

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**TESIS**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y VIRULENCIA DE POBLACIONES DE *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* DE CULTIVOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN EL ESTADO DE SINALOA”**

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA  
TOMÁS AARÓN VEGA GUTIÉRREZ**

**DIRECTOR:  
DR. CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA**

**CO-DIRECTOR:  
DR. GUADALUPE ALFONSO LÓPEZ URQUÍDEZ**

**CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, DICIEMBRE DE 2019**

La presente tesis titulada “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y VIRULENCIA DE POBLACIONES DE *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*** DE CULTIVOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN EL ESTADO DE SINALOA” fue realizada por **TOMÁS AARÓN VEGA GUTIÉRREZ**, bajo la dirección del consejo particular que se indica, ha sido **APROBADA** por el mismo, y **ACEPTADA** como requisito parcial para obtener el título de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CONSEJO PARTICULAR**

DIRECTOR: \_\_\_\_\_  
DR. CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA

CO-DIRECTOR: \_\_\_\_\_  
DR. GUADALUPE ALFONSO LÓPEZ URQUÍDEZ

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. SIXTO VELARDE FÉLIX

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. ÁNGEL ROBERTO MARTÍNEZ CAMPOS

ASESOR: \_\_\_\_\_  
DR. RAÚL ALLENDE MOLAR

Culiacán, Sinaloa, diciembre de 2019



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN  
FACULTAD DE AGRICULTURA DEL VALLE DEL FUERTE  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
FACULTAD DE AGRICULTURA DEL VALLE DEL  
CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, la que suscribe Tomás Aarón Vega Gutiérrez, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 05382637, de la Unidad Académica Facultad de Agronomía, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Carlos Alfonso López Orona y del Dr. Guadalupe Alfonso López Urquidez y cede los derechos del trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y VIRULENCIA DE POBLACIONES DE *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* DE CULTIVOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN EL ESTADO DE SINALOA”, a la Facultad de Agronomía, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

Tomás Aarón Vega Gutiérrez



## UAS- Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.

## DEDICATORIA

Este trabajo importante que concluyo, se lo dedico a la persona que en todo momento está presente en mi vida, gracias por escucharme siempre, por el amor que me dio, y aunque no esté presente físicamente y el cielo nos separó, tengo la certeza que me acompaña siempre, gracias hasta el cielo **Mamá María †**.

A **Dios**, por haberme prestado la vida, darme salud y la oportunidad de finalizar este trabajo, por todas sus bendiciones.

A mi **esposa Ana Cecilia**, amor eres un pilar fundamental en mi vida, gracias por todo tu apoyo y el amor incondicional que siempre me has dado, gracias por acompañarme a lo largo de estos años en momentos felices y tristes, este logro también te lo debo a ti, el cual también es tuyo. Gracias Gordis.

A ti **hijo Luis Tomás**, hijo eres una parte fundamental en este proyecto, naciste cuando estaba con el doctorado, gracias por tu amor, por darme esos abrazos y sonrisas que me hacen el día, eres mi inspiración, mis ganas de salir adelante y de no tirar la toalla en momentos difíciles. Dios me de vida para verte crecer, formar una familia y que sigas el ejemplo de tus padres, cuando puedas leer estas palabras hijo, quiero que sepas lo mucho que te amo.

A ti **Mirena Alejandra**, chaparra espero que esto sirva para darte un buen ejemplo y seas una mujer exitosa, sé que lo serás, sabes que eres uno de los pilares de mi vida, gracias por enseñarme a quererte tanto y dejarme estar en tu vida. Te amo hija.

A **mi madre Ana Luisa**, gracias por tu apoyo incondicional, ten la certeza que todo lo que emprenda en mi vida es gracias a tu ejemplo y amor, este trabajo te lo dedico, eres la mujer más valiente que conozco. Gracias mi chata.

A **mi padre Baldomero**, viejo aunque ya no puedas comprender estas palabras, te agradezco el tiempo que me dedicaste, gracias por quererme, aunque a tu manera pero lo hiciste. Me hubiera gustado que comprendieras este logro de mi vida. Gracias por tus enseñanzas.

A **mis hermanos Carlos Abraham y Ana Guadalupe**, gracias por todo su cariño. Espero les sirva de ejemplo mi ejemplo, échense ganas a la vida, saben que es difícil.

A **mi suegra María Luisa Arredondo**, este trabajo también es de usted, gracias por su apoyo incondicional siempre y por su amor.

A **toda mi familia**, muchas gracias.

## AGRADECIMIENTOS

A mi **ALMA MATER**, la Universidad Autónoma de Sinaloa, en particular al Colegio de Ciencias Agropecuarias, y la Facultad de Agronomía mi casa, por darme la oportunidad de realizar una parte de mi proyecto de vida.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por proporcionarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

Al **Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI)** de la **Universidad Autónoma de Sinaloa**, por el financiamiento al presente trabajo de investigación a través del proyecto de investigación “Diversidad genotípica y potencial patogénico de poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el estado de Sinaloa” con clave **PROFAPI2015/152**.

Al **Dr. Carlos Alfonso López Orona**, amigo gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de ser tu alumno de posgrado y aprender juntos en este camino, gracias por tu disponibilidad y tu ayuda para realizar este trabajo. Espero haber cumplido contigo y seguir cosechando éxitos juntos.

Al **Dr. Guadalupe Alfonso López Urquídez**, bato muchas gracias por encaminarme a la docencia y la investigación, esto es culpa tuya y te lo agradezco, hoy empieza otro camino para mí y sé que seguirás ayudándome incondicionalmente, gracias por todo tu apoyo.

Al **Dr. Sixto Velarde Félix**, gracias por lo que me enseñó, su apoyo, sugerencias y regaños en la presente investigación.

Al **Dr. Ángel Roberto Martínez Campos**, gracias por su apoyo en la presente investigación.

Al **Dr. Raúl Allende Molar**, gracias por su apoyo en la presente investigación.

A **mis compañeros de Área**, Madueño, Flavio, David y Silvia, gracias por todo su apoyo amigos.

A **mis compañeros de laboratorio**, Martín, Lorena, Alan, Daniel, Alfredo y Jorge, gracias por su apoyo y permitirme enseñarles algo de lo que aprendí.

*‘Llegando al final, todo es diferente...’*

## ÍNDICE GENERAL

|   |      |
|---|------|
| ABREVIATURAS .....  | I    |
| ÍNDICE DE CUADROS. ....   | II   |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | IV   |
| RESUMEN .....   | VII  |
| ABSTRACT.....   | VIII |
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 1    |
| II. JUSTIFICACIÓN .....   | 3    |
| III. HIPÓTESIS .....  | 4    |
| 3.1. HIPÓTESIS .....  | 4    |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL .....   | 4    |
| 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....   | 4    |
| V. REVISIÓN DE LITERATURA .....   | 5    |
| 5.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE TOMATE.....                                   | 5    |
| 5.1.1. <i>Importancia económica del cultivo de tomate a nivel mundial</i> ..... | 5    |
| 5.1.2. <i>Estadística nacional de producción de tomate</i> .....                | 6    |
| 5.1.3. <i>Clasificación taxonómica del tomate</i> .....                         | 7    |
| 5.2. <i>Requerimientos edafoclimáticos del tomate</i> .....                     | 7    |
| 5.3. PROBLEMAS FITOSANITARIOS DEL TOMATE .....                                  | 8    |
| 5.4. ENFERMEDADES EN EL ÁREA RADICULAR Y/O CORONA DE LA PLANTA DE TOMATE .....  | 9    |
| 5.5. REVISIÓN DEL GÉNERO <i>FUSARIUM</i> .....                                  | 9    |
| 5.5.1. <i>Virulencia del género Fusarium</i> .....                              | 11   |
| 5.5.2. <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Fol)</i> .....                 | 12   |
| 5.5.3. <i>Fusarium solani species complex (FSSC)</i> .....                      | 23   |
| 5.6. ECOLOGÍA Y EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE HONGOS .....                    | 25   |
| 5.7. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE <i>FUSARIUM</i> .....                        | 26   |
| 5.7.1. <i>Identificación morfológica de Fusarium</i> .....                      | 26   |
| 5.7.2. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....                   | 27   |
| 5.7.2.1.2. GEN DEL FACTOR DE ELONGACIÓN EF-1A.....                              | 30   |
| 5.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....  | 30   |
| 5.9. CONTROL DE LA FUSARIOSIS.....  | 31   |
| VI. MATERIALES Y METODOS .....  | 33   |
| 6.1. ÁREA DE ESTUDIO .....  | 33   |
| 6.2. COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....  | 34   |
| 6.3. ESTERILIZADO DEL MATERIAL .....  | 35   |
| 6.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE <i>FUSARIUM SPP</i> .....                    | 36   |
| 6.4.1. <i>Elaboración del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA)</i> .....   | 36   |
| 6.4.2. <i>Aislamiento de Fusarium spp</i> .....                                 | 37   |
| 6.4.3. <i>Obtención de aislamientos monospóricos de Fusarium spp</i> .....      | 38   |
| 6.5. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....  | 40   |
| 6.6. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA .....                                | 41   |
| 6.7. EXTRACCIÓN DEL ADN .....   | 43   |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 6.8.         | AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL ADN .....  | 44        |
| 6.9.         | ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....  | 46        |
| 6.11.        | ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 47        |
| <b>VII.</b>  | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>  | <b>48</b> |
| 7.1.         | TOMA DE MUESTRAS Y SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD.....  | 48        |
| 7.2.         | IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....  | 49        |
| 7.3.         | <i>Pruebas de patogenicidad mediante cultivares diferenciales de tomate</i> .....                              | 53        |
| 7.4.         | ANÁLISIS DE VIRULENCIA .....   | 55        |
| 7.5.         | IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....   | 57        |
| 7.6.         | ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....  | 60        |
| 7.7.         | SENSIBILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE <i>FUSARIUM</i> SPP. A DIFERENTES FUNGICIDAS<br>COMERCIALES..... | 63        |
| <b>VIII.</b> | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>IX.</b>   | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>X.</b>    | <b>ANEXOS .....</b>  | <b>75</b> |



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**cm.:** centímetros

**CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

**CLA:** agar de hoja clavel

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EUA:** Estados Unidos de América

**g.:** gramos

**ha:** hectárea

**INIFAP:** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias

**ITS:** región espaciadora transcrita interna

**mG:** miligramos

**mL:** mililitros

**mM:** milímetros

**NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica

**PCNB:** Pentacloronitrobenceno

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDA:** Papa dextrosa agar

**pH:** Potencial hidrógeno

**SIAP:** Sistema de información agroalimentaria y pesquera

**SIX:** Proteínas secretadas en el xylema

**t:** tonelada

**TEF-1 $\alpha$ :** Factor de elongación de la traducción 1 alfa

## ÍNDICE DE CUADROS.

| CUADRO | PÁG.   |
|--------|--|
| 1.     | Principales países productores de tomate a nivel mundial..... 6  |
| 2.     | Producción nacional de tomate..... 6   |
| 3.     | Distribución de las unidades de muestro por estrato..... 33  |
| 4.     | Escala de severidad de acuerdo a Marlatt <i>et al.</i> , (1996)..... 42  |
| 5.     | Condiciones de temperatura de alineación y primers de secuencia (ITS, TEF-1 $\alpha$ y SIXs) para el análisis de <i>Fusarium</i> spp. por PCR..... 45                        |
| 6.     | Fungicidas evaluados para el control de <i>Fusarium</i> spp. Ingrediente activo (i.a.), nombre químico, y dosis ensayadas (D1, D2, D3 y D4) en partes por millón (ppm)... 47 |
| 7.     | Coordenadas geográficas de los municipios del estado de Sinaloa donde fueron colectadas las plantas de tomate con síntomas de <i>Fusarium</i> spp. .... 48                   |
| 8.     | Caracterización morfológica de 15 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de plantas de tomate en el estado de Sinaloa..... 50  |
| 9.     | Diferenciación de razas fisiológicas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> por PCR..... 54  |
| 10.    | Análisis de varianza no paramétrica con la prueba de Kruskal-Wallis y comparación de medias por Dunn ( $P \leq 0.05$ )..... 56   |
| 11.    | Condiciones de precipitación y temperaturas de las zonas de donde se recuperaron los aislamientos. 57  |
| 12.    | Origen de los aislamientos, códigos y números de acceso al GenBank del complejo de especies de <i>Fusarium</i> encontradas en el estado de Sinaloa..... 58                   |

13. Porcentaje de inhibición *in vitro* del crecimiento radial de los 63 aislamientos de *Fusarium* spp. bajo diferentes concentraciones de fungicida.

## ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA |  | PÁG. |
|--------|--|------|
| 1      | Principales estados productores de tomate en México, en el ciclo 2017-2018.....  | 1    |
| 2      | Macroconidios y microconidios de <i>Fol</i> .....  | 17   |
| 3      | Macroconidios y microconidios de <i>Fusarium solani</i> species complex (FSSC).....  | 24   |
| 4      | Mapa de México y del estado de Sinaloa donde fueron colectadas plantas de tomate con síntomas de <i>Fusarium spp</i> .....   | 34   |
| 5      | Colecta en campo de plantas de tomate con síntomas de <i>Fusarium spp</i> .....  | 35   |
| 6      | Autoclave utilizada para esterilizar los materiales de laboratorio.....  | 36   |
| 7      | Pesado de PDA en una báscula de precisión y colocación del PDA en un matraz Erlenmeyer.....  | 37   |
| 8      | Colocación del tejido infectado en caja Petri con medio de cultivo PDA.....  | 38   |
| 9      | Micelio desarrollado en caja Petri de los aislamientos obtenidos.....  | 39   |
| 10     | Técnica de diluciones seriadas para cultivos monospóricos.....   | 40   |
| 11     | Características de la colonia de <i>Fusarium oxysporum</i> vista de frente de la caja petri (A), fialides característico de <i>Fusarium oxysporum</i> (B), colonia de <i>Fusarium oxysporum</i> vista de reverso de la caja petri (C), microconidios de <i>Fusarium oxysporum</i> (D)..... | 40   |
| 12     | Siembra de la variedad Bonnie Best en charolas de poliestireno.....  | 41   |
| 13     | Inoculación de las diferentes cepas de <i>Fusarium spp</i> .....   | 42   |
| 14     | Extracción del ADN de los aislamientos de <i>Fusarium spp</i> , con nitrógeno líquido.....   | 44   |
| 15     | Fotografías de los síntomas encontrados en las plantas de tomate muestreados. <b>a</b> clorosis en las hojas; <b>b</b> marchitamiento en las hojas;  | 49   |

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <b>c</b> necrosis en los haces vasculares del tallo; <b>d</b> achaparramiento en la planta de tomate.....  |    |
| 16 | Caracterización morfológica de aislados de <i>Fusarium</i> .....   | 50 |
| 17 | Características morfológicas de aislamientos de <i>Fusarium falciforme</i> :<br><b>a</b> Microconidias barra de escala= 5 µm; <b>b</b> Macroconidia y Microconidia barra de escala= 5 µm; <b>c y f</b> Fiálides barra de escala= 5 µm; <b>d</b> Vista superior de una colonia típica en PDA; <b>g</b> Aislamientos fúngicos de plantas de tomate enfermas.....   | 51 |
| 18 | Características morfológicas de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> : <b>a</b> Macroconidia y microconidias barra de escala= 5 µm; <b>b</b> Microconidias barra de escala= 5 µm; <b>c</b> Vista superior de una colonia típica en PDA; <b>e y f</b> Fiálides barra de escala= 5 µm; <b>g</b> Aislamientos fúngicos de plantas de tomate enfermas.....  | 52 |
| 19 | Identificación de razas de FOL mediante cultivos diferenciales.....  | 53 |
| 20 | Incidencia de la enfermedad (%) causada por aislados de <i>F. oxysporum</i> y <i>F. falciforme</i> en plantas de tomate a los 60 días después de la inoculación.....   | 55 |
| 21 | Producto PCR obtenido a partir de ADN genómico de aislamientos seleccionados para la identificación de <i>Fusarium spp.</i> con el par de cebadores EF-1 y EF-2, visualizados en un gel de agarosa al 1,0%. Carril 1; Marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2-10; aislamientos seleccionados (FOB20SINELO, FOB25SINGUA, FOB29SINESC, FOB30SINFUE, FFB31SINGUA, FFB38SINCUL, FFB39SINSIN, FFB47SINCUL y FFB50SINCUL). Carril 11; control negativo..... | 58 |
| 22 | Producto PCR obtenido a partir de ADN genómico de aislamientos seleccionados para la identificación de <i>Fusarium spp.</i> con el par de cebadores ITS1 y ITS4, visualizados en un gel de agarosa al 1,0%. Carril 1; Marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2-7; aislamientos seleccionados (FFA54SINFUE, FFA55SINESC, FFA63SINNAV, FOA62SINFUE, FOA64SINELO Y FOA66SINESC)..   | 59 |
| 23 | Dendograma filogenético por el método método de Neighbour joining en el alineamiento de nucleótidos de secuencias parciales del gen TEF-1α de <i>F. falciforme</i> y <i>F. oxysporum</i> . Los valores en los nodos representan el porcentaje de núcleos de arranque (1000 repeticiones).....  | 61 |

|    |  |    |
|----|--|----|
| 24 | Dendograma filogenético por el método método de Neighbour joining en el alineamiento de nucleótidos de secuencias parciales del gen ITS de <i>F. falciforme</i> y <i>F. oxysporum</i> . Los valores en los nodos representan el porcentaje de núcleos de arranque (1000 repeticiones)..... | 62 |
|----|--|----|

## RESUMEN

El marchitamiento por *Fusarium* es uno de los principales factores limitantes para la producción de tomate en México. Se obtuvieron 1050 aislamientos de tejidos vasculares de plantas de tomate con síntomas de marchitez y amarillamiento. Los aislamientos patogénicos se evaluaron mediante análisis filogenético del gen TEF-1 $\alpha$  y la región ITS, marcadores morfológicos y pruebas de patogenicidad. Dentro de los 15 aislamientos patogénicos de *Fusarium*, 7 fueron identificados como *F. oxysporum* y 8 como *F. falciforme*. En el análisis filogenético de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium falciforme* se confirmó que ambas poblaciones están constituidas por distintos linajes filogenéticos. El estudio se realizó en el estado de Sinaloa, México, tomando muestras de acuerdo con un gradiente latitudinal. Los aislamientos mostraron diferencias en agresividad; *F. falciforme* fue el más patogénico. Los aislamientos de ambos complejos provocaron síntomas aéreos similares de amarillamiento y oscurecimiento de los tejidos vasculares en las plantas de tomate. Pero solo los aislamientos de *F. falciforme* provocaron la necrosis en las coronas de las plantas. Los marcadores morfológicos permitieron diferenciar aislamientos de complejos distintos pero no diferenciar entre linajes.

## ABSTRACT

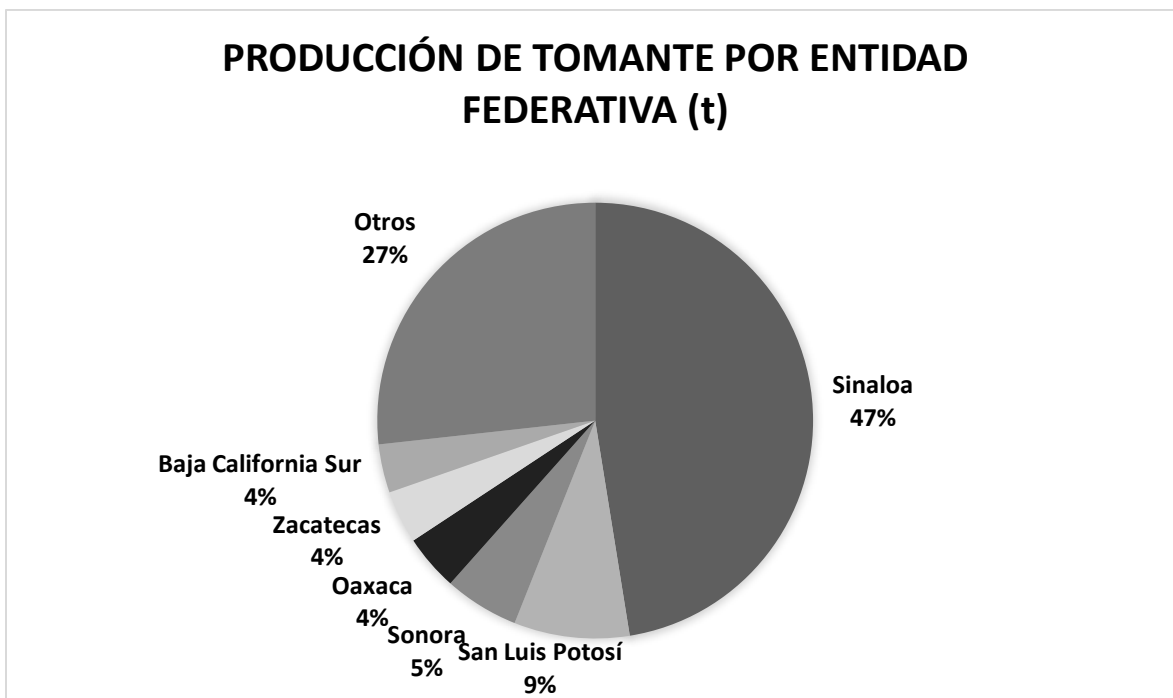
*Fusarium* wilt is one of the main limiting factors for tomato production in Mexico. One thousand and fifty isolates were obtained from vascular tissues tomato plants showing wilt and yellowing symptoms in Sinaloa, Mexico. The pathogenic isolates were evaluated through phylogenetic analysis of the TEF-1 $\alpha$  gene and ITS region, morphological markers and pathogenicity tests. Within the 15 pathogenic *Fusarium* isolates, 7 were identified as *F. oxysporum* and 8 as *F. falciforme*. Phylogenetic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Fusarium falciforme* isolates confirmed that both populations are constituted by distinct phylogenetic lineages. The isolates showed differences in aggressiveness; *F. falciforme* was the most aggressive. Isolates of both complexes triggered similar aerial symptoms of yellowing and darkening of the vascular tissues in tomato plants. But only *F. falciforme* isolates triggered necrosis in the plant crowns. Morphological markers allowed differentiating isolates from distinct complexes but not differentiating between lineages.



## I. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas con mayor producción en el mundo, debido a su gran aportación gastronómica y al alto grado de aceptación que tiene en las diferentes culturas, lo cual se evidencia por el hecho de que es el producto hortícola más consumido en el mundo. En el año 2017 la producción mundial de tomate fue de 33.4 millones de toneladas y los diez países con mayor participación fueron, en orden de importancia, China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, España, Brasil y México. (FAO, 2018).

En el ciclo 2017-2018 en México (Figura 1) se cosecharon 23,101 hectáreas de tomate con una producción de 629,852 t. Sinaloa es el principal estado productor de tomate con un volumen de 811,113 t, lo que representa el 47 % del total de la producción nacional (SIAP, 2018).



**Figura 1.** Principales estados productores de tomate en México, en el ciclo 2017-2018.

Parte de la producción de tomate se exporta a Estados Unidos de Norteamérica, donde se le demanda por su sabor, presentación, calidad y larga vida de anaquel. Su producción

implica una gran aportación de divisas y generación de empleos, en todas las fases de la cadena agroalimentaria. Sin embargo, los productores corren un alto riesgo al invertir su capital en la producción de esta hortaliza, ya que tiene la desventaja de ser altamente susceptible al ataque de enfermedades (Blancard, 2005).

Entre las enfermedades que afectan la producción de tomate se encuentran las causadas por microorganismos, entre los cuales están los hongos del suelo, destacando en esta hortaliza la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *splycopersici* (Fol) (Sacc.) Snyder y Hansen, la cual provoca la disminución del rendimiento hasta en un 60 % y afecta la calidad del producto (Agrios, 2004). Se han reportado tres razas de *Fol*, las cuales se distinguen por su virulencia a cultivares de tomate diferenciales como lo son: Bonny Best, sin genes de resistencia; Manapal, resistente solo a la raza 1; Walter, resistente a las razas 1 y 2; e I3R3, resistente a la raza 3. La raza 1 se describió en 1886 y la 2 se reportó en 1945 en Ohio, EUA. La raza 3 se observó en Australia en 1978 y en California, Florida, Georgia, Arkansas, Carolina del Norte y Tennessee, EUA; mientras que esta última raza en México se reportó en 1996 (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996).

Actualmente la creación de cultivares resistentes es el método más sencillo, efectivo y seguro para el control de las enfermedades (Fernández-Valiela, 2001). Sin embargo, se requiere encontrar variedades de plantas cultivadas, capaces de resistir el ataque de los agentes causales. Aunque en Sinaloa se conocen al menos 10 enfermedades radiculares-vasculares del tomate, la más importante, como se mencionó anteriormente, es la marchitez vascular o fusariosis (Ramírez, 1998).

Sin embargo, la implementación de medidas apropiadas de control de enfermedades requiere una identificación exacta del patógeno para poder diseñar estrategias integrales de control. Ante esto, se determinó la necesidad de realizar una caracterización molecular y morfológica, así como analizar la virulencia de las poblaciones de *Fusarium* spp. causantes de la fusariosis vascular del cultivo de tomate en el estado de Sinaloa.

## II. JUSTIFICACIÓN

Dado que Sinaloa es el principal productor de tomate a nivel nacional, estudios que proporcionen información sobre la enfermedad de la fusariosis vascular son de vital importancia. En dicho estado, *Fusarium* spp. causa pérdidas estimadas entre el 21 y 47 % en la producción de tomate tanto en invernadero como en condiciones de campo abierto. El control se ha basado principalmente en el uso de cultivares resistentes, rotación de cultivos, los tratamientos químicos al suelo y las aplicaciones de fungicidas, entre otras técnicas culturales, físicas y biológicas (Chen y Zhou, 2009; Enespa y Dwivedi, 2014 ).

Por tanto, la implementación de medidas apropiadas de manejo de enfermedades requiere una identificación y detección confiable del patógeno para diseñar estrategias integrales de control (Moine *et al.*, 2014). Además de las técnicas clásicas como identificación morfológica y crecimiento de colonias, los métodos de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han proporcionado un enfoque rápido para la identificación de patógenos de plantas (O' Donnell 2000; Vincelli y Tisserat, 2008). También varias regiones de ADN, tales como la región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADN ribosomal (rADN) y, particularmente, el gen del factor de elongación de la traducción 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ), son útiles para la identificación de especies de *Fusarium*. (O'Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004).

Por esta razón, la necesidad de realizar la caracterización molecular y morfológica, así como analizar la virulencia de las poblaciones de *Fusarium* spp. causantes de la fusariosis vascular de cultivos de tomate en el estado de Sinaloa. La información resultante será fundamental para el diseño de estrategias sostenibles de control.

### III. HIPÓTESIS

#### 3.1. Hipótesis

Diferentes especies de *Fusarium* spp. serán las causantes de la fusariosis vascular del cultivo de tomate en el estado de Sinaloa. Así mismo, se encontrará variación en la virulencia entre las poblaciones de *Fusarium* spp.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente el agente causal de la fusariosis vascular del cultivo de tomate en el estado de Sinaloa, así como determinar su patogenicidad y virulencia.

#### 4.2. Objetivos particulares

- a) Identificar las especies de *Fusarium* spp. causantes de la fusariosis vascular del cultivo de tomate con base en la caracterización morfológica y molecular.
- b) Determinar la patogenicidad y virulencia de las cepas de *Fusarium* spp. causantes de la fusariosis vascular en el cultivo de tomate en el estado de Sinaloa.
- c) Conocer la relación filogenética de las especies aisladas en el estado de Sinaloa de *Fusarium* spp. con otras cepas de *Fusarium* obtenidas de otras partes de México y el mundo mediante un análisis filogenético.
- d) Evaluar la sensibilidad de los aislamientos obtenidos de *Fusarium* spp. a diferentes fungicidas comerciales.

## V. REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1. Generalidades del cultivo de tomate

El cultivo del tomate ocupa el primer lugar entre las hortalizas en el mundo. Presenta una alta diversidad genética, existiendo variedades con distinto aspecto, color y sabor, desde el punto de vista económico, es una de las especies hortícolas más importantes de México, debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera (Ortega, 2010). De acuerdo con la consulta con técnicos responsables de producción de tomate en Sinaloa, se requieren alrededor de 350 jornales por hectárea.

