

Primer reporte de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 aislada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) proveniente de la Costa central del Perú

First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 isolated of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) comes from the Central Coast of Peru

Medali Huarhua¹, Liliana Aragón¹, Juan Flores¹, Rin Tsuzuki², Tsutomu Arie²

¹ Departamento de Fitopatología, Clínica de Diagnóstico de Fitopatología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

² Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT), Fuchu, Tokyo 183-8509, Japón.

RESUMEN

Antecedentes: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) causa la marchitez vascular en tomate. Las especies de *Fusarium* pueden llegar a ser identificadas por características morfológicas. Sin embargo, para poder detectar las formas especiales, razas o formas patógenas se emplean herramientas moleculares o cultivares diferenciales. Actualmente, en el Perú no existe reporte de la identificación de razas de Fol.

Objetivos: Identificar mediante técnicas moleculares y empleo de cultivares diferenciales, razas de *Fusarium oxysporum* asociados a la marchitez de tomate provenientes de la costa del Perú.

Métodos: Identificación morfológica de ocho aislamientos de *Fusarium* de tomate, seguido de los análisis filogenéticos basados en las regiones espaciadoras intergénicas del ADN ribosomal (IGS). Además, se realizó la detección de los genes (SIX4, SIX3 y SIX1) y fragmentos de los genes endo (pg1) y exo (pgx4) poligalacturonasa. La prueba de patogenicidad fue realizada en cultivares diferenciales de tomates (Ponderosa, Momotaro, Momotaro 8 y Block).

Resultados y conclusiones: De acuerdo a los análisis moleculares y prueba de patogenicidad, se identificó al aislamiento HEI 11 como Fol raza 1.

Palabras clave: Cultivares, IGS, genes SIX, poligalacturonasa, xilema

ABSTRACT

Background: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) causes wilt symptoms on tomato. *Fusarium* species can be identified by morphological characteristics. However, in order to detect special form, races or pathogenic forms, molecular methods and differential cultivars are used. Currently, in Peru there is no report of the identification of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Objectives: Identify by molecular techniques and the use of differential cultivars, *Fusarium oxysporum* races associated with tomato wilt from the coast of Peru.

Methods: Morphological Identification of eight *Fusarium* isolates from tomato were done followed by phylogenetic analysis based on the intergenic spaces (IGS) of DNA r. In addition, avirulence genes (SIX4, SIX3 and SIX1) and fragments of the endo (pg1) and exo (pgx4) polygalacturonase genes of the pathogen were detected. Pathogenicity tests were carried out on tomato differential cultivars (Ponderosa, Momotaro, Momotaro 8 and Block).

Results and conclusions: According to the molecular techniques and pathogenicity test, the HEI 11 isolate was identified as Fol race 1.

Keywords: Cultivars, IGS, genes SIX, polygalacturonase, xylem

ARTICLE HISTORY

Received 24 November 2019 / Accepted 14 July 2020

Published on line: 12 October 2020

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Medali Huarhua, medalihuarhua@lamolina.edu.pe

ORCID: 0000-0002-1482-8170

INTRODUCCIÓN

El tomate es una de las hortalizas ampliamente producidas y consumidas a nivel mundial como producto fresco y para industrialización (Kimura y Sinha, 2008). El rendimiento promedio del Perú fue de 41.5 t ha⁻¹ en el año 2017, siendo las principales provincias productoras: Ica, Lima y Arequipa (SIEA, 2017; INEI, 2018). Sin embargo, la rentabilidad se ha visto mermada por diferentes factores y entre ellos problemas patológicos. Tal es el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hans, agente causal de la marchitez vascular en el cultivo de tomate (Blancard, 2011). Este patógeno es responsable de numerosas pérdidas económicas y actualmente se encuentra distribuido por todos los continentes (González et al., 2012). Se conoce que hasta el momento *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) ha sido agrupado en tres razas fisiológicas (Raza 1, 2 y 3) de acuerdo con Hirano y Arie (2006) y Arie (2010). Fol ingresa por el sistema radicular y se desplaza a través del tejido vascular para habitar y obstruir los vasos del xilema, lo que conlleva al estrés hídrico severo en la planta, cuya sintomatología se manifiesta en el amarillamiento de las hojas, iniciando por la parte del tercio inferior de un solo lado en los folíolos, acompañado de una decoloración vascular, marchitez y finalmente la muerte de la planta (Srinivas et al., 2019). Durante la infección Fol secreta algunas enzimas que degradan la pared celular de la planta, tal es el caso de las poligalacturonas (PG) a partir de las cuales se han diseñado oligonucleótidos basadas sobre las diferencias nucleotídicas de los genes de la exopoligalacturonas (pgx4) y endopoligalacturonas (pg1) que poseen los tipos patogénicos (Hirano y Arie, 2006; Balogun et al., 2008; Çolak y Biciçi, 2013). Así mismo, otros oligonucleótidos fueron diseñados a partir de proteínas únicas secretadas a nivel del xilema, llamadas proteínas SIX (Secreted In Xylem, por sus siglas en inglés), tres de las cuales, AVR1 (SIX4), AVR2 (SIX3) y AVR3 (SIX1) promueven la virulencia y colonización en el cultivo de tomate (Lievens et al., 2009). Por la supresión de mecanismos de resistencia basales, el conjunto de estas proteínas determina la virulencia del patógeno hacia un hospedante en particular (Hirano y Arie, 2006; González et al., 2012; Inami et al., 2012). Las tres razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* solo pueden ser detectados mediante métodos basados en la PCR y/o acorde a su capacidad de infectar a un

conjunto de cultivares diferenciales de tomate y la respuesta de susceptibilidad y resistencia frente al aislamiento de Fol (Hirano y Arie, 2006; Arie, 2010; Kashiwa et al., 2016). En el Perú la identificación de las especies de *Fusarium* se basa en características morfológicas y se asumen formas especiales de acuerdo al síntoma y al huésped de donde se aisló. A nivel mundial existen técnicas moleculares para el diagnóstico de Fol, pero aún no han sido implementadas en el país y por ende no existe una identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y sus razas. Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo es identificar mediante técnicas moleculares y empleo de cultivares diferenciales razas de *Fusarium oxysporum* asociados a la marchitez de tomate provenientes de la costa del Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de las muestras

Los aislamientos de *Fusarium* fueron proporcionados por la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología para su identificación molecular. Los aislamientos fueron enviados de las principales zonas productoras: Ica (6), Lima (1) y Arequipa (1) en los años 2012 al 2016. Las muestras fueron colectadas de plantas con síntomas de marchitez y para el envío se tomaron plantas completas acompañadas de sustrato colocadas en bolsas oscuras y enviadas en cajas de Tecnopor; para luego ser procesadas en el laboratorio de la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología. Los controles positivos, se emplearon las tres razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* MAFF 305121 (Raza 1), JCM 12575 (raza 2) y Ch12-1A (raza 3), provistos por la Universidad de Agricultura y Tecnología de Tokio (Tabla 1).

