

Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí*

Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato farmlands in San Luis Potosí

Rosendo Hernández Martínez¹, Alfonso López Benítez², Fernando Borrego Escalante², José Espinoza Velázquez², David Sánchez Aspeytia³, Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza⁴ y Luis Alejandro López Ochoa⁵

¹INIFAP-Campo Experimental Rio Bravo. Carretera Matamoros-Reynosa, km 61. A. P. 172. C. P. 88900. Rio Bravo, Tamaulipas. México. Tel: 018999340745. (ing_rosendohm@hotmail.com). ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Depto. de Fitomejoramiento, Calzada Antonio Narro No. 1923. C. P. 25315. Saltillo, Coahuila, México. Tel: 018444110298. (fborrego@uaan.mx), (jespvel@uaan.mx). ³INIFAP- Unidad Saltillo, Carretera Saltillo-Zacatecas km. 342+119. No. 9515. C. P. 25315. Col. Hacienda de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Tel: 018444391901. (dsanchezaspeytia@yahoo.com.mx). ⁴CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, Departamento Agropecuario Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes. No. 250. A. P. 280. C. P. 81100. Guasave, Sinaloa, México. Tel: 016878729626. (ignacioemaldonado@yahoo.com.mx; imaldona@ipn.mx). ⁵Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Forestales. A. P. 41. C. P. 67700. Linares, Nuevo León. México. Tel: 018212124895. (lopezochoa.luis@gmail.com). *Autor para correspondencia: alflopezbe_2000@hotmail.com.

Resumen

La marchitez por *Fusarium* causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) es una de las enfermedades más importantes del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Su variabilidad patogénica ha originado las razas 1, 2 y 3, ya descritas en varios países. En México se ha reportado en Sinaloa, Baja California Sur y Morelos. El tomate es un cultivo hortícola muy importante en Villa de Arista, San Luis Potosí, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar mediante pruebas de patogenicidad la variabilidad en la virulencia de aislamientos de *Fol* en predios tomateros de esta región. Se obtuvieron 27 aislamientos de *Fusarium oxysporum* de plantas de tomate con síntomas característicos de la marchitez por *Fusarium* de nueve variedades en siete predios tomateros, las cuales se procesaron en laboratorio para aislar el hongo, purificarlo, preparar inoculo y realizar pruebas de patogenicidad. Las variedades diferenciales utilizadas fueron Bonny Best, susceptible a las razas 1, 2 y 3; Manapal, resistente a la raza 1; Walter, resistente a las razas 1 y 2; e I3R3, resistente a las razas 1, 2 y 3. Las razas identificadas fueron, raza 2 en las variedades Rafaello y Tipsey en los predios Agro

Abstract

Wilting caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is one of the most important diseases of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Its pathogenic variability originated races 1, 2 and 3, as described in several countries. In Mexico has been reported in Sinaloa, Baja California Sur and Morelos. Tomato is a quite an important horticultural crop in Villa de Arista, San Luis Potosí, and for this reason, the aim of this study was to characterize pathogenicity tests by the variability in virulence of isolates of *Fol* in tomato farmlands of this region. 27 isolates of *Fusarium oxysporum* were gathered from tomato plants with characteristic symptoms of wilting of tomato plants in nine varieties of seven lots, which were processed in the laboratory to isolate the fungus, purify were obtained prepare inoculum and pathogenicity tests. Differential varieties used were Bonny Best susceptible to races 1, 2 and 3; Manapal resistant to race 1; Walter, resistant to races 1 and 2; I3R3 and resistant to races 1, 2 and 3. The races identified were race 2 in the Rafaello and Tipsey on the fields Agro Vida and Rancho el Clérigo, and race 3 in the varieties El Cid, Hannibal, and

* Recibido: enero de 2014
Aceptado: junio de 2014

Viva y Rancho el Clérigo, y la raza 3 en las variedades El Cid, Aníbal y 77-05 en los predios San Gilberto, Santa María Elena y Lourdes. La identificación de estas razas mediante la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) coincidió con los resultados de las pruebas patogénicas.

Palabras claves: *Solanum lycopersicum* L., marchitez vascular del *Fusarium*, *Fol* razas 2 y 3.

Introducción

El tomate es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial, además de ser una de las de mayor valor económico, su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, por el gran número de productos que se obtienen. La FAO en sus registros ubica a China como el principal productor de tomate con 48 millones de toneladas. México ocupa el onceavo lugar con 2.4 millones de toneladas anuales (FAO, 2011). Los principales estados productores de tomate en México son; Sinaloa, Baja California, Michoacán, Jalisco, Yucatán y San Luis Potosí. El rendimiento promedio nacional es de 41.67 t ha⁻¹ (SIAP-SAGARPA, 2011).

El tomate, como todos los cultivos, es afectado por diferentes factores que limitan su producción y por ende su rentabilidad. Entre los factores más importantes que afectan el desarrollo normal de este cultivo se encuentra las enfermedades de tipo infeccioso provocada por hongos, las cuales se presentan en la mayoría de las zonas tomateras de México.

Una de las enfermedades de mayor importancia para este cultivo es la marchitez vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) (Sacc.) Snyder y Hansen (Agrios, 2004), la cual puede causar pérdidas superiores a 50% (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2004). Esta enfermedad ha sido identificada como una de las más devastadoras en todas las regiones del mundo donde se cultiva el tomate (Marlatt *et al.*, 1996) y es particularmente severa en áreas con clima cálido.

