicas.....	<b>Pag.49</b>
<b>Figura.16</b> Re-aislamientos del fitopatógeno de cada una de las plantas tratadas.....	<b>Pag. 52</b>
<b>Figura 17</b> Productos de PCR obtenidos con el cebador Uni.....	<b>Pag. 54</b>

<b>Figura.18</b> Producto de PCR obtenido con el primer Sp13.....	<b>Pag.55</b>
<b>Figura 19.</b> Producto de PCR obtenido con el set de primer Sp23.....	<b>Pag.56</b>
<b>Figura 20.</b> Producto de PCR contenido con el set de primer SpI.....	<b>Pag. 58</b>

**Lista de tablas**

<b>Tabla.1</b> Fitopatógenos que afectan el cultivo de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	<b>Pag.6</b>
<b>Tabla 2.</b> Proteínas secretadas por el patógeno.....	<b>Pag.14</b>
<b>Tabla.3</b> Primers propuestos para la clasificación taxonómica de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> obtenidos de plantas de tomate.....	<b>Pag.19</b>
<b>Tablas.4</b> Primers universales para la amplificación de secuencias de la región ITS.....	<b>Pag.31</b>
<b>Tabla. 5</b> Escala de severidad de marchitez vascular.....	<b>Pag.34</b>
<b>Tabla.6</b> Set de Primers para la diferenciación de las razas de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> y forma especial.....	<b>Pag.35</b>
<b>Tabla.7</b> Combinaciones y tamaños de los amplímeros esperados para cada raza fisiológica y forma especial. ....	<b>Pag.36</b>
<b>Tabla.8</b> Origen y características fenotípicas macro y microscópicas de los aislamientos.....	<b>Pag.38</b>
<b>Tabla.9</b> Concentración de DNA genómico obtenido para cada aislamiento evaluado en el NanoDrop.....	<b>Pag. 42</b>
<b>Tabla. 10</b> Clasificación taxonómica de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> por análisis de la región ITS1 e ITS4.....	<b>Pag. 47</b>
<b>Tabla. 11</b> Grado de infección y síntomas presentes en las plantas tratadas correspondientes a la variedad ManGlover y Milano.....	<b>Pag. 50</b>

***Tabla. 12 Razas fisiológicas o forma especial para los 8 aislamientos de Fusarium oxysporum según los amplímeros obtenidos por cada uno de los Primers.....Pag. 54***

## Resumen

El tomate (*Solanum lycopersicum*), uno de los cultivos con mayor producción en Colombia, se ve afectado por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Fol, es el hongo causante de las enfermedades conocidas como marchitez vascular y mal de talluelo. La severidad de estas enfermedades se asocia a la variabilidad genética del patógeno, evidenciada por la presencia de diferentes razas fisiológicas. Una de las técnicas de control más efectivas es la siembra de variedades de tomate resistentes a la infección por parte de alguna de las razas fisiológicas. Sin embargo, esta estrategia requiere de una clasificación taxonómica detallada de los aislamientos de *F. oxysporum* en la cual se incluya la detección de formas especiales y razas fisiológicas. Debido a que en Colombia se desconoce el tipo de razas fisiológicas de Fol presentes en los cultivos, el objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar molecularmente aislamientos nativos de *F. oxysporum* en dos fincas dedicadas al cultivo de Tomate en Cundinamarca y Tolima para aportar información sobre la distribución de este patógeno en zonas afectadas con marchitez vascular y proponer un método de diagnóstico molecular de este fitopatógeno. A partir de las muestras evaluadas, se obtuvieron un total de 8 aislamientos de *F. oxysporum*, los cuales se aislaron, purificaron, e identificaron mediante claves taxonómicas. Adicionalmente, se realizó la caracterización molecular por secuenciamiento de la región ITS, se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de tomate variedad ManGlober y Milano y se realizó la tipificación hasta nivel de forma especial y raza fisiológica por medio de PCR convencional. De los ensayos realizados, se sugiere que de los 8 aislamientos evaluados, 3 pertenecen a la raza 1 (2F, 4F y 8H) y 1 pertenece a la forma especial *radicis-lycopersici* (2R). Los aislamientos restantes si bien no

podieron ser clasificados hasta raza fisiológica, si demostraron ser patógenos del tomate, por lo cual pueden ser usados en otras aproximaciones para la búsqueda de estrategias de manejo de la marchitez vascular. Se sugiere apoyar los resultados aquí obtenidos con pruebas de patogenicidad In vivo usando variedades resistentes y susceptibles a las tres razas fisiológicas de Fol para confirmar los datos obtenidos. Los resultados aportados por esta investigación, dan cuenta de la distribución del fitopatógeno en puntos específicos del cultivo de tomate en el país y constituyen el primer acercamiento para obtener información epidemiológica de este fitopatógeno en Colombia.

**Palabras clave:** Marchitez vascular, *Fusarium oxysporum*, tomate, PCR

## Abstrac

Tomato (*Solanum lycopersicum*), one of the crops with the highest production in Colombia, is affected by the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Fol, is the causal agent of the disease known as vascular wilt. The severity of this disease is associated with the genetic variability of the pathogen, evidenced by the presence of different physiological races. One of the most effective control techniques is the sowing of tomato resistant varieties. However, this strategy requires a detailed taxonomic classification of the *F. oxysporum* isolates that include the detection of special forms and physiological races. In Colombia, the type of physiological races of Fol present in the crops is unknown. Because of that, the objective of this investigation was to isolate and molecularly characterize native isolates of *F. oxysporum* in two farms dedicated to the cultivation of Tomato in Cundinamarca and Tolima in order to provide information about the distribution of this pathogen in areas affected with vascular wilt and propose a method for molecular diagnosis of this phytopathogen. From the samples evaluated, 8 isolates of *F. oxysporum* were obtained, which were isolated, purified, and identified by taxonomic keys. In addition, molecular characterization was carried out by sequencing the ITS region, pathogenicity tests were carried out on tomato plants varieties Manglober and Milano, and molecular typing was carried out to a special form level and physiological race by means of conventional PCR. From the tests carried out, it is suggested that of the 8 isolates evaluated, 3 belong to Fol race 1 (2F, 4F and 8H) and 1 belongs to the special form radicis- lycopersici (2R). The remaining isolates could not be classified until physiological race, but they proved to be pathogenic strains, so they can be used in other approaches for the search of vascular wilt management strategies. It is suggested to support the results obtained here with in vivo pathogenicity tests with resistant and susceptible varieties to the three physiological races of Fol to confirm the

obtained data. The results contributed by this research, give an initial imagine of the pathogen distribution in specific points of the tomato crop in the country and constitute the first approach to obtain epidemiological information of this phytopathogen in Colombia.

**Key words:** vascular wilt, *Fusarium oxysporum*, tomato crops, PCR

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

## 1. Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es considerado uno de los cultivos de hortalizas más importantes en la mayoría de países. En Colombia, se tienen un total de 8.906 hectáreas sembradas con este cultivo, distribuidas en 26 departamentos que generan aproximadamente 382.609 toneladas anuales en producción (DANE-ENA.2017). En los últimos años, se ha evidenciado un problema fitosanitario importante en este cultivo, generado por el hongo Ascomiceto *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* (Fol), agente causal de la enfermedad conocida como marchitez vascular (McGovern, 2015)

La marchitez vascular, se caracteriza por producir destrucción de tejidos vasculares, amarillamiento de hojas, doblamiento del tallo e incluso puede llegar a provocar la muerte de la planta (Hernández, *et al.* 2014). La incidencia y severidad de esta enfermedad ha conllevado a una disminución importante en la rentabilidad del cultivo y la calidad del producto generado; de hecho, existen reportes que indican pérdidas en producción de hasta un 80% (Nirmaladevi, *et al.* 2016).

La severidad de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* en un cultivo determinado, ha sido asociada a su variabilidad genética, producto de eventos de co-evolución con diferentes plantas hospedera (Estupiñan & Ossa. 2007). Esta variabilidad, se ve reflejada en las diferencias morfológicas, metabólicas y patogénicas de las cepas

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

pertencientes a esta especie fúngica (Hernández, *et al.* 2014). Tales diferencias, han derivado en a la aparición de aislamientos que aun siendo de la misma especie son capaces de infectar un número limitado de plantas y así mismo, generar enfermedad en ellas. De hecho, esta característica, común en otras especies de *Fusarium*, generó la necesidad de una clasificación taxonómica más detallada en la cual se incluyeron las formas especiales y las razas fisiológicas. En *F. oxysporum*, se han descrito 38 formas especiales, que se caracterizan por infectar un hospedero (planta) determinado. (Arbelaez, 2000). Cada forma especial, cuenta con un número variado de razas fisiológicas, las cuales presentan diferentes perfiles de virulencia a variedades específicas de una planta hospedera particular (Turrà. *et al.* 2015).

En el caso específico de tomate, existen dos formas especiales infectivas: *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol) agente causal de la marchitez vascular y *F. oxysporum f. sp. radicis-licopersici* agente causal del pie de tómate o podredumbre de raíz (Nirmaladevi, *et al.* 2016). Fol, presenta 3 razas fisiológicas (R1, R2 y R3), las cuales se diferencian por su virulencia ante distintas variedades de tomate que presentan genes de resistencia específicos, adquiridos (posiblemente) por un proceso de introgresión genética (Turrà. *et al.* 2015).

En este contexto, la resistencia de una variedad de tomate a alguna de las tres razas fisiológicas de Fol, y el conocimiento de la raza presente en un cultivo, permite realizar una selección adecuada de las variedades que deberían ser sembradas como estrategia para

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

reducir la incidencia y severidad de la marchitez vascular en este sistema productivo (McGovern,2015).

Infortunadamente, en Colombia no se cuenta con información acerca de qué tipo de razas fisiológicas del patógeno se encuentran afectando los cultivos de tomate. Sin embargo, las razas 1, 2 y 3 han sido descritas en otros países del continente americano incluyendo Estados Unidos, México, Chile y Brasil (Tamayo, 2013) y en zonas específicas europeas y asiáticas como Italia, China y Corea (Martinez. 2016), siendo la raza 3 de Fol la más agresiva descrita a la fecha. (Cai, *et al.* 2013)

En este contexto, surge la necesidad de realizar una caracterización molecular de *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* (Fol) en cultivos de tomate de Colombia, con el objetivo de identificar que razas de Fol se encuentran presentes en algunos de los departamentos productores de tomate en el país. De esta forma, se busca aportar información de relevancia para los programas de manejo fitosanitario de este cultivo. Así mismo, se pretende generar un protocolo que pueda ser implementado en procesos de diagnóstico molecular de este fitopatógeno y que contribuya en la generación de planes de manejo integrado para favorecer el buen desarrollo de la planta y la sostenibilidad de esta cadena productiva.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

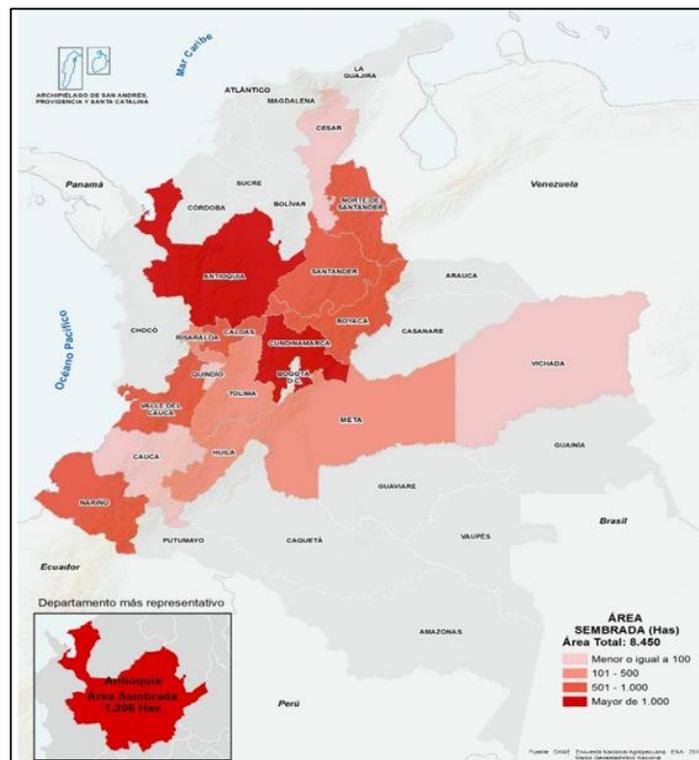
Angie Tatiana Almonacid Suarez

## 2. Marco conceptual

### 2.1 Marco de referencia

#### 2.1.1 El cultivo de tomate en Colombia

El tomate, es una de las hortalizas con mayor importancia económica en el país debido a su nivel de producción,(CCB, 2015). Para el año 2016, se habían alcanzado un total de 382.609 toneladas (ton) anuales de producción, a partir de 8.906 hectáreas sembradas en 26 departamentos (Figura 1). De estos, Boyacá es el principal departamento productor con 79.325 ton, seguido por Antioquia con 56,245 ton, Nariño con 51,399 ton, Caldas con 48,832 ton y Cundinamarca con 37,699 ton. (DANE, 2017).



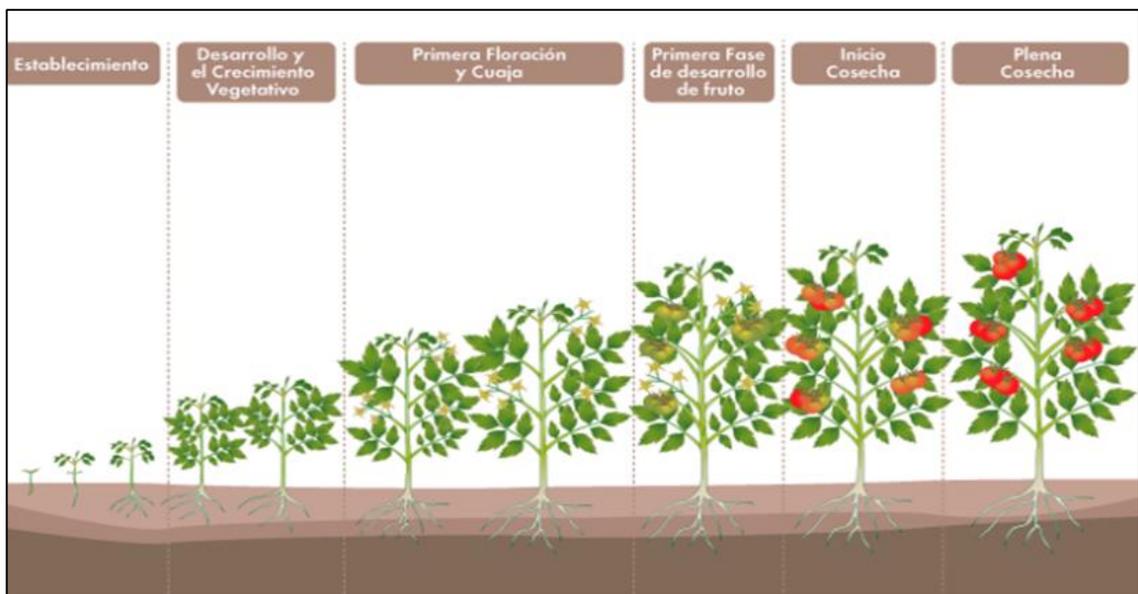
**Figura 1.** Departamentos productores de tomate en Colombia (DANE, 2017).