Material biológico

Los aislamientos fueron obtenidos a partir de plantas con síntomas de marchitez y decoloración vascular del cultivo, los tejidos se lavaron con agua potable para eliminar la materia orgánica presente, seguido con agua destilada estéril, dentro de la cámara de siembra se realizaron cortes de pequeñas porciones de tallo y raíz que se colocaron en hipoclorito de sodio al 0.5 % por 3 minutos, se secó sobre un papel toalla por 20 minutos, transcurrido el tiempo se procedió a sembrar cuatro puntos en medio KOMADA fueron incubadas a 25 °C por 5 días (Carrillo-Fasio et al., 2003; Komada, 1975). De cada aislamiento se realizó un cultivo mo-

TABLA 1. Aislamientos de *Fusarium oxysporum* obtenidos del cultivo de tomate que fueron empleados para el estudio

NOMBRE DEL AISLAMIENTO		LOCALIZACIÓN	FECHA DE PROCEDENCIA
HEI 1		Ica	11-2013
HEI 2		Cachiche-Ica	12-2013
HEI 3		Majes-Arequipa	06-2013
HEI 5		Subtanjalla-Ica	12-2014
HEI 6		Mala-Lima	03-2016
HEI 9		Ica	12-2014
HEI 10		Ica	03-2012
HEI 11		Ica	04-2016
MAFF 305121	Raza 1	TUAT	Kawabe et al. (2005)
JCM 12575	Raza 2	TUAT	Inami et al. (2012)
Ch12-1A	Raza 3	TUAT	Inami et al. (2012)

nospórico, para lo cual una porción de 0.5 cm² de PDA con tejido de micelio de 7 días se colocó en un tubo de vidrio que contenía 10 mL de agua destilada estéril, se mezcló en vortex y contabilizó por campo visual de 10 X, un número de 10 a 20 conidios, se tomó 50 µL y se extendió sobre un medio agar agua, luego de 18 horas se evaluó y seleccionó las conidios germinadas y se sembró en medios PDA (Duarte et al., 2016).

Identificación morfológica

Para la caracterización morfológica de *F. oxysporum* se tomaron en cuenta características del desarrollo en medio PDA basados en las claves descritas por Booth (1970), Piontelli y Toro (1992) y Leslie y Summerell (2006). La producción de clamidosporas se realizó a partir de macroconidios producidos en el medio PDA, estos fueron cosechados y concentrados por centrifugación, luego suspendidos en agua destilada estéril por 20 a 30 días a 25 °C (Dhingra y Sinclair, 1995). Las medidas de estas estructuras fueron comparadas con descriptores empleados por Booth (1970) y Hoog (2000).

Extracción de ADN

El método empleado para la extracción de ADN fue el desarrollado por la Universidad de TUAT, método de mini preparación propuesto por Saitoh et al. (2006) y Liu et al. (2000). De cada aislamiento, se obtuvo una porción de 5-10 mm de agar con micelio en crecimiento activo, los cuales fueron depositados en tubos de 1.5 mL con 500 µL de Buffer de Lisis (100 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 1M KCl; pH 8.0). Se trituró el micelio y

se incubó por 10 minutos, luego se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm. Se recuperó la fase acuosa superior, a la cual se añadieron 2 µL de ARNasa y se incubó a 37 °C por 30 minutos, se añadió un volumen similar al colectado de Isopropanol y se colocó a -20 °C por 15 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura de ambiente y se descartó el sobrenadante; luego se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó durante 5 minutos. Posteriormente se eliminó el etanol y se secó al vacío. Finalmente, el ADN se resuspendió en 30 µL de agua ultra pura y fue almacenado a -30 °C.

Reacción de PCR

Se preparó un volumen de reacción de 25 µL, que contenía 1 µL de ADN genómico (50 ng-100ng), 4 µL de Buffer de reacción para la PCR (10 X) (ACTaqTM); 2 µL de cada dNTPs (2.5 mM); 0.5 µL de cada oligonucleótido (20 µM) y 0.125 µL de Taq ADN polimerasa (ACTaqTM) (5 U. µL⁻¹) y se completó con agua ultra pura. Para la amplificación de la región IGS se emplearon los oligonucleótidos FIGS11/ FIGS y para los genes SIX se emplearon los oligonucleótidos: SIX4F1/R1, SIX3- F1/R2 Y P12-F1/R1, 12. Las condiciones de la PCR fueron iguales: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; seguido de 35 ciclos de 30s a 94 °C, 30 s de anillamiento a 61 °C y 30 s de elongación a 72 °C; y un ciclo final de 72 °C por 7 min (Rep et al., 2004; Inami et al., 2012, 2014). Para la amplificación de los genes endo (*pg1*) y exo (*pgx4*) poligalacturonasa se utilizaron los oligonucleótidos: uni, spr13 y spr23 y se llevó a cabo con

una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 minutos; 45 ciclos de segunda desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 61 °C por 1 minuto, elongación a 72 °C por 2 minutos; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos (Çolak y Bicici, 2013). La reacción de la PCR fue visualizada bajo electroforesis en un gel de agarosa al 2 %.

La purificación del producto de PCR se realizó mediante el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean y se sometió a una reacción de calidad de ADN. La secuenciación del ADN se realizó usando el protocolo de temperatura de alargamiento escalonado (STeP) descrito por Platt *et al.* (2007); Finalmente, la reacción de secuenciación STeP realizó en un volumen de 10 µL con 100 ng de ADN de amplicon y 0.5µL BigDye Terminator v3.1.

Secuenciación

Para obtener la secuencia completa se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los cebadores "Forward" y "Reverse", usando el programa GENETIX-MAC and ENZYME X. La identificación se determinó en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias de la región IGS fueron alineadas para generar árboles filogenéticos (Inami *et al.*, 2012). El árbol filogenético fue generado por el método de máxima Parsimonia con el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

Preparación del inóculo

El método empleado fue descrito por Balogun *et al.* (2008). Se preparó un caldo de papa dextrosa, en volúmenes de 40 mL en matraces Erlenmeyer (100 mL) para ser sometido a 121 °C por 30 min en autoclave. Luego se procedió a colocar en el caldo una pequeña porción ($\leq 0.5 \text{ cm}^2$) de PDA con micelio del hongo de cuatro días de edad de cada uno de los aislamientos. Este caldo con el inóculo fue incubado a temperatura ambiente por cinco días en un agitador orbital a 120 rpm, para producción de brotes celulares (conidios unicelulares), terminando el período de incubación, se filtró la solución, se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se quedó con el precipitado, donde se encontraron los conidios. La suspensión de conidios que se obtuvo de la preparación, se ajustó a la concentración a 1×10^7 conidios mL^{-1} .