El hongo tiene una gran capacidad genética para generar variantes en apariencia y coloración de las colonias, así como en la producción de microconidios, y clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983; Zunilde y Sanabria, 2001). Esta capacidad de variación también se manifiesta en su virulencia por la aparición de razas fisiológicas. La existencia de razas

77-05 in the farmlands San Gilberto, Santa María Elena and Lourdes. The identification of these breeds was made using the molecular technique of Chain Reaction (PCR) coincided with the results of tests pathogenic.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., vascular *Fusarium* wilt, *Fol* races 2 and 3.

Introduction

Tomato is one of the most consumed vegetable worldwide, in addition to being one of the highest economic value, and with a demand continuously increases its cultivation, production and trade. It is regarded as one of the most important vegetable in many countries, the large number of products obtained. The FAO in its records placed China as the leading producer of tomato with 48 million tonnes. Mexico occupies the eleventh place with 2.4 million tonnes annually (FAO, 2011). The main producing states in Mexico are tomato; Sinaloa, Baja California, Michoacán, Jalisco, Yucatán and San Luis Potosí. The national average is 41.67 t ha⁻¹ (SIAP-SAGARPA, 2011).

Tomato, like all crops is affected by factors that limit their production and thus profitability. Among the most important factors that affect the normal development of this crop is infectious type of disease caused by fungus, which is present in most areas of Mexico tomato.

One of the most important diseases of this crop is vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) (Sacc.) Snyder and Hansen (Agrios, 2004), which may cause losses exceeding 50% (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2004). This illness has been identified as one of the most devastating in all regions of the world where the tomato is grown (Marlatt *et al.*, 1996) and is particularly severe in areas with warm weather.

The fungus has a high genetic capacity to generate variants in appearance and coloration of the colonies, as well as in the production of microconidia, and chlamydospores (Nelson *et al.*, 1983; Zunilde and Sanabria, 2001). This ability to change is also reflected in their virulence by the appearance of physiological races. The existence of physiological races *Fol* was demonstrated by pathogenicity testing, where the races are distinguished by their virulence on tomato varieties that carry specific genes for resistance (McGrath *et al.*, 1987;

fisiológicas en *Fol* fue demostrada mediante pruebas de patogenicidad, donde las razas son distinguidas por su virulencia sobre variedades de tomate que llevan genes específicos para resistencia (McGrath *et al.*, 1987; Stall, 1961). Hasta ahora se han descrito tres razas (Davis *et al.*, 1988; Chellemi *et al.*, 1992; Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996; Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008).

La existencia de la raza 1 fue descrita por primera vez en 1886 (Booth, 1971) y la resistencia a esta raza fue encontrada en el locus 1 de *Solanum pimpinellifolium* PI-79532 (Bohn y Tucker 1940), la raza 2 fue identificada inicialmente en 1945 en Ohio (Alexander y Tucker, 1945) y la resistencia a esta nueva raza eliminarse encontró en el nuevo locus (1-2) del híbrido natural *S. esculentum* x *S. pimpinellifolium* PI-126915 (Alexander y Hoover, 1955). La raza 3, capaz de atacar los cultivares con los loci para resistencia 1 y (1-2) fue identificada en Queensland, Australia en 1978 (Grattidge y O'Brien, 1982). Ésta raza se ha observado en Estados Unidos de América (Davis *et al.*, 1988; Chellemi *et al.*, 1992; Marlatt *et al.*, 1996; Bost, 2001) en México (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996; Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008) y en Brasil (Reis *et al.*, 2004).

La fuente de resistencia a esta nueva raza se encontró en la especie silvestre *Solanum pennellii* P1414773 designando al locus que le confiere control a esta raza de *Fol* (1-3) (McGrath *et al.*, 1987). Con la finalidad de reducir las pérdidas económicas debido a las enfermedades, los agricultores aplican grandes cantidades de productos químicos por ciclo de producción y en ocasiones sin tener un control adecuado sobre el número y momento de las aplicaciones, lo que da lugar a mayores costos de producción y contaminación ambiental.

El método más sencillo, barato, efectivo y seguro para su control en la producción agrícola es el uso de cultivares resistentes (Fernández-Valiela, 2001). Sin embargo, es de particular importancia para el fitomejorador, el conocimiento y entendimiento de la capacidad de variación genética de un patógeno, pues esto constituye el origen y posterior diseminación de nuevas razas fisiológicas con la habilidad para atacar variedades que previamente eran resistentes. El monitoreo de las poblaciones de patógenos en los lotes de producción ha sido muy valioso para el desarrollo y uso de variedades resistentes (Andrison, y Vallavieille-Pope, 1993) y ha permitido una visión clara de la evolución de las poblaciones de los patógenos como respuesta a la selección debida a los genes para resistencia utilizados.

Stall, 1961). So far described three strains (Davis *et al.*, 1988; Chellemi *et al.*, 1992; Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996; Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008).