El tomate tiene una amplia variedad de usos para el consumo fresco o procesado, es utilizado como ingrediente principal en jugos, pastas, bebidas y otros concentrados, presenta un sabor universalmente apreciado en más de 120 recetas culinarias, cuenta con un alto valor nutritivo, con altos contenidos de vitaminas A y C, además de utilizarse en la industria cosmética, farmacéutica y ornamental (Rodríguez *et al.*, 2001). La planta puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Se desarrolla bien en un amplio rango de latitudes, tipos de suelos, temperaturas, métodos de cultivo y es moderadamente tolerante a la salinidad (Chamarro, 2001).

#### 5.1.1. Importancia económica del cultivo de tomate a nivel mundial

La alta demanda de tomate representa 344, 538,190 dólares a nivel mundial. En el año 2018, México se ubicó en el noveno lugar como productor de este cultivo (Cuadro 1). China, India y Turquía son los 3 países con más producción de tomate en el mundo (FAO, 2018).

**Cuadro 1.** Principales países productores de tomate a nivel mundial

| <b>País</b>               | <b>Producción (t)</b> |
|---------------------------|-----------------------|
| China                     | 59,626,900            |
| India                     | 20,708,000            |
| Turquía                   | 12,750,000            |
| Estados Unidos de América | 10,910,990            |
| Egipto                    | 7,297,108             |
| Irán                      | 6,177,290             |
| Italia                    | 6,015,868             |
| España                    | 5,163,466             |
| México                    | 4,243,058             |
| Brasil                    | 4,230,150             |

Fuente: FAO, 2018

### 5.1.2. Estadística nacional de producción de tomate

De acuerdo a las estadísticas oficiales de producción de tomate, en el año 2018 se produjeron 1' 708, 997 t a nivel nacional, siendo Sinaloa el principal productor de tomate (Cuadro 2), con una producción anual de 811,113 t, para lo cual, la entidad destinó una superficie de 11, 862 ha, sin embargo, el estado que obtuvo el mejor rendimiento fue Oaxaca con 138.5 t/ha aproximadamente (SIAP, 2019).

**Cuadro 2.** Producción nacional de tomate

| <b>Estado</b>       | <b>Producción (t)</b> | <b>Rendimiento (t/ha)</b> |
|---------------------|-----------------------|---------------------------|
| Sinaloa             | 811,11                | 68.39                     |
| San Luis Potosí     | 146,42                | 88.91                     |
| Sonora              | 94,70                 | 59.56                     |
| Oaxaca              | 70,95                 | 138.58                    |
| Zacatecas           | 67,25                 | 45.26                     |
| Baja California Sur | 61,43                 | 48.36                     |
| Querétaro           | 60,58                 | 84.64                     |
| Michoacán           | 52,43                 | 35.20                     |
| Baja California     | 37,62                 | 74.61                     |
| Jalisco             | 36,78                 | 71.41                     |

Fuente: SIAP, 2019

### 5.1.3. Clasificación taxonómica del tomate

El origen del tomate es la región andina de Colombia, Chile, Perú, y Bolivia (Peralta *et al.*, 2007). Sin embargo, hay indicios de que la domesticación se produjo en México (Sims, 1979; Bai y Lindhout, 2007).

El cultivo de tomate, desde su introducción a Europa en el siglo XVI, varios botánicos lo relacionaron con el género *Solanum*, en 1753 Linneo lo clasificó y lo nombró *Solanum lycopersicum*. Un año después Miller lo reclasificó y nombró como *Lycopersicum esculentum* (Peralta *et al.*, 2007). Actualmente la clasificación del tomate dada por la Integrated Taxonomic Information System (ITIS, 2017) es la siguiente:

**Reino:** Plantae

**División:** Tracheophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Solanales

**Familia:** Solanaceae

**Género:** *Solanum*

**Especie:** *S. lycopersicum* L.

### 5.2. Requerimientos edafoclimáticos del tomate

El tomate es una planta de clima cálido, las temperaturas óptimas según el ciclo de vida son las siguientes: temperaturas nocturnas entre 15 y 18 °C, temperaturas diurnas de 24 a 25 °C y temperatura ideal para la floración de 21 °C (Rodríguez *et al.*, 2001). Los requerimientos de humedad del suelo para el desarrollo del tomate son aquellas no superiores al 50 %, y suelos no encharcados (Rodríguez *et al.*, 2001). Los periodos críticos de humedad en las plantas de crecimiento determinado son: después del trasplante, 125.3 mm; en floración e inicio de fructificación, 110.6 mm; en la etapa de maduración de fruto, 167.5 mm (INIFAP, 2010). La disponibilidad de agua, también puede afectar la formación de flores y posteriormente la disminución de frutos. La media del

número de flores por racimo, decrece cuando disminuye el suministro de agua (Wien, 1997).

La humedad relativa por su lado, debe ser inferior al 90 %, valores superiores favorecen las enfermedades fúngicas. Se consideran como óptimos valores de humedad relativa entre 70 y 80 %. En condiciones de baja humedad relativa la tasa de transpiración crece, lo que acarrea estrés hídrico, cierre estomático y reducción de la fotosíntesis en las fases de fructificación. Valores extremos de humedad con baja iluminación reducen el cuajo de tomates y la reducción en la viabilidad del polen. El tomate se desarrolla en una gama de suelos. Sin embargo, estos deben de ser fértiles, profundos y que presenten un buen drenaje. El rango de pH óptimo varía entre 6 y 6.5 para que la planta se desarrolle y disponga de nutrientes adecuadamente.

### **5.3. Problemas fitosanitarios del tomate**

Los problemas fitosanitarios constituyen uno de los aspectos más importantes en el proceso productivo del cultivo de *Solanum lycopersicum*. En México, el tomate es un cultivo con tendencias a incrementarse debido al aumento considerable y progresivo de las áreas sembradas. A nivel mundial el tomate es afectado por diferentes patógenos que dañan tanto la parte aérea como el área radicular, constituyendo un factor limitante en la producción, las enfermedades son ocasionadas por bacterias, virus, hongos, entre otros; además de las variaciones climáticas que afectan a este cultivo.

Dentro de las enfermedades causadas por hongos en la parte aérea de la planta sobresalen especies como *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* causantes del tizón tardío y el tizón temprano del tomate, respectivamente. *Stemphylium* spp. y *Aspergillus* spp. causantes del moho gris y el moho negro, respectivamente. En Sinaloa, las bacterias año con año causan problemas en dicho cultivo; la peca bacteriana (*Pseudomonas syringae*), la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris*) y el cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis*) son introducidas principalmente en los trasplantes y están asociadas con la semilla. La marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*), la necrosis de la médula (*Pseudomonas corrugata*) y la pudrición del tallo (*Erwinia*



*carotovora*) sobreviven en el suelo y pueden causar la destrucción rápida del cultivo (Ramírez *et al.*, 2010).

#### **5.4. Enfermedades en el área radicular y/o corona de la planta de tomate**

En México se han reportado daños a causa de *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*, provocando el ahogamiento o secadera, marchitez sureña por *Sclerotium rolfsii* (Quiroga *et al.*, 2007). *P. ultimum* agente causal de la muerte de plántulas y pudrición de raíz (González *et al.*, 2010), *Ralstonia solanacearum* (Perea *et al.*, 2010), pudrición del pie por *Fusarium solani* (Ortega, 2010), pudrición de la corona ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) (Apodaca *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 1993) y la marchitez vascular por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) razas 1, 2 y 3 (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008; Carrillo-Fasio *et al.*, 2003; Valenzuela *et al.*, 1996; Jone *et al.*, 1993). Siendo esta última la principal causa de problemas sanitarios, disminuyendo en un 60 % el rendimiento del tomate y afecta la calidad del producto. Esta enfermedad, se ha reportado en por lo menos 32 países (Jones *et al.*, 1993), prosperando en una diversidad de condiciones ambientales desde trópicos secos hasta climas templados (Cai *et al.*, 2003). Existen tres razas reportadas del hongo, las cuales se distinguen por su patogenicidad en variedades diferenciales de tomate que contienen distintos genes de resistencia (Cai *et al.*, 2003).

#### **5.5. Revisión del género *Fusarium***

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link, quien lo definió como especie con micelio hialino con esporas, con forma de canoa o plátano, el cual es el carácter primario distintivo. Dicha descripción se realizó basándose en las observaciones de *F. roseum*, primera especie descrita, y debido a su falta de especificidad, se podría aplicar al menos a 50 géneros de *Hiphomycetes* (Marasas *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1994). Por ello la definición original ha sufrido una serie de modificaciones quedando como: *especies con macroconidios fusoides, ligeramente curvados, septados y con una célula basal pedicelada; con microconidios y clamidosporas terminales o intercalares, que pueden estar ausentes o presentes* (Nelson *et al.*, 1994).

Los primeros registros de problemas provocados por *Fusarium*, se presentaron a mediados del siglo XIX, donde Martius llevó a cabo una investigación y reportó a este género como el agente causal de la podredumbre en tubérculos de papas almacenadas. Sin embargo, fue hasta finales del siglo XIX cuando se descubrió su importancia como causante de enfermedades en plantas. Los primeros estudios que demostraron la patogenicidad de *Fusarium* en plantas vivas se publicaron entre 1892 y 1899 (Booth, 1984).

Otro factor importante en la clasificación de hongos filamentosos es la reproducción. Los hongos con formas anamórficas, conocidos también como deuteromicetos u hongos imperfectos, en los que se han incluido las formas asexuales de muchas especies de hongos filamentosos, se clasifican con base en su morfología asexual aunque se les conozca su forma teleomórfica (sexual) (Carlile, *et al.*, 2001). Este hecho solo ocurre para el 5 % de las especies anamórficas descritas (Seifert y Gams, 2001). Los principales géneros en los que se agrupan las formas teleomórficas de *Fusarium* son *Gibberella*, y algunos géneros segregados de *Nectria*. Dentro del género *Fusarium* existen especies que presentan reproducción sexual, como miembros del complejo de *F. solani*. Este hecho dificulta la clasificación, ya que, tradicionalmente las formas sexuales de una especie se han incluido en un grupo diferente y con un nombre distinto de las que presentan las formas sin reproducción sexual. Especies del género *Fusarium*, situado dentro de los hongos anamórficos, se corresponden a las formas sexuales del orden *Hipocreales*. Este orden se sitúa dentro de los pirenomicetos, un grupo descriptivo más que un término taxonómico real aunque la mayoría de los hongos pertenecientes a este grupo formen probablemente un grupo monofilético (Samuels y Blackwell, 2001).

La importancia de *Fusarium* como patógeno de plantas se debe al daño que causa y a la dificultad para controlarlo. Este género se puede dividir en tres grupos en función del tipo de enfermedad que produce. Un primer grupo, cuyo representante principal es *F. oxysporum*, y cuyos integrantes provocan marchitez vascular en el huésped. En segundo lugar, estarían las podredumbres de raíz causadas principalmente por *F. solani* y por último las especies que provocan enfermedades en las plantas de las gramíneas (*F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* y *F. culmorum*) (Price, 1984).

### **5.5.1. Virulencia del género *Fusarium***

Una característica asociada con la virulencia de *Fusarium* spp. es su amplia distribución, atribuida a la capacidad para crecer en gran número de ambientes y a su eficaz mecanismo de dispersión, dicho hongo también sobrevive en el suelo como saprófito o en restos vegetales, donde en algunos casos puede mantenerse viable hasta por 10 años (Kant *et al.*, 2011).

Cuando una planta sana crece en suelo infestado por el hongo, el contacto con las raíces induce la germinación de los conidios, el tubo germinativo de la espora o el micelio penetra directamente por el ápice de las raíces o ingresa a estas, a través de heridas o de los puntos de formación de las raíces laterales. El micelio avanza por medio del córtex de las raíces intercelularmente y cuando alcanza los vasos del xilema entra por los extremos. El micelio permanece en los vasos y se mueve a través de ellos, principalmente, hacia arriba, hacia el tallo y la corona de la planta (Agrios, 2005).

En los vasos, el micelio se ramifica y produce microconidios, que son liberados y llevados hacia el ápice en la corriente de la savia. Los microconidios germinan en el punto en donde el movimiento se detiene, el micelio penetra la pared superior del vaso y se producen más microconidios en el próximo vaso. El micelio también avanza lateralmente, dentro de los vasos adyacentes, penetrando por los extremos. La combinación de estos procesos, llamado taponamiento de los vasos por micelio, esporas, gel, gomas y tálides y el aplastamiento de los vasos por proliferación de células adyacentes de parénquima, es la responsable de la marchitez (Yadeta y Thomma, 2013). Luego, el hongo invade todos los tejidos, alcanza la superficie externa de la planta muerta y allí esporula. Las esporas pueden ser diseminadas a nuevas plantas por el viento y el agua. *Fusarium* puede diseminarse a distancias cortas, mediante el agua, equipos agrícolas y herramientas infestadas por el hongo y a distancias largas, por medio de plantas enfermas o suelo adherido a ellas. Una vez que el suelo es infestado, permanece así indefinidamente (Dixon y Tilston, 2010).

### 5.5.2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) produce marchitez vascular en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L). En 1895 fue descrita por Masee (Masee, 1895) y ha sido encontrada en al menos 32 países. La enfermedad continúa apareciendo como consecuencia del cultivo intensivo del tomate, siendo esta una de las más destructivas. El hongo penetra por heridas o aberturas naturales de las raíces, invadiendo al xilema y propagándose en forma ascendente hacia el tallo y la corona de la planta. El micelio se ramifica y produce microconidios que son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta en el torrente de la savia. La obstrucción de los vasos por conidios produce un déficit de agua en las plantas afectadas, ocasionando que los estomas se cierren, las hojas se marchiten y la planta muera (Agrios, 1986).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) es un hongo que se presenta principalmente como saprófito en el suelo, o también como patógeno especializado. La denominación forma especial, o en latín, *forma speciale* (f. sp.), se determina de acuerdo con la planta hospedante que afecte. Es posible distinguir razas fisiológicas dentro de una misma forma especial (Garcés *et al.*, 2001).

Esta enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo causando grandes pérdidas económicas en el cultivo de tomate. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de hasta seis años. Su desarrollo se ve favorecido a una temperatura óptima de 20 °C pero su rango va de los 12 °C a los 28 °C, asociado a alta humedad relativa. Se caracteriza por ser un hongo muy variable debido a su especificidad y virulencia. Dicha variabilidad también se manifiesta por la presencia de razas fisiológicas numeradas del uno al tres (R1, R2 y R3) (González, 2006).