Evaluación de la patogenicidad en invernadero

Se sembraron semillas de tomate de cada cultivar diferencial (Ponderosa, Momotaro, Momotaro 8, Block) en contenedores de plástico en un sustrato estéril; se emplearon tres contenedores y cada uno contenían dos semillas del cultivar diferencial, haciendo un total de seis plantas de cada cultivar por aislamiento, después de 21 días se procedió a realizar heridas en las raíces introduciendo una espátula de plástico a nivel radicular, seguido se inoculó en la base de cada planta con 1 mL de la suspensión conidial en una concentración de 1×10^7 conidios mL^{-1} . A la cuarta semana después de la inoculación se evaluaron los síntomas externos de cada planta, empleando la escala descrita por Inami *et al.* (2012); así mismo, se evaluó el pardeamiento del cilindro vascular con la escala descrita por Kashiwa *et al.* (2016) que es empleada en el laboratorio de TUAT. Una vez concluido el experimento se procedió al reaislamiento del patógeno de las plantas inoculadas, para lo cual se empleó el medio KOMADA y medio PDA. Los postulados de Koch se verificaron mediante el reaislamiento del hongo a partir de raíces y tallo con síntomas, para lo cual se emplearon los medios ya descritos para el aislamiento y la corroboración de la identificación del organismo se realizó mediante características morfológicas y moleculares (análisis basados en los genes de la poligalacturonasa) bajo la metodología previamente descrita.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

Los ocho aislados en estudio, se identificaron como *F. oxysporum*, de acuerdo a las características morfológicas y mediciones microscópicas en el medio PDA y se identificaron como HEI 1, HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9 y HEI 10. En cuanto a las características morfológicas, el menor y mayor crecimiento de la colonia después de siete días de evaluación fue para los aislamientos HEI 3 y HEI 10 con 5 cm y a 7 cm respectivamente. Para dos aislamientos, HEI 1 y HEI 11, produjeron colonias con micelio de coloración violácea evaluadas sobre y bajo la superficie de la placa; para los aislados: HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, la pigmentación fue de una tonalidad blanca sobre la superficie y en el reverso de la placa la coloración fue de violácea clara a oscura. El desarrollo micelial de las colonias se caracterizó por tener un crecimiento radial y concéntrico, con micelio

afelpado y algodonoso. En cuanto a las características de medición de las estructuras, los ocho aislamientos presentaron microconidios de forma oval a elíptica, cuyas mediciones oscilaron entre: $6.72 (\pm 0.82) - 11.46 (\pm 1.6) \times 2.64 (\pm 0.51) - 3.48 (\pm 0.96) \mu\text{m}$., usualmente de 0-1 septo. Los macroconidios de $25.2 (\pm 1.72) - 29.28 (\pm 1.91) \times 3.58 (\pm 0.8) - 4.44 (\pm 0.63) \mu\text{m}$., con 3-5 septos; ligeramente curvadas con la presencia de una célula pie, las clamidosporas fueron simples y dobles con diámetros de $6.86 (\pm 0.78) - 12.64 (\pm 1.49) \mu\text{m}$ (Tabla 2). Estas mediciones coincidieron con los descriptores propuestos por Booth (1970), Hoog (2000), Leslie y Summerell (2006) e investigaciones realizadas por Ciampi *et al.* (2009) y Hafizi *et al.* (2013) para la especie de *F. oxysporum*.

PCR y análisis filogenético de la región IGS

En todos los aislamientos se logró amplificar la región IGS con el uso de los oligonucleótidos FIGS11 y FIGS12, los productos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % observándose una única banda de alrededor de 600 bp. Investigaciones previas realizadas por Kawabe *et al.* (2005), Balogun *et al.* (2008) e Inami *et al.* (2014); han demostrado el uso de dichos oligonucleótidos para la región IGS en *F. oxysporum*, debido a que las especies estrechamente rela-

cionadas pueden mostrar considerable diversidad en la región IGS, manifestándose en variaciones frecuentes en cuanto a longitud y secuencia; lo que permite la diferenciación entre especies cercanas genéticamente (Appel y Gordon, 1995; Gómez, 2008). Al realizar la construcción filogenética, a partir de los alineamientos obtenidos de la región IGS del ADNr de las muestras y de las secuencias obtenidas de formas especiales de *F. oxysporum* que fueron tomados de la base de datos NCBI, con una prueba de Bootstrap (1000 réplicas) para evaluar el soporte de agrupaciones, se obtuvo que las ocho muestras de estudio fueron agrupadas dentro de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenidos del NCBI y separadas de *Gibberella fujikuroi* (FGSC 7610) (Figura 1). No obstante Silva *et al.* (2014) y Alanis-Martínez *et al.* (2015) mencionaron que las formas especiales de *F. oxysporum* pueden tener una información genética muy distinta atribuida a su origen polifilético, para el caso de Fol, se presentan tres clados (A1, A2 y A3), lo que sugiere una relación polifilética de nuestros aislamientos con al menos 3 orígenes. Kawabe *et al.* (2005), manifiesta que no se ha encontrado una relación entre las razas y grupos polifiléticos reportados. Por lo que, el agrupamiento de los aislamientos a nivel de clado no indicarían la patogenicidad del aislamiento, solo refiere el grado de cercanía en relación con los

TABLA 2. Mediciones de las estructuras de los ocho aislamientos de *Fusarium oxysporum* aisladas del cultivo de tomate