The existence of race 1 was first described in 1886 (Booth, 1971) and resistance to this race was found at locus 1 of *Solanum pimpinellifolium* PI-79532 (Bohn and Tucker 1940), race 2 was identified given initially in 1945 in Ohio (Alexander and Tucker, 1945) and resistance to eliminate this new breed was found in the new locus (1-2) natural hybrid *S. esculentum* x *S. pimpinellifolium* PI-126915 (Alexander and Hoover, 1955). Race 3, able to attack cultivars with resistance loci 1 and (1-2) was identified in Queensland, Australia in 1978 (Grattidge and O'Brien, 1982). This race has been observed in the United States of America (Davis *et al.*, 1988; Chellemi *et al.*, 1992; Marlatt *et al.*, 1996; Bost, 2001) in Mexico (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996; Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008) and Brazil (Reis *et al.*, 2004).

The source of resistance to this new breed was found in the wild species *Solanum pennellii* P1414773 designating the locus that confers control this breed of *Fol* (1-3) (McGrath *et al.*, 1987). In order to reduce the economic losses due to disease, farmers use large amounts of chemicals per production cycle and sometimes without adequate control over the number and timing of applications, which results in higher costs production and environmental pollution.

The most simple, cheaper, effective and safe way to have control in agricultural production method is the use of resistant cultivars (Fernández-Valiela, 2001). However, it is of particular importance to the breeder, knowledge and understanding of the ability of a pathogen genetic variation, as this is the origin and subsequent spread of new physiological races with the ability to attack previously resistant varieties were. The monitoring of pathogen populations in the production lots has been invaluable in the development and use of resistant varieties (Andrison, and Vallavieille-Pope, 1993) and allowed a clear view of the evolution of pathogen populations in response to selection due to genes for resistance used.

The objectives of this study were to determine, by testing pathogenicity variability in virulence of isolates of *Fol* in tomato producing farms in the state of San Luis Potosí and identification of breeds by genotyping

Los objetivos de este trabajo fueron determinar, mediante pruebas de patogenicidad la variabilidad en la virulencia de aislamientos de *Fol* en predios productores de tomate en el estado de San Luis Potosí y la identificación de las razas por genotipificación en variedades con resistencia diferencial a las razas de *Fol* y confirmando estas observaciones empleando una metodología de PCR diferencial.

Materiales y métodos

Muestreo, aislamiento y purificación del patógeno. El 27 de octubre de 2011, se colectaron veintisiete muestras de tallos de plantas enfermas con síntomas característicos de marchitez vascular por *Fusarium* en cinco predios tomateros comerciales del municipio de Villa de Arista, San Luis Potosí. Las variedades muestreadas fueron: China, Rafaello, Antare, 77-05, Moctezuma, Aníbal, Imperial, El Cid y Tipsey. Los predios muestreados fueron: Agro Viva, Rancho el Clérigo, San Gilberto, Santa María Elena y Lourdes. Las muestras colectadas se colocaron en bolsas de polietileno, se identificaron con datos de fecha, lugar de muestreo, variedad muestreada, tipo de muestra y se transportaron en hielera al laboratorio de Patosistemas Agrícolas del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), para aislar el hongo en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), identificarlo morfológicamente y purificarlo. De las muestras colectadas se tomaron fragmentos longitudinales de 5 mm de tallos con síntomas de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por un min y se lavaron después con agua destilada estéril, se secaron y transfirieron asépticamente a placas de Petri con medio de cultivo PDAe incubados a 25 °C por 7 días. Los aislamientos obtenidos se sub-cultivaron posteriormente en PDA, para producir cultivos puros mediante puntas de micelio que fueron utilizados después para su identificación y pruebas de patogenicidad. La identificación de los aislamientos se hizo considerando la sintomatología en plantas enfermas, la observación y comparación de sus características morfológicas de micelio y conidios en medio de cultivo a nivel microscópicos (Booth, 1977; Summerell *et al.*, 2003).

Pruebas de patogenicidad en diferenciales. Los genotipos que se utilizaron como materiales diferenciales fueron; Bonny Best, sin genes de resistencia y susceptible a las tres razas; Manapal, resistente solo a la raza 1 por la presencia del locus 1 pero susceptible a las razas 2 y 3; Walter, resistente a las razas 1 y 2 debido a la presencia de los loci 1 y 1-2, pero

in differential varieties with resistance to races *Fol* and confirming these observations using a differential PCR methodology.

Materials and methods

Sampling, isolation and purification of the pathogen. On October 27, 2011, twenty-seven samples of stems of diseased plants with characteristic symptoms of vascular wilt *Fusarium* tomato plants collected from five commercial farms in the municipality of Villa de Arista, San Luis Potosí. The varieties sampled were: China, Rafaello, Antare, 77-05, Moctezuma, Hannibal, Imperial, El Cid and Tipsey. The plots sampled were Agro Viva, Rancho el Clérigo, San Gilberto Santa María Elena and Lourdes. The collected samples were placed in polyethylene bags, were identified with date data, place of sampling, sampled range, sample type and transported in a cooler to the laboratory of pathosystems of the Agricultural Plant Breeding Department of the Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), to isolate the fungus in culture medium Papa-Dextrose-Agar (PDA), identified morphologically and purification.

From the samples collected, longitudinal pieces of 5 mm of stems with symptoms of the disease were taken, were disinfected with sodium hypochlorite at 2% for min and then washed with sterile distilled water, dried and aseptically transferred to Petri dishes with PDA culture medium and incubated at 25 °C for 7 days. The isolates were subsequently subcultured in PDA, to produce pure culture mycelium using rods were then used for identification and pathogenicity tests. Identification of the isolates was made considering the symptoms in infected plants, compared to the observation and morphological characteristics of mycelium and conidia in culture medium at microscopic level (Booth, 1977; Summerell *et al.*, 2003).