El tomate puede ser un cultivo tanto anual como perenne y su ciclo de producción consta de varias etapas de desarrollo. Luego de la siembra, una semilla puede durar un tiempo

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

aproximado de cuatro a cinco días para germinar. La fase inicial del cultivo corresponde al establecimiento de la planta. Posteriormente, se da el crecimiento vegetativo, caracterizado por el desarrollo de la raíz y la parte aérea (hojas). Una vez finalizada la etapa de crecimiento vegetativo, se da el proceso de floración y formación de frutos hasta alcanzar la madurez fisiológica la cual se logra de 80 a 120 días posteriores a la germinación (Figura 2). (Escobar & Lee, 2009)



**Figura 2.** Ciclo productivo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). (Escobar & Lee, 2009)

A pesar de su facilidad de manejo, el cultivo se ve afectado por un diverso número de fitopatógenos bacterianos, fúngicos y virales que inciden en la productividad del mismo (Tabla 1). De ellos, son de interés particular los hongos Fol y Forl, por su alta incidencia en

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

el país, su baja respuesta a tratamientos químicos convencionales y por la escasa información de su distribución en los departamentos productores de Colombia.

**Tabla 1.** Fitopatógenos que afectan el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*).

Fitopatógeno	Enfermedad	Referencia	
<b>Fitopatógenos fúngicos</b>			
<i>Stemphylium spp</i>	Manchas gris de las hojas	(bernal, 2010)	
<i>Cladosporium fulvum</i>	Moho de la hoja		
<i>F. oxysporum f. sp. radicle-lycopersici</i>	Podredumbre de raíz		
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris		
<i>Alternaria solani</i>	Tizón temprano		
<i>Phytophthora infestans</i>	Tizón tardío		
<i>Phytophthora spp</i>	Pudrición de fruta y de raíces		
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	Marchitamiento		
<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Moho blanco		
<b>Fitopatógenos bacterianos</b>			
<i>Clavibacter michiganensis</i>	Cancro bacteriano		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Marchitamiento bacteriano		
<i>Erwinia carotovora</i>	Pudrición bacteriana del tallo		
<i>Pseudomonas corrugata</i>	Necrosis de la médula		
<i>Xanthomonas campestris</i>	Mancha bacteriana		
<i>Pseudomonas spp</i>	Pequeñas manchas bacterianas		
<b>Fitopatógenos virales</b>			
<i>Tobamovirus</i>	Virus del mosaico del tomate		
<i>Geminivirus</i>	Virus del rizado amarillo del tomate		

### 2.1.2 *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y la marchitez vascular.

Como se mencionó anteriormente, *Fusarium oxysporum* Schlectend.: *Fr. f. sp. lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hansen (Fol), es el agente causal de la enfermedad denominada marchitez vascular en tomate y ha sido reportado en más de 32 países (Vásquez & Castaño. 2017) La marchitez vascular, fue descrita desde hace más de 100 años y es reconocida actualmente por constituir uno de los patosistemas más estudiados a la fecha dado

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

el alto impacto económico que genera en los cultivos de tomate (Sain & Rep. 2015 y Ma *et al.* 2013). Las pérdidas generadas por esta enfermedad se encuentran reportadas en rangos del 47% al 80%. Por ello, Fol (y otras formas especiales de *Fusarium oxysporum*) ha sido descrito como uno de los 10 patógenos fúngicos de mayor relevancia en el sector agrícola a nivel mundial (Dean, *et al.* 2012).

*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, es un fitopatógeno de la clase Hyphomycete. Se caracteriza por su fácil diseminación a distancias cortas, por medio de agua, equipos agrícolas y herramientas contaminadas y a distancias largas, por medio del suelo o la presencia de plantas enfermas o material vegetal infectado (Dixon & Tilston, 2010), referenciado por Vásquez & Castaño. 2017. Así mismo, se ha reportado como uno de los patógenos con mayor persistencia en suelos, debido a su capacidad de producir microconidias, macroconidias y clamidiosporas como estructuras de reproducción, diseminación y resistencia (Vásquez & Castaño. 2017).

Las clamidiosporas, son producidas a través de la modificación de hifas vegetativas. La formación de estas, está relacionada con factores de estrés, agotamiento de nutrientes, ausencia del hospedante, y ambientes adversos. Debido a sus características, le confieren al hongo la capacidad de sobrevivir un extenso periodo de tiempo y presentan un eficiente desarrollo en condiciones favorables tales como la presencia de exudados radicales. Adicionalmente, tienen la capacidad de resistir temperaturas muy altas y se ha demostrado que causan síntomas más graves que las microconidias (Mc Govern, 2015).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

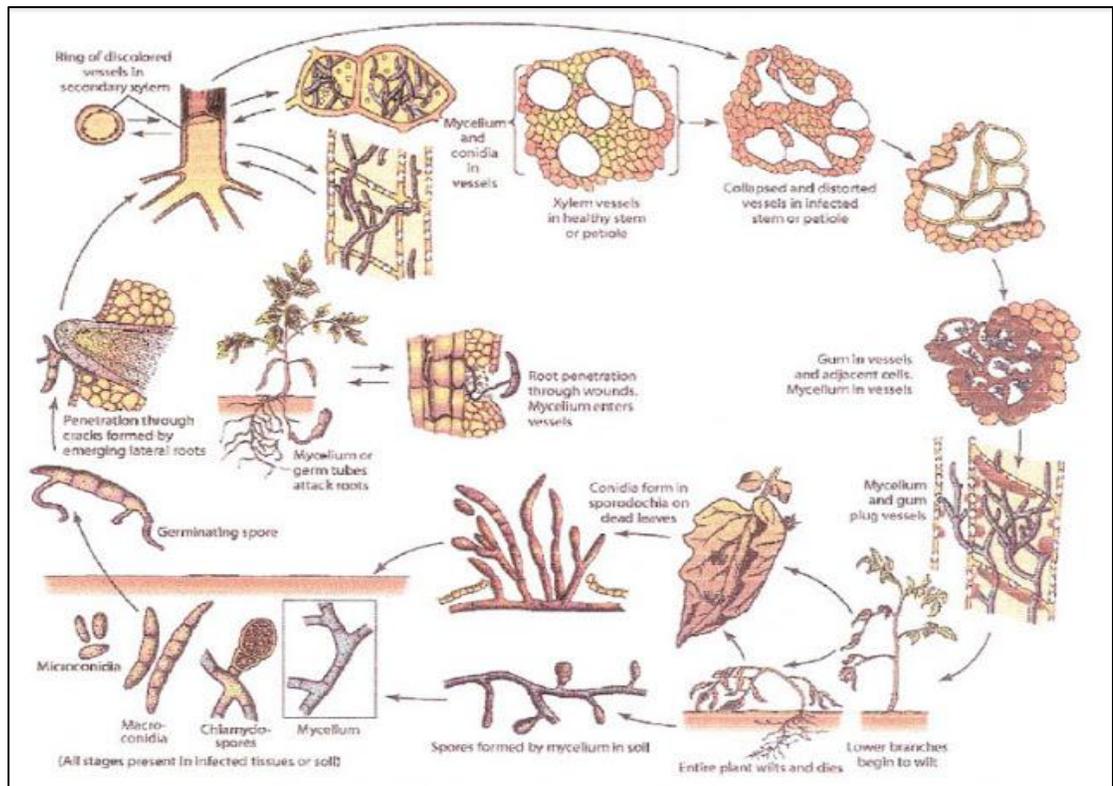
Por otra parte, las macroconidias han sido relacionadas con la diseminación aérea del hongo y se incluyen en las claves taxonómicas usadas para su identificación debido a los cambios morfológicos que sufren. (Katan *et al.* 1997). Finalmente, las microconidias son producidas en el micelio aéreo y difieren de los macroconidos en forma y tamaño, la mayoría de estos no presentan septos son generalmente pequeños y son predominantes en tejidos infectados. (Rodríguez, 2013)

El crecimiento de este patógeno se ve favorecido en lugares con temperaturas de 20°C a 32°C y con una alta humedad relativa (entre el 75-95%). *Fol*, es capaz de sobrevivir en el suelo, como saprófito o en restos vegetales, y puede mantenerse hasta 10 años viable (Kant *et al.* 2011). Cuando una planta susceptible entra en contacto con un suelo contaminado con *Fol*, se da inicio al proceso de germinación de los conidios, el micelio generado a partir de ellos, penetra e ingresa al ápice de las raíces. Posteriormente, avanza a través del córtex intercelularmente para alcanzar los vasos del xilema, permanece en ellos ramificándose y produciendo microconidos, que son liberados y llevados al ápice a través de la corriente de la savia y luego se transloca a través de ellos, hacia el tallo y la corona de la planta (Figura 3) (Agrios, 2005).

Los microconidos, germinan en el punto en donde el movimiento se detiene, el micelio producido, penetra la pared superior del vaso y se producen más microconidos en el próximo vaso. El proceso de taponamiento de los vasos por micelio, esporas, gel, gomas y tilides junto con el aplastamiento de los vasos por proliferación de las células adyacentes del parénquima son los responsables de la marchitez vascular (Yadeta & Thomma, 2013).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Arafat, 2015).

En las infecciones severas, el hongo invade todos los tejidos vegetales causando la muerte de la planta, esto le permite avanzar su proceso de colonización para llegar a la superficie externa de la planta para así esporular, generando un segundo foco de diseminación del fitopatógeno en el cultivo (Vásquez & Castaño, 2017).

Este patógeno se considera un hongo Hemibiótrofo debido a que su estilo nutricional se compone de una primera fase siendo este un biótrofo donde necesita que las células de la planta se encuentren vivas para su alimentación sin producir algún daño o la muerte de esta. Por otra parte, en su segunda fase este se vuelve un hongo necrótrofo, es decir que se

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

alimentan de células que sufren de necrosis derivada de la infección por el mismo, haciendo así que finalmente se produzca la muerte de la planta. (Silva, *et al.* 2016)

En plántulas, la carencia en el tallo de lignina, favorece que el hongo ataque rápidamente los vasos xilemáticos produciendo el colapso y la destrucción total de los tejidos, fenómeno conocido como el mal de talluelo (Agrios, 2005). La planta luego de su infección muestra síntomas característicos como es la aparición de un color pardo oscuro en el tallo, el cual es más visible en el punto de unión peciolo-tallo (Figura 4).



**Figura 4.** Síntomas clásicos de la Marchitez vascular (A) y el mal de talluelo (B) en cultivos de tomate *Solanum lycopersicum* (Vázquez, 2017; Díaz, 2015).

Por otra parte, cuando el hongo ataca plantas adultas la enfermedad es conocida como Marchitez vascular. Los síntomas característicos incluyen el amarillamiento de hojas y la generación de una coloración pardo-oscuro en el tallo y los haces vasculares. Por lo general,

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

una vez el hongo es capaz de colonizar los haces vasculares, se genera la muerte de la planta (Figura 4).

Debido a la diferencia en la virulencia de Fol en distintas variedades de plantas de tomate se han diferenciado tres tipos de razas fisiológicas. La raza 1, descrita en 1886, la 2 reportada en 1945 en Ohio, EUA y la raza 3 identificada en Australia, California, Florida, Georgia, Arkansas, Carolina del Norte y Tennessee (EUA) en 1978; y en 1996 en México (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996). (Ascencio, *et al.* 2008). Cada una de estas razas ha generado problemas fitosanitarios significativos en los cinco continentes y su identificación forma parte importante de los sistemas de manejo integrado del cultivo de tomate.

### *2.1.3 Características generales de las razas fisiológicas de Fol y su relación con la resistencia a la marchitez vascular.*

El modelo gen a gen, fue propuesto para explicar la resistencia en algunas plantas a patógenos determinados, asociándola a la interacción de genes presentes en la planta hospedera y el fitopatógeno. En este modelo, se plantea que una planta puede ser resistente a un patógeno si expresa un gen de resistencia (*R*) cuyo producto interactúe, directa o indirectamente, con la proteína producida a partir de un gen de avirulencia *AVR* expresado por el fitopatógeno.

En muchos casos, el patógeno es capaz de evolucionar con el fin de evadir la resistencia mediada por el gen *R*, mediante la producción de nuevos factores de virulencia (proteínas efectoras) o la pérdida de función del gen que la codifica. En el primer caso, la planta puede

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

llegar a adquirir genes *R* diferentes capaces de reconocer las nuevas proteínas, repitiendo el ciclo hasta conformar un proceso de co-evolución planta-patógeno que genera la aparición de las razas fisiológicas en diferentes patosistema como el caso de Fol.

Como se mencionó anteriormente, a la fecha, se han descrito tres razas fisiológicas de Fol (raza 1, 2 y 3), las cuales se dividen según su capacidad de evadir los genes específicos de resistencia (*R*) en las plantas de tomate, denominados genes Inmunidad o genes *I* (*I*-1, *I*-2 e *I*-3). Estos genes (o su producto) se caracterizan por su habilidad de interactuar, directa o indirectamente, con las proteínas efectoras AVR1, AVR2 y AVR3 producidas por Fol (Houterman et al., 2008).

AVR1, está presente en la mayoría de los aislamientos de Fol raza 1 y se encuentra ausente en las razas 2 y 3 (con algunas excepciones). Esta proteína, también denominada como Six4 (proteína secretada en xilema), es reconocida por el producto del gen de resistencia *I*-1, por lo cual todas aquellas plantas de tomate que poseen este gen son resistentes a la infección por Fol raza 1. Por otra parte, AVR2 (Six3) y AVR3 (Six1) se encuentran distribuidos con diferentes variantes alélicas en todas las razas de Fol y son reconocidos por los genes de resistencia *I*-2 e *I*-3 respectivamente (Rep et al., 2015).

Se ha propuesto que la delección del gen *AVR1* en aislamientos Fol raza 1, condujo a la aparición de la raza 2 (genotipo *AVR2*-*AVR3*). Así mismo, un posible evento de mutación en el gen *AVR2* pudo conllevar al fenotipo de la raza 3 (genotipo *-avr2* *AVR3*) (Inami et al.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

2012). En la actualidad, son muy pocas las variedades de tomate con resistencia a la raza 3, por ello se considera que es la más agresiva y de importancia para el sistema productivo de tomate junto con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (Negrete. 2013).

Debido a la diversidad en su virulencia el manejo de este hongo resulta ser difícil. Se han empleado varios métodos para hallar estrategias de control efectivas como el empleo de inductores de resistencia, biorreguladores y productos de origen botánico, la aplicación de fungicidas químicos, el control tradicional con buenas prácticas de manejo del cultivo y el uso de variedades resistentes.( Rodríguez,2002, Carrillo, 2012. Blunt, 2017). Esta última aproximación, es reconocida por sus buenos resultados en campo. Sin embargo, para su implementación es necesario hacer estudios a nivel molecular con el fin de identificar el tipo de raza fisiológica del fitopatógeno y así determinar que variedad es más conveniente cultivar. De aquí la importancia del desarrollo de técnicas moleculares que permitan de forma exacta, reproducible y eficiente identificar no solo a nivel de forma especial este fitopatógeno sino además aporten información sobre la raza fisiológica a la cual pertenece. (Khallal, 2007)

#### **2.1.4 Proteínas secretadas por Patógenos.**

Los patógenos que producen la enfermedad Marchitez vascular y otros, son capaces de secretar cierto grupo de proteínas durante la colonización generando un establecimiento (Planta- Patógeno). Generalmente encontramos proteínas ricas en cisteína, proteínas inductoras de necrosis, enzimas que se dirigen a la planta física o barreras químicas y

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

respuestas de defensa inducida y saponinas. (Tabla 2). A continuación hablaremos de algunas de estas proteínas que son secretadas por el patógeno.