AISLAMIENTO	MICROCONIDIAS		MACROCONIDIAS		CLAMIDOSPORA	
	TAMAÑO ^A	SEPTAS	TAMAÑO ^A	SEPTAS	DIÁMETRO ^B	DESCRIPCIÓN
HEI 1	$11.34 (\pm 1.46) \times 3.48 (\pm 0.96)$	0 a 1	$26.46 (\pm 1.85) \times 3.84 (\pm 0.84)$	3 a 4	$10.99 (\pm 1.06)$	Simple/Pares
HEI 2	$6.72 (\pm 0.82) \times 2.64 (\pm 0.51)$	0 a 1	$27.36 (\pm 1.86) \times 4.44 (\pm 0.63)$	3 a 5	$8.905 (\pm 0.98)$	Simple/pares
HEI 3	$10.02 (\pm 1.88) \times 3.06 (\pm 0.62)$	0	$33.18 (\pm 3.1) \times 4.26 (\pm 0.65)$	3 a 5	$7.64 (\pm 1.13)$	Simple/Pares
HEI 5	$8.94 (\pm 1.08) \times 3.36 (\pm 0.78)$	0 a 1	$25.2 (\pm 1.72) \times 4.38 (\pm 0.62)$	3 a 4	$8.35 (\pm 0.99)$	Simple/Pares
HEI 6	$7.14 (\pm 0.97) \times 2.64 (\pm 0.48)$	0 a 1	$29.28 (\pm 1.91) \times 4.38 (\pm 0.58)$	3 a 4	$9.36 (\pm 1.07)$	Simple
HEI 9	$11.46 (\pm 1.6) \times 3.06 (\pm 0.6)$	0 a 1	$26.28 (\pm 1.78) \times 4.20 (\pm 0.73)$	3 a 4	$8.43 (\pm 0.91)$	Simple/Pares
HEI 10	$10.9 (\pm 1.4) \times 2.8 (\pm 0.57)$	0 a 1	$25.66 (\pm 1.67) \times 3.58 (\pm 0.8)$	3 a 5	$6.86 (\pm 0.78)$	Simple
HEI 11	$8.94 (\pm 1.22) \times 3.48 (\pm 0.36)$	0	$27 (\pm 1.97) \times 4.44 (\pm 0.55)$	3 a 4	$12.64 (\pm 1.49)$	Simple

A = Promedio de longitud y ancho de 100 Microconidias /Macroconidias $\pm$ desviación estándar.

B = Promedio de diámetro de 100 clamidosporas $\pm$ desviación estándar.

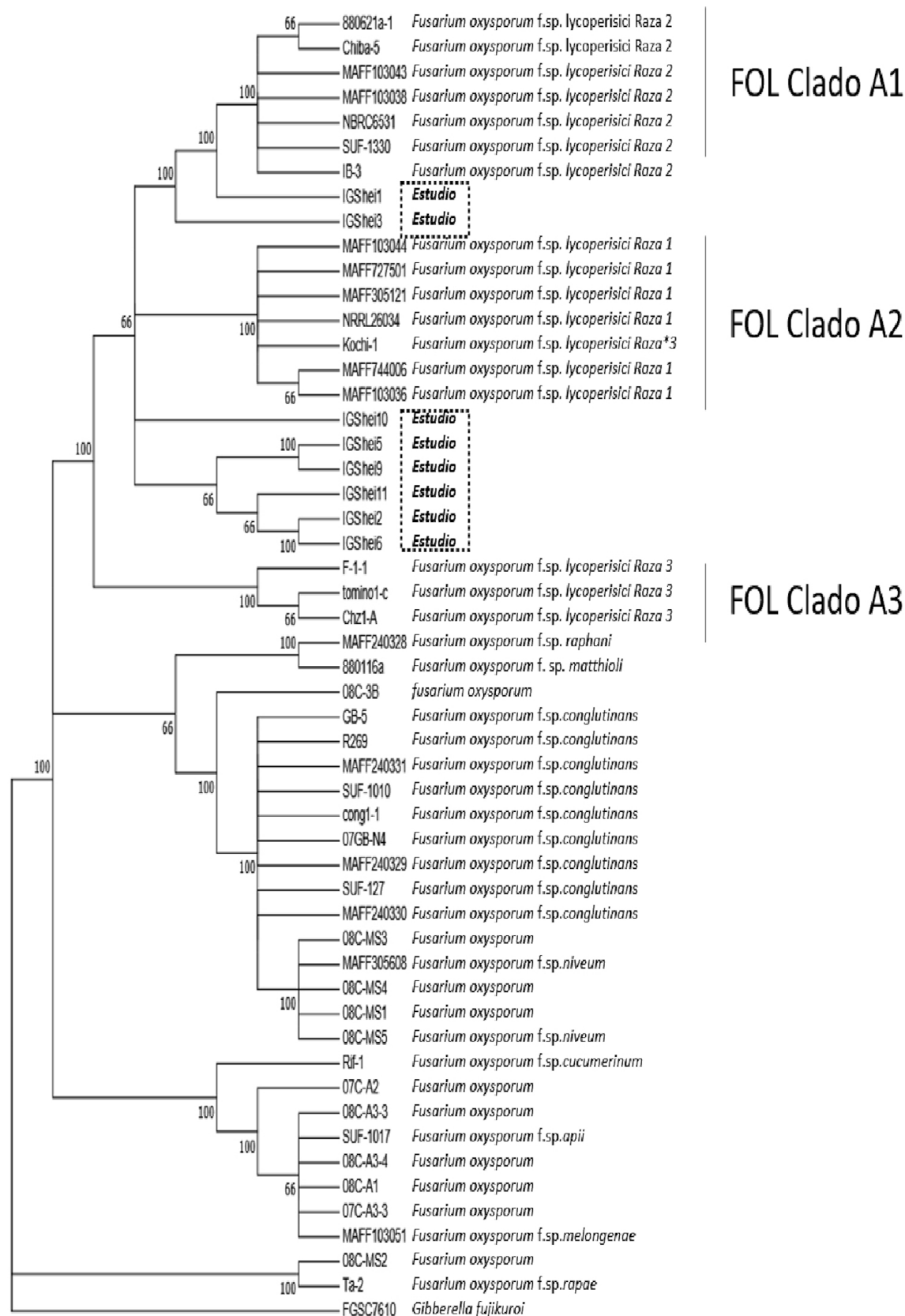


FIGURA 1. Análisis filogenético utilizando Mega 7. Método de Máxima parsimonia con 1000 replications para el Bootstrap. Se compararon las secuencias espaciadoras internas (IGS) de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* obtenidos en el estudio con las diferentes secuencias de *Fusarium oxysporum* obtenidas del NCBI y un aislamiento como grupo externo, *Gibberella fujikuroi*.