Pathogenicity tests on differential. Genotypes that were used as differential materials; Bonny Best, no resistance genes and susceptible to the three breeds; Manapal resistant race 1 only by the presence of locus 1 but susceptible to the races 2 and 3; Walter, resistant to races 1 and 2 due to the presence of the loci 1 and 1-2, but susceptible to race 3; I3R3 and resistant to races 1, 2 and 3 due to the presence of the 1-3 gene (Reis *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004) and were provided by Dr. John Paul Jones, Institute of Science for Food and Agriculture of the University of Florida. Planting of the

susceptible a la raza 3; e I3R3, resistente a las razas 1, 2 y 3 debido a la presencia del gen *I-3* (Reis *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004) y se proporcionaron por el Dr. John Paul Jones, del Instituto de Ciencias para la Agricultura y la Alimentación de la Universidad de Florida. La siembra de las variedades diferenciales se realizó en diciembre de 2011 en invernadero en charolas de poliestireno de 200 cavidades conteniendo peat moss (Premier, Pro-mix. Pgx. Professional) y se inocularon con el hongo *Fol* 25 días después de siembra, siguiendo el método de inmersión de puntas de raíz (Williams, 1981).

El experimento consistió en el establecimiento de cinco plantas de cada una de las cuatro variedades diferenciales con tres repeticiones para cada uno de los 27 aislamientos, bajo un diseño de bloques al azar. Las plántulas de cada juego de diferenciales se sacaron con cuidado de las celdas de las cajas y con un suave chorro de agua se eliminó el exceso de sustrato, teniendo cuidado de mantener íntegras las raíces, después, se cortaron con tijeras aproximadamente dos centímetros de la punta de las raíces y se sumergieron durante dos minutos en una suspensión de 1×10^6 conidios por mL, utilizando un juego de diferenciales para cada aislamiento del hongo. Después de la inoculación, las plántulas fueron trasplantadas a vasos de plástico de 0.5 L de capacidad conteniendo una mezcla de peat moss (Premier sphagnum peat moss turbe, catálogo # 70976040, lote SKU 673116) y suelo de bosque de la región estéril, manteniéndose en el invernadero a una temperatura aproximada de 25 ± 2 °C bajo condiciones de luz natural e irrigándose cuando fuera necesario. La evaluación de la respuesta a la inoculación se realizó 25 días después de la inoculación con base a la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad, considerados estos como amarillamiento foliar, marchitez, coloración amarillenta o café de los haces vasculares y coloración café en la raíz. La severidad de la enfermedad se evaluó utilizando la escala de severidad del 1 al 5 de Marlatt *et al.* (1996).

Identificación de razas de *Fol* por PCR diferencial. Se realizó la amplificación de ADN por la técnica de PCR anidada que consiste en dos reacciones secuenciales de PCR, utilizando como templado para la segunda reacción el producto obtenido de la primera, el cual contiene el fragmento que se desea amplificar en la segunda reacción. Para las primeras reacciones, se amplificaron los fragmentos de los genes *endo* poligalacturonasa (*pgl1*) y *exo* poligalacturonasa (*pgx4*), utilizando el conjunto de primers endoF + endoR y exoF + exoR descritos por (Di Pietro y Roncero, 1998 y Posada *et al.* 2000). El volumen de la reacción de PCR fue de 12.5 µl, la cual contenía 8.05 µl de agua ultrapura, 1.25 µL de buffer de reacción para PCR, 0.5 µL MgCl₂ (50 µM),

differential varieties was conducted in December 2011 in di gases in polystyrene trays containing peat moss 200 cavities (Premier Pro-mix. Pgx. Professional) and inoculated with the fungus *Fol* 25 days after planting, following immersion method of root tips (Williams, 1981).

The experiment consisted in the establishment of five plants of each of the four differential varieties with three replicates for each of the 27 isolates under a randomized block design. Seedlings of each set of differentials were removed carefully from the cells of the boxes and with a gentle stream of water excess substrate was removed, taking care to keep intact the roots, then cut with scissors about two inches from the root tip and immersed for two minutes in a suspension of 1×10^6 conidia per mL, using a differential set of each isolate of the fungus. After inoculation, the seedlings were transplanted into plastic cups 0.5 L capacity containing a mixture of peat moss (Premier sphagnum peat moss troubled, catalogue # 70976040, Lot SKU 673116) and forest soil of the barren region, maintained in a greenhouse at a temperature of approximately 25 ± 2 °C under natural light and watering when necessary. The evaluation of the response to inoculation was made 25 days after inoculation based on the presence or absence of symptoms of the disease, considered these as foliar yellowing, wilting, yellowing or Coffee vascular bundles and brown discoloration of the root. Disease severity was assessed using the severity scale from 1 to 5 of Marlatt *et al.* (1996).