**Tabla 2.** Proteínas secretadas por el patógeno. Adaptada de (Sain & Rep,2015)

Protein name	pathogen	Virulence phenotype deletion mutant	Avr	comments
<b>Small, Secreted proteins</b>				
SIX1	<i>Fol</i>	Reduced virulence on tomato	Yes (I-3)	
SIX2	<i>Fol</i>	-	-	
SIX3	<i>Fol</i>	Reduced virulence on tomato	Yes (I-2)	Interacts With Six5
SIX4	<i>Fol</i>	No supression of I-2/ I-3 mediated resistance en tomato.	Yes (I,I-1)	
SIX4	Fo5176	Reduced virulence on at	-	
SIX4	<i>Foc</i>	Reducen virulence on cabbage	-	
SIX5	<i>Fol</i>	Reduced virulence on tomato	-	Interacts With Six3 Required for 1-2 mediated immunity
SIX6	<i>Fol</i>	Reduced virulence on tomato	-	
SIX7	<i>Fol</i>	-	-	
SIX8	<i>Fol</i>	-	-	Multi-copy gene in Fol
SIX8b	<i>Fol</i>	-	-	Multi-copy gene in Fol
SIX9-14	<i>Fol</i>	-	-	
VDAG_05180	<i>Vd vdLs17</i>	Reduced virulence on tomato	-	Two LysM domains
Ave1	<i>Vd JR2</i>	Reduced virulence on tomato	Yes ( <i>Ve1</i> )	Homology to PNPs
Ave1	<i>Fol</i>	-	Yes ( <i>Ve1</i> )	Not found in xylem during infection
XLOC_009059	<i>Vd JR2</i>	Reduced virulence on tomato		
XLOC_008951	<i>Vd JR2</i>	Reduced virulence on tomato		
<b>NEP (-like) Proteins</b>				
NEP1	<i>Foe</i>	No virulence effect on coca	-	Ethylene and necrosis-inducing factor on several dicotylous plants
NEP	<i>Vd-8</i>	-	-	Wilt- inducing factor on cotton
NLP1	<i>Vd V592</i>	No virulence effect on cotton	-	Wilt- and necrosis-inducing factor on cotton

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

NLP2	<i>Vd V592</i>	No virulence effect on cotton	-	Wilt- and necrosis-inducing factor on cotton
NLP3-9	<i>Vd V592</i>	-	-	-
NLP1	<i>Vd JR2</i>	Reduced virulence on tomato <i>At</i> and <i>Nb</i>	-	Necrosis-inducing factor on <i>Nb</i> ; Mutant has reduced conidiophore formation and extensive formation of aerial hyphae
NLP2	<i>Vd JR2</i>	Reduced virulence on tomato at and <i>At</i>	-	Necrosis-inducing factor on <i>Nb</i>
NLP3-9	<i>Vd JR2</i>	-	-	-
<b>Secreted Enzymes</b>				
PG1	<i>Fol</i>	<i>ApgI Apgx6</i> double mutant reduced virulence on tomato	-	-
PGX6	<i>Fol</i>	<i>ApgI Apgx6</i> double mutant reduced virulence on tomato	-	-
TOM1	<i>Fol</i>	Reduced virulence on tomato	-	Tomatinase activity±25% reduced in deletion mutant
Mep1	<i>Fol</i>	<i>AfomepI AfosepI</i> double mutant reduced virulence on tomato	-	-
Sep1	<i>Fol</i>	<i>AfomepI AfosepI</i> double mutant reduced virulence on tomato	-	-
Isc1	<i>Vd V991</i>	Reduced virulence on tomato	-	-
<b>Hydrophobins</b>				
Ceratoul min	<i>Onu</i>	No virulence effect on elm	-	-
VDHI	Dvd-T5	No virulence effect on tomato	-	Reduced microsclerotia production in deletion mutant

Las plantas presentan unas barreras tanto físicas como químicas, que genera, que el patógeno use mecanismos de toxicidad o actividad enzimática que le permita avanzar dentro de ella y así mismo producir virulencia. La cutícula vegetal que está compuesta de cutina y enlaces tipo Ester, es una de las primeras barreras con las que se enfrenta el hongo y para penetrarla utiliza enzimas tipo cutinasas que ayuda a la degradación de esta. Algunos Hongos cuentan con una cantidad de enzimas de degradación como (CWDE). (Zhao et al 2013) Entre estas podemos encontrar 4 endopoligacturonasas (PG) y 4 exopoligacturonasas (PGX) que

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

tienen como función principal la degradación de pectina. Demostrando la importancia de la enzima durante el proceso infectivo del tomate. (Sain & Rep, 2015)

Las saponinas es una de las barreras químicas presentes en la planta que se genera debido a sus compuestos glucosídicos que contienen propiedades para la protección contra los microbios en las plantas de tomate, una de las saponinas principales es la alfa-Tomatina que tiene una actividad antifúngica, debido a su capacidad para unir esteroides en membranas fúngicas, creando así, una pérdida de la integridad de la membrana. Sin embargo Fol tiene la capacidad para producir una enzima que degrada este compuesto llamada Tomatinasa haciendo que la alfa Tomatina sea ineficaz como agente antimicrobiano. (Sain & Rep, 2015)

Las cisteínas, fueron identificadas en la sabia del xilema de plantas de tomate infectadas, denominadas enzimas secretadas en xilema (SIX) entre estas podemos encontrar la SIX1, SIX3, SIX4. Las cuales juegan un papel importante en la virulencia de Fol. (Schmidt, 2013 y Houterman. 2007)

Las lacasas extracelulares son oxidoreductasas que catalizan la reducción de 4 electrones de O<sub>2</sub> en agua con la oxidación simultánea de sustratos orgánicos y son considerados como uno de los factores responsables de la virulencia fúngica. Hasta la fecha se conocen 15 genes potenciales de lacasa en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y algunos de ellos están siendo estudiados.(Kwiatos et al.2015)

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

### *2.1.5 Métodos de identificación molecular de fitopatógenos del género Fusarium asociados a PCR convencional*

Los análisis de caracterización de tipo morfológico (fenotípico), constituyen la primera línea de identificación de cepas fúngicas y permiten en la mayoría de los casos identificar a nivel de género (y en algunas ocasiones especie) un aislamiento particular. Sin embargo, estos análisis no son suficientes a la hora de aportar información necesaria para la diferenciación de razas fisiológicas o formas especiales de una misma especie, ya que estas comparten las mismas características macro y microscópicas, como la producción de pigmentos, la forma y color de las colonias y la producción de un tipo de conidios con características particulares (Gomez.2008)

Debido a esto, surgió la necesidad de utilizar técnicas de tipo molecular donde se realicen estudios de nivel filogenético que aporten información para esclarecer la identidad de aislamientos ambientales de interés agrícola o industrial. Una de las técnicas más usadas es la PCR (Polymerase Chain Reaction) que consiste en generar múltiples copias de un fragmento de DNA en específico.

Esta técnica es una de las más eficientes para la identificación de patógenos en plantas (Wiwik et al., 2013). Para el análisis de las secuencias de DNA, se utilizan marcadores de DNA ribosomal, específicamente en el caso de los hongos, la del espacio interno transcripto

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

ITS, la cual ha sido muy utilizada actualmente para facilitar y solucionar las relaciones taxonómicas a nivel de especie en diferentes modelos fúngicos. (Alves-Santos et al., 2002).

A pesar de su utilidad para la identificación de un aislamiento a nivel de género y especie, el ITS no presenta la suficiente variabilidad para diferenciar formas especiales ni razas fisiológicas en complejos fúngicos como el de *Fusarium oxysporum*. Por ello, se han descrito otro tipo de aproximaciones que incluyen la tipificación a través de PCR convencional utilizando set de primers específicos para cada una de las razas descritas hasta la fecha.

En el caso de particular de Fol, Pinzón y colaboradores describieron el uso de los primers ITS1, ITS4, Fu-f, Fu-r, ITS-f, ITS-r, FUM1-f, FUM1-r, EF-1, EF-2, para la diferenciación especie-específica de hongos del género *Fusarium* (Pinzón. Et al. 2013).

Así mismo, Inami y colaboradores y Hirano y Arie 2006, plantearon el uso de combinaciones específicas de primers (Tabla 3), que permitían realizar de forma eficiente la diferenciación a nivel de raza de los *F. oxysporum f. sp. lycopersici* a través de amplificación por PCR convencional (Inami, et al. 2014). En estos estudios, se logró además discriminar los aislamientos pertenecientes a la forma especial *lycopersici* de la forma especial *radicis-lycopersici*, la cual es también infectiva de tomate pero genera la pudrición de la corona de tomate en lugar de la marchitez vascular (generada por Fol) (Inami, et al. 2014).

**Tabla 3.** *Primers propuestos para la clasificación taxonómica de los aislamientos de Fusarium oxysporum obtenidos de plantas de tomate.*

Set de primers	Primers	Secuencia	Referencia
FIGS11	FIGS11	5'-GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG-3'	(Inami et al. 2014)

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

FIGS12	FIGS12	5'-GCAAAATTCAATAGTATGGC-3'	
Uni	Unif	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'	(Hirano & Arie. 2006)
	Unifr	5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'	
Sp13	Sp13f	5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3'	
	Sp13r	5'-TCCTTGACACCATCACAGAG-3'	
Sp23	Sp23f	5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3'	
	Sp23r	5'-GCAACAGGTCGTGGGGAAAA-3'	
Sprl	Sprlf	5'-GATGGTGGAACGGTATGACC-3'	
	Sprlr	5'-CCATCACACAAGAACACAGGA-3'	

EL método propuesto por Hirano y Arie, permite la comparación de secuencia de nucleótidos de genes de la enzima endo y exo-poligalacturonasa, que es específica para este hongo patógeno, y cuyo producto es el causante de la degradación de la pared celular de la planta (REF). Debido al éxito en los resultados obtenidos para la diferenciación de razas y forma especial, esta aproximación ofrece una alternativa conveniente y útil para la diferenciación de este patógeno. Su aplicabilidad como método de diagnóstico molecular ha sido probada por otros autores como Pirayesh y colaboradores (2018) quienes empleando la metodología de Hirano y Arie. 2006 (con algunas modificaciones) lograron diferenciar el tipo de raza y forma especial de sus 50 aislamientos fúngicos. Así como también lo aseguran Martínez, et al. 2014 (Estudio realizado con aislamientos de México).

Sin embargo, se han presentado ciertas desventajas como reacciones cruzadas, ya que se ha encontrado que algunos aislamientos pueden llegar a ser tanto FOL raza 2 o FOLR y aseguran que esto podría ocasionar problemas para la determinación del patógeno. Por tanto, se sugiere seguir analizando el papel de este gen en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* con cebadores específicos y así desarrollar un método más preciso.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

En Colombia, no se ha estandarizado esta técnica para la diferenciación de razas fisiológicas y forma especiales en *Fusarium oxysporum* y aún se desconocen cuáles de ellas están presentes en los cultivos colombianos, lo que ha dificultado el control de este patógeno.

## 2.2 Marco legal.

### 2.2.1 Marco legal a nivel nacional

La recolección y aislamiento de los microorganismos que se evaluaron en el presente proyecto de investigación se llevó a cabo contando con el permiso marco de recolección de especímenes de la Universidad Nacional de Colombia (Resolución 0255 del 12 de marzo de 2014) expedido por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA). Todos los microorganismos de la investigación fueron registrados como parte de la colección “Banco de cepas y genes del IBUN” perteneciente al Registro Nacional de colecciones biológicas del Instituto Von Humboldt.

Los análisis que se derivaron de esta investigación no tuvieron efectos ambientalmente negativos, ya que los desechos generados fueron eliminados de acuerdo a las normas ambientales vigentes y a la normatividad que mantiene la Universidad Nacional para el manejo de estos residuos. Los ensayos de actividad biológica que se realizarán se basan en modelos In vitro e In vivo que no atentan contra la integridad física de animales o personas. Todo el material vegetal y los microorganismos (patógenos) fueron mantenidos en zonas confinadas físicamente para evitar la dispersión accidental del y fueron destruidas mediante

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

esterilización (bien sea por medios físicos o químicos) posterior a su análisis en el laboratorio (a excepción de las cepas conservadas dentro del cepario del Instituto de biotecnología).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

### **3. Pregunta de investigación**

¿Existen diferentes formas especiales y/o razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* presentes en los cultivos colombianos de tomate que puedan estar asociadas a la generación de la marchitez vascular en los cultivos de tomate de estas regiones del país?

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

#### **4. Justificación**

El hongo *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* (Fol), es un patógeno de gran importancia en los cultivos de tomate, debido a su alto impacto y amplia distribución. Fol vive como saprofito en el suelo y permanece muchos años viables ocasionando brotes de infección en amplios periodos de tiempo (Martinez,2016). Este fitopatógeno, es causante de la enfermedad conocida como la marchitez vascular del tomate cuya incidencia ha reducido considerablemente la superficie dedicada este cultivo (Tamayo. 2013).

Uno de los métodos más efectivos para el control de la marchitez vascular es el uso de variedades resistentes a este fitopatógeno (Martinez.2016). Sin embargo, la resistencia o susceptibilidad de una variedad específica a Fol está asociada a la raza fisiológica de este patógeno (Raza 1, 2 o 3) presente en el suelo donde se realizara el cultivo.

El desconocimiento de las razas presentes dificulta el uso de una variedad específica y por ende disminuye la eficiencia de esta estrategia de control, provocando el uso de técnicas con un mayor costo de producción como la aplicación de fungicidas químicos que ocasionan problemas adicionales como la contaminación del medio ambiente, la generación de microorganismos resistentes y la disminución de poblaciones microbianas no blanco (Amini & Sidovich.1 2010).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

En este sentido, es importante caracterizar el fitopatógeno hasta el nivel de raza con el objetivo de contribuir en su manejo durante el crecimiento de la planta. No existen a la fecha reportes en literatura que describan la presencia de alguna de las tres razas de Fol en Colombia. Por lo tanto, la presente propuesta de investigación se propone identificar las razas de Fol presentes en dos fincas dedicadas al cultivo de tomate, con alta incidencia de marchitez vascular en los departamentos de Cundinamarca y Tolima, los cuales son reconocidos por ser una de las zonas de mayor producción de tomate en el país (DANE-ENA.2017).

Esta información busca contribuir en los sistemas de control integrado de plagas y enfermedades en el cultivo de tomate, mediante la generación de un protocolo de identificación molecular y fenotípico de los aislamientos de Fol que puedan ser aplicados como métodos diagnósticos de este fitopatógeno en campo y que adicionalmente proporcionen información epidemiológica preliminar acerca de la distribución de las razas de Fol identificadas en el país.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

## **5. Objetivos.**

### ***3.1 Objetivo general.***

Caracterizar molecularmente las formas especiales y razas fisiológicas del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* presentes en cultivos colombianos afectados con marchitez vascular.

### ***3.2 Objetivos específicos.***

- Generar y caracterizar fenotípicamente un banco de aislamientos de *Fusarium oxysporum* a partir de plantas de tomate con síntomas de marchitez vascular provenientes de diferentes regiones de Cundinamarca y Tolima.
- Identificar molecularmente hasta nivel de especie los aislamientos obtenidos por amplificación de la región ITS.
- Tipificar los aislamientos de *Fusarium oxysporum* obtenidos hasta nivel de forma especial y razas fisiológica por medio de PCR convencional.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

## 6. Metodología

### 6.1 Aislamiento y purificación de hongos fitopatógenos del género *Fusarium* a partir de tejido vegetal afectado con marchitez vascular.