Fol y/o Fo de tomates no patogénicos (Appel y Gordon, 1995; Kawabe *et al.*, 2005). De acuerdo con el trabajo de Arie (2010), *Fusarium oxysporum* no patógeno dio origen a las formas patogénicas (Fol) durante la asociación saprofítica con el tomate, después del inicio de la domesticación asociado con la actividad de los elementos móviles presentes en el genoma de *F. oxysporum* que contribuyeron a la emergencia de Fol y a su diversidad patogénica; en ese sentido, sin bien nuestros aislamientos se encuentran cercanamente relacionados con los *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, no se podría atribuir a una forma especial a nivel de esta región; ya que podrían estar cercanamente asociados a Fo no patogénicos; por lo que, solo con la información reportada de la región IGS no brinda precisión al detectar formas especiales, ya que los determinantes de la especificidad del hospedero pueden transferirse horizontalmente entre cepas de *F. oxysporum* de diferentes linajes, este intercambio genético hace que sea difícil desarrollar oligonucleótidos para la detección específica de una forma especial dada. Por ello, los marcadores moleculares basados en los determinantes genéticos de la patogenicidad, son promisorios para distinguir la forma especial (Van Der Does *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014).

PCR para detección de genes de avirulencia (gen SIX) en *Fusarium oxysporum*

De acuerdo a los resultados el aislamiento HEI 11 es el único en el que se evidenció la presencia de los tres genes de avirulencia (SIX4, SIX3 y SIX1) con un tamaño de banda igual a los controles positivos SIX4 (800bp), SIX3 (570 bp) y SIX1(400bp) y se confirmó su alto grado de identidad con sus respectivos genes SIX reportados para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con un porcentaje de identidad de 100 % para SIX4, 99 % para SIX3 y 98 % para SIX1, respectivamente. Por otro lado, para los aislamientos HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, se observaron productos de amplificación solo con el juego de los oligonucleótidos SIX3-F1/SIX3-R2 para el gen SIX3 (AVR2); sin embargo, los tamaños amplificados fueron diferentes a los controles positivos (Figura 2). Las proteínas efectoras en hongos son secretadas dentro del espacio extracelular, las cuales pueden actuar a este nivel o pueden ser absorbidos por las células de la planta e interactuar con objetivos intracelulares (Houterman *et al.*, 2007). El grupo de proteína efectoras, determina la virulen-

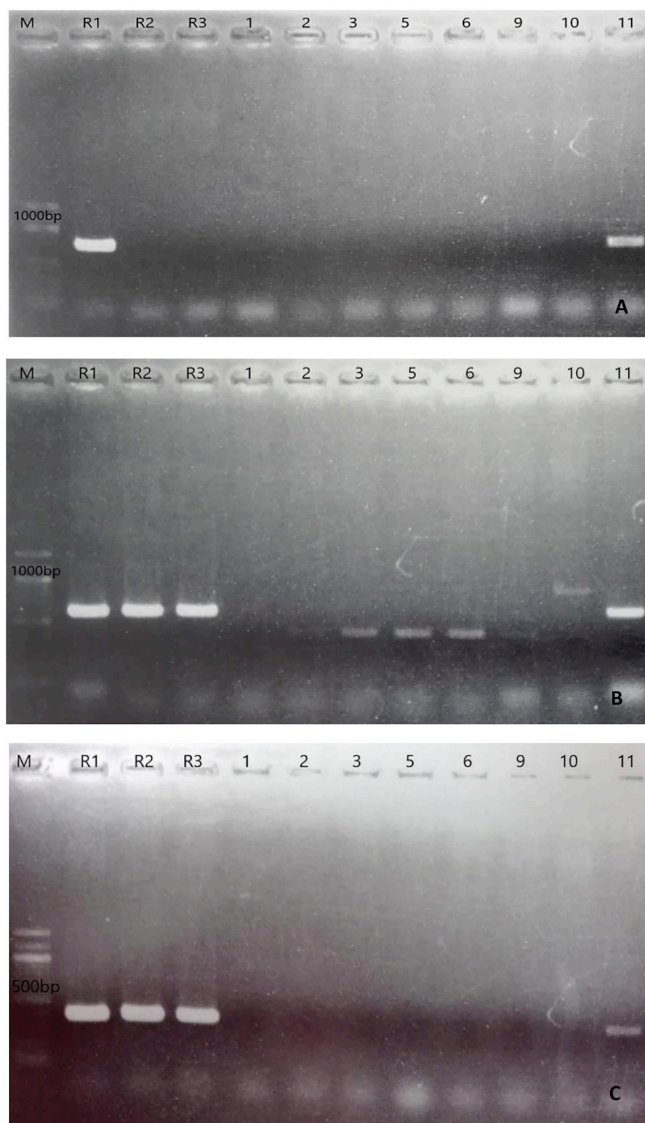


FIGURA 2. Productos de PCR de los tres genes SIX (SIX4, SIX3, SIX1) del aislado HEI 11 (11) en gel de agarosa con bandas de tamaño esperado a los controles positivos: R1, Fol raza 1; R2, Fol raza 2; R3, Fol raza 3. A: banda correspondiente a SIX4 usando los oligonucleótidos SIX4 F1/SIX4 R1. B: banda correspondiente a SIX3 usando los oligonucleótidos SIX3 F1/SIX3 R2. C: banda correspondiente a SIX1 usando los oligonucleótidos P12 F1/P 12 R1. Las muestras 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10 y 11 corresponden a los aislados HEI 1, HEI 2, HEI3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, HEI 11, respectivamente.

cia de un patógeno hacia un hospedante en particular (González *et al.*, 2012). Para el caso de las proteínas relacionadas a la patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Rep *et al.* (2003) mencionaron que éstas se encuentran acumuladas en la savia del xilema tras la infección y promueven la virulencia de este patógeno hacia el tomate. Entre ellos se reportaron 3 genes de avirulencia AVR1 (=SIX4), AVR2 (=SIX3) y AVR3 (=SIX1). Por lo que, las razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

pueden ser determinada por la combinación de estos genes (Inami et al., 2012). Por lo tanto, la amplificación de los genes de avirulencia en el aislamiento HEI 11, indicarían la presencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Ya que, numerosas investigaciones, reportan estos genes SIX1, SIX3, SIX4 como parte exclusiva de aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y no en otras formas especiales o aislamientos no patogénicos (Lievens et al., 2009). Los resultados manifiestan que el aislamiento HEI 11 pertenece a la raza 1; ya que, fue el único aislamiento que amplificó el gen de avirulencia AVR1, que solo es detectada en la raza 1, pero no en la raza 2 y 3 (Houterman et al., 2009; Inami et al., 2014). Además, amplificaron para los genes de avirulencia AVR2 y AVR3. Inami et al. (2012), describen que basados en los genes AVR, la presencia de los tres genes de avirulencia: AVR1 (SIX4), AVR2 (SIX 3) y AVR3 (SIX1) corresponderían a la Raza 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