***Fol* breeds identifying differential PCR.** The DNA amplification was performed by nested PCR technique consisting in two sequential PCR reactions using as template for the second reaction product obtained from the first, which contains the fragment to be amplified in the second reaction. For the first reactions, fragments of endo polygalacturonase genes (*pgl1*) and exo polygalacturonase (*pgx4*) were amplified using the set of primers endoF + endoR and exoF + exoR described by (Di Pietro and Roncero, 1998 Posada *et al.*, 2000). The volume of the PCR reaction was 12.5 ml, which contained 8.05 ul of ultrapure water, 1.25 L of reaction buffer for PCR, 0.5 l MgCl₂ (50 µM), 0.5 l of dNTPs (10 µM), 0.5 l of each primer (10 µM), 0.2 L of Taq DNA polymerase (1 U) and 1 L of DNA (100 pg) of the corresponding sample.

DNA amplification was performed in a Multigene thermociclador (Labnet International, Inc., USA). Amplifier conditions were: 4 min denaturation at 95 °C, followed

0.5 µL de dNTP's (10 µM), 0.5 µL de cada primer (10 µM), 0.2 µL de Taq DNA polymerase (1 U) y 1 µL de ADN (100 pg) de la muestra correspondiente.

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Multigene (Labnet International, Inc., EUA). Las condiciones del amplificador fueron: desnaturalización 4 min a 95 °C; seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, anillamiento 1 min a 62 °C y elongación 2 min a 72 °C; y un ciclo final de 5 min a 72 °C. Para la segunda reacción de PCR anidado se utilizaron los primers unif + unir, sp23f + sp23r para la re-amplificación del gen *pgl* y sp13f + sp13r, sprlr + sprlr para re-amplificar el gen *pgx4*, descritos por Hirano y Arie (2006), empleando la misma concentración de reactivos y programa de PCR de la primera reacción. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que se emplearon en la primera reacción de PCR.

Resultados y discusión

De los veintisiete aislamientos colectados, solo cinco produjeron colonias en medio de cultivo PDA con micelio y conidios con características morfológicas propias de *Fusarium oxysporum* (Summerell *et al.*, 2003) lo que además de la sintomatología observada en plantas adultas en el campo, permitió que fueran identificados como *Fol*. Éstos cinco aislados (Cuadro 1) fueron identificados con el nombre del predio del cual procedían, produjeron severos síntomas de la marchitez por *Fusarium* (amarillamiento foliar, marchitamiento parcial o total, coloración amarillenta o café de los haces vasculares, coloración café en la raíz) en las variedades Bonny Best y Manapal, indicando su completa susceptibilidad.

by 30 cycles of 1 min at 94 °C, annealing for 1 min at 62 °C and 2 min at 72 °C; and a final cycle of 5 min at 72 °C. For the second nested PCR reaction primers were used unif + join, sp23f + sp23r for re-amplification of the gene *pgl* y sp13f + sp13r, sprlr + sprlr to re-amplify the gene *pgx4* described by Hirano and Arie (2006), using the same concentration of reactants and the PCR program of the first reaction. Amplification conditions were the same as were used in the first PCR reaction.

Results and discussion

Of the twenty-seven isolates collected, only five produced colonies on PDA culture medium with mycelium and conidia characteristic of *Fusarium oxysporum* morphological characteristics (Summerell *et al.*, 2003) that in addition to the symptoms observed in adult plants in the field, allowed them to be identified as *Fol*. These five isolated (Table 1) were identified with the name of the property which came produced severe symptoms of wilting (leaf yellowing, partial or total wilting, yellowing or coffee vascular bundles, brown discoloration of the root) on Bonny Best and Manapal varieties, indicating its complete susceptibility.

Bonny Best is susceptible to all three races of *Fol* and Manapal is resistant to race 1, these isolates should be different from race 1. Walter showed complete susceptibility to three of the five isolates and resistance to two, indicating that these two *Fol* isolates can be identified as race 2, since the Walter variety is resistant to races

Cuadro 1. Identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en cinco lotes comerciales de tomate en Villa de Artista, San Luis Potosí.

Table 1. Identification of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in five commercial tomato-farmlands in Villa de Artista, San Luis Potosí.

Predio	Cepa	Variedad	Bonny Best	Variedades diferenciales				Raza
				Manapal	Walter	I3R3		
San Gilberto	1	El Cid	S	S	S	R		3
Santa María Elena	2	Aníbal	S	S	S	R		3
Agro Viva	3	Rafaello	S	S	R	S		2
Rancho el Clérigo	4	Tipsey	S	S	R	S		2
Lourdes	5	77-05	S	S	S	R		3

S= susceptible; R= resistente.

Considerando que Bonny Best es susceptible a las tres razas de *Fol* y Manapal es resistente a la raza 1, estos aislamientos deben ser diferentes a la raza 1. Walter mostró completa susceptibilidad a tres de los cinco aislamientos y resistencia a dos, indicando que estos dos aislamientos pueden identificarse como *Fol* raza 2, ya que la variedad Walter es resistente a las razas 1 y 2 y susceptible a la raza 3. Algunas plantas de la variedad I3R3 considerada como resistente a la raza 3, mostraron algunos signos de susceptibilidad, lo cual fue atribuido por Reis *et al.* (2004) a una posible variabilidad genética en la raza 3 o una posible impureza genética en el cultivar BHRS-2,3 utilizado como resistente a esta raza 3. Un segundo y tercer experimento con los mismos cultivares diferenciales mostraron de nuevo algunas plantas de la variedad diferencial I3R3 susceptibles a la raza 3.