Para la obtención de aislamientos patógenos de *Fusarium oxysporum* f. sp *Lycopersici*, se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en fincas dedicadas al cultivo de tomate localizadas en los departamentos de Tolima y Cundinamarca respectivamente. Las plantas seleccionadas presentaban síntomas clásicos de marchitez vascular tales como necrosis y clorosis en hojas superiores e inferiores, pudrición de tallo y raíces y presencia de manchado café en el tallo (Figura 5). Una vez seleccionadas, las plantas fueron transportadas en cadena de frío hasta el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, donde posteriormente, se realizó el aislamiento del fitopatógeno siguiendo las recomendaciones de Inami y colaboradores en 2014



**Figura 5.** Planta de tomate con síntomas de marchitez vascular.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

Para el aislamiento del fitopatógeno de interés, se tomaron fragmentos de raíces, tallos, hojas y frutos, obteniendo tres muestras diferentes por cada sección a partir de tres plantas independientes. Estas muestras se dividieron en dos grupos, el primer grupo de muestras, se depositó directamente en agar PDA suplementado con gentamicina (0.2 µg/mL) sin ningún tratamiento adicional. Las muestras incluidas en el segundo grupo se esterilizaron superficialmente mediante inmersiones sucesivas de 3 minutos en hipoclorito de sodio (5%), agua destilada estéril y alcohol etílico (70%). Una vez esterilizadas, se depositaron en agar PDA suplementado con gentamicina (Figura 6).



**Figura 6.** Esterilización y ubicación en agar de los fragmentos de la planta de tomate.

Hojas.(A) raíces. (B) tallos. (C)

A continuación, todos los medios fueron incubados a una temperatura de 25 ° C por diez días.

Las colonias que se obtuvieron fueron purificadas mediante sub-cultivo en agar PDA, para su posterior análisis macro y microscópico (Inami, *et al.* 2014).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

Para su preservación, cada uno de los aislamientos purificados fue conservado a -20°C. Esta conservación se realizó siguiendo el protocolo de Inami y colaboradores. Brevemente, las conidias de cada aislamiento se obtuvieron por raspado de una colonia generada a partir de un cultivo monosporico en agar PDA de diez días de crecimiento usando solución salina normal (0.85%) suplementada con Tween 80 (0.1%). Esta suspensión, fue filtrada a través de jeringas con algodón estéril, con el objetivo de retener la mayor cantidad de micelio, permitiendo recuperar únicamente conidias (macro y microconidias). La concentración de la suspensión filtrada fue calculada por recuento en cámara de Neubauer y se ajustó a  $1 \times 10^7$  conidias/mL usando glicerol al 25%. Posteriormente, 1 mL de la suspensión se dispuso en viales plásticos de 2.5 mL y se congeló a -20°C hasta su uso en los diferentes ensayos.

## 6.2 Caracterización macro y microscópica de los aislamientos fúngicos obtenidos.

Para la caracterización macro y microscópica de las colonias que se obtuvieron, se utilizaron las claves taxonómicas descritas por Booth, 1971, Nelson et al. 1983, y Samson et al. 1995.

Los aislamientos de las cepas fueron incubados a 30°C durante 8 días aproximadamente. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la revisión de sus características fenotípicas macroscópicas, esperando encontrar particularidades propias de *Fusarium oxysporum* tales como: i) crecimiento radial ii) micelio algodonoso de color blanco y iii) pigmento rosa-violeta en el centro o abarcando la totalidad de la caja.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

En cuanto a su identificación microscópica, se realizó una tinción con azul de lactofenol con la finalidad de verificar si este era un hongo hialino o dematiaceo. A continuación, con la ayuda de un microscopio NIKON E100- LED se realizó una observación de sus características principales como: i) Hifas septadas, ii) Microconidios (0 a 1 septo) ii) Macroconidios (3 a 4 septos) y iii) la presencia de clamidosporas.

### *6.3. Identificación molecular mediante amplificación del gen ITS*

Para la identificación hasta nivel de especie de los aislamientos fúngicos obtenidos que cumplieran con las características reportadas para el género *Fusarium*, se implementó la metodología propuesta por (Stirling. 2003) como se describe a continuación

#### *6.3.1. Extracción de DNA genómico.*

En tubos eppendorf de 2mL, se adicionarán 0.5 g de las muestras fúngicas con 700 µl de buffer de extracción CTAB (Tris HCL 50 mM pH 7,5; EDTA 50 mM y SDS 1%) y microesferas para ayuda de la lisis celular. Esta mezcla se agito en el Beadbeater -24 por 10 minutos a 6.000 rpm. Posteriormente, el material fúngico tratado se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos, se agregó 10 µl de proteinasa K y se calentaron a 58°C durante 1 h. Posteriormente, se adicionó un volumen de 700 µl de cloroformo y se realizó una agitación constante por 20 min. La solución obtenida fue centrifugada durante 20 min a 4°C y 12.000 rpm.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

La fase acuosa generada fue separada para permitir la precipitación del DNA con la adición de 500  $\mu$ l isopropanol y 5  $\mu$ l de acetato de sodio. Los tubos tratados fueron incubados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y pasados 30min se centrifugaron a 10.000 rpm por espacio de 20 min. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 500  $\mu$ l de etanol con la finalidad de eliminar cualquier contaminante, el pellet fue secado a temperatura ambiente durante 1 hora, y posteriormente fueron suspendidas en 100  $\mu$ l de agua ultra pura. Para eliminar RNA de las muestras, cada una fue tratada con 2  $\mu$ l de RNAasa durante 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

La verificación de la integridad del DNA obtenido se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa (1%), y su cuantificación se realizó por triplicado en el NanoDrop Thermo Scientific, usando un volumen de 2  $\mu$ l de DNA de cada una de las muestras. Aquellas muestras, que presentaron bajos rendimientos en la extracción (baja concentración), o contaminación con proteínas o RNA fueron extraídas nuevamente a partir de material fúngico fresco o sometidas a un segundo proceso de precipitación con isopropanol, lavado con metanol y tratamiento con RNAasa respectivamente.

### 6.3.2. Amplificación por PCR de la región ITS 1

Se llevó a cabo por amplificación de secuencias de las regiones ITS del ADN ribosomal mediante PCR, utilizando los primers universales TS1e ITS4 los cuales fueron utilizados por Pinzón, y colaboradores en su estudio (Tabla 4). Para la PCR se utilizaron 0.6  $\mu$ l de DNA,

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

0.2 mM de cada primer, 0.2 mM de dNTPs, 1U de Taq polimerasa (genTaq, 5 U/  $\mu$ l), 1.25 de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) y buffer de reacción 1X, para un volumen final de 50  $\mu$ l.

**Tabla 4.** *Primers universales para la amplificación de secuencias de la región ITS.*

<b>Primers universales</b>	<b>Secuencia</b>
ITS1	(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')
ITS4	(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

La amplificación de la región ITS se llevó a cabo en un termociclador BioRad T-100 Thermal Cycler, usando como programa de PCR un ciclo de denaturación inicial a 95°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos conformados por una fase de denaturación a 95°C por 1 minuto, anillamiento a 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Finalmente, se programó una fase de extensión final a 72°C por 10 minutos.

5  $\mu$ l del producto de PCR fueron valorados en gel de agarosa (2%) en el digitalizador Gel Doc™ XR+ System (BioRad). La aparición de una única banda de aproximadamente 500 a 650 pb fue considerado como resultado positivo y el producto de PCR restante se envió a secuenciar en el Instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia usando los primers ITS1 e ITS4.

### *6.3.3. Secuenciamiento y análisis filogenético de las secuencias ITS obtenidas*

Las secuencias obtenidas, fueron editadas en el programa Finch TV (Geopzia®) para eliminar las regiones con menor calidad correspondientes a los extremos inicial y final de la secuencia. Posteriormente, para cada aislamiento se generó una secuencia consenso mediante alineamiento de las secuencias ITS1 e ITS4 en el programa SerialCloner. Una vez obtenidas

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

las secuencias consenso, se realizó una búsqueda de los vecinos cercanos de cada hongo evaluado usando el algoritmo Blastn (Megablast, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La asignación de cada hongo en una especie particular se realizó teniendo en cuenta los porcentajes de similitud de la secuencia consenso con los reportados en la plataforma.

Posteriormente, se realizó un análisis filogenético de las secuencias de cada aislamiento con el programa MEGA7, utilizando el método Neighbor-Joining (Bootstrap 1000 réplicas), luego de realizar el alineamiento de las secuencias de los aislados con el algoritmo MUSCLE. En el análisis filogenético se incluyeron los cinco vecinos cercanos con mayor porcentaje de similitud identificados durante el análisis de las secuencias consenso de cada aislamiento y se usó como grupo externo el ITS del hongo fitopatógeno *F. graminearum* zkh-F9.

#### 6.4 Tipificación a nivel de forma especial y raza fisiológica de los aislamientos pertenecientes a *Fusarium oxysporum*.

##### 6.4.1. Pruebas de patogenicidad en tomate.

Para determinar que los aislamientos de *Fusarium oxysporum* obtenidos correspondían a la forma especial *lycopersici* o *radicis-lycopersici*, se realizaron ensayos de patogenicidad con el objetivo de establecer cuál es su capacidad para infectar plantas de tomate bajo condiciones controladas. Para ello, se empleó una metodología similar a la descrita por Borrero y colaboradores (2004) y Cotxarrera y colaboradores (2002).

Brevemente, se realizaron inóculos de cada aislamiento fúngico en 50 ml de caldo arroz (Harina de arroz 20g/L, glucosa 15g/L, Triptosa 5g/L), depositados en Erlenmeyer de 200

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

ml, a los cuales se les adiciono 1mL de un vial de trabajo preservado a -20°C (Figura 7). Posteriormente, los inóculos se incubaron durante 15 días a 25°C en agitación constante (150 r.p.m). Una vez finalizado el tiempo de incubación, se ajustó la concentración de los inóculos con agua estéril a  $1 \times 10^6$  conidios/mL.



**Figura 7.** Inóculos de los aislamientos fúngicos.

Posteriormente, las raíces de semillas pre-germinadas de las variedades de tomate ManGlover y Milano, de 10 días de crecimiento, se colocaron en la superficie de la solución de conidios durante 30 minutos (Figura 8). Transcurrido este tiempo, las plántulas se trasplantaron a bandejas de plástico que contenían 100 g de vermiculita estéril. A cada plántula se le adicionó 1 mL de una solución 1X Murashigue & Skoog cada tercer día y se realizó un monitoreo hasta los 20 días para determinar la capacidad de cada patógeno para

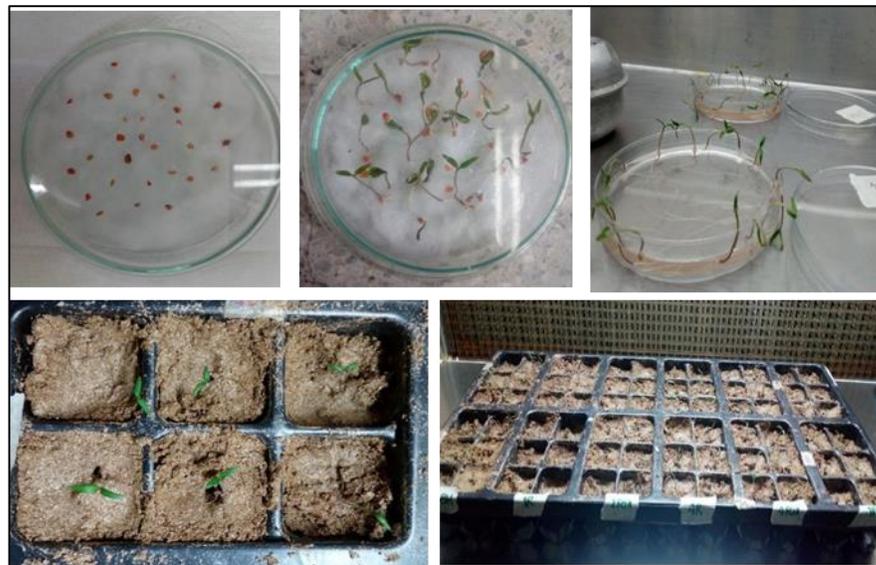
Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

colonizar las raíces de las plantas tratadas y causar síntomas de marchitez vascular o mal de talluelo usando la escala de severidad presentada en la tabla 5. (Cotxarrera, *et al.* 2002)

**Tabla 5.** Escala de severidad de marchitez vascular

Grado de severidad	Síntomas
0	Plantas Asintomáticas
1	Plantas infectadas débilmente ( $\leq 50\%$ hojas cloritas o marchitas)
2	Plantas altamente infectadas ( $\geq 50\%$ hojas cloróticas o marchitas)
3	Plantas muertas



**Figura 8.** Proceso de inoculación de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* en variedades Manglober bajo condiciones controladas.

Adicionalmente, se realizó el re-aislamiento del fitopatógeno de las plantas tratadas a partir de muestras de tallo y raíz, usando la metodología descrita en el numeral 1 y la caracterización macro, microscópica definida hasta este punto. En este ensayo, la capacidad

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

de cada aislamiento para colonizar el sistema radicular de las plantas tratadas y generar los síntomas de marchitez vascular o pudrición del tallo, fueron tomados como indicativos de que los aislamientos pertenecen a la forma especial *lycopersici* o *radicis-lycopersici*.

#### 6.4.2. Identificación de razas fisiológicas mediante PCR convencional.

Para diferenciar entre las tres razas de *F. oxysporum f sp. lycopersici* a la cual pueden pertenecer los aislamientos obtenidos y distinguirlos de la forma especial *radicis-lycopersici*, se usaron los sets de primers uni, sp13, sp23 y sprl diseñados por Hirano y Arie en el 2006 presentados en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Set de Primers para la diferenciación de las razas de *F. oxysporum f sp. lycopersici* y forma especial.

Set de primers	Primers	Secuencia
Uni	UniF	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'
	UniR	5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'
Sp13	Sp13F	5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3'
	Sp13R	5'-TCCTTGACACCATCACAGAG-3'
Sp23	Sp23F	5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3'
	Sp23R	5'-GCAACAGGTTCGTGGGGAAAA-3'
Sprl	SprlF	5'-GATGGTGAACGGTATGACC-3'
	SprlR	5'-CCATCACACAAGAACACAGGA-3'

La PCR de cada set de primers se realizó en un volumen de 25uL utilizando como concentraciones finales de reacción 1X de Buffer (10X), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0.2

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

mM de dNTPs (20mM), 0.5 mM de Primers (5mM), 1U de Taq pol (5 U/ $\mu$ l) y 5  $\mu$ l de DNA (30-50ng). El programa de PCR usado estuvo conformado por una fase de denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos compuesto por una fase de denaturación a 94°C por 1 min, anillamiento a 61°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, Finalizando con una fase de extensión final a 72°C por 10 min y 12°C- $\infty$ . Este procedimiento se llevó a cabo mediante en el termociclador BioRad T-100.

Los 4  $\mu$ l del producto de PCR fueron valorados en gel de agarosa (2.5 %) en el digitalizador Gel Doc™ XR (BioRad). La categorización de cada aislamiento en una forma especial o raza fisiológica, se realizó empleando dos criterios; i) la generación de un amplímero de tamaño conocido con cada set de primer y ii) la combinación de amplímeros obtenidos con los 4 set de primers. Las combinaciones y los tamaños de cada amplímero esperado y su correlación con una raza fisiológica o forma especial fueron descritos por Hirano y Arie y se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7.** *Combinaciones y tamaños de los amplímeros esperados para cada raza fisiológica y forma especial.*

Razas	Primers			
	uni	Spl3	Sp23	sprl
FOL race 1	+	+	-	-
FOL race 2	+	-	+	-
FOL race 3	+	+	+	-
FORL	+	-	-	+
<b>amplificación</b>	670-672 bp	445 bp	518 bp	947 bp

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

## 7. Resultados y análisis de resultados

### 7.1 Aislamiento y caracterización fenotípica de *Fusarium oxysporum*

Con el objetivo de obtener aislamientos patógenos de *F. oxysporum f sp. lycopersici* en cultivos de tomate colombianos afectados por marchitez vascular, se realizó un muestreo en dos fincas tomateras en Cundinamarca y Tolima las cuales se encontraban con pérdidas en su producción con un valor superior al 80% (comunicación personal).