PCR para detección de genes de la poligalacturonasa

Con oligonucleótidos específicos diseñados a partir de genes de la poligalacturonasa para discriminación de razas de Fol empleados para la corroboración de la forma especial del aislamiento HEI 11. Los resultados mostraron la amplificación para el juego de oligonucleótido "uni", con tamaño de banda de 672 bp. Así también, amplificó para el set de oligonucleótidos "sp13" con un tamaño de banda de 445 bp y no se evidenció ningún producto amplificado para el set de oligonucleótidos "sp23" (Figura 3). Los tamaños de amplicones mencionados se ajustan a los reportados

por Hirano y Arie (2006) para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1. Las poligalacturonasas son las primeras enzimas involucradas en la degradación de la pared celular durante la patogénesis y juegan un papel importante en el desarrollo de la infección al menos en dos fases: penetración de la corteza de la raíz, con el fin de alcanzar el sistema vascular; y colonización y difusión del hongo hacia la parte superior a través de los vasos del xilema (Bravo, 2013; Srinivas et al., 2019). Por lo que, el diseño de los oligonucleótidos específicos (uni, sp13, sp23, sprl) diseñados por Hirano y Arie (2006) a partir de secuencias nucleotídicas parciales de genes como la endopoligalacturonas (pg 1) y exopoligalacturonas (pgx 4) de aislamientos de Fol y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, permitieron la confirmación del aislamiento HEI 11 como Fol raza 1. El juego de oligonucleótidos "uni" amplificó un producto con un mismo tamaño de banda con respecto a los controles positivos R1, R2, y R3, confirmando la presencia de *F. oxysporum*. Además, amplificó para el set de oligonucleótidos sp13 (445 bp) el cual indica que el aislamiento HEI 11, podría pertenecer a la raza 1 o raza 3; sin embargo, al no amplificar con el juego del oligonucleótido sp23 (518 bp), el cual solo amplifica para raza 2 o raza 3, se descartó que HEI 11 pertenezca a la raza 3, con lo que se valida que, a nivel molecular el aislamiento HEI 11 pertenece a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1. Pruebas similares fueron realizadas por Kawabe et al. (2005) y Baysal et al. (2009).

Prueba de patogenicidad

De los ocho aislamientos evaluados, solo HEI 11 causó los síntomas característicos de Fol (Figura 4), los cuales se observaron a partir de la tercera semana (síntomas secundarios) después de la inoculación, solo en el cultivar susceptible a las tres razas (ponderosa) y no en los otros cultivares con resistencia a una de las razas (Momotaro, Momotaro 8 y Block), los síntomas coincidieron con los descritos por Walker (1971) para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* dentro de un invernadero, los cuales comenzaron con una ligera decoloración a nivel de las nervaduras de las hojas, seguido de un decaimiento del peciolo (epinastia) y amarillamiento que inició en las hojas basales y avanzó a las hojas jóvenes; finalmente se observó marchitez y muerte de la planta; al realizar el corte del tallo se evidenció pardeamiento de las células vasculares.

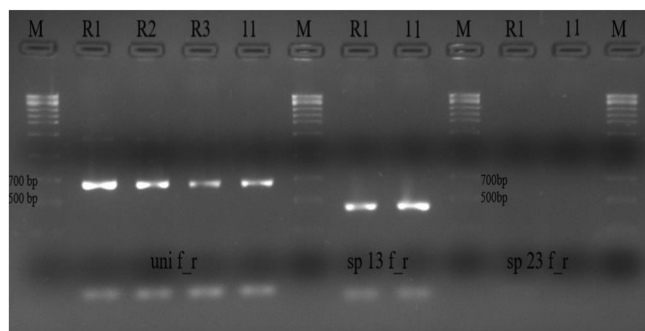


FIGURA 3. Productos de PCR de electroforesis en gel de agarosa usando los juegos de oligonucleótidos uni f/r, sp13, sp23 específicos para detectar Fol. M: marcador molecular. R1: Fol raza 1. R2: Fol raza 2. R3: Fol raza 3. 11: aislamiento HEI 11. HEI 11 con banda de tamaño esperado al control positivo R1 con los oligonucleótidos uni f/r y sp13.