Este hongo por lo general ataca durante los periodos cálidos del año. Prefiere los suelos arenosos y ácidos, las plantas son más sensibles a la enfermedad cuando necesitan nitrógeno, fósforo y calcio, cuando están sometidas a días cortos y poco luminosos. El ataque fuerte de nematodos como *Meloydogine* spp., o cuando las plantas han sufrido asfixia radical favorece la incidencia de la enfermedad, aún en plantas consideradas previamente, como resistentes a *Fusarium* (Blancard, 1992).

#### **5.5.2.1. Distribución mundial de la fusariosis vascular del tomate**

*Fusarium* se encuentra distribuido por todo el mundo, aunque Carrillo-Fasio *et al.*, 2003, señalan que presenta mayor incidencia en regiones de clima cálido. Para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) se reportan tres razas fisiológicas, de las cuales las razas 1 y 2 presentan distribución mundial, mientras que la raza 3 tiene menor distribución geográfica (Reis *et al.*, 2005). Las razas fisiológicas se distinguen por su virulencia a cultivares de tomate diferenciales como lo son: Bonny Best, sin genes de resistencia; Manapal, resistente solo a la raza 1; Walter, resistente a las razas 1 y 2; e I3R3, resistente a la raza 3. La raza 1 se describió en 1886 y la 2 se reportó en 1945 en Ohio, EUA. La raza 3 se observó en Australia en 1978 y en California, Florida, Georgia, Arkansas, Carolina del Norte y Tennessee, EUA; mientras que en México se reportó en 1996 (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996), y en 2005 en Brasil (Reis *et al.*, 2005).

#### **5.5.2.2. Panorama nacional de la fusariosis vascular del tomate**

En México, se ha reportado a *Fol* razas 1, 2 y 3 en Sinaloa (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003, Valenzuela *et al.*, 1996), San Luis Potosí, Nayarit (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008), Baja California Sur (Holguín, 2005); y en Morelos las razas 2 y 3 (Ortega, 2010).

#### **5.5.2.3. Panorama estatal de la fusariosis vascular del tomate**

En México es importante la producción de tomate debido a que se encuentra en continuo aumento la demanda y producción del mismo. Sin embargo, en cuantiosas ocasiones su rendimiento se ve mermado por la incidencia de diversas plagas y enfermedades (Pelegrín *et al.*, 2004).

Una de las zonas de relevancia en la producción de alimentos en la República Mexicana, es el noroeste de México, el cual está conformado por los estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora (Martínez-Ruíz *et al.*, 2016).

La producción de tomate en Sinaloa se encuentra afectada por diversos microorganismos los cuales son causa de enfermedades, destacando la marchitez del tomate provocada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*).

La marchitez o fusariosis se encuentra presente en gran parte de las zonas productoras de tomate del estado de Sinaloa. En el año 2003 un muestreo de raíces y tallos de plantas con sintomatología de *Fol* que se colectaron en 20 campos hortícolas del valle de Culiacán, Sinaloa, permitiendo concluir que, de los 40 aislamientos, el 60 % correspondieron a la raza 2, el 40 % a la raza 3 y no se encontró la raza 1 (Carillo-Fasio *et al.*, 2003).

Posteriormente, en marzo de 2003 Ascencio-Álvarez *et al.* (2008), encontraron la presencia de esta enfermedad en el valle de Culiacán, Sinaloa, en 29 cepas donde se pudo aislar e identificar a nivel razas de *Fol*, el 24 % correspondió a la raza 1, 14 % a la raza 2 y 62 % a la raza 3.

En un estudio más reciente en el año 2008 sobre la presencia de esta enfermedad en Sinaloa, se determinó que de las 26 cepas aisladas de *Fol* a nivel razas, 88 % corresponde a la raza 3, el 12 % a la raza 2 y no se encontró la raza 1 (Sánchez-Peña *et al.*, 2010).

Lo anterior probablemente se debe a que en la actualidad existe una mayor disponibilidad de variedades tolerantes a las razas 1 y 2, las cuales evolutivamente aparecieron primero que la raza 3 (SAGARPA, 2005).

#### **5.5.2.4. Síntomas en el cultivo de tomate ocasionados por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici***

La marchitez ocasionada por *Fol*, inicia con un ligero aclaramiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes más extremos, posteriormente ocurre la epinastia de las hojas inferiores, previo al achaparramiento, amarillamiento de las hojas inferiores, formación ocasional de raíces adventicias, marchitamiento de hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis marginal de hojas persistentes y finalmente la muerte. Sin embargo, el único síntoma característico de la enfermedad es la necrosis de los haces vasculares, fácilmente apreciable mediante un corte transversal del tallo infectado, donde se observan los haces vasculares de color oscuro, formando un anillo. La marchitez de la planta es producto probablemente de la obstrucción de los vasos del xilema por el micelio,

esporas, geles y tilosas, así como por la acción individual o combinada de toxinas, enzimas hidrolíticas y reguladores de crecimiento (González y Sánchez, 1980).

La infección por *Fol* ocurre en las raíces, generalmente donde hay heridas. El sistema vascular de la raíz, hipocótilo, tallo y pecíolos se puede descolorar ya que el tejido se torna café rojizo, ocasionando el taponamiento del sistema vascular, lo cual produce un leve amarillamiento y envejecimiento prematuro de las hojas inferiores, lo que se hace más pronunciado y afecta a las hojas más jóvenes sin que la planta llegue a marchitarse. El raquitismo se ocurre cuando la infección tiene lugar en estado de plántula, siendo más grave el daño, en condiciones de alta humedad en el suelo (Bolkan, 1980).

Una parte del tallo tiene un ligero amarillamiento longitudinal, el cual al avanzar se transforma en bandas amarillas bastante notorias que se tornan ligeramente pardas en su parte central y luego se convierten en áreas de necrosis beige a marrón claro, apenas cóncava en el centro de la banda que por debajo, al remover la corteza y parte del tallo, presenta la coloración café de los vasos del tallo, más visible en ciertos lugares, dándole un aspecto de estriado obscuro. En el follaje se presenta amarillamiento unilateral de un foliolo o bien, amarillamiento unilateral del raquis de una hoja (Blancard, 1992).

#### **5.5.2.5. Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

*Fol* es un hongo cosmopolita, cuyo ciclo de vida incluye una etapa de crecimiento saprofito y una de crecimiento parasitario, con distintas fases en cada uno de ellos (Beckman, 1987).

Este patógeno habita en el suelo y sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectados que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero es más frecuente como clamidosporas. Cuando las plantas sanas se desarrollan en un suelo contaminado, los tubos germinales de las esporas o el micelio penetran directamente en las puntas de las raíces o entran en estas últimas a través de heridas o a nivel de la zona donde se forman las raíces laterales (Agrios, 2004).

*Fol* tiene la capacidad particular que exhiben ciertas cepas del hongo de producir una patología en una determinada especie de planta o grupo, debido a que solamente las plantas hospedantes y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos

nutricionales del hongo y, por lo tanto, puede desarrollarse solo en este tipo de plantas (Nelson, 1981; Gordon y Martyn, 1997).

Una vez que el micelio está dentro de los tejidos de la planta, se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilémicos, entra en ellos a través de las punteaduras. Se mantienen entonces exclusivamente en los vasos y viaja a través de ellos, principalmente en sentido ascendente, hacia el tallo y la corona de la planta. Cuando se encuentra en los vasos, dicho micelio se ramifica y produce microconidios, los cuales son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta a través de la savia. Los microconidios germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente, el micelio penetra la pared superior del vaso y el hongo produce más microconidios en el siguiente vaso. El micelio del hongo avanza también lateralmente en los vasos adyacentes, en los que penetra a través de las punteaduras (Agrios, 1999).

Una vez invadida la planta el patógeno excreta enzimas pectolíticas que destruyen la lámina del parénquima del xilema. Las células perenquimatosas mueren y toman una coloración café, lo cual se observa como un anillo cuando se corta el tallo transversalmente. El hongo excreta toxinas, como la lycomarasmina causando necrosis en las nervaduras de las hojas. Una segunda toxina es el ácido fusárico que además de marchitez produce manchas acuosas en las hojas y coloración café en el tejido vascular. El efecto combinado de las toxinas, el taponamiento por el hongo, la formación de tylosis y el taponamiento por el gel formado por la mezcla de los productos pectolíticos degradados y los contenidos celulares, probablemente contribuyan al marchitamiento de las plantas afectadas por el patógeno (Agrios, 1999).

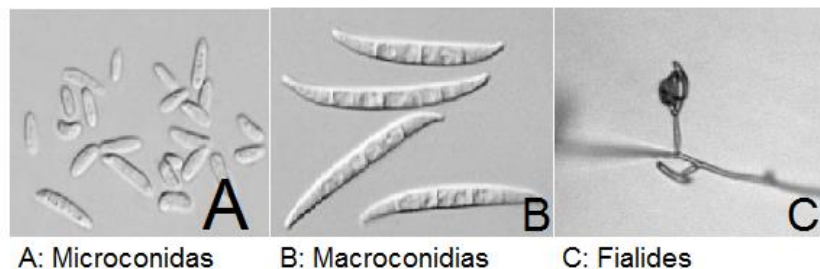
Según Agrios, (1999) este hongo también puede ocasionar la contaminación de las semillas en los frutos de las plantas infectadas, esto sucede principalmente cuando la humedad del suelo es alta y la temperatura relativamente baja, condiciones que también son favorables para el desarrollo del cultivo de tomate aunque sean infectadas por el hongo. Sin embargo, es frecuente que los frutos infectados se pudran, se desprendan y, que incluso después de haber sido cosechados, sus semillas infectadas sean tan ligeras que se eliminan durante los métodos de extracción y limpieza de las semillas, lo cual hace que casi no tengan importancia alguna en la propagación del hongo.



#### 5.5.2.6. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum*

Este patógeno produce micelio abundante, de color blanco a oscuro pero usualmente con tintes púrpuras. Originados sobre fiálides simples, los microconidios son variables, de ovals a elipsoidales, cilíndricos, rectos o curvados, con un tamaño de 5-12 x 2.2-3.5  $\mu\text{m}$ . Los macroconidios poseen de 3-5 septas, son fusoides, terminados en punta ambos lados, con diferentes tamaños según el número de septas: con 3 septas, 27-46 x 3-5  $\mu\text{m}$ ; con 5 septas, 35-60 x 3-5  $\mu\text{m}$ ; de 6-7 septas, 50-66 x 3.5-5  $\mu\text{m}$ . Las esporas de 3 septas son las más comunes. Las clamidosporas generalmente son abundantes, de pared gruesa, terminales o intercalares, hialinas o subhialinas, globosas de 1 célula, de 6.4-11.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente solitarias pero ocasionalmente formadas en pares o grupos (Barron, 1968; Booth, 1971; Holliday, 1980; Carris y Glawe, 1989). Respecto a los conidióforos, estos son alargados con microconidios hialinos, pequeños, elípticos; clamidosporas de 1-2 células; macroconidios finos, alargados con 3-5 células y de pared delgada; la masa de esporas de color ocre, rosa o amarillo (Mendoza, 1996).

Booth (1971) menciona que la forma y tamaño de las esporas son las características principales para el reconocimiento de *Fusarium*. Este cuenta con numerosas estructuras llamadas esporodoquios donde se agrupan las esporas. Existen dos tipos de conidios, los macroconidios que son hialinos, tabicados, generalmente con tres tabiques y microconidios más pequeños hialinos, unicelulares (Figura 2). Posee células de paredes engrosadas que actúan como estructuras de resistencias denominadas clamidosporas, pueden ser terminales o intercalares. Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula.



**Figura 2.** Macroconidios y microconidios de *Fol* (Leslie y Summerell, 2006).

Las especies del género *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporas: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos de esporas, mientras que otras especies no.

El macroconidio es la estructura principal para caracterizar a la especie y al género *Fusarium*; su forma y tamaño varía según la especie. Este se puede formar en una estructura especializada llamada esporodoquio, como también en monofiálides, polifiálides y en el micelio aéreo. Para algunas especies el microconido es una característica relativamente constante y estable, pero se debe utilizar cautelosamente como criterio taxonómico. La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica de *Fusarium*, pero varios géneros de *Coelomyces* también la tienen (Nelson *et al.*, 1983; Seifert, 2001; Samson *et al.*, 2004; Leslie y Summerell, 2006).

El microconidio es un carácter primario en taxonomía del género *Fusarium* y se considera su presencia o ausencia. Si el microconidio está presente, las características consideradas son: forma, modo de formación, si está solo, en falsas cabezas, en cabezas o en cadenas. Estos se forman en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides pero no en el esporodoquio. Se pueden ver aislados, en masas o en cadenas. La forma en la que son producidos se observa mejor en un medio con sustrato natural como el agar-clavel (Samson *et al.*, 2004; Leslie y Summerell, 2006).

La presencia o ausencia de clamidosporas es también un carácter importante en la taxonomía del género *Fusarium*. Si están presentes, pueden estar solas, en pares, en grupos, o en cadenas. Su pared puede ser gruesa, rugosa o lisa. Es una spora de supervivencia ante ambientes adversos que garantiza la propagación y supervivencia del hongo (Samson *et al.*, 2004; Leslie y Summerell, 2006).

#### **5.5.2.7. Clasificación taxonómica de Fol**

De acuerdo con el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2017) la clasificación taxonómica de *Fusarium oxysporum* es la siguiente:

**Reino:** Fungi

**División:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Nectriaceae

**Género:** *Fusarium*

**Especie:** *F. oxysporum*

Algunas especies tienen un estado sexual reconocido dentro de la familia Nectriaceae, orden Hypocreales; los géneros que representan a *Fusarium* como teleomorfo son *Albonectria*, *Gibberella* y *Haematonectria* (Leslie y Summerell, 2006).