A partir del material vegetal obtenido con características sintomáticas de marchitez vascular, se logró obtener el aislamiento de 8 cepas fúngicas con características fenotípicas diferentes que correspondían a las descritas para *Fusarium oxysporum* (Tabla 8, Figura 9). Cada uno de los aislamientos fue conservado en glicerol a -20°C y depositado en el banco de cepas y genes del Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, como parte de la colección de microorganismos del grupo de investigación de bioprocesos y bioprospección. Brevemente, cada una de las cepas aisladas se caracterizaron por presentar crecimiento radial, generación de micelio blanco algodonoso y producción de pigmento rosa-violeta (diferencial para cada aislamiento) (Figura 9).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

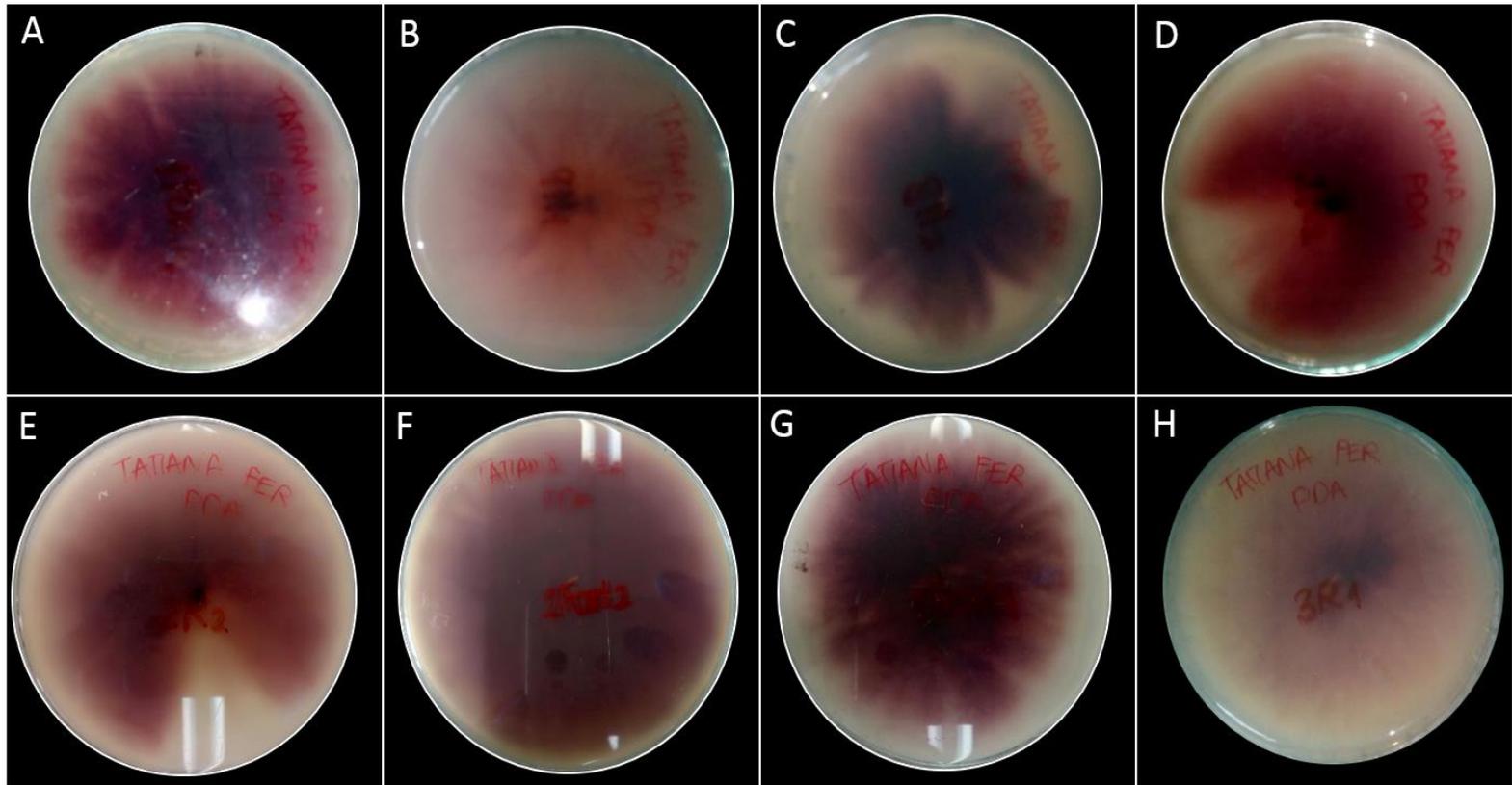
Angie Tatiana Almonacid Suarez

**Tabla 8.** Origen y características fenotípicas macro y microscópicas de los aislamientos obtenidos.

Aislamiento	Origen geográfico	Origen fisiológico	Características macroscópicas	Microscópicas
3R	Tolima (Finca el jardín)	Raíz	Micelio blanco algodonoso Pigmento leve de color morado	Micelio hialino con presencia de clamidiosporas, micro y macroconidios
2R	Cundinamarca	Raíz	Micelio blanco algodonoso Pigmento leve de color morado	Hongo hialino con hifas septadas, presencia microconidios, y abundantes microconidios
8H	Tolima (Finca el jardín)	Hoja	Micelio algodonoso de color blanco Pigmento morado oscuro en el centro	Micelio hialino con presencia abundante de microconidios, y macroconidias
9H	Tolima (Finca el jardín)	Hoja	Micelio algodonoso y compacto de color blanco Coloración rosa-rojo en el centro.	Hongo hialino septado con presencia de microconidios, macroconidios septados y poca cantidad de clamidiosporas
1R	Tolima (Finca el jardín)	Raíz	Micelio uniforme algodonoso de color blanco pigmento violeta en el centro.	Hongo hialino con hifas septadas, presencia microconidios, y abundantes microconidios
F1	Cundinamarca	Raíz	Micelio blanco y algodonoso Pigmento rosa-rojo en el centro de la caja	Hongo hialino con hifas septadas y presencia de clamidiosporas y microconidios y macroconidios septados
F2	Cundinamarca	Raíz	Micelio algodonoso de color blanco Pigmento violeta en la totalidad de la caja	Micelio hialino con presencia de hifas, micro y macroconidias septadas y clamidiosporas
F4	Tolima (Finca el jardín)	Tallo	Micelio algodonoso de color blanco Pigmento en el centro de color violeta.	Hongo hialino con macroconidios y microconidios septados

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

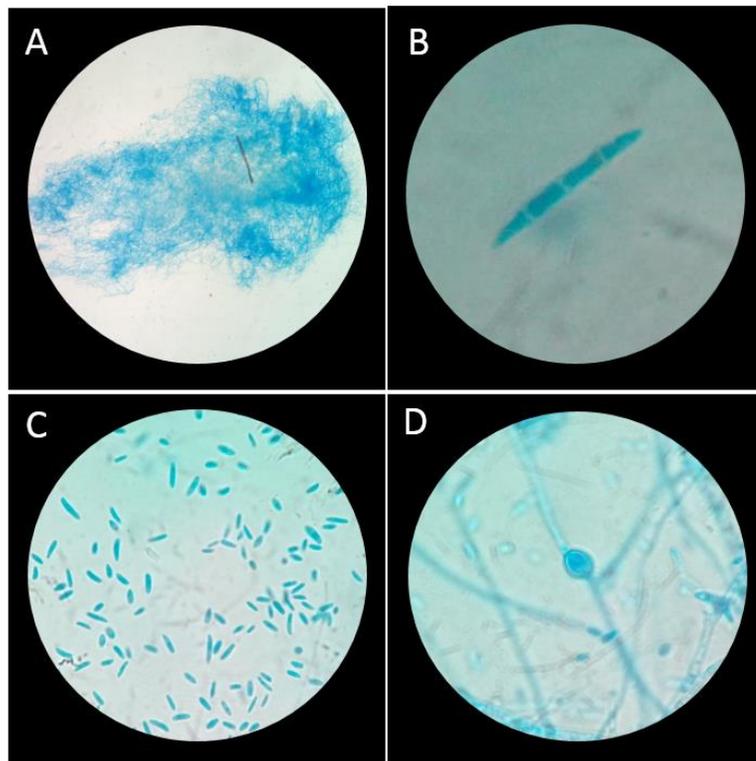


**Figura 9.** Características macroscópicas de los aislamientos obtenidos. De derecha a izquierda se presentan los aislamientos 1F (A), 9H (B), 8H (C), 2R (D), 1R ©, 2F (F), 4F (G), 3R (H).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

Adicionalmente, la revisión de las características microscópicas de los aislamientos con tinción de azul de lacto fenol permitió evidenciar la presencia de hifas hialinas septadas, microconidios (sin septos o con 1 septo), macroconidios en forma de media luna con 3 o 4 septos y en algunos casos clamidiosporas (Figura 10).



**Figura 10.** Características microscópicas de los aislamientos obtenidos. En la figura se presentan el micelio hialino (A), macroconidias (B), microconidios (C) y clamidiosporas (D).

Estas características fueron comparadas con las claves taxonómicas reportadas por Booth, 1971, Nelson, et al. 1983 y Samson, et al 1995. Encontrando coincidencias con los hongos del género *Fusarium oxysporum*. Teniendo en cuenta que estos hongos, fueron aislados de plantas de tomate sintomáticas con marchitez vascular, se propuso que los aislamientos

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

perteneían a *F. oxysporum* *f.sp. Lycopersici*. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, era necesario llevar a cabo pruebas moleculares y de inoculación *In vivo* que aportaran información adicional a la identificación de estos aislamientos y así confirmar su capacidad de generar síntomas característicos de la enfermedad tras su re inoculación en diferentes variedades de plantas de tomate.

Es importante resaltar que dentro de los aislamientos obtenidos, se evidencio la producción diferencial del pigmento rosa-violeta característico de los hongos del genero *Fusarium* (Figura 9). La producción de compuestos pigmentados en miembros del género *Fusarium* ha sido bien documentada, particularmente para policétidos como la Bikaverina (previamente conocida como Lycopersina) (Limon, Rodriguez-Ortiz, & Avalos, 2010), Fusaribina (y otras naphtoquinonas) (Tatum, Baker, & Berry, 1985) y melaninas (Toledo et al., 2017). En general se sugiere que estos pigmentos son producto del metabolismo secundario del hongo y se relacionan a la protección del mismo a condiciones abióticas como luz U.V., presencia de radicales libres de oxígeno (ROS) o depleción de nutrientes (en el caso de la bikaverina, depleción de nitrógeno en el medio) (Limon et al., 2010). Adicionalmente, algunos de estos compuestos han demostrado tener actividad fitotóxica, insecticida, anticomicetos, antibacteriana y fungicida y se postulan como posibles factores de virulencia en algunos *Fusarium* fitopatógenos incluyendo a Fol (Medentsev & Akimenko, 1998; Nirmaladevi, Ramesha, Sunitha, Babu, & Srinivas, 2015; Son et al., 2008; Sondergaard et al., 2016).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

El aislamiento de cepas fúngicas con producción diferencial de estos metabolitos podría ser indicativos de su patogenicidad y son datos a tener en consideración al momento de trabajar con aislamientos nativos. En el caso particular de la presente investigación, los aislamientos 1F, 4F y 8H fueron los que presentaron, en líquido y en sólido la mayor producción del pigmento, lo cual podría incidir en su virulencia durante la infección a las plantas de tomate tratadas y por ende fue tomado en consideración al analizar los datos obtenidos en los ensayos de infección In vivo.

### 7.2 Identificación taxonómica de los aislamientos por secuenciamiento del gen ITS.

Una vez obtenidos los aislamientos que posiblemente pertenecían a *F. oxysporum f sp. lycopersici*, era necesaria su identificación taxonómica por técnicas moleculares. Por ello, se llevó a cabo un proceso de extracción de DNA con cloroformo-isopropanol. Como se observa en la Figura 11, la técnica permitió el aislamiento de 85,06 a 556,4 ng de DNA genómico íntegro para todos los hongos exceptuando 8H (figura 11, tabla 9). Sin embargo, también se observó contaminación con RNA y/o proteínas en algunos casos como F2, F1, F4, 3R y 1R.

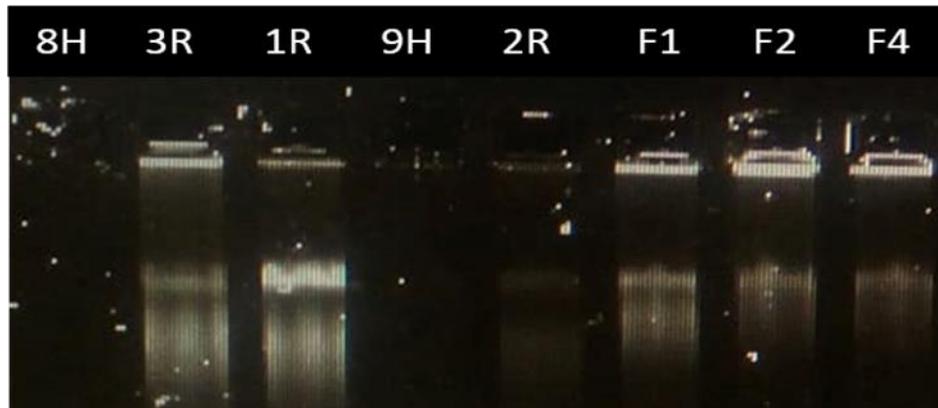
**Tabla 9.** Concentración de DNA genómico obtenido para cada aislamiento evaluado en el NanoDrop. En la tabla se presenta la concentración media  $\pm$  la desviación estándar de tres análisis diferentes por muestra de DNA obtenido.

Aislamientos	Concentración de DNA (ng)
3R	185,9 $\pm$ 8.98
1R	525,2 $\pm$ 20.34
9H	87,3 $\pm$ 1.40
8H	31,3 $\pm$ 2.46
2R	98,1 $\pm$ 1.26

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

1F	422 ± 9.77
2F	446,7 ± 8.099
3F	342,5 ± 3.94

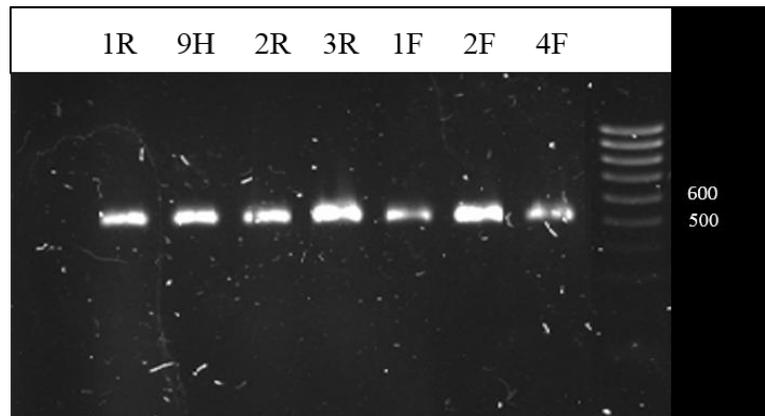


**Figura 11.** DNA genómico obtenidos por el método de extracción fenol-cloroformo de los aislamientos evaluados.

Para evitar una posible interferencia de estos componentes durante las PCR, se llevaron a cabo una precipitación adicional con cloroformo e isopropanol y dos lavados adicionales con metanol. Además, se repitió el tratamiento con RNAsa para reducir la concentración de este ácido nucleico en las muestras. Posteriormente, se realizó la amplificación de la región ITS1 usando los primers universales ITS1 e ITS4. (Figura 12) Las secuencias obtenidas fueron ensambladas para generar una secuencia consenso única para cada hongo de entre 500-600 pb (Anexo 1). Posteriormente, estas secuencias consenso fueron usadas para el análisis taxonómico mediante la plataforma Blastn.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez



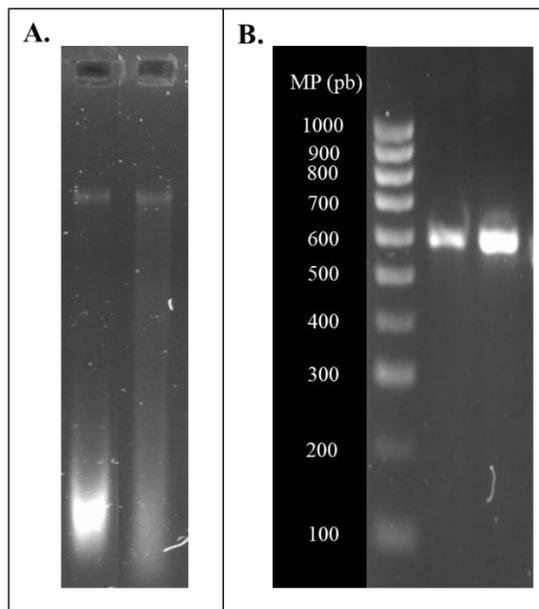
**Figura 12.** Amplificación de la región ITS1.