Es importante continuar monitoreando la variabilidad genética para virulencia en *Fol* en lo que respecta a la raza 3. Hernández (2012) evaluó la respuesta a la raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de ocho de los principales cultivares comerciales cultivados en Culiacán, Sinaloa, México resultando todos ellos susceptibles a esta raza. Esta situación aunada a la aparición de una nueva raza de este patógeno puede constituir una enfermedad económicamente muy importante para los productores de tomate. Este estudio indicó la presencia de solo las razas 2 y 3 en los predios analizados en San Luis Potosí. Ortega (2010) y Sánchez-Peña *et al.* (2010) reportaron también la presencia de las razas 2 y 3 de *Fol* en el estado de Morelos y Sinaloa respectivamente.

Es probable que estas razas del hongo hayan sido introducidas a las áreas tomateras de México mediante semilla contaminada, ya que actualmente las semillas de las variedades cultivadas en México son de importación. Existe también la posibilidad de que la raza 3 de este hongo se haya originado a través de un cambio genético en las poblaciones locales nativas de California de *Fol* como lo señala Cai *et al.* (2003). Sin embargo, las tres razas de este hongo se han descrito en México en áreas productoras de tomate distantes y separadas unas de otras (Valenzuela *et al.*, 1996; Carrillo *et al.*, 2003; Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008), las reportan en lotes comerciales de tomate en Culiacán, Sinaloa, en Baja California Sur (Holguín, 2005) y en Morelos (Ortega, 2010), por lo que es probable que el origen de estas razas en México haya sido mediante introducción de semilla contaminada.

Las razas identificadas fueron raza 2 en variedades de Rafaello y Tipsey en los predios Agro Viva y rancho el Clérigo, y la raza 3 en las variedades El Cid, Anibal y 77-05

1 and 2 and susceptible to race 3. Certain plants of the variety I3R3 considered resistant to race 3, showed some signs of susceptibility, which was attributed by Reis *et al.* (2004) to a possible genetic variability in race 3 or a possible genetic impurity in the cultivar BHRS-2,3 used as resistant to this race 3. A second and third experiment with the same differential cultivars showed again some plants of the differential manifold I3R3 susceptible to race 3.

It is important to continue monitoring the genetic variability for virulence in *Fol* with respect to the race 3. Hernández (2012) evaluated the response to the race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* eight major commercial cultivars grown in Culiacán, Sinaloa, Mexico resulting all susceptible to this race. This situation coupled with the emergence of a new race of this pathogen can be an economically very important for tomato growers disease. This study indicated the presence of only 2 and 3 races on the grounds discussed in San Luis Potosí. Ortega (2010) and Sánchez-Peña *et al.* (2010) also reported the presence of races 2 and 3 of *Fol* in the state of Morelos and Sinaloa, respectively.

It is likely that these races of the fungus have been introduced to areas of Mexico tomato by contaminated seed, as currently the seeds of cultivated varieties in Mexico are imported. There is also the possibility that race 3 of this fungus has arisen through a genetic change in local populations of native *Fol* in California as noted by Cai *et al.* (2003). However, the three races of this fungus have been described in Mexico in tomato growing areas distant and separated from each other (Valenzuela *et al.*, 1996; Carrillo *et al.*, 2003; Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008), the report on commercial batches of tomato in Culiacan, Sinaloa, Baja California Sur (Holguín, 2005) and Morelos (Ortega, 2010), so it is likely that the origin of these races in Mexico has been by introducing contaminated seed.

The races identified were race 2 in varieties Rafaello and Tipsey in Agro Vida and Rancho el Clérigo and race 3 varieties in El Cid, Hannibal and 77-05 on the campus San Gilberto Santa María Elena and Lourdes. These results suggest an incidence of 40% of *Fol* race 2 and 60% of the race 3. In all cases, the fungus was reisolated for the presence of the pathogen and the same race. Cai *et al.* (2003) took the same tests and the determination of the races, the susceptible cultivars showed severe symptoms of yellowing and wilt, while resistant cultivars showed no symptom, coinciding with the same results.

en los predios San Gilberto, Santa María Elena y Lourdes. Éstos resultados sugieren una incidencia de 40% de *Fol* raza 2 y 60% de la raza 3. En todos los casos se reaisló el hongo para comprobar la presencia del patógeno y la misma raza. Cai *et al.* (2003) hicieron las mismas pruebas y al determinar las razas, los cultivares susceptibles mostraron síntomas de amarillamiento severo y marchitez, mientras que los cultivares resistentes no presentaron ningún síntoma, coincidiendo con estos mismos resultados.

Estos mismos resultados se obtuvieron mediante la técnica de PCR de acuerdo a Hirano y Arie (2006) para la identificación de las diferentes razas de *Fol*, Cuadro 2. Los aislados 3 y 4 presentaron un patrón que corresponde al de la raza 2 reportado por Hirano y Arie (2006) en donde los pares de primers uni y sp23 amplificaron (Cuadro 2). La amplificación con el par de primers uni en los aislados 1, 2 y 5 indican que el aislado corresponde a *Fol* o *Forl* de acuerdo a Hirano y Arie (2006). La ausencia de amplificación en el PCR anidado con el par de primers sprl indica que no se trata de *Forl* de acuerdo al patrón reportado en Hirano y Arie (2006). El patrón reportado para aislados japoneses de *Fol* raza 3 por Hirano y Arie (2006) es la amplificación con los pares de primers uni, sp13 y sp23.