#### **5.5.2.8. Razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

A continuación, se presenta una descripción de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de acuerdo con Cauich, *et al.* (2008). El marchitamiento vascular del tomate por *Fusarium* fue primeramente descrito por Masse en 1885 en las Islas de Wight y Guernsey, situadas en el canal de la Mancha. En el año de 1899, la enfermedad se encontraba ya reportada en los Estados Unidos de América causando severas pérdidas en las áreas dedicadas al cultivo en el norte del estado de Florida (Smith, 1899). En 1940 reportaron que la enfermedad se encontraba diseminada en todo el mundo (Bohn y Tucker, 1940), y hasta esta fecha se desconocía la ocurrencia de variabilidad patogénica en este hongo. Cinco años más tarde, se determinó la presencia de una raza nueva en Ohio, que se le denominó como raza 2 (R2) (Alexander y Tucker, 1945); su identificación se debió a que todos los materiales que presentaban resistencia a la raza 1 (R1) fueron atacados severamente, incluyendo 160 materiales de *Lycopersicon pimpinellifolium* (Walker, 1971). El descubrimiento de R2 originó estudios en Florida encaminados a la búsqueda de fuentes de resistencia (Alexander y Tucker, 1945), la cual se identificó en la colecta P. I. 126915 de *Lycopersicon pimpinellifolium* x

*Lycopersicon esculentum*, tanto para R1 como para R2, siendo monogénica dominante. Lo anterior permitió cuatro años más tarde, obtener un nuevo cultivar, que se denominó Walter (Stall y Walter, 1965). Grattidge y O'Brien (1982) encontraron una nueva raza de *Fol* en Queensland, Australia, área considerada como el mayor centro de producción de tomate, y en donde no se habían tenido problemas de marchitez desde 1978 a 1980 (Grattidge, 1982). En esta región, las variedades Walter y Floradade resistentes a R1 y R2 eran ampliamente cultivadas, y fue a partir de 1980 en que dichas variedades empezaron a tener problemas con marchitamiento por *Fusarium*. De estas plantas se realizaron aislamientos y pruebas de inoculación en plantas diferenciales, concluyéndose que se trataba de una nueva raza, a la cual designaron como raza 3 (R3).

#### **5.5.2.9. Genes de virulencia y proteínas efectoras. Patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

Existen evidencias de que los hongos patógenos reconocen al hospedante y así poder penetrar a las plantas, superar las defensas de la planta y posteriormente invadir dentro de las mismas. El hongo percibe las señales químicas y físicas de la planta y responde con el crecimiento de las hifas, la infección de las estructuras, la adhesión a la superficie vegetal, y la secreción de enzimas líticas y fitotoxinas, respuestas requeridas para el desarrollo patogénico (Di Pietro *et al.*, 2001).

*Fol* secreta enzimas y proteínas cuando coloniza los vasos xilemáticos de la planta de tomate, las cuales promueven la colonización del hospedante, por la supresión de los mecanismos de resistencia basales (Houterman *et al.*, 2007). El número de proteínas, se relaciona con la virulencia de un patógeno hacia un hospedante particular (Speth *et al.*, 2007).

Existen 11 proteínas identificadas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, las cuales se denominan proteínas secretadas en el xilema (SIX, por sus siglas en inglés) (Houterman *et al.*, 2007; Lievens *et al.*, 2009). Tres de estas proteínas son contrarrestadas por los genes I de tomate: Avr1 (SIX4) es reconocida por los genes I e I-1 (Houterman *et al.*, 2008), Avr2 (SIX3) es reconocido por I-2 (Houterman *et al.*, 2009); y Avr3 (SIX1) es reconocido por I-3 (Amaral *et al.*, 2008).

#### **5.5.2.10. Proteínas secretadas en el xilema**

La primera proteína secretada en la planta que se identificó de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, fue llamada SIX1, es una pequeña proteína rica en cisteína necesaria para la virulencia total en el tomate (Rep *et al.*, 2005). Además, el reconocimiento de la proteína por las plantas de tomate que llevan el gen de resistencia I-3 conduce a la resistencia a la enfermedad (Rep *et al.*, 2004). Por lo tanto, SIX1 también se llama Avr3 para indicar su relación gen por gen con el gen de resistencia I-3. Más recientemente, se identificaron proteínas fúngicas adicionales a partir de la savia de xilema de las plantas infectadas, que abarcan las pequeñas proteínas secretadas SIX2, SIX3, SIX4, SIX5, SIX6 y SIX7, una arabinanasa, una oxidorreductasa y una serina proteasa (Houterman *et al.*, 2007).

La función de la mayoría de estas pequeñas proteínas es desconocida hasta ahora, para dos de ellas, se ha establecido una función de avirulencia utilizando experimentos de desactivación de genes. Estos son SIX4 (Avr1), que se requiere para la resistencia mediada por I e I-1 (Houterman *et al.*, 2008) y SIX3 (Avr2), que se requiere para la resistencia mediada por I-2 (Houterman *et al.*, 2009). Además, se encontró que SIX4 / Avr1 suprimía la resistencia a la enfermedad mediada por I-2- y I-3 (Houterman *et al.*, 2008). Se cree que las cepas de la raza 2 se originaron por la pérdida de AVR1 (SIX4) de las cepas de la raza 1, mientras que las cepas de la raza 3 parecen haber evolucionado desde la raza 2 hasta las mutaciones puntuales en AVR2 (SIX3). El fuerte vínculo entre estos genes SIX y la patogenicidad hacia el tomate los convierte en excelentes marcadores para la patogenicidad específica del huésped y del cultivar (Houterman *et al.*, 2009).

#### **5.5.2.11. La relación gen por gen en el patosistema Tomate-Fol**

Los efectores son pequeñas proteínas o moléculas que alteran las células huésped y funcionan para promover el crecimiento de patógenos. Pueden o no provocar respuestas de defensa del anfitrión (Hogenhout *et al.*, 2009). Uno de los desarrollos en el campo de la investigación del marchitamiento por *Fusarium* ha sido el descubrimiento de estas proteínas efectoras producidas por *Fusarium oxysporum*. A veces una proteína efectora es reconocida por las proteínas de resistencia de plantas correspondientes, y desencadena mecanismos de defensa en las plantas. Tales efectores se definen

clásicamente como proteínas de la avirulencia. Los efectores de *Fusarium* se describen como proteínas secretadas en el xilema SIX (Rep *et al.*, 2004). Estas proteínas de resistencia R están involucradas en el reconocimiento de efectores patogénicos durante el proceso de infección y en la respuesta de defensa de la planta (Martínez–Pacheco, 2017).

Las plantas desarrollaron varias líneas de defensa en respuesta a diferentes patógenos, a través de un proceso de coevolución. Una de ellas consiste en el reconocimiento de moléculas conservadas, como la flagelina bacteriana o la quitina fúngica, las cuales están en la superficie de los microorganismos. Este reconocimiento ocurre a través de receptores transmembranas en las células vegetales, llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y provoca el desarrollo de una respuesta de inmunidad inducida, la cual, los microorganismos deben vencer para la colonización exitosa de los tejidos vegetales (Sarris *et al.*, 2016).

Otra línea de defensa reside en la presencia de los genes *R* y de sus productos: estas a diferencia de los receptores de reconocimiento de patrones, están relacionadas con la patogenicidad y responden a moléculas llamadas efectores que una vez reconocidas por estas proteínas, reciben el nombre de factores de avirulencia o proteínas de avirulencia. Debido a que la relación que se establece entre el gen *R* y su correspondiente gen del factor de avirulencia (*Avr*) en el patógeno es generalmente uno a uno, a este tipo de inmunidad se le denomina resistencia gen por gen y al evento se le denomina inmunidad inducida por efectores (Sarris *et al.*, 2016).

Los genes *R* y los receptores de reconocimiento de patrones son las dos ramas principales de la inmunidad en plantas y se definen de acuerdo al tipo, la localización del receptor, las moléculas detectadas y los componentes de las señales específicas que desencadenan (Hein *et al.*, 2009). Dado que una de las funciones de los efectores en el interior de las células vegetales es desarticular las respuestas de defensa de la planta, existe una constante carrera evolutiva entre los efectores patogénicos y los componentes de la inmunidad en plantas. Esto provoca la ocurrencia de gran selección sobre los genes

de los efectores, las moléculas de los efectores y los receptores inmunes en la planta (Dong *et al.*, 2014).

### **5.5.3. *Fusarium solani* species complex (FSSC)**

Además de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, detectados a nivel mundial causando enfermedades en tomate, también se ha descrito a *Fusarium solani* como un importante patógeno de este cultivo en distintos lugares del mundo, entre los cuales se cuentan Argentina (Wolcan y Lori, 1991), California, Australia, India, Turquía e Israel (Cucuzza y Waterson, 1992; Miyao *et al.*, 2000).

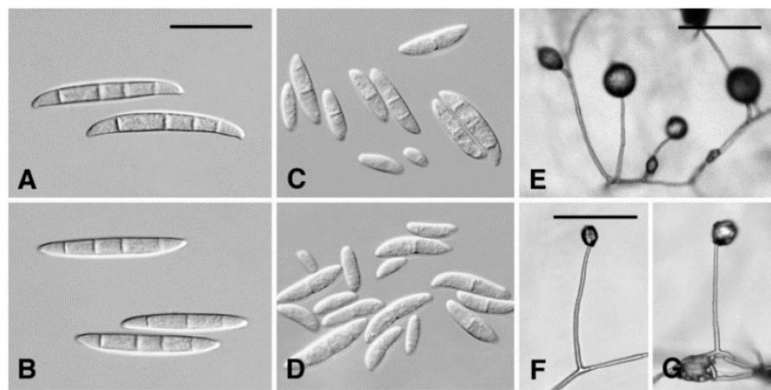
Los miembros del complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC) se conocen como patógenos de plantas, animales y humanos. Sin embargo, el estado taxonómico de un grupo tan importante de hongos sigue siendo muy confuso, muchas especies nuevas y linajes se han aclarado recientemente.

El complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC) es un grupo que se estima que actualmente contiene al menos 60 especies filogenéticamente distintas (Coleman, 2016). Los miembros del FSSC se han estudiado más ampliamente como patógenos de plantas, cuentan con un amplio rango de hospederas y se han subdividido en *formae speciales* (f. sp.) según su huésped. Análisis filogenéticos recientes han revelado que cada *forma especial* corresponde a una especie, biológica y filogenéticamente distinta (Coleman, 2016; O'Donnell *et al.*, 1998).

*Fusarium solani* (FSSC) puede distinguirse de otras especies de *Fusarium* gracias a sus características morfológicas, presencia de clamidosporas, longitud de las monofialidas, y tamaño y forma de las macroconidias y microconidias (Leslie y Summerell, 2006). *F. falciforme* forma parte del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC, por sus siglas en inglés), al igual que *F. solani*, comparten características morfológicas similares.

### 5.5.3.1. Características morfológicas de *Fusarium solani* species complex (FSSC)

Desarrolla abundante micelio aéreo, blanco o con tonos rosados. Los microconidios típicos de forma ovoide a fusiforme, o ligeramente curvados cuando son septados, de 0 a 2 septas con un tamaño de 9.6-14.9 × 4.0-6.3 μm. Los macroconidios dispersos curvados, células centrales anchas y de 0 a 4 septas. Con un tamaño de 29.5–50.3 × 5.0–8.1 μm (n = 50). Las clamidosporas terminales e intercalares, simples y en cadenas; generalmente unicelulares y globosas, ocasionalmente de 2 (Figura 3). (Leslie y Summerell, 2006).



A-B: Macroconidios; C-D: Microconidios; E-G: Filídes.

**Figura 3.** Macroconidios y microconidios de *Fusarium solani* species complex (FSSC) (Leslie y Summerell, 2006).

### 5.5.3.2. Distribución mundial de *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4)

Dentro de este complejo de especies de *Fusarium solani* sobresale *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) el cual ha sido reportado en los últimos años causando marchitamientos y pudriciones en varias especies de plantas; el primer reporte de *F. falciforme* fue realizado por Cabral *et al.*, (2016) quienes reportaron a *F. falciforme* como agente causal de la pudrición de la raíz del garbanzo en Brasil; Sousa *et al.*, (2017) reportaron a *F. falciforme* en 2017 causando la pudrición de la raíz en frijol lima también en Brasil; Gupta *et al.*, (2019) reportaron la pudrición de la raíz y el tallo en la papaya causada por *F. falciforme* en la India.



### **5.5.3.3. Panorama nacional de *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) en la agricultura**

En México, Tirado *et al.* (2018), reportaron la podredumbre basal de la cebolla causada por *F. falciforme*; Rentería *et al.* (2018), reportaron la pudrición radicular en plantas de sandía en Sonora, causada por *F. falciforme*; Vega *et al.* (2019), reportaron la podredumbre de la raíz en papaya en Sinaloa, México causada también por *F. falciforme*. Recientemente Douriet *et al.* (2019) reportaron a *F. falciforme* causando la podredumbre del tallo del maíz en Sinaloa, México.

## **5.6. Ecología y evolución de las poblaciones de hongos**

El rol de los hongos en los ciclos biogeoquímicos suele estudiarse superficialmente. Para su enseñanza, algunas generalidades sobre los hongos deben tomarse en cuenta: los hongos tienen características de plantas, bacterias, y animales, pero forman su reino aparte, más cercano a los animales que a las plantas; evolutivamente, se separaron de otros linajes hace aproximadamente 1,500 millones de años, pero colonizaron la tierra hace unos 400 millones de años (Brundrett, 2018); son organismos heterótrofos con una pared celular de quitina; incluyen hongos microscópicos como levaduras y mohos, pero también hongos macroscópicos que forman cuerpos fructíferos o setas; crecen vegetativamente y se reproducen mediante la dispersión de esporas en el aire, agua, y en el suelo mediante animales. Aunque actualmente se han descrito unas 120,000 especies de hongos, mediante métodos moleculares se ha estimado que podrían existir entre 2.2 a 3.8 millones de especies (Hawksworth, 2017).

Dentro de los ecosistemas terrestres, básicamente son tres los roles ecológicos de los hongos: descomposición, simbiosis mutualista y parasitismo. La descomposición de diferentes formas de materia orgánica (madera, animales muertos, hojarasca, etc.), es uno de los roles más importantes de los hongos, dado que mediante este proceso se da un reciclaje de nutrientes en el ecosistema, algunos provenientes de sustratos de difícil degradación, como la madera (Robledo, 2007). Respecto a las simbiosis mutualistas, además de los líquenes, debe darse un gran énfasis en los hongos micorrízicos, los que hacen simbiosis con el 92% de las plantas vasculares, y han permitido la colonización y diversificación de las plantas en la tierra (Brundrett, 2018).