Como resultado, se obtuvo que todos los aislamientos están cercanamente relacionados a diferentes cepas del hongo *Fusarium oxysporum*, confirmando así la identidad a nivel de especie de las cepas obtenidas en el presente trabajo (Tabla 10, Figura 12), a excepción del aislamiento 8H, el cual tuvo que ser amplificado a partir de una muestra de DNA obtenida de cultivo líquido, ya que el protocolo usado para los demás aislamientos fue insuficiente para obtener DNA de buena calidad con este hongo.

Las modificaciones realizadas para la extracción de 8H incluyeron un tiempo más largo de disrupción mecánica (10 a 15 min) y purificación por columna del DNA obtenido seguido de tratamiento con 10  $\mu$ L de RNAsa. Estas modificaciones permitieron obtener un DNA con la calidad necesaria para realizar la amplificación del gen ITS (Figura 13). Sin embargo, a la fecha la muestra está siendo procesada en el Instituto de genética de la Universidad Nacional. Razón por la cual, este dato no fue incluido en el presente documento.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

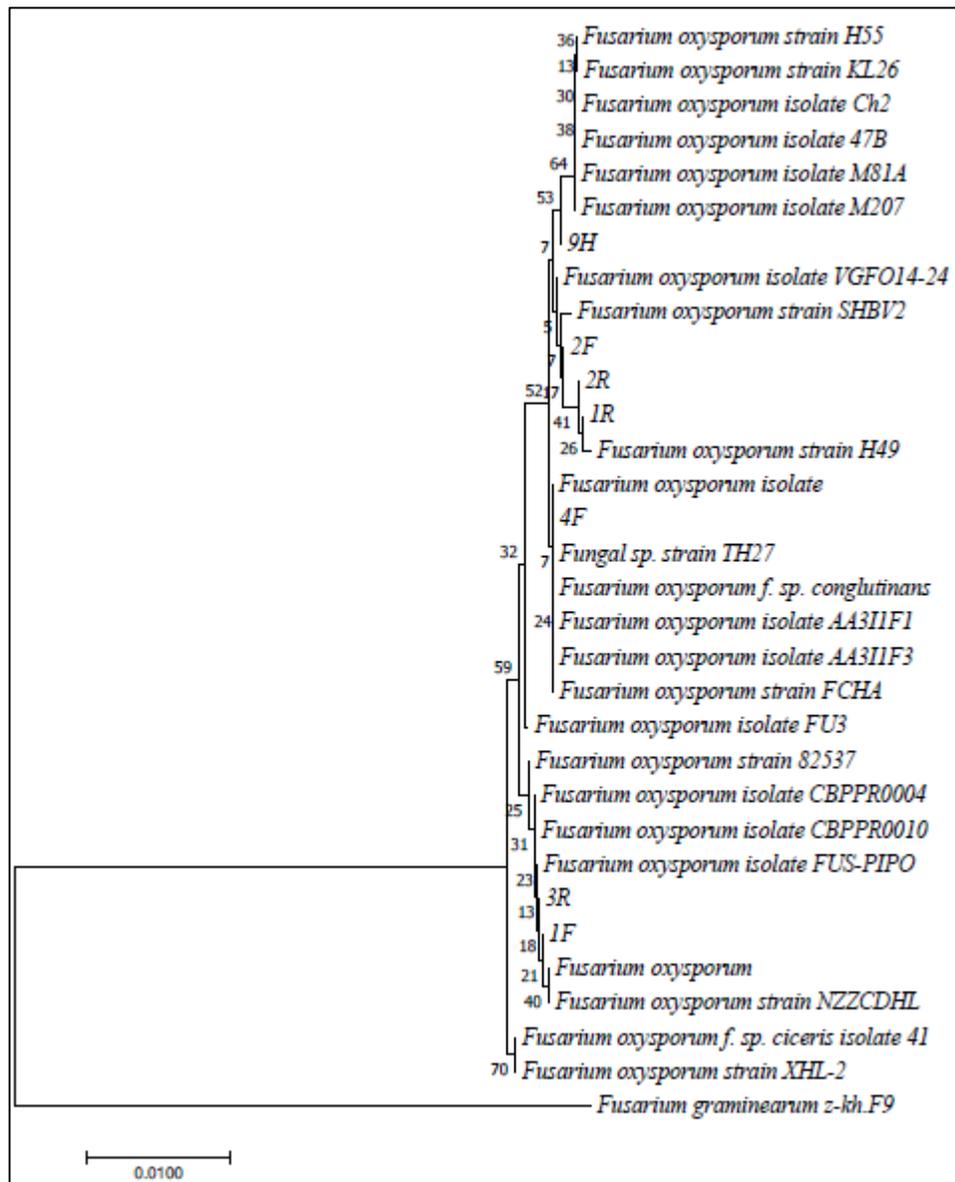


**Figura 13.** Extracción de DNA y amplificación del gen ITS del aislamiento 8H. En la figura se presenta el DNA genómico obtenido con y sin tratamiento de RNAsa durante la segunda extracción (A) y el producto de PCR obtenido con ambos DNA (B).

Durante el análisis de los datos obtenidos por el blast, fue posible evidenciar dos eventos de interés. En primer lugar, se encontró que algunos de los aislamientos que fueron aislados del mismo punto geográfico compartían los mismos vecinos cercanos, como el caso de 2F y 2R. Sin embargo, al ser sus características fenotípicas diferentes se sugiere que no se tratan de la misma cepa y por lo tanto se siguen tratando como aislamientos independientes. (Figura 14)

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez



**Figura 14.** Árbol filogenético de los aislamientos de *F. oxysporum* en evaluación. La generación del árbol se realizó usando el método Neighbor-Joining (test Bootstrap; 1000 réplicas). Las distancias evolutivas se calcularon con el método Kimura 2-parameter. *F. graminearum z-kh-F9* fue usado como grupo externo.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

**Tabla 10.** Clasificación taxonómica de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* por análisis de la región ITS1 e ITS4.

Aislamiento	Longitud secuencia consenso (pb)	Vecino cercano (blast)	% Similaridad	Valor -e
3R	514	<i>Fusarium oxysporum</i> strain XHL-2	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> strain NZZCDHL	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> strain 82537	99%	0.0
1R	514	<i>Fusarium oxysporum</i> strain KL26	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate VGFO15-17	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate VGFO14-24	99%	0.0
9H	471	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate M81A	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate M207	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate 47B	100%	0.0
2R	519	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate 47B	99%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate M81A	99%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate Ch2	99%	0.0
1F	511	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate CBPPR0004	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> strain H49	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> strain H31	100%	0.0
2F	522	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate Ch2	99%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> strain SHBV2	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate M81A	99%	0.0
4F	526	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate AA3IIF1	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. conglutinans	100%	0.0
		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate AA3IIF3	100%	0.0

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

Es importante recalcar también, que algunos de los aislamientos, presentaron como vecinos cercanos cepas de formas especiales diferentes a *lycopersici* y *radicis-lycopersici*. Tal es el caso de 4F cuyo vecino cercano corresponde a un aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (patógeno de la mostaza). A pesar que los porcentajes de similaridad de la cepa 4F con este microorganismo son superiores al 99%, es pertinente recordar que la región ITS no es lo suficientemente variable para diferenciar las formas especiales del complejo de *Fusarium oxysporum*. La región ITS es usada únicamente para la identificación a nivel de géneros y en algunos casos de especies en aislamientos fúngicos (Alves-Santos et al., 2002). La confirmación de la pertenencia de un hongo fitopatógeno a una forma especial, debe realizarse por re-aislamiento del patógeno de su planta hospedera mediante un ensayo de inoculación In vivo. Así mismo, la confirmación de una raza fisiológica debe realizarse por una aproximación molecular, usando primers específicos, como en los casos de Fol y Forl, o mediante inoculación en variedades resistentes.

### 7.3 Pruebas de patogenicidad In vivo

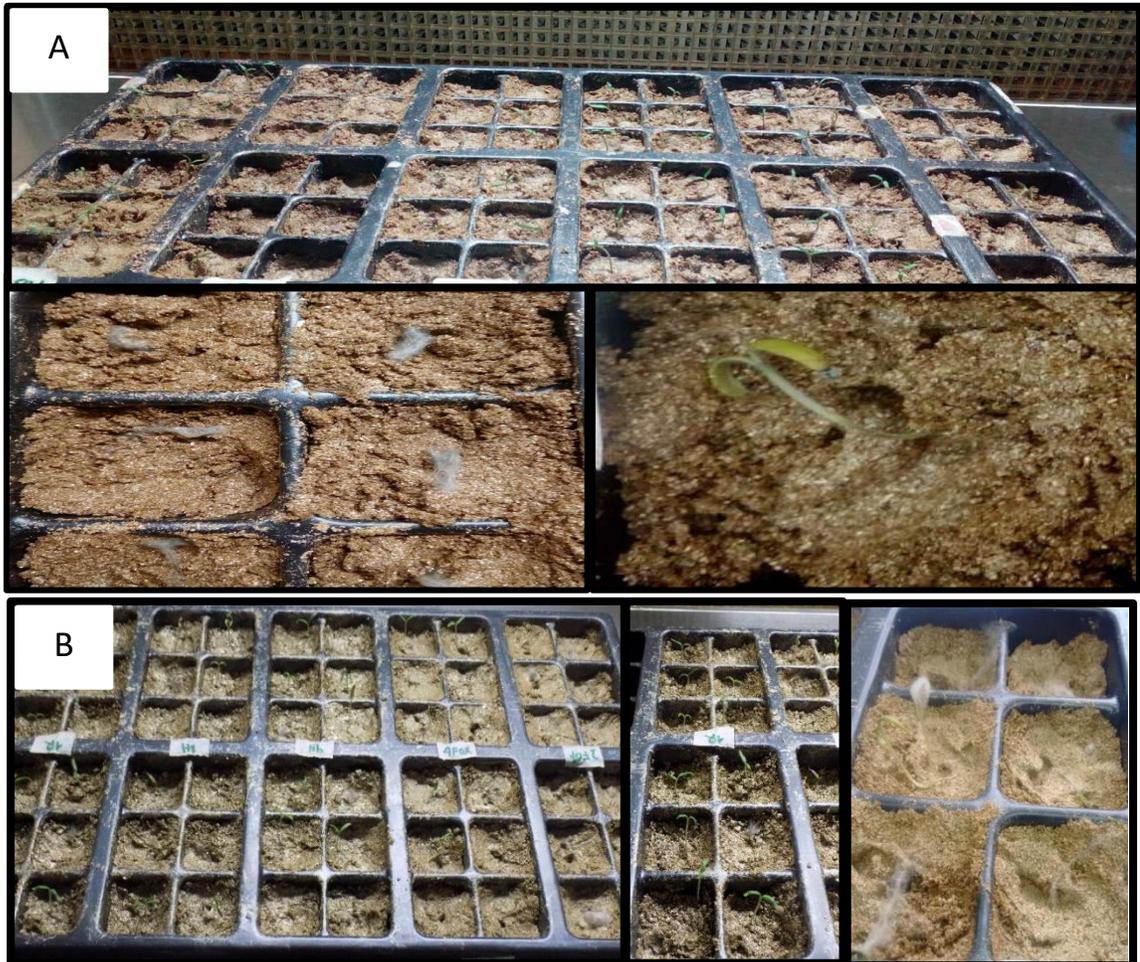
Con el objetivo de confirmar que los aislamientos obtenidos correspondían a algunas de las formas especiales infectivas de tomate, se llevaron a cabo ensayos de infección In vivo bajo condiciones controladas con los ocho aislamientos en plantas de tomate variedad Manglober y Milano.

Como resultado, se logró demostrar que todos los asilamientos causaban síntomas característicos del mal del talluelo y marchitez vascular tales como amarillamiento de hojas y pudrición de tallo. Es importante recalcar que en la mayoría de las plantas inoculadas se

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

evidencio una colonización total o parcial del fitopatógeno, observada macroscópicamente gracias a la aparición de micelio en el exterior de la planta (Figura 15).



**Figura 15.** Síntomas presentes en los tratamientos infectados con las cepas fúngicas obtenidas. Variedad ManGlover (A). Variedad Milano (B).

Al cabo de 20 días post infección, ambas variedades mantuvieron un grado de infección entre 2 (Plantas altamente infectadas) y 3 (plantas muertas) (Tabla 11). De hecho, la evaluación de

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

síntomas fue detenida en este punto dado que las plantas detuvieron su crecimiento y se marchitaron. Estos resultados, soportan la hipótesis inicial de que los aislamientos pertenecen de hecho a la forma especial *lycopersici* o a la forma especial *radicis lycopersici*.

**Tabla 11.** Grado de infección y síntomas presentes en las plantas tratadas correspondientes a la variedad ManGlover y Milano.

Variedades	Infección con cepas	Grado de infección (día 8)	Grado de infección (día 20)	Síntomas
ManGlover	3R	2	3	Plantas totalmente cubiertas por micelio, evidencia de pudrición del tallo y amarillamiento de hojas. (Figura 15 A.)
	1R	2	3	
	9H	2	3	
	2R	2	3	
	1F	2	3	
	2F	2	3	
	4F	2	3	
Milano	3R	1	2	Algunas Plantas total y parcialmente cubiertas por micelio, pudrición del tallo y amarillamiento de hojas. (Figura 15.B)
	1R	1	3	
	9H	1	2	
	2R	1	2	
	1F	1	2	
	2F	1	2	
	4F	1	3	
Milano y ManGlover	<b>CONTROL</b>	0	0	Hojas sin ninguna clase de infección y no presentaban ningún síntoma.