Cuadro 2. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identificadas mediante la técnica de PCR en cinco lotes comerciales de tomate en Villa de Arista, San Luis Potosí.

Table 2. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identified by PCR in five commercial batches of tomato in Villa de Arista, San Luis Potosí.

Predio	Cepa	Variedad	Uni	Primer			raza
				sp13	sp23	Sprl	
San Gilberto	1	El Cid	+	-	-	-	3
Santa María Elena	2	Anibal	+	-	-	-	3
Agro Viva	3	Rafaello	+	-	+	-	2
Rancho el Clérigo	4	Tipsey	+	-	+	-	2
Lourdes	5	77-05	+	-	-	-	3

Con aislados provenientes de los estados de Morelos (Domínguez, 2012), Sinaloa y Nayarit, se ha encontrado un patrón en el cual se obtiene una amplificación única con el par de primers uni con aislados de *Fol* de la raza 3 identificados de acuerdo a variedades diferenciales de tomate, incluyendo los tres aislados evaluados en este trabajo (1, 2 y 4). Este patrón aún no ha sido validado molecularmente, pero es posible postular que los aislados mexicanos difieren en las secuencias de los genes de la endo- (*pgl*) y exo-poligalacturonasas (*pgx4*). Esta validación molecular requiere hacerse en el futuro secuenciando estos genes a partir de un mayor número

These results were obtained by PCR according to Hirano and Arie (2006) for the identification of the different races of *Fol*, Table 2. Isolates 3 and 4 showed a pattern corresponding to that of race 2 reported by Hirano and Arie (2006) wherein the primer pairs amplified uni and sp23 (Table 2). Amplification with the primer pair uni in the isolated 1, 2 and 5 indicate that the corresponding isolated *Fol* o *Fol* according to Hirano and Arie (2006). The absence of amplification in the nested PCR with the primer pair sprl indicates *Fol* is not according to the pattern reported in Hirano and Arie (2006). The pattern reported for Japanese isolates of *Fol* race 3 Hirano and Arie (2006) is the amplification with primer pairs uni, sp13 and sp23.

With isolates from the states of Morelos (Domínguez, 2012), and Sinaloa and Nayarit, found a pattern in which a single amplification was obtained with the primer pair uni with isolated *Fol* race 3 identified according to differential tomato varieties, including three isolates evaluated in this study (1, 2 and 4). This pattern has not yet been validated molecularly, but it is possible to postulate that the mexican isolates differ in the sequences of the genes of the endo- (*pgl*) and exo-polygalacturonase (*pgx4*). This molecular validation needs to be done in the future by sequencing

these genes from a larger number of mexican isolates, or use new sets of primers as most recently reported by Lievens *et al.* (2009) designed to amplify the genes for secreted proteins in xylem (*Six*).

This paper analyzed isolates of *Fol* from different geographical location and included only a Mexican isolate *Fol* race 1, so if they are used primers also should be validated with isolates of different races of *Fol* from our country. Another possibility is that the race of *Fol* gives us the pattern with the pair of primers uni is not yet described

de aislados mexicanos, o bien, utilizar nuevos sets de primers como los reportados más recientemente por Lievens *et al.* (2009) diseñados para amplificar los genes para las proteínas secretadas en xilema (*Six*).

En este trabajo se analizaron aislados de *Fol* a partir de diferente ubicación geográfica e incluyeron únicamente un aislado mexicano de *Fol* raza 1, por lo que si se emplean éstos primers también deberán ser validados con aislados de las diferentes razas de *Fol* provenientes de nuestro país. Otra posibilidad es que la raza de *Fol* que nos da el patrón con el par de primers uni aún no esté descrita en otros países. Para confirmar esta posibilidad, se requerirá realizar en el futuro, estudios filogenéticos empleando la secuenciación de diferentes regiones del genoma de *Fol* para la identificación inequívoca de los aislados de *Fol* provenientes de México.

Conclusiones

La marchitez vascular del tomate en los predios tomateros y variedades muestreadas en la región de Villa de Arista, San Luis Potosí, es causada por *Fol* razas 2 y 3. Por lo tanto es necesario utilizar cultivares adaptados a la región con resistencia a las razas 2 y 3. Tanto las pruebas de patogenicidad mediante variedades diferenciales como la técnica de biología molecular de PCR anidado diferencial coincidieron en determinar sólo dos razas en las mismas variedades y en los mismos predios tomateros.