Agrios, (2005) menciona que algunos hongos patógenos de plantas pasan parte de su vida en su hospedante, y otra parte en el suelo o en los residuos vegetales, otros pasan todo su ciclo de vida sobre la planta hospedante y solo sus esporas alcanzan el suelo, donde permanecen en reposo hasta que son llevadas a un hospedero en el que germinan y se reproducen. Los hongos del complejo que provocan las cenicillas, se desarrollan sobre la superficie de la planta a la que infectan, pero envían sus haustorios hacia el interior de las células epidérmicas de la planta. Otros hongos deben pasar parte de su ciclo de vida como parásitos de su hospedante y parte de él como saprófitos sobre los tejidos muertos depositados en el suelo, para poder concluir su ciclo de vida en la naturaleza. Sin embargo, este último grupo de hongos se mantiene en estrecha asociación con los tejidos de su hospedante (ya sea que estén vivos o muertos) y, en la naturaleza, no se desarrollan en cualquier otro tipo de materia orgánica.

## **5.7. Técnicas de identificación de *Fusarium***

La implementación de medidas apropiadas de manejo de enfermedades requiere una identificación y detección confiable del patógeno. Existen las técnicas de identificación, como la identificación morfológica que se basa principalmente en las características de la colonia del hongo, así como de sus estructuras típicas, así mismo, se cuenta con métodos de biología molecular, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual ha proporcionado un enfoque rápido para la identificación de patógenos de plantas (O' Donnell, 2000) a través del uso de varias regiones de ADN, tales como la región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADN ribosomal (rADN) y, particularmente, el gen del factor de elongación de la traducción 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ), son útiles para la identificación de *Fusarium* spp. (O'Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004).

### **5.7.1. Identificación morfológica de *Fusarium***

Aunque existen técnicas nuevas para la identificación de especies de *Fusarium* spp, una herramienta importante y tradicional es el uso de métodos simples de identificación macroscópica que se realiza con base en la caracterización del crecimiento de colonias,

la coloración, el desarrollo de micelio y la morfología de sus estructuras en diferentes medios de cultivo. Mientras que, para nivel microscópico, se observa las formas de las fiálides, el tamaño de sus macroconidios, así como de sus microconidios. La taxonomía clásica continúa vigente, aunque requiere de mucha experiencia del técnico en el microscopio. Existen distintos medios de cultivo que permiten su crecimiento, entre ellos el papa dextrosa agar (PDA) y agar de hoja clavel (CLA, por sus siglas en inglés). En medio PDA se permite observar el diámetro de la colonia, su coloración (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) y el desarrollo del micelio, mientras que en medio CLA, se permite observar el desarrollo de cadenas de microconidias, morfología de macroconidias y el tamaño y forma de sus fiálides. Sin embargo, en el diagnóstico moderno de enfermedades fúngicas no basta con realizar la identificación morfológica, ya que existe gran similitud entre sus estructuras morfológicas, y por lo tanto resulta un problema para realizar un diagnóstico correcto de la especie. Para esto, se utilizan métodos de biología molecular para diagnosticar una enfermedad correctamente, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

### **5.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son el ADN, la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio ( $Mg^{+}$ ), una solución amortiguadora o buffer y  $H_2O$ . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay, 2013).

La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas, es considerada una enzima termoestable. Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar

y son complementarios a esta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reverse» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente). Por su parte, los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X (Tamay, 2013).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay, 2013).

De acuerdo con Jiménez *et al.* (2003), el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa se divide en las siguientes etapas:

1. Desnaturalización del ADN en dos cadenas simples por fusión a temperatura elevada (1 min. 90 – 95 °C).
2. Anillamiento de dos oligonucleótidos (iniciadores) en las cadenas originales para la síntesis de una nueva cadena disminuyendo la temperatura a (45 seg. 40 - 60 °C), estos iniciadores contienen entre 10 y 30 bases de ADN.
3. Extensión de la nueva cadena a partir de los cebadores, añadiendo nucleótidos libres en forma de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) con una temperatura elevada a (2 min. 70 – 75 °C) en la cual se incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, utilizando ADN polimerasa como catalizador cuya temperatura óptima oscila alrededor de los 72 °C e iones  $Mg^{2+}$  como cofactor.

Este ciclo se repite 25-35 veces en una reacción de PCR típica, que generalmente tarda 2-4 horas, según la longitud de la región de ADN que se copia.

#### **5.7.2.1. Marcadores moleculares**

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1983). Gracias a los avances en la biología molecular, se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares, que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Dentro de los marcadores moleculares se menciona la existencia de dos tipos: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN.

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia no típica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso, es un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés, y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (Azofeifa, 2006). Para Valadez y Kahl (2000), un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido, que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas, utilizando electroforesis o cromatografía y un marcador genético como cualquier gen, cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente (por ejemplo, un gen que ocasiona resistencia para algún antibiótico (Azofeifa, 2006).

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas, y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998).

##### **5.7.2.1.1. Gen de la región espaciadora transcrita interna ITS**

La región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADN ribosomal codificado nuclearmente (ITS rDNA) es un marcador de nivel de especie popular en estudios de filogenia de hongos y plantas (Bruns *et al.*, 1991; Baldwin *et al.*, 1995; Álvarez y Wendel, 2003). Por

lo cual se usa ampliamente para facilitar la identificación de patógenos de plantas y recientemente se ha propuesto como un marcador para hongos (Seifert, 2009). Dicho marcador está compuesto por la región codificante de rRNA 18S y 5.8S (ITS1) y entre las regiones codificantes de rRNA 5.8S y 28S (ITS2) (Porter y Golding 2011).

#### **5.7.2.1.2. Gen del Factor de Elongación EF-1 $\alpha$**

El gen del factor de elongación 1-  $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ), el cual codifica una parte esencial de maquinaria de traducción proteínica, tiene una gran utilidad filogenética, ya que es altamente conservado a nivel de especie dentro del género *Fusarium* y se han desarrollado cebadores o iniciadores universales que funcionan a través del género (Geiser *et al.*, 2004; Roger *et al.*, 1999). Esto se debe a que presenta una sola copia no ortóloga para este género. Este gen fue utilizado por primera vez como marcador filogenético para inferir las especies y nivel de género entre los lepidópteros (Cho *et al.*, 1995). Para el caso de *Fusarium*, estos cebadores fueron desarrollados para investigar linajes dentro del complejo *Fusarium oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998). Estos iniciadores amplifican una región de ~700 pb del gen EF-1 $\alpha$ , flanqueando 3 intrones que constituyen la mitad de la longitud del amplificado en todos los *Fusarium* conocidos. Este gen es encontrado consistentemente en copia simple en *Fusarium*, y tiene un alto nivel de polimorfismo, aun cuando es comparado con las porciones ricas en intrones de los genes que codifican proteínas, como la calmodulina,  $\beta$ -tubulina e histona 3 (H3). Por estas razones TEF-1 $\alpha$  se ha convertido en el marcador de elección, como herramienta para la identificación de *Fusarium* spp. (Geiser *et al.*, 2004).

### **5.8. Análisis Filogenético**

Los análisis filogenéticos de secuencias de ADN o proteínas se han vuelto una importante herramienta para estudiar la historia evolutiva de los organismos (Nei, 1996; Yang y Rannala, 2012).

Una filogenia es una historia de la división de las especies inferida a través del tiempo. Existen dos procesos involucrados en esta inferencia: estimación de la topología y estimación de la longitud de las ramas para una topología dada (Pagel, 1999; O'Meara,

2012). El método de inferencia filogenética usado en filogenética molecular puede ser clasificado en tres grandes grupos: métodos de distancia, métodos de verosimilitud y métodos de parsimonia (Nei, 1996; Yang y Rannala, 2012). Sin embargo, actualmente se incluye otro método, se propone un nuevo método llamado método de unión de vecinos (Neighbor-Joining). Estos sirven para reconstruir árboles filogenéticos a partir de datos de distancia evolutiva (Saitou y Nei, 1987).

El principio del método de unión de vecinos, es encontrar pares de unidades taxonómicas operativas (OTU), que minimizan la longitud total de las ramas en cada etapa de agrupamiento de las OTU que comienzan con un árbol en forma de estrella. Las longitudes de las ramas, así como la topología de un árbol parsimonioso, se pueden obtener rápidamente mediante este método. Por lo tanto, un análisis filogenético se obtiene mediante metodologías matemáticas y es una representación gráfica, en la que se definen los grupos de individuos que comparten un ancestro en común (clados) y la similitud genética de los individuos y su comparación con la información (Nayaka *et al.*, 2011).

### **5.9. Control de la fusariosis**

El control de *Fusarium* se basa principalmente en el uso de variedades resistentes, fumigaciones al suelo y las aplicaciones de fungicidas, entre otras técnicas. La generación de variedades resistentes constituye el avance más importante para el control de esta enfermedad (González *et al.*, 2012).

Los fungicidas constituyen una herramienta valiosa en un programa de manejo integrado de la fusariosis del tomate (Yossen *et al.*, 2010). Sin embargo, la alta variabilidad genética que existe dentro de las distintas especies del género *Fusarium* dificulta seleccionar los mejores fungicidas para su control (Srivastava *et al.*, 2011).

Entre los grupos químicos eficaces para el control de *Fusarium*, se citan los sistémicos como los bencimidazoles y triazoles, y los de contacto como los imidazoles y ditiocarbamatos (Jahanshir y Dzhililov, 2010; Srivastava *et al.*, 2011).

Los bencimidazoles y triazoles se caracterizan por favorecer la formación de cepas de patógenos resistentes. Para minimizar el riesgo de aparición de resistencia, se ha enfatizado la necesidad de no realizar aplicaciones repetidas de fungicidas específicos, si no de utilizarlos alternadamente o con productos de grupos químicos no relacionados y con diferente modo de acción. Los ditiocarbamatos poseen múltiples sitios de acción en las células fúngicas y tienen un riesgo muy bajo de generar resistencia (Fishel, 2013). Sin embargo, se han encontrado aislamientos de diversos hongos fitopatógenos que presentaron resistencia y disminución de la sensibilidad al mancozeb (Sampath Kumar *et al.*, 2007; Henríquez *et al.*, 2011).



## VI. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. Área de estudio

El muestreo de los aislamientos utilizados en el presente estudio se realizó durante el ciclo agrícola otoño-invierno 2016-2017 en parcelas sembradas con tomate en el estado de Sinaloa, ubicado a los 25° 00' 10" N y a los 107° 30' 10" W, el cual presenta una altitud máxima de 2800 m. (Figura 4).

El universo del estudio lo constituyeron las 410 agrícolas productoras de tomate de Sinaloa (CESAVESIN, 2015). Se realizó un muestreo estratificado (Krebs, 1998) con cuatro niveles de acuerdo con un gradiente latitudinal. A partir de ello se determinó que el tamaño de la muestra fue de 84 unidades de producción, las cuales se convirtieron en unidades de muestra (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Distribución de las unidades de muestro por estrato

| <b>Estrato</b>    | <b>Unidades de producción</b> | <b>Tamaño de muestra (n)</b> |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Zona Norte        | 74                            | 15                           |
| Zona Centro Norte | 69                            | 14                           |
| Zona Centro       | 178                           | 37                           |
| Zona sur          | 89                            | 18                           |
| Total Sinaloa     | 410                           | 84                           |

Fuente: Elaboración propia

Dentro de ellas se aplicó a su vez un muestreo dirigido, seleccionando las plantas que presentaron síntomas característicos de la enfermedad. Como criterio para estimar el tamaño de muestra se tomó la variación de la superficie destinada a este cultivo en cada unidad de producción.



**Figura 4.** Mapa de México y del estado de Sinaloa donde fueron colectadas plantas de tomate con síntomas de *Fusarium* spp.

## 6.2. Colecta del material biológico

Se colectaron plantas de tomate con síntomas de fusariosis vascular en 84 lotes agrícolas, se tomaron al azar 15 plantas por lote, a las cuales se les realizó un corte transversal en el tallo a los 30 cm arriba de la corona para observar la necrosis de los haces vasculares y así poder tomarlas como muestra. (Figura 5).



**Figura 5.** Colecta en campo de plantas de tomate con síntomas de *Fusarium* spp.

### **6.3. Esterilizado del material**

En el laboratorio se realizó el esterilizado de los materiales como son los vasos de precipitado, pinza, agujas, navajas, entre otros. Esto se llevó a cabo en una autoclave a 20 libras de presión y una temperatura de 121 °C durante 40 minutos (Figura 6).



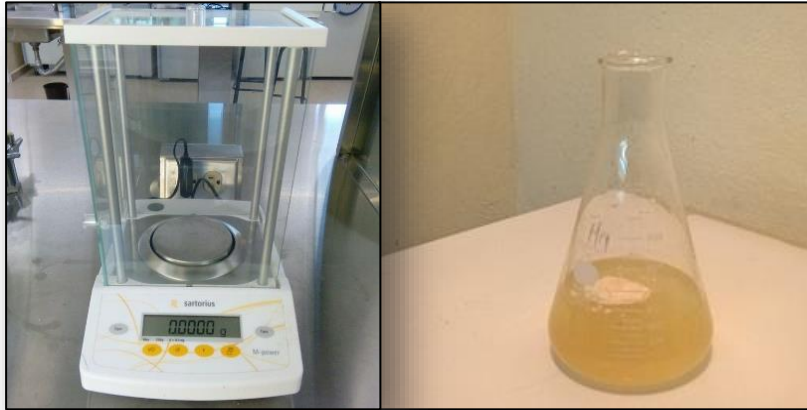
**Figura 6.** Autoclave utilizada para esterilizar los materiales de laboratorio.

#### **6.4. Aislamiento y purificación de *Fusarium* spp.**

##### **6.4.1. Elaboración del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA)**

Para la elaboración del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se utilizaron 39 gramos de medio PDA, los cuales fueron depositados en un matraz Erlenmeyer, se aforó a 1 litro con agua destilada estéril y se agitó, posteriormente se selló con papel aluminio.

Se colocó en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos, después se dejó enfriar hasta alcanzar 30 °C, posteriormente se añadieron 300 mg de sulfato de estreptomicina (para inhibir el crecimiento bacteriano) y 1.5 ml de pentacloronitrobenceno (PCNB) para evitar el crecimiento de hongos que no sean del género *Fusarium* (Figura 7) (Leslie y Summerell, 2006).