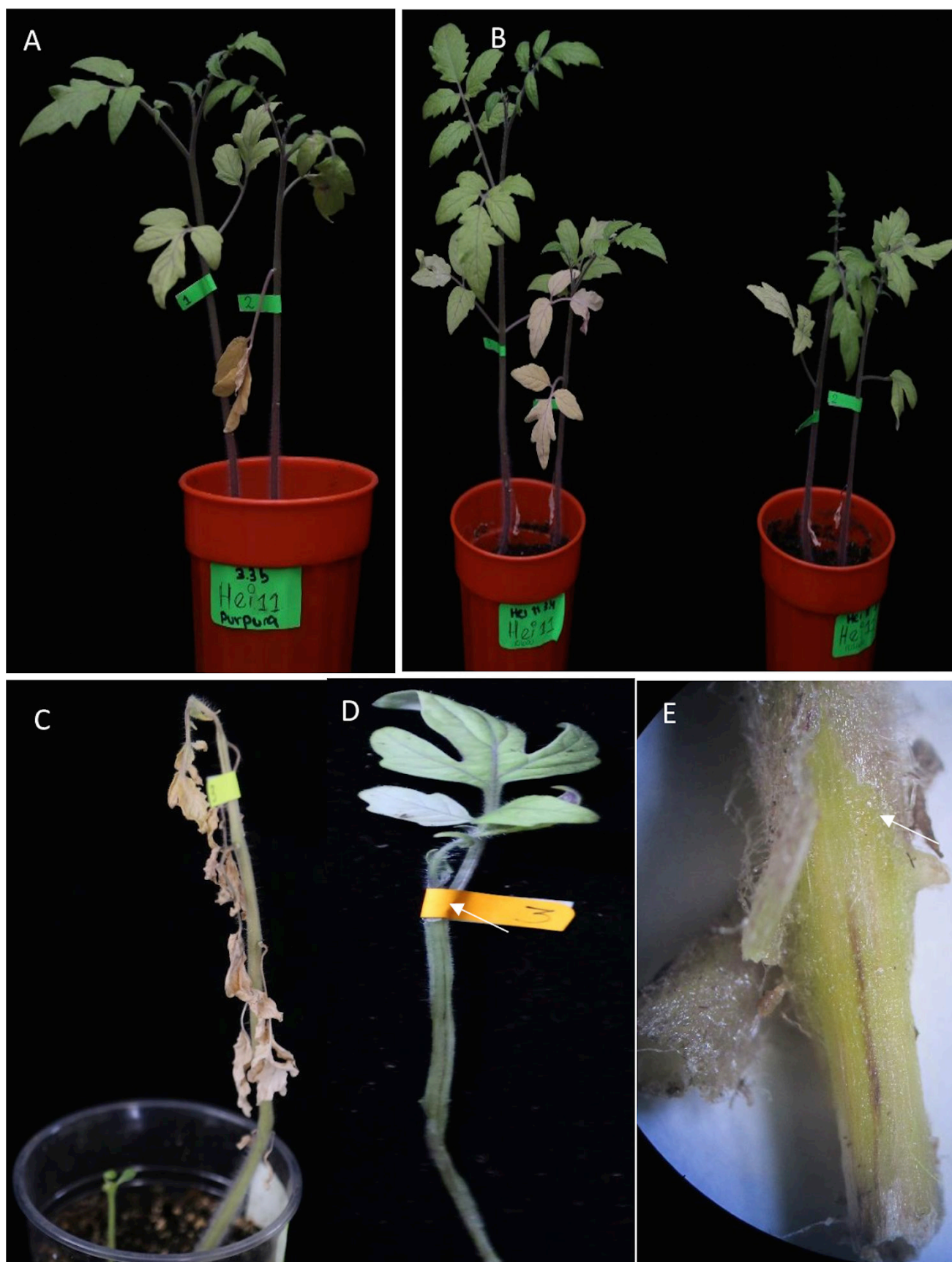


FIGURA 4. Síntomas de la prueba de patogenicidad en el cultivo de tomate, a la cuarta semana de inoculación con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A-B: amarillamiento de las hojas basales, epinastia. C: muerte total de la planta. D-E: decoloración vascular.

Para los aislamientos HEI 1, HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, si bien estos fueron obtenidos de tomate. Sin embargo, no mostró síntomas en el cultivar susceptible a las tres razas; ni en ningún otro cultivar, por lo que no fueron identificadas como razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Aunque, estos aislamientos son capaces de parasitar plantas de tomate, ya que fueron aislados de este cultivo; no obstante, el análisis molecular demostró que carecen de genes de patogenicidad que les permita causar síntomas en el cultivar susceptible (Negrete, 2013). Algunas investigaciones manifiestan que estos *F. oxysporum* no patogénicos aislados de tomate pudieron originar a las formas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* patogénicos durante su asociación saprofítica en el inicio de la domesticación del tomate (Arie, 2010). En la prueba de patogenicidad la determinación del aislamiento HEI 11 como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1, fue establecida cuando éste, mostró síntomas en el cultivar que carecía de genes de resistencia (Ponderosa) y no se evidenció síntomas en los cultivares: Momotaro (I, I2, I3), Momotaro 8 (I, I2, I3) y Block (I, I2, I3); los cuales poseían genes de resistencia I (Balogun et al., 2008; Inami et al., 2012; Negrete, 2013). Así mismo, en base al análisis molecular se demostró que el aislamiento HEI 11 posee los genes de avirulencia (AVR1, AVR2, AVR3), los cuales pudieron ser reconocidos por al menos uno de los genes de resistencia de los cultivares diferenciales (Momotaro, Momotaro 8 y Block), estableciéndose una relación incompatible entre el patógeno y el hospedante, evidenciándose en la ausencia de la enfermedad en los cultivares resistentes. Por el contrario, en el cultivar susceptible (Ponderosa) al no poseer genes de resistencia se estableció una relación compatible, es decir presencia de la enfermedad. Finalmente, el re aislamiento del aislamiento HEI 11 en el medio selectivo KOMADA y medio PDA de raíces y tallos con síntomas de decoloración vascular y la corroboración de la identidad morfológica y molecular confirmó que se trata de la misma cepa inicial empleada para la inoculación, lo que permitió establecer una relación entre el aislamiento y la enfermedad, completando así el postulado de Koch.

CONCLUSIÓN

El presente estudio permitió identificar al aislamiento HEI 11 como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 y corroborar que las pruebas moleculares basadas en el empleo de oligonucleótidos específicos,

son herramientas útiles para la determinación de la *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y de su patogenicidad. Esta investigación servirá de base para futuras investigaciones con fines de estudios del comportamiento poblacional de este patógeno en el país.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Plant Pathology in Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT) Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y al Departamento de Fitopatología de la UNALM. M. Huarhua agradece al personal de TUAT, pero en especial Akai Kotaro, Seon Mi Jo, Hasegawa Ryo, Daichi Kawakami, Reiko Shindo, Nanako Takase y Rin Tsuzuki por el soporte durante su estancia en Japón y finalmente al programa La-CEP y MINEDU-Perú.

LITERATURA CITADA

- Alanis-Martínez, I., C. Medina-Mendoza, N. Marbán-Mendoza., E. Valadez-Moctezuma, 2015. Técnicas moleculares clásicas para la diferenciación de formas especiales de *Fusarium oxysporum*. Revista Mexicana de Fitopatología 42:1-7.
- Appel, D., T.R. Gordon, 1995. Intraspecific Variation within Populations of *Fusarium oxysporum* Based on RFLP Analysis of the Intergenic Spacer Region of the rDNA. Experimental Mycology 19: 120-128. Doi: 10.1006/emyc.1995.1014
- Arie, T., 2010. Phylogeny and phytopathogenicity mechanisms of soilborne *Fusarium oxysporum*. Journal of General Plant Pathology 76: 403-405. Doi: 10.1007/s10327-010-0264-z
- Balogun, O.S., Y. Hirano, T. Teraoka, T. Arie, 2008. PCR-based analysis of disease in tomato singly or mixed inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 1 and 2. Phytopathologia Mediterranea 47: 50-60.
- Baysal, Ö., M. Siragusa, H. Ikten, I. Polat, E. Gümrükcü, F. Yigit, F. Carimi, J.A. Teixeira da Silva, 2009. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. Physiological and Molecular Plant Pathology 74: 68-75. Doi: 10.1016/j.pmp.2009.09.008
- Blancard, D., 2011. Enfermedades del tomate - identificar, conocer y controlar. Mundi-Prensa, México. D.F.
- Booth, C., 1970. *Fusarium oxysporum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 211: 1-2.
- Bravo, G., 2013. Sistemas hidrolíticos de componentes vegetales en el patógeno de tomate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: lipasas y poligalacturonasas. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Carrillo-Fasio, J.A., T.J. Montoya-Rodríguez, R.S. García-Estrada, J.E. Cruz-Ortega, I. Márquez-Zequera, A.J. Sañudo-Barajas, 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 123-127.
- Ciampi, L., J. Nissen, E. Venegas, R. Fuentes, M. Costa, R. Schöbitz, E. Alvarez, P. Alvarado, 2009. Identification of two species of *Fusarium* link that cause wilting of colored callas (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.) cultivated under greenhouse conditions