La severidad de los síntomas pocos días post inoculación, puede asociarse al uso de plántulas de 10 días de crecimiento, las cuales se encuentran en etapas tempranas de desarrollo. Como se mencionó anteriormente, en esta etapa, el tallo y las raíces de las plántulas presentan un menor contenido de lignina en comparación a plantas ya establecidas, de hecho, se ha propuesto para varios modelos biológicos (incluyendo leguminosas y cereales) que el

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

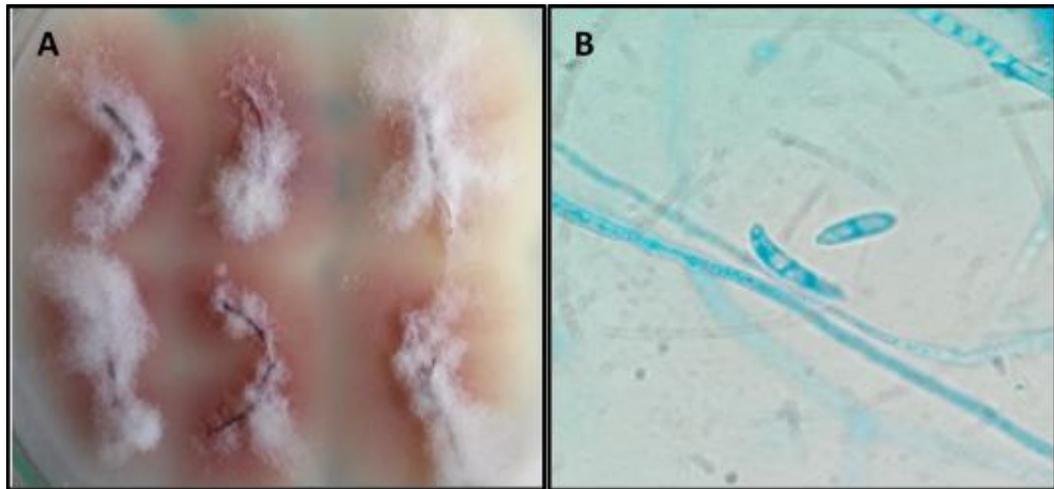
proceso de lignificación se incrementa con el crecimiento de las mismas, alcanzando su concentración máxima en los tejidos vegetales en el momento de la producción de granos (cereales) o la maduración de frutos (en algunas leguminosas) llegando a constituir desde el 1 al 15% del peso seco del material vegetal (Frei, 2013).

La importancia de este polímero en las plantas, recae en parte en su rol para la tolerancia a estrés de origen abiótico y biótico. La presencia de lignina en la pared celular de diferentes tejidos vegetales, se ha asociado a la resistencia frente a fitopatógenos fúngicos y bacterianos incluyendo el patosistema tomate-Fol (Mandal & Mitra, 2007). De hecho, se ha reportado que la lignificación del tejido radicular es una respuesta de las plantas de tomate a la infección por Fol para reducir la capacidad del hongo de colonizar intracelularmente la raíz de la planta (Panina et al. 2007, Michielse et al. 2012). Sin embargo, dado que las plántulas presentan menos concentración de lignina en su pared celular son un blanco más sensible a la infección por Fol por lo cual los síntomas se presentan más rápido y con mayor severidad tal y como se observó en el ensayo realizado en la presente investigación.

Además de observar el efecto de la inoculación de los aislamientos sobre el crecimiento y desarrollo de dos variedades de tomate, el ensayo de infección In vivo también buscaba confirmar los postulados de Koch. Por ello, era necesario hacer un re-aislamiento del fitopatógeno de las plantas tratadas. Como se observa en la figura 16, fue posible re-aislar las cepas fúngicas evaluadas a partir de muestras de raíz y tallo con y sin esterilización superficial. Su identidad, fue confirmada con base en las características macro y microscópicas determinadas en la primera fase del estudio.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez



**Figura 16.** Re-aislamientos del fitopatógeno de cada una de las plantas tratadas. En la imagen se presentan las características macroscópicas (A) y microscópicas (B) del hongo F2 re aislado de muestras de raíz con (A, arriba) y sin esterilización superficial (A, abajo) 8 días post inoculación.

Con base en estos resultados, se llegó a la conclusión de que los ocho aislamientos obtenidos pertenecían a las formas especiales infectivas de tomate y que son cepas patogénicas dada su capacidad de colonizar externa e internamente el sistema radicular de las plantas tratadas y así mismo generar los síntomas característicos descritos para el mal del talluelo (propios de la infección por la forma especial *lycopersici*) y la pudrición de corona y tallo (generados por la infección de la forma especial *radicis-lycopersici*).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

#### 7.4 Tipificación de los aislamientos de *F. oxysporum* obtenidos por PCR

Una vez determinado que los ocho aislamientos evaluados eran capaces de infectar y generar síntomas de marchitez vascular, mal del talluelo y/o pudrición de la raíz, era necesario categorizarlos en una forma especial y en una raza fisiológica específica. Teniendo en cuenta que los aislamientos provenían de cultivos de tomate con alta incidencia de marchitez vascular, se asumió que la mayoría (o todos) de los aislamientos obtenidos debían pertenecer a la forma especial *lycopersici*. Sin embargo, es necesario diferenciarla de la forma especial *radicis-lycopersici* ya que sus sistemas de control y manejo son diferentes.

En este contexto, se realizó una búsqueda sistemática en la literatura de técnicas moleculares reportadas para la diferenciación de las formas especiales infectivas de tomate que estuvieran basadas en PCR convencional, teniendo en cuenta particularmente, aquellas que permitieran discriminar las razas fisiológicas de Fol.

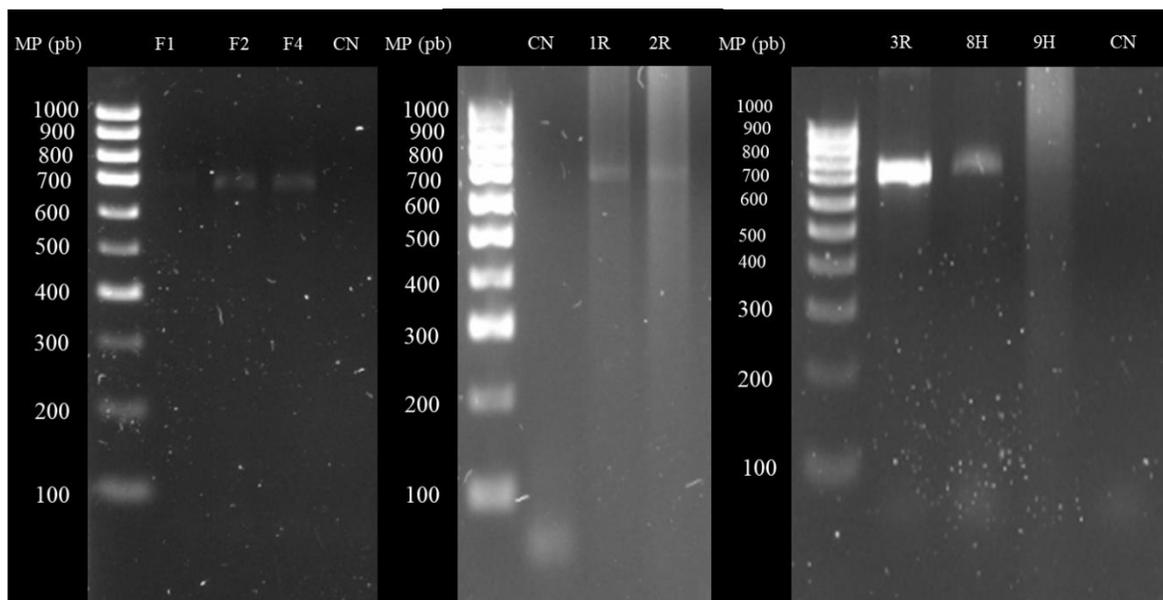
Por ello, se seleccionó la metodología propuesta por Hirano y Arie (2006), quienes reportaron un sistema de categorización de las razas fisiológicas de Fol usando los set de primers uni, sp13, sp23 y spr1. La implementación de esta técnica usando el DNA genómico de los 8 aislamientos obtenidos permitió determinar que 6 de ellos pertenecen a la forma especial *lycopersici*, con base en que se obtuvieron los amplímeros esperados de 670-672 pb con el set de primers Uni (Figura 17), mientras que no se obtuvo ninguna amplificación con el set de primers SprI (Datos no mostrados).

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

**Tabla 12.** Razas fisiológicas o forma especial para los 8 aislamientos de *Fusarium oxysporum* según los amplímeros obtenidos por cada uno de los Primers.

Aislamientos	Primers				Raza Fisiológica / Forma especial
	Uni	Sp13	Sp23	Sp1	
<b>1F</b>	+	+	- / + / -	-	FOL 1 / FOL 3
<b>2F</b>	+	+	-	-	FOL 1
<b>4F</b>	+	+	-	-	FOL 1
<b>1R</b>	+	+	-	+	FOL 1 /FORL
<b>2R</b>	+	-	-	+	FORL
<b>3R</b>	+	+	+/-/-	-	FOL 1/ FOL 3
<b>8H</b>	+	+	-	-	FOL 1
<b>9H</b>	-	+	-	-	Sin determinar

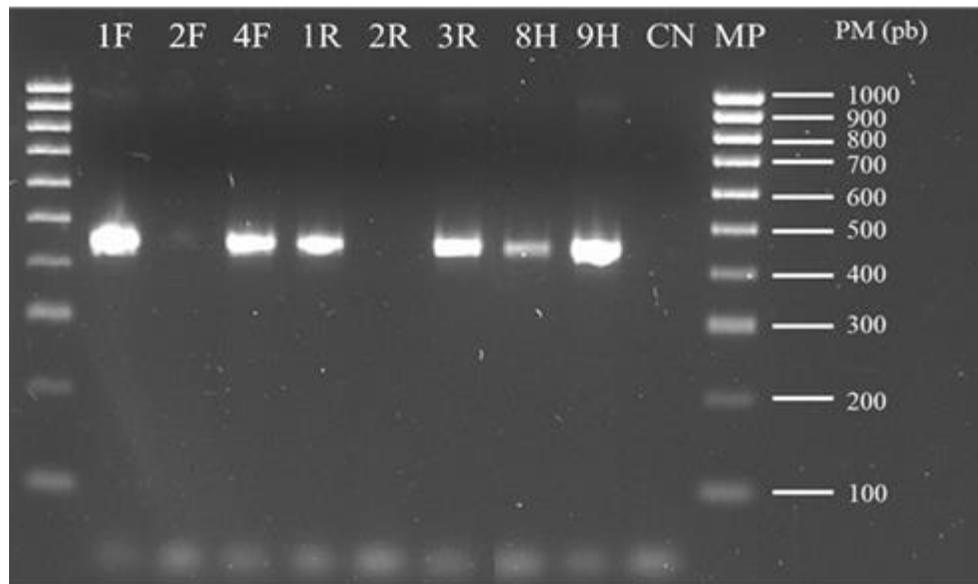


**Figura 17.** Productos de PCR obtenidos con el cebador Uni. En la figura se muestran los amplímeros obtenidos que coinciden con el peso molecular esperado (entre 670-672 pb). CN, control negativo.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

De estos aislamientos, las cepas 2F, 4F y 8H además del amplímero obtenido con uni, únicamente generaron amplímeros de más de 400 pb con el set de primers Sp13 (Figura 18), por lo cual se concluye que pertenecen a la raza fisiológica 1 de la forma especial *lycopersici*.

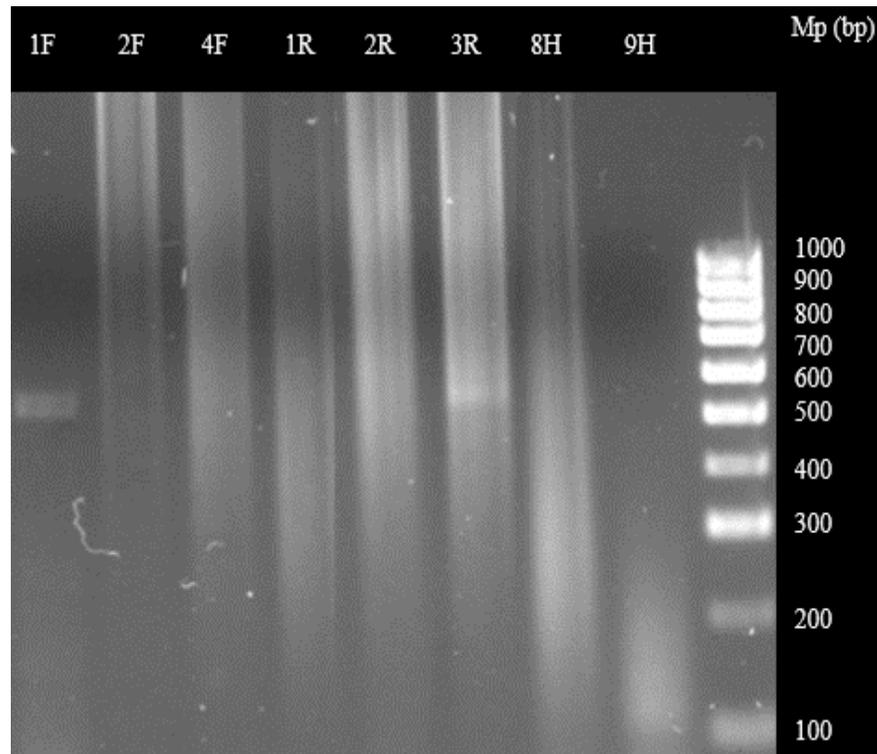


**Figura 18.** Producto de PCR obtenido con el primer Sp13. En la figura se muestran los amplímeros de 445 bp obtenidos en los aislamientos 1F, 2F, 4F, 1R, 3R, 8H, 9H.

Por otra parte, los aislamientos 1F y 3R, quienes también presentaron amplímeros con Sp13, generaron diferentes perfiles de amplificación en los triplicados realizados para cada PCR realizada con el set de primers Sp23. Como se muestra en la tabla 12 y en la figura 19, tanto para 1F como para 3R, en una de las tres PCR llevadas a cabo con el set de primers Sp23, se obtuvo una banda de aproximadamente 518 pares de bases que correspondía al resultado esperado. Sin embargo, en las otras dos pruebas realizadas, bajo las mismas condiciones, tal amplímero no fue observado.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez



**Figura 19.** Producto de PCR obtenido con el set de primer Sp23. En la figura se presenta el amplímero de 518 bp obtenido para los aislamientos 1F y 3R. MP, Marcador de peso molecular.

Si tenemos en cuenta como resultado positivo el amplímero obtenido en una de las réplicas de Sp23 de estos dos hongos, sería adecuado clasificarlos dentro de la raza fisiológica 3. En caso contrario, estos aislamientos pertenecerían a la raza fisiológica 1. La evaluación de nuevas condiciones de PCR, que incluyeron el uso de un amplio rango de concentración de DNA (10-500 ng), permitió evidenciar que el set de primer Sp23, no generaba resultados reproducibles lo cual dificultó el análisis de estos datos.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

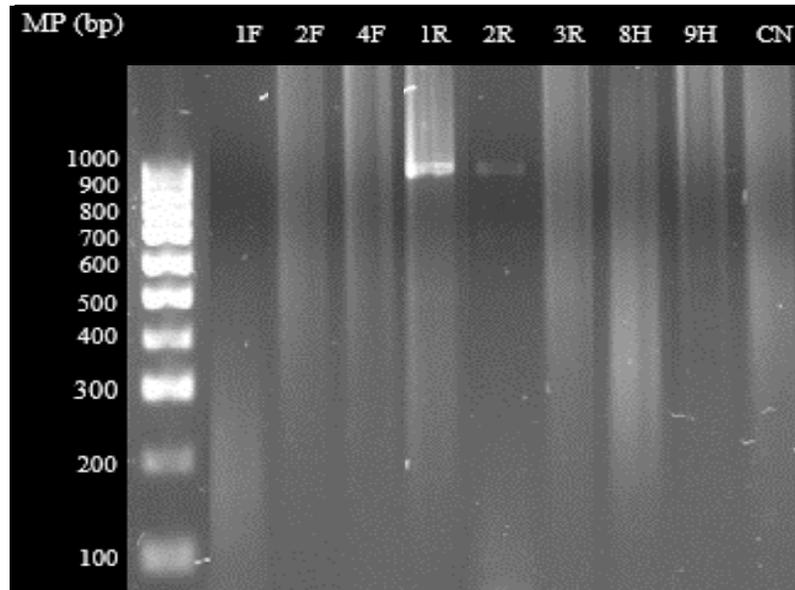
Angie Tatiana Almonacid Suarez

En este caso, se sugiere confirmar la identidad a nivel de raza fisiológica de 1F y 1R a través de ensayos con plantas resistentes a la raza fisiológica 1 como UC82-L o Florida MH-1 (Sheu & Wang, 2006). En caso de que pertenecieran a esta raza fisiológica, la infección In vivo con 1F o 3R no debería generar síntomas en esta variedad de plantas. De no ser así, estos dos aislamientos pertenecerían posiblemente a la raza fisiológica 3. De esta forma, tomando en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación, a la fecha solo se puede afirmar que 1F y 3R pertenecen a la forma especial *lycopersici* y no pueden ser clasificados en una raza fisiológica específica.