**Figura 7.** Pesado de PDA en una báscula de precisión y colocación del PDA en un matraz Erlenmeyer.

#### **6.4.2. Aislamiento de *Fusarium* spp.**

Los tallos de las plantas de tomate fueron lavados con agua destilada, posteriormente se les realizaron pequeños cortes longitudinales en porciones de 3 mm aproximadamente en el tejido infectado con navajas esterilizadas, los cuales fueron introducidos en hipoclorito de sodio al 1 % durante 1 min y se enjuagaron con agua destilada estéril por 2 min, después se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo PDA previamente rotuladas, y fueron introducidas en una incubadora a 25-28 °C, por 7 días (Figura 8) (Rodríguez y Montilla, 2002).



**Figura 8.** Colocación del tejido infectado en caja Petri con medio de cultivo PDA.

#### **6.4.3. Obtención de aislamientos monospóricos de *Fusarium* spp.**

Para obtener aislamientos monospóricos de *Fusarium* y tener una identificación confiable, es necesario partir de cultivos monospóricos que garanticen la autenticidad y pureza de los mismos, para lo cual se aplicó la metodología planteada por Hansen y Smith (1932). Se procedió a transferir el tejido crecido en medio PDA, con presencia de esporulación típica del género *Fusarium*, donde se cortó un pequeño fragmento crecido del hongo se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 2 ml de capacidad que anteriormente fue llenado con 100  $\mu$ L de agua destilada estéril (Figura 9).



**Figura 9.** Micelio desarrollado en caja Petri de los aislamientos obtenidos.

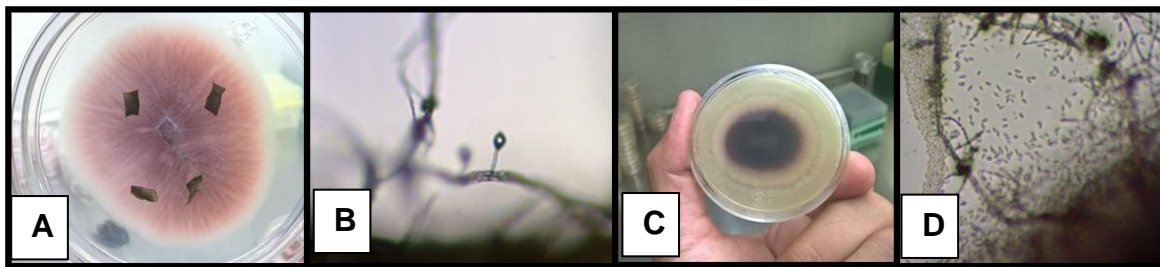
Una vez colocado el micelio en el tubo Eppendorf, se agitó con un vortex para favorecer al desprendimiento de esporas para que flotaran en el agua estéril, posteriormente se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de la dilución y se transfirieron a otro tubo que ya tenía agregado 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Este mismo procedimiento se realizó 2 veces con la misma muestra. Para la tercera dilución, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  con una micropipeta y se colocó en una caja Petri con medio de cultivo PDA, para lo cual la dilución fue distribuida e incorporada superficialmente en el medio de cultivo (Hansen y Smith, 1932). Posteriormente, cada caja Petri con la dilución se selló y etiquetó con el número de muestra correspondiente, las cuales fueron incubadas por 5 días en oscuridad a 25-28  $^{\circ}\text{C}$  para promover la germinación de las esporas. Una vez transcurridos los días se procedió obtener una espora germinada y se transfirió a una nueva caja Petri con medio PDA. El mismo procedimiento se utilizó para cada una de las muestras (Figura 10).



**Figura 10.** Técnica de diluciones seriadas para cultivos monosporicos.

### 6.5. Identificación morfológica

Una vez crecidos los aislamientos del hongo después de 14 días de incubación en medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA) a 25 °C en un fotoperíodo de 12 horas luz, analizaron en el microscopio compuesto, observándose el color de la colonia y la formación de micelio aéreo. Para caracterizar estructuras como macroconidias, microconidias y fialides, se utilizó el medio de cultivo agar de hojas de clavel (CLA) para identificar aislados de *Fusarium* spp. según los criterios propuestos por Leslie y Summerell (2006).



**Figura 11.** Características de la colonia de *Fusarium oxysporum* vista de frente de la caja petri (A), fialides característico de *Fusarium oxysporum* (B), colonia de *Fusarium oxysporum* vista de reverso de la caja petri (C), microconidios de *Fusarium oxysporum* (D).



### 6.6. Pruebas de patogenicidad y virulencia

Las pruebas de patogenicidad se realizaron utilizando los cultivares de tomate Bony Best, Manapal, Walter e I3R3. Las semillas se sembraron en charolas de poliestireno de 128 cavidades (Figura 12) con una mezcla de turba de la marca peat moss® previamente esterilizada en autoclave por 15 min a 121 °C, las cuales se irrigaron y fertilizaron de acuerdo con las recomendaciones técnicas del INIFAP (2010).



**Figura 12.** Siembra de la variedad Bonnie Best en charolas de poliestireno.

Las raíces de 20 plantas por genotipo en la etapa de dos hojas verdaderas se lavaron y se sumergieron en una suspensión conidial ( $1 \times 10^5$  UFC / ml) de cada aislamiento durante 10 minutos e inmediatamente se trasplantaron en vasos de poliestireno con capacidad de 0.5 L con turba previamente esterilizada (Figura 13).

La suspensión conidial se obtuvo recogiendo las esporas de cada aislado cultivado en PDA, con 10 ml de una solución salina isotónica. Diez plantas control de cada genotipo lavadas y suspendidas en agua antes del trasplante sirvieron como control negativo. Las

plantas se mantuvieron durante 60 días en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 12 h a 23 a 26 ° C.



**Figura 13.** Inoculación de las diferentes cepas de *Fusarium* spp.

En este ensayo se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones de una planta en cada material para la toma de datos, se observó y se registró la respuesta de las plantas inoculadas; la primer evaluación de la patogenicidad se realizó 15 días después de la inoculación, posteriormente cada 15 días después de la primer evaluación, esto con base en la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad, utilizando la escala de severidad de Marlatt *et al.* (1996), como se muestra en el Cuadro 4. El ensayo se instaló el 2 de octubre del 2017 y finalizó el 30 de noviembre ese mismo año; el segundo ensayo se realizó en diciembre del 2017.

**Cuadro 4.** Escala de severidad de acuerdo a Marlatt *et al.*, 1996.

| <b>Escala</b> | <b>Síntomas</b>  |
|---------------|--|
| 0             | Planta sana  |
| 1             | Primeros síntomas de clorosis de las hojas                         |
| 2             | Severa clorosis de las hojas, síntomas iniciales de marchitamiento |
| 3             | Graves síntomas de marchitamiento y clorosis de las hojas          |
| 4             | Planta totalmente marchita, completamente necrótica                |

El índice de severidad de la enfermedad (DSI) se calculó con la fórmula propuesta por Galanihe *et al.* (2004):

$$DSI = \sum [P \times Q / M \times N] \times 100$$

Donde P = punto de severidad; Q = número de plantas infectadas con alguna escala; M = número total de plantas observadas; N = máxima clasificación en el número de la escala.

### **6.7. Extracción del ADN**

Para la extracción del ADN, se empleó el método descrito por Ausubel *et al.* (2003), colectando el micelio del hongo con una asa bacteriológica estéril a partir del medio sólido (Figura 14); este fue colocado en mortero para ser pulverizado con nitrógeno líquido (-196 °C) con ayuda de un pistilo previamente esterilizado; el polvo resultante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se agregaron 2 mL de la solución de extracción CTAB al 2 % (100 mM de Tris.Cl (pH 8), 20 mM de EDTA (pH 8) y 1.4 M de NaCl); a la mezcla homogénea se le agregó cloroformo-alcohol isoamilico en una proporción de 24:1 y se centrifugó. Posteriormente se extrajo la fase acuosa y se agregó 1/10 volumen de solución CTAB/NaCl y se volvió a centrifugar para recuperar la fase acuosa y posteriormente, se agregó 1 volumen de la solución de precipitación CTAB 1 % (50 mM de Tris.Cl (pH8), 10 mM de EDTA (pH 8)), se centrifugó a 4 °C; se removió sin tocar la fase sobrenadante y se agregó el buffer TE de alta sal (10 mM de Tris.Cl (pH 8), 0.1 mM de EDTA (pH 8) y 1 M NaCl); posteriormente, se precipitó añadiendo 0.6 volumen de isopropanol y centrifugó a 4 °C; por último, se lavó la pastilla con etanol al 80 %, se secó y se resuspendió en un mínimo volumen de TE (0.1 a 0.5 mL por gramo de DNA).



**Figura 14.** Extracción del ADN de los aislamientos de *Fusarium* spp, con nitrógeno líquido.

### **6.8. Amplificación mediante PCR y análisis electroforético del ADN**

Para la identificación de los aislados del género *Fusarium* se han desarrollado metodologías basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, entre las que destaca la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por su elevada sensibilidad, especificidad y rapidez. Mediante esta técnica se ha llevado a cabo la identificación a nivel género y especie de los aislados de *Fusarium* spp.

El ADN extraído de aislamientos de *Fusarium* fue analizado por PCR con el primers ITS1 y ITS4 (ITS), así como también, los primers EF-1 y EF-2 (TEF) propuestos por Geiser *et al.* (2004) y O'Donnell *et al.* (1998). La mezcla de la reacción final (25  $\mu$ L) contenía 1.5  $\mu$ L de DNA, una mezcla de dNTPS (10 mM), primers (10 mM),  $MgCl_2$  (25 mM), buffer PCR, 5U de *Taq* DNA polimerasa. Las secuencias de todos los primers y condiciones de PCR se muestran en el Cuadro 5. También se utilizó el conjunto de primers para discriminar entre las razas Fol. SIX 1 se utilizó para la identificación de la forma especial *lycopersici*. SIX4 puede usarse para la identificación de cepas de raza 1, mientras que

los polimorfismos en SIX3 pueden usarse para diferenciar cepas de raza 2 de cepas de raza 3.

**Cuadro 5.** Condiciones de temperatura de alineación y primers de secuencia (ITS, TEF y SIXs) para el análisis de *Fusarium* spp. por PCR.

| Primer                 | Secuencia de Primers (5' → 3') | Tamaño del fragmento | Especie   |
|------------------------|--------------------------------|----------------------|---|
| D: EF1                 | ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC       | 700pb                | Todas las especies del género <i>Fusarium</i> <sup>ab</sup> |
| R: EF2                 | GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT  |                      |   |
| D:ITS1                 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG            | 600 pb               | Todas las especies de hongos <sup>c</sup>                   |
| R:ITS4                 | TCCTCCGCTTATTGATATG            |                      |   |
| D: Six1 P12-F2         | GTACCCTCCGGATTTTGAGC           | 992 pb               | FOL razas 1, 2 y 3 <sup>de</sup>                            |
| R: Six1 P12-R1         | AATAGAGCCTGCAAAGCATG           |                      |   |
| D: Six4 Six4-F1        | TCAGGCTTCACTTAGCATAAC          | 967 pb               | FOL raza 1 <sup>f</sup>                                     |
| R: Six4 Six4-R2        | GCCGACCGAAAAACCCTAA            |                      |   |
| D: Six3a Six3-G121A-F2 | ACGGGGTAACCCATAT TGCA          | 608 pb               | FOL raza 3 <sup>df</sup>                                    |
| D: Six3b Six3-G134A-F2 | TTGCGTGTTTCCCGGCCA             |                      |   |
| D: Six3c Six3-G137C-F1 | GCGTGTTTCCCGGCCGCC             |                      |   |
| R: Six3-R2             | GGCAATTAACCACTCTGCC            |                      |   |

D: Iniciador directo, R: iniciador reverso

a O'Donell *et al.* (1998)

b Geiser *et al.* (2004).

c White *et al.* (1990).

d Van Der Does *et al.* (2008).

e Rep *et al.* (2004).

f Lievens *et al.* (2009).

Una vez terminada la reacción, los productos amplificados se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1 %, teñidos con el colorante Gel Red 3X (biotium) y corridos a 150 V durante 30 min. Como amortiguador de corrida se usó una solución a base de NaOH-Borato 1X (SB) (Brody y Scott, 2004). Cuando el producto amplificado se separó, el gel de agarosa se expuso a una cámara de luz UV (UVP), y las imágenes se capturaron y digitalizaron mediante el programa Launch Doc-ItLS (UVP).

### **6.9. Análisis filogenético**

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando las secuencias TEF-1 $\alpha$  e ITS. Las secuencias de todos los aislados se alinearon usando Clustal W usando el programa Geneious R9. Los árboles fueron construidos por el método de unión de vecinos basado en distancias determinadas por el método de Jukes y Cantor usando 1000 réplicas de arranque. También se hizo un análisis de similitud, comparando cada una de las secuencias puestas en los arboles filogenéticos mediante una tabla de doble entrada, cabe señalar que las secuencias fueron comparadas en las bases de datos *Fusarium* ID y *Fusarium* MLST.

### **6.10. Valoración de la resistencia a diferentes fungicidas**

Se determinó la actividad inhibidora de los fungicidas en el crecimiento radial del micelio de 15 aislamientos seleccionados en PDA, los cuales contenían diferentes concentraciones de cada fungicida en las placas de Petri.

Lo fungicidas evaluados fueron Tiabendazol, Tebuconazole y Boscalid por parte de los sistémicos, y clorotalonil como fungicida de contacto. Se evaluaron con 4 dosis (Cuadro 6), los cuales se ensayaron individualmente para evaluar su efecto sobre el crecimiento del patógeno. Se transfirió micelio del patógeno al medio de PDA solidificado con las diferentes concentraciones de fungicidas y sin fungicida como testigo. Posteriormente se incubaron durante seis días a 27 °C. El crecimiento del micelio del patógeno se midió en cada placa, las cuales se compararon con el crecimiento del testigo. Cada aislamiento constituyó una unidad experimental, las cuales tuvieron una distribución completamente al azar con tres repeticiones.