- in Chile. Chilean Journal of Agricultural Research 69: 516-525. Doi: 10.4067/S0718-58392009000400006
- Çolak, A., M. Bici, 2013. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in protected tomato growing areas of Eastern Mediterranean Region of Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 37: 457-467. Doi: 10.3906/tar-1203-71
- Dhingra, O.D., J.B. Sinclair, 1995. Basic plant pathology methods. 2 ed. CRC Press, Boca Raton.
- Duarte Y., A. Echevarría, B. Martínez, 2016. Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. Revista de Protección Vegetal 31: 173-183.
- Gómez, E.D., 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- González, I., Y. Arias, B. Peteira, 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* - tomate. Revista de Protección Vegetal 27: 1-7.
- Hafizi, R., B. Salleh, Z. Latiffah, 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. Brazilian Journal of Microbiology 44: 959-968. Doi: 10.1590/S1517-83822013000300047
- Hirano, Y., T. Arie, 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of General Plant Pathology 72(5): 273-283. Doi: 10.1007/s10327-006-0287-7
- Hoog, G.S., 2000. Atlas of clinical fungi. CBS, Utrecht.
- Houterman, P.M., L. Ma, G. Van Ooijen, M.J. De Vroomen, B.J.C. Cornelissen, F.L.W. Takken, M. Rep, 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. Plant Journal 58: 970-978. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x
- Houterman, P.M., D. Speijer, H.L. Dekker, C.G. De Koster, B.J.C. Cornelissen, M. Rep, 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants: Short communication. Molecular Plant Pathology 8: 215-221. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x
- Inami, K., T. Kashiwa, M. Kawabe, A. Onokubo-Okabe, N. Ishikawa, E.R. Pérez, T. Hozumi, L. Aragón, F. Cáceres De BaLdarrago, M. Jiménez, K. Madadi, T. Peever, T. Teraoka, M. Kodama, T. Arie, 2014. The tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* shares common ancestors with nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from wild tomatoes in the Peruvian Andes. Microbes and Environments 29: 200-210. Doi: 10.1264/jsme2.ME13184
- Inami, K., C. Yoshioka-Akiyama, Y. Morita, M. Yamasaki, T. Teraoka, T. Arie, 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): 1-10. Doi: 10.1371/journal.pone.0044101.
- INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática), 2018. Agrario. En Compendio estadístico del Perú 2018. Pp. 951-1037. https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1483/cap13/cap13.pdf.
- Kashiwa, T., T. Suzuki, A. Sato, K. Akai, T. Teraoka, K. Komatsu, T. Arie, 2016. A new biotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 emerged by a transposon-driven mutation of avirulence gene AVR1. FEMS Microbiology Letters 363(14): 1-6. Doi: 10.1093/femsle/fnw132
- Kawabe, M., Y. Kobayashi, G. Okada, I. Yamaguchi, T. Teraoka, T. Arie, 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and pg1, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. Journal of General Plant Pathology 71: 263-272. Doi: 10.1007/s10327-005-0203-6
- Kimura, S., N. Sinha, 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. Cold Spring Harbor Protocols 3(11): 1-9. Doi: 10.1101/pdb.emo105
- Komada, H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Review of Plant Protection Research 8: 114-125.
- Kumar, S., G. Stecher, K. Tamura, 2016. MEGA7: Análisis genético evolutivo molecular versión 7.0 para conjuntos de datos más grandes. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.
- Leslie, F., B. Summerell, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual (First). Blackwell Publishing, Oxford.
- Lievens, B., P.M. Houterman, M. Rep, 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. FEMS Microbiology Letters 300: 201-215. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x
- Liu, D., S. Coloe, R. Baird, J. Pedersen, 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology 38: 471.
- Negrete, L., 2013. Prevalencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros de Villa de Arista, San Luis Potosí, posibles fuentes de resistencia y forma de herencia. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Piontelli, E., M.A. Toro, 1992. Micromorfología de algunas especies de *Fusarium* en PDA modificado III. Boletín Micológico 7(1-2): 85-91. Doi: 10.22370/bolmicol.1992.7.0.1285
- Platt, A.R., R.W. Woodhall, A.L. George, 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. BioTechniques 43: 58-62. Doi: 10.2144/0112499
- Rep, M., H.L. Dekker, J.H. Vossen, A.D. De Boer, P.M. Houterman, C.G. De Koster, B.J.C. Cornelissen, 2003. A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins. FEBS Letters 534(1-3): 82-86. Doi: 10.1016/S0014-5793(02)03788-2
- Rep, M., H.C. Van Der Does, M. Meijer, R. Van Wijk, P.M. Houterman, H.L. Dekker, C.G. De Koster, B.J.C. Cornelissen, 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. Molecular Microbiology 53: 1373-1383. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x
- Saitoh, K., K. Togashi, T. Arie, T. Teraoka, 2006. A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. Journal of General Plant Pathology 72: 348-350. Doi: 10.1007/s10327-006-0300-1

- SIEA (Sistema Integrado de Estadística Agraria), 2017. Boletín estadístico de producción agrícola y ganadera. IV Trimestre. Ed. MINAGRI, Cercado de Lima. Doi: 10.2139/ssrn.1920472
- Silva, F.P., M.H. Vechiato, R. Harakava, 2014. EF- 1 gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. Tropical Plant Pathology 39: 64-73. Doi: 10.1590/S1982-56762014000100008
- Srinivas, C., D. Nirmala, K. Narasimha, C. Mohan, D. Chakrabhavi, T. Lakshmeesha, S. Bhim, N. Kalagatur, S. Niranjana, A. Hashem, A. Alqarawi, B. Tabassum, E. Abd Allah, S. Chandra, 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity- A review. Saudi Journal of Biological Sciences 26: 1315-1324. Doi: 10.1016/j.sjbs.2019.06.002
- Van Der Does, H.C., B. Lievens, L. Claes, P.M. Houterman, B.J.C. Cornelissen, M. Rep, 2008. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. Environmental Microbiology 10: 1475-1485. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01561.x
- Walker, J., 1971. *Fusarium* wilt of tomato. Monograph, Vol. 6. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minesota.