A diferencia de los anteriores hongos, las PCR llevadas a cabo con el aislamiento 1R permitieron obtener amplímeros con los primers Uni, Sp13 y SprI (Figura 17, 18 y 20). Estos resultados fueron consistentes en las tres PCR llevadas a cabo. Sin embargo, este perfil de amplificación no estaba descrito por Hirano y Arie y no se encontró otro caso similar en la literatura que permitiera la clasificación de 1R en alguna raza fisiológica. Dado que se generó el amplímero esperado con SprI (exclusivo de la forma especial *radicis-lycopersici*) y con Sp13 (presente en la forma especial *lycopersici* raza 1 y 3), no es posible asignar a este aislamiento a ninguna forma especial. Al igual que en el caso anterior, se sugiere realizar ensayos en planta con variedades susceptibles y resistentes a cada forma especial y raza fisiológica para generar mayor información acerca de la clasificación que debería concedérsele a este aislamiento.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez



**Figura 20.** Producto de PCR contenido con el set de primer *SpI*. En la figura se presenta el amplímero de 947 bp esperado de los aislamientos 1R y 2R.

2R, fue el único aislamiento fúngico que inequívocamente pudo ser clasificado dentro de la forma especial *radicis-lycopersici* gracias a que se obtuvieron únicamente dos amplímeros de 947 y 670 pares de bases con los primers *SprI* y *Uni* respectivamente. Finalmente, se propone que el aislamiento 9H pertenece a la raza fisiológica 1 ya que solo amplificó con el set de primers *Sp13* (figura 17). Infortunadamente, no se obtuvo el amplímero esperado de *Uni* que caracteriza a las formas especiales *lycopersici* y *radicis lycopersici*. Por ello, no se considera apropiado clasificarlo como *Fol* raza 1.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

A pesar de los fallos en la reproducibilidad de la técnica y el hallazgo de perfiles no descritos en la literatura, el uso de los primers Uni, Sp13, Sp23 y SprI, permitió clasificar hasta nivel de raza fisiológica a 4 de los 8 aislamientos obtenidos. Los resultados demostraron la presencia de dos cepas de Fol raza 1 presentes en Cundinamarca y una cepa de Fol raza 1 y ForI en Tolima. A pesar de ser la menos patógena de las tres razas de Fol, la raza 1 es la de mayor distribución geográfica reportada (Inami et al, 2012), lo cual coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Dado que existen varias variedades de tomate resistentes a la infección por Fol raza 1, pueden proponerse estrategias de manejo de este patógeno en las fincas evaluadas mediante el uso de estas variedades. Así mismo, se pueden buscar métodos adecuados para el manejo de ForI en la finca el Jardín de Tolima para contribuir en la reducción de la incidencia de marchitez vascular y pudrición del tallo presente en sus cultivos.

Los datos aquí presentados constituyen, hasta donde se conoce por revisión bibliográfica, el primer trabajo que busca clasificar a nivel de forma especial y raza fisiológica, aislamientos nativos de *F. oxysporum* en Colombia y plantea un método que puede seguir siendo estandarizado para el desarrollo de una herramienta diagnóstica molecular dirigida a los programas de manejo integrado de plagas y enfermedades en los cultivos de tomate del país.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

## 8. Conclusiones

La marchitez vascular del tomate en los predios tomateros de Cundinamarca y Tolima evaluados, está asociada a la presencia de diferentes cepas de *Fusarium oxysporum*. De las cepas aisladas y evaluadas, fue posible identificar 3 pertenecientes a la forma especial *lycopersici* raza 1 (2F, 4F y 8H) y una perteneciente a la forma especial *radicis-lycopersici* (2R).

A pesar de su utilidad, el uso de los primers Uni, Sp13, Sp23 y SprI, debe ser rigurosamente estandarizado para conseguir resultados reproducibles y exactos que permitan clasificar inequívocamente cualquier aislamiento de *F. oxysporum* proveniente de plantas de tomate sintomáticas de marchitez vascular.

Los resultados obtenidos en esta investigación, si bien aportan información valiosa sobre la distribución de este fitopatógeno en Tolima y Cundinamarca, no pudieron ser concluyentes en el caso de las cepas 1F, 1R, 3R y 9H. Sin embargo, los ensayos realizados si permitieron demostrar su patogenicidad y por ende, se sugiere que pueden ser usadas junto con los aislamientos ya caracterizados en ensayos de tamizaje para la evaluación de otras estrategias de control diferentes al uso de variedades resistentes tales como el control químico o el control biológico.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

## 9. Referencias bibliográficas

1. Agrios, G. (2005). Plant Pathology. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. 922 p.
2. Alves, F. Cordeiro, J. Sayagues, R. Martí, P. García, M. Crespo, M. Díaz, A. Eslava, P. (2002). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. Plant Pathol. 51:605-611. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00745.x.
3. Amini, J. & Sidovich, D. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated With Fusarium wilt of tomato. Journal of Plant Protection Research.50(2):172-8.
4. Arbelaez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía
5. Arafat, K. (2015). Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Obtenido de: <https://plantdiseasepathology.blogspot.com.co/2015/11/fusarium-oxysporum-f-sp-lycopersici.html>
6. Asencio, A. Lopez. A. Borrego. F. Rodriguez, A. Flores, A. Jiménez. F. Gámez, A. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: II. Herencia de la Resistencia a la Raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Tres Especies del Género *Lycopersicon* Universidad autónoma Agraria Antonio Narro. México

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

7. Bernal, R. (2010). Enfermedades de tomate (*lycopersicum esculentum mill.*) en invernadero en las zonas de salto y bella. Instituto nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay.
8. Booth, C. (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, p. 32-35, 70-72.
9. Borrero, C. Trillas, M. Ordovas, J. Tello, J. Aviles, M. (2004) Predictive factors for the suppression of fusarium wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology*. 94(10):1094-101
10. Blunt, W. Copp, B. Keyzers, R. (2017) Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural product reports*. 34(3):235-94
11. Cotxarrera, L. Trillas, M. Steinberg, C. Alabouvette, C. (2002). Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry*. 34(4):467-76
12. Díaz, S. (2015). Tomate: plagas y enfermedades. Obtenido de: <https://www.agrohuerto.com/tomate-plagas-y-enfermedades-comunes/>
13. Cai, G. Gale, I. Scheider, R. Kistler, H. Davis, R. Elias, K. Miyao, E. (2003) Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology*. 93:1014–1022
14. Carrillo, J. Montoya, T. Garcia, R. Cruz, E. Marquez, I. Sañudo, J. (2012). Razas de *Fusarium Oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacan, Sinaloa, Mexico. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

15. CCB. (2015). Manuel del tomate. Programa de apoyo agrícola y agroindustrial vicepresidencia de fortalecimiento empresarial cámara de comercio de Bogotá.Colombia.
16. DANE-ENA. Boletín técnico. Encuesta Nacional Agropecuaria, (2017). In: DANE, editor. Bogotá, Colombia: DANE;p. 1-25.
17. Dean, R. Van, J. Pretorius, Z. Hammond, K. Pietro, A. Spanu, D. Rudd, J. Dickman, M. Kahmann, R. Ellis, J. Foster, G. (2012) The top 10 Fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–430
18. Estupiñan, H. & Ossa, J. (2007) Efecto del agente causal de la marchitez Vascular de la Uchuva (*Physalis peruviana L.*) El hongo *Fusarium Oxysporum* schlecht, sobre algunas Solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo.Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota.D.C
19. Escobar, H & Lee, R. (2009). Manual de producción de tomate bajo invernadero / editores Hugo Escobar, Rebecca Lee. – Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano,
20. Frei, M. (2013). Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *The Scientific World Journal*, 2013.
21. Gómez, E. (2008). Caracterización de Cepas Toxigenicas del genero *Fusarium* Mediante técnicas de biología Molecular. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Valencia

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

22. Hernández, R. Lopez, A. Borrego, F. Espinoza, J. Sanchez, D. Maldonado, E. Lopez, L. (2014). Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato farmlands in San Luis Potosí Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.5 no.7 Texcoco sep./nov
23. Hirano, Y. & Arie, T. (2006) PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*.72(5):273-83.
24. Houterman, P. Cornelissen, B. Rep, M. (2008). Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathog* 4:e1000061. Revisado: 15 de Diciembre de 2016.
25. Houterman, P. Speijer, D. Dekker, H. Koster, C. Cornelissen, B. Rep, M. (2007) The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol. Plant Pathol.*, 8, 215–221.
26. Inami, K. Yoshioka, C. Morita, Y. Yamasaki, M. Teraoka, T. & Arie, T. (2012). A genetic mechanism for emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: inactivation of avirulence gene AVR1 by transposon insertion. *PLoS One*, 7(8), e44101
27. Katan, T. Katan, J. & Hadar, E. (1989). Vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* from carnation in Israel. *Plant Pathology*, 38(3), 376-381, doi:10.1111/j.1365-3059.1989.tb02156.x
28. Kant, P. Reinprecht, Y. Martin, C. Islam, R. Pauls, K. (2011) . Integration of biotechnologies: disease resistance pathology *Fusarium*. In: Moo-Young M. (ed.). *Comprehensive Biotechnology*, second edition, Elsevier, Amsterdam. P.729-743.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

29. Khallal, S. (2007). Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid & salicylic acid): 1- Changes in growth, some metabolic activities and endogenous hormones related to defence mechanism. *Aust J Basic & Appl Sci.*; 1(4): 691-705.
30. Kwiatos, N. Ryngajłło, M. Bielecki, S. (2015). Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. Published in *Frontiers in Microbiology*. Sep 10
31. Lopez, C. (2011). Descifrando las bases moleculares de la resistencia cuantitativa. Departamento de Biología (edificio 421), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
32. Ma, L. Geiser, D, Proctor, R. Rooney, A. O'Donnell, K. Trail, F. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology*.67:399-416
33. Mandal, S. & Mitra, A. (2007). Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4-6), 201-209.
34. Martinez, R. Lopez, A. Borrego, F. Espinoza, J. Sánchez, D. Maldonado, I. Lopez, L. (2014). Razas de *Fusarium Oxysporum f.sp. lycopersici* en predios tomateros en san Luis de Potosi. *Rev. Mex. Cienc. Agríc* vol.5 no.7 Texcoco sep. /nov
35. Martinez , F. (2016). hongos fitopatógenos asociados al tomate (*solanum lycopersicum* l.) en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*. México.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

36. McGovern, R. (2015) Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*. 2015;73:78-92.
37. Michielse, C. Reijnen, L. Olivain, C. Alabouvette, C. Rep, M. (2012). Degradation of aromatic compounds through the  $\beta$ -ketoacid pathway is required for pathogenicity of the tomato wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Molecular plant pathology*, 13(9), 1089-1100
38. Negrete, J. (2013). Prevalencia de Razas de *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Lycopersici* en predios tomateros de villa de arista, san luis de pótosí, posibles fuentes de resistencia y forma de herencia. Universidad Autónoma Agraria. Mexico.
39. Nelson, E. Tousson, T. Marasas, W.(1983) *Fusarium* species, a Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, p. 39-48.
40. Samson, R. Hoekstra, E. Frisvad, J. Filtenborg, O. (Eds) (1995) Introduction to Foodborne Fungi, fourth edition, CBS, Baarn, Netherlands, p. 85-119
41. Nirmaladevi, D. Venkataramana, M. Srivastava, R. Uppalapati, S. Gupta, V. Yli-Mattila, T. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific reports*. 6.
42. Panina, Y. Fravel, D. Baker, C. Shcherbakova, L. (2007) Biocontrol and plant pathogenic *Fusarium oxysporum*-induced changes in phenolic compounds in tomato leaves and roots. *J. Phytopathol.* 155, 475–481.

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

43. Pirayesh, S. Zamanizadeh, H. Morid, B. (2018). Molecular identification of physiological races of *Fusarium Oxysporum f. sp lycopersici* and *radicis lycopersici* causal agent of fusarium Wilt of Tomato in Irán. J. Agr. Sci. Tech. Vol. 20: 193-202
44. Pinzón, Y. Bustamante, S. Rodriguez, P. Buitrago, B. (2013). Diagnóstico molecular de aislamientos de *fusarium* sp. Obtenidos de ñame (*dioscorea* sp.).Universidad Nacional de Colombia.
45. Penesyanyan, A. Kjelleberg, S. Egan, S. (2010).Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. Marine drugs.8(3):438-59.
46. Raza, W. Ling, N. Zhang, R. Huang, Q. Xu, Y. Shen, Q. (2016) Success evaluation of the biological control of Fusarium wilts of cucumber, banana, and tomato since 2000 and future research strategies. Critical reviews in biotechnology.1-11.
47. Rodríguez, E. (2013). Caracterización de aislamientos de Fusarium spp. Obtenidos de zonas productoras de uchuva (*Physalis peruviana*) en Cundinamarca y Boyacá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá. D, C.
48. Rodríguez, D. & Montilla. J. (2002) Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 63:46-50.
49. Sheu, Z. & Wang, T. (2006). First report of Race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the causal agent of *fusarium* wilt on tomato in Taiwan. *Plant disease*, 90(1), 111-111.
50. Sain, M. & Rep, M. (2015). The Role of Pathogen-Secreted Proteins in Fungal Vascular Wilt Diseases. International journal of molecular sciences.16(10):23970-93

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

51. Silva, N. Lumyong, S. Hyde, K. Bulgakov, T. Phillips, A. Yan, J. (2016). Mycosphere Essays 9: Defining biotrophs and hemibiotrophs. Guizhou Academy of Agricultural Sciences. Thailand
52. Schmidt, S. Houterman, P. Schreiver, I. Ma, L. Amyotte, S. Chellappan, B. Boeren, S. Takken, F.L. Rep, M. (2013) Mites in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. BMC Genom., 14, 119
53. Stirling, D. (2003). DNA extraction from fungi, yeast, and Bacteria. In *PCR Protocols* (pp. 53-54). Humana Press.
54. Turrà, D. Ghalid, M. Rossi, F. Pietro, A. (2015) Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals. *Nature*.527(7579):521-4..
55. Tamayo, P. & Jaramillo, J. (2013.) Marchitez vascular, *Fusarium* In: CORPOICA, editor. Enfermedades del tomate, pimentón, ají y berenjena en Colombia. 1. Bogotá, Colombia: CORPOICA; p. 1-83.
56. Vázquez, L. & Castaño, J. (2017). Integrated disease management of fusarium wilt of tomato [*fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (sacc.) w.c. snyder & h.n. hansen]: a review. Ingeniera Agrónoma, c.M.Sc. Fitopatología, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Manizales. Colombia.
57. Wiwik, S. Dewa, S. Made, I. Made. (2013). First report on *Fusarium solani*, a pathogenic fungus causing stem rot disease on dragon fruits (*Hylocereus* sp.) in Bali. *J. Biol. Agric. Healthcare* 3:93-99.
58. Yadeta, K. & Thomma, B. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*. 4:97

Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* aislado de cultivos colombianos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitez vascular.

Angie Tatiana Almonacid Suarez

59. Zhao, Z. Liu, X . Wang, C. Xu, J. (2013). Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. BMC Genomics, 14:274