Literatura citada

- Agrios, G. N. 2004. Plant Pathology. Fourth Ed. Academic Press. New York, USA. 635 p.
- Alexander, L. J. and Hoover, M. M. 1955. Disease resistance in wild species of tomato. Ohio Agricultural Experiment Station. Vol. 51.
- Alexander, L. and Tucker, C. 1945. Physiological specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. J. Agric. Res. 70:303-313.
- Andrion, D. and Vallavieille-Pope, C. D. 1993. Racial diversity and complexity in regional populations of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in France over a 5-year period. Plant Pathol. 42(3):443-464.
- Apodaca-Sánchez, M. Á.; Zavaleta, M. E.; Osada, K. S. y García, E. R. 2004. Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici* WR Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. Rev. Mex. Fitopatol. 22(1):7-13.
- Ascencio-Ascencio, A.; López, B. A.; Borrego, E. F.; Rodríguez, H. S. A.; Flores, O. A.; Jiménez, D. F. y Gómez, V. A. J. 2008a. 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*. Rev. Mex. Fitopatol. 26(2):180-183.
- Bohn, G. W. and Tucker, C. M. 1940. Studies on *Fusarium* wilt of the Tomato. I immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. and its inheritance in hybrids. Research Bulletin. Missouri Agricultural Experiment Station. 311 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 p.
- Booth, C. 1977. *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 58 p.
- Bost, S. C. 2001. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Tennessee. Plant Dis. 85(7):802-802.
- Cai, G.; Gale, L. R.; Schneider, R. W.; Kistler, H. C.; Davis, R. M.; Elias, K. S. and Miyao, E. M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology. 93(8):1014-1022.
- Carrillo, F. J. A.; Montoya, R. T. J.; García, E. R. S.; Cruz, O. J. E. y Sañudo, B. A. J. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Rev. Mex. Fitopatol. 21(2):123-127.
- Chemelli, D. O.; Dankers, H. A. and Crosier, B. 1992. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Northwest Florida and Southwest Georgia. Plant Dis. 76(8):861.
- Davis, R. K.; Kimble, K. A. and Farrar, J. J. 1988. A third race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identified in California. Plant Dis. 72(5):453.

in other countries. In order to confirm this possibility, it is required to perform in future phylogenetic studies using the sequencing of different regions of the genome *Fol* for unambiguous identification of isolates from Mexico *Fol*.

Conclusions

The vascular wilt in tomato-farmlands and the sampled varieties in the region of Villa Arista, San Luis Potosí, is caused by *Fol* races 2 and 3. Therefore is necessary to use cultivars adapted to the region with resistance to races 2 and 3. Both pathogenicity tests using differential varieties like art molecular biology nested PCR differential agreed determine s or the two races in the same varieties and tomato plants in the same plots.

End of the English version



- Di Pietro, A. and Roncero, M. I. G. 1998. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pgl* encoding the major extracellular *endopolygalacturonase* of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant-microbe interactions*. 11(2):91-98.
- Domínguez, A. G. 2012. Aislamiento, identificación y distribución de *Fusarium* spp. en jitomate cultivado en suelo bajo invernadero. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI). Yautepec, Morelos, México. 107 p.
- Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y Alimentación (FAO). 2011. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Fernández-Valiela, M. M. 2001. Introducción a la Fitopatología. INTA. Buenos Aires, Argentina. 518 p.
- Grattidge, R. and O'Brien, R. G. 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Dis.* 66(2):165-166.
- Hernández, M. R. 2012. Selección de genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con base en parámetros genéticos para rendimiento y resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) (Sacc.) Snyder y Hansen. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Saltillo, Coahuila, México. 88 p.
- Hirano, Y. and Arie, T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72(5):273-283.
- Holguín, P. R. J. 2005. *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in Baja California Sur, México. *Plant Dis.* 89(12):1360.
- Lievens, B.; Houterman, P. M. and Rep, M. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS microbiology letters*. 300(2):201-215.
- Marlatt, M. L. J.; Correll, J. C.; Kaufman, P. and Cooper, P. E. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Dis.* 80(12):1336-1342.
- McGrath, D. J.; Gillespie, D. and Vawdrey, L. 1987. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*. *Crop Pasture Sci.* 38(4):729-733.
- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 p.
- Ortega, G. J. G. 2010. Diagnóstico de hongos fitopatógenos de jitomate y efecto de *Trichoderma asperelum* Tc74 sobre *Fusarium* spp. Tesis de Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI). Yautepec, Morelos, México. 82 p.
- Posada, M. L.; Patino, B.; Heras, A.; Mirete, S.; Vázquez, C. and González, J. M. T. 2000. Comparative analysis of an *endopolygalacturonase* coding gene in isolates of seven *Fusarium* species. *Mycol. Res.* 104(11):1342-1347.
- Reis, A.; Giordano, L. B.; López, C. A. and Boiteux, L. S. 2004. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 4:495-502.
- Sánchez-Peña, P.; Cauich-Pech, S. O.; Núñez-Farfán, J.; Núñez-Cebreros, R. D.; Hernández-Verdugo, S. Parra-Terraza, S. and Villarreal-Romero, M. 2010. Incidence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato in Sinaloa México. *Plant Dis.* 94(11):1376.
- Scott, J. W.; Agrama, H. A. and Jones, J. P. 2004. RFLP-based analysis of resistance genes to *Fusarium* wilt races 1, 2 and 3 in tomato. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129(3):394-400.
- Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2011. Estadísticas agrícolas por entidades de México. URL: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>.
- Stall, R. E. 1961. Development of *Fusarium* wilt on resistant varieties of tomato caused by a strain different from race 1 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Dis. Rep.* 45:12-15.
- Summerell, B. A.; Salleh, B. and Leslie, J. F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 87(2):117-128.
- Valenzuela-Ureta, J. G.; Lawn, D. A.; Heisey, R. F. and Zamudionaloa, V. 1996. First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in Mexico. *Plant Dis.* 80(1):105.
- Williams, P. H. 1981. *Fusarium* Yellows. Screening crucifers for multiple disease resistance. Williams, P. H. Ed. University of Wisconsin, Madison. 124-129.
- Zunilde, C. L. y Sanabria, N. H. 2001. Características culturales y patogénicas en aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* procedentes de plantaciones comerciales de tomate. *Agronomía Tropical.* 51(4):519-530.