**Cuadro 6.** Fungicidas evaluados para el control de *Fusarium* spp. Ingrediente activo (i.a.), nombre químico, y dosis ensayadas (D1, D2, D3 y D4) en partes por millón (ppm).

| Ingrediente<br>activo (i.a.) | Nombre químico   | Dosis (ppm) |    |     |      |
|------------------------------|--|-------------|----|-----|------|
|                              |  | D1          | D2 | D3  | D4   |
| Tiabendazol                  | 2-(4-tiazolil)-benzimidazol  | 1           | 10 | 100 | 1000 |
| Tebuconazole                 | Alfa-[2-(4 Clorofenil) etil]- alfa-(1-1 dimetiletil)1 H-1,2,4 triazol-1 etanol | 1           | 10 | 100 | 1000 |
| Clorotalonil                 | Tetracloro isoftalonitrilo   | 1           | 10 | 100 | 1000 |
| Boscalid                     | 2-cloro-N-(4''-clorobifenil-2-il)nicotinamida,                                 | 1           | 10 | 100 | 1000 |

La eficacia de control de los fungicidas se evaluó como el porcentaje de inhibición del crecimiento de las colonias para cada fungicida, con respecto al diámetro medio de las colonias de los controles. El porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio (PIRG) se calculó según la fórmula de Pandey *et al.* (1982). El porcentaje de PIRG se determinó como  $[(Dc - Dt) / Dc] \times 100$ , donde Dc fue el aumento promedio de diámetro de colonia de hongos con el testigo, y el DT fue el aumento del diámetro promedio de una colonia de hongos con el fungicida (Weitang Song *et al.*, 2004).

### 6.11. Análisis estadístico

Se realizó un análisis no paramétrico a partir de los datos obtenidos en los dos ensayos de patogenicidad, llevando a cabo la prueba de Kruskal-Wallis y una comparación de medias por la Prueba de Dunn ( $p \leq 0.05$ ), ya que los datos no cumplieron con los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas de Bartlett, aun después de ser sometidos a una transformación de raíz cuadrada. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software XLSTAT (Addinsoft, 2008).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Toma de muestras y síntomas de la enfermedad

Se realizó un muestreo en 84 lotes hortícolas del estado de Sinaloa en el ciclo agrícola otoño-invierno 2016-2017, obteniendo un total de 1050 plantas con síntomas de la enfermedad (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Coordenadas geográficas de los municipios del estado de Sinaloa donde fueron colectadas las plantas de tomate con síntomas de *Fusarium* spp.

| Municipio                | Coordenadas Geográficas    | Numero de Muestras |
|--------------------------|----------------------------|--------------------|
| El Fuerte                | 26°05'00'' N 108°45'56'' O | 148                |
| Guasave                  | 25°47'26'' N 108°38'59'' O | 99                 |
| Sinaloa de Leyva         | 25°76'52'' N 108°27'55'' O | 12                 |
| Mocorito                 | 25°45'43'' N 108°03'11'' O | 43                 |
| Angostura                | 25°37'47'' N 108°13'25'' O | 32                 |
| Navolato                 | 24°46'07'' N 107°31'46'' O | 134                |
| Culiacán                 | 24°50'12'' N 107°35'42'' O | 245                |
| Elota                    | 24°03'25'' N 106°47'55'' O | 110                |
| El Rosario               | 23°2'51'' N 105°56'54'' O  | 200                |
| Escuinapa                | 22°45'0'' N 105°50'16'' O  | 27                 |
| <b>Total de muestras</b> |                            | <b>1050</b>        |

Las plantas muestreadas presentaron clorosis en las hojas y marchitamiento principalmente (Figura15). También se observó que las plantas presentaban una severa necrosis en los haces vasculares del tallo 30 cm por encima de la base de las plantas (Figura 15c).





**Figura 15.** Fotografías de los síntomas encontrados en las plantas de tomate muestreados. **a** clorosis en las hojas; **b** marchitamiento en las hojas; **c** necrosis en los haces vasculares del tallo; **d** achaparramiento en la planta de tomate.

## 7.2. Identificación morfológica

Se obtuvieron 149 aislamientos monospóricos, los cuales se identificaron como *Fusarium* spp. basado en la morfología de sus colonias utilizando los criterios propuestos para la identificación de especies de *Fusarium* de Leslie y Summerell (2006) y Nelson *et al.* (1983). La caracterización morfológica se realizó con la ayuda de un microscopio y el programa Dino capture (Figura 16).



**Figura 16.** Caracterización morfológica de aislados de *Fusarium*.

Dentro de los 15 aislamientos patógenos de *Fusarium*, 7 aislamientos mostraron marcadores morfológicos típicos para *F. oxysporum* y 8 para *F. falciforme* (Cuadro 8).

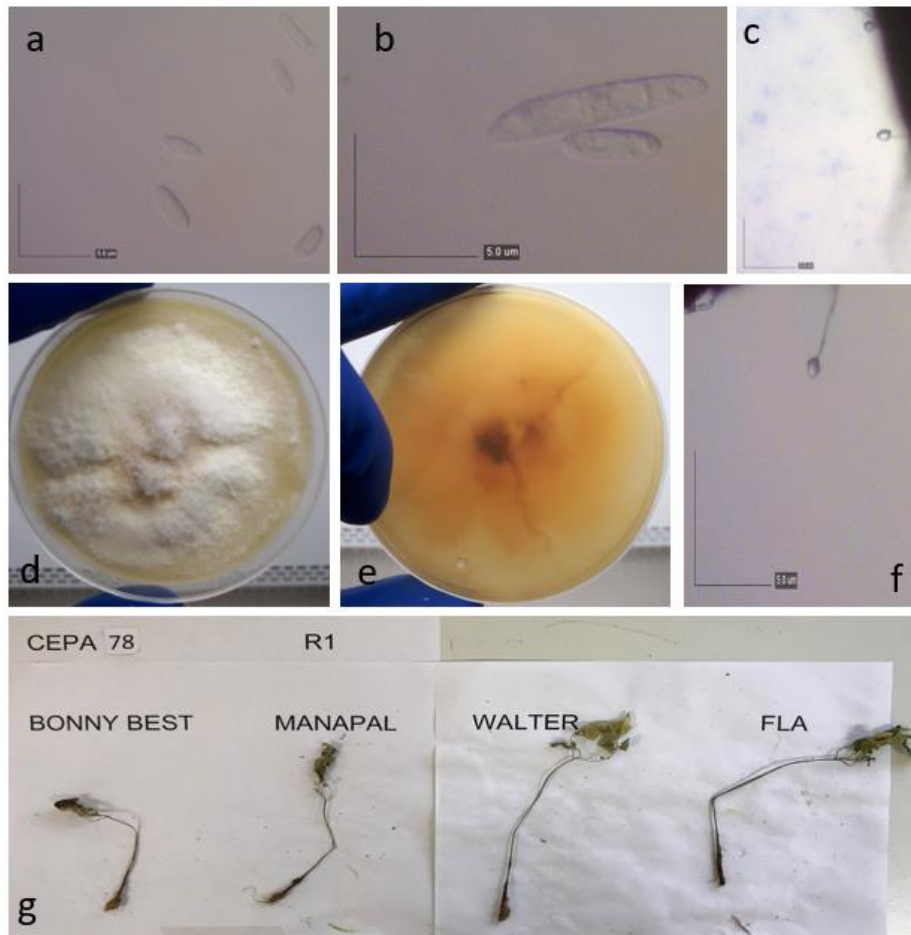
**Cuadro 8.** Caracterización morfológica de 15 aislamientos de *Fusarium* spp. de plantas de tomate en el estado de Sinaloa.

| Aislamiento                 | <sup>1</sup> Color de Micelio<br>Frente/atrás | <sup>2</sup> Macroconidias |        | <sup>2</sup> Microconidias |        |
|-----------------------------|---|----------------------------|--------|----------------------------|--------|
|                             |   | Largo / ancho (µm)         | Septas | Largo / ancho (µm)         | Septas |
| <b><i>F. oxysporum</i></b>  |   |                            |        |                            |        |
| FOB20SINELO                 | Blanco/Amarillo                               | 18-37 x 5-6                | 3-4    | 4-16 x 3.5-5               | 0-1    |
| FOB25SINGUA                 | Blanco/Marrón                                 | 17-35 x 5-7                | 3-4    | 4-15 x 3-5                 | 0-1    |
| FOB29SINESC                 | Crema/Amarillo                                | 17-32 x 4-6                | 3-4    | 6-14 x 3-4.2               | 0-1    |
| FOB30SINFUE                 | Blanco/Amarillo                               | 16-30 x 5-6                | 3-4    | 4-15 x 4-6                 | 0-1    |
| FOA62SINFUE                 | Blanco/Amarillo                               | 16-35 x 5-7                | 3-4    | 4-16 x 4-5                 | 0-1    |
| FOA64SINELO                 | Blanco/Amarillo                               | 17-30 x 5-6                | 3-4    | 5-15 x 4-5                 | 0-1    |
| FOA66SINESC                 | Blanco/Marrón                                 | 19-40 x 6-7                | 3-4    | 6-15 x 4-6                 | 0-1    |
| <b><i>F. falciforme</i></b> |   |                            |        |                            |        |
| FSB31SINGUA                 | Blanco/ Marrón                                | 29-42 x 3.5-6              | 2-4    | 3-26 x 1.5-5               | 1-3    |
| FSB39SINSIN                 | Blanco/Crema                                  | 27-36 x 5-7                | 2-4    | 4.5-17 x 1.5-3             | 1-3    |
| FSB50SINCUL                 | Blanco/ Marrón                                | 19-31 x 5-7                | 3-4    | 5-18 x 1.5-3               | 1-3    |
| FSA55SINESC                 | Blanco/ Marrón                                | 19-34 x 4-7                | 3-4    | 4-16 x 1.5-3               | 1-3    |
| FSA54SINFUE                 | Blanco/Amarillo                               | 21-35 x 4.5-7              | 2-4    | 5-20 x 1.5-3               | 1-3    |
| FSA63SINNAV                 | Blanco/ Marrón                                | 22-37 x 5-7                | 3-4    | 4-16 x 1.5-3               | 1-3    |
| FFB38SINCUL                 | Blanco/ Marrón                                | 18-33 x 5-7                | 3-5    | 6-24 x 2-4                 | 1-3    |
| FFB47SINCUL                 | Blanco/Amarillo                               | 25- 37 x 4-6               | 3-5    | 5-21 x 2-4                 | 1-3    |

<sup>1</sup>Obtenido 14 días después de la incubación en medio PDA a 20 ° C en un fotoperíodo de 12.

<sup>2</sup>Caracterizado 14 días después de la incubación en medio BLA a 20 ° C.

Los aislamientos de *F. falciforme* mostraron micelio aéreo algodonoso de color blanco, con pigmentación marrón en el fondo de la colonia. Se observaron microconidias en forma ovals con o a 2 septas, 22.5-26 x 7-15  $\mu\text{m}$  de longitud (Fig. 17a). Las macroconidias se mostraron de forma cilíndrica, ligeramente rectas y anchas con 3 o 4 septas, 68-75.2 x 12.9-19.4  $\mu\text{m}$  (Fig. 17b). No se observó la presencia de clamidiosporas.

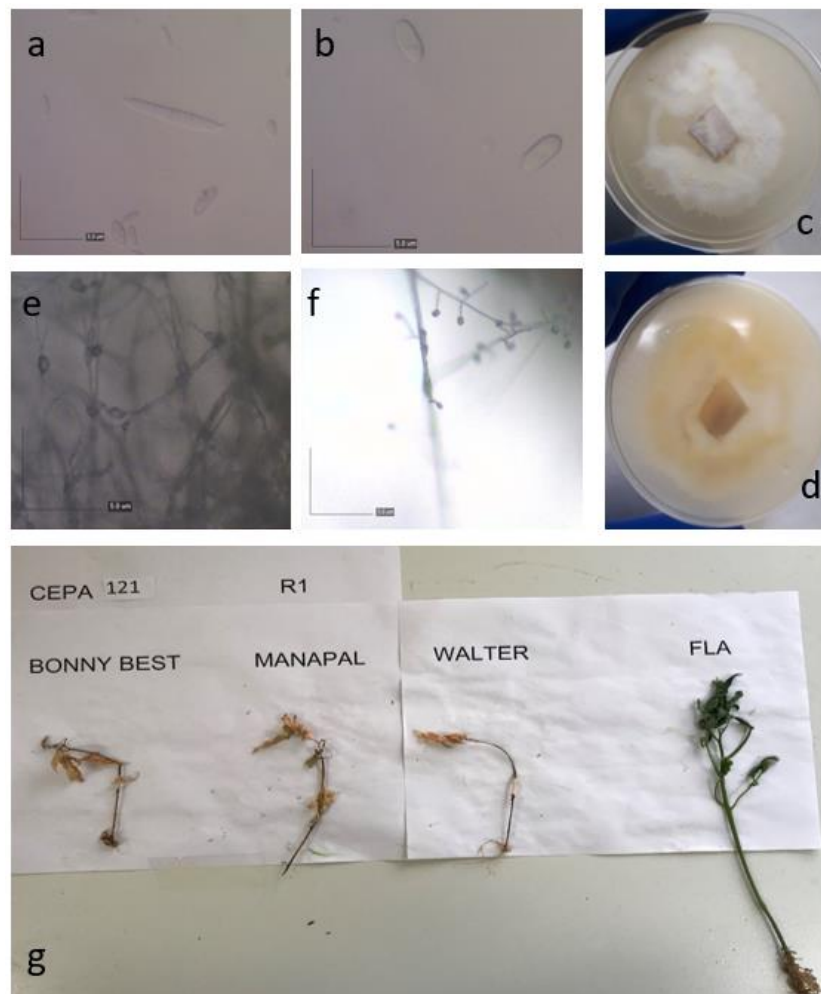


**Figura 17.** Características morfológicas de aislamientos de *Fusarium falciforme*: **a** Microconidias barra de escala= 5  $\mu\text{m}$ ; **b** Macroconidia y Microconidia barra de escala= 5  $\mu\text{m}$ ; **c y f** Fiálides barra de escala= 5  $\mu\text{m}$ ; **d** Vista superior de una colonia típica en PDA; **g** Aislamientos fúngicos de plantas de tomate enfermas.

*F. falciforme* fue la especie con mayor cantidad de aislamientos obtenidos a partir de plantas de tomate. *F. falciforme* forma parte del Complejo de Especies de *Fusarium solani* (FSSC, por sus siglas en ingles), al igual que *F. solani*, comparten características morfológicas similares; *F. solani* ha sido reportado causando la podredumbre del pie del tomate (Miyao *et al.*, 2000); Sin embargo, en el presente trabajo se reporta por vez

primera a *F. falciforme* como agente causal de la podredumbre del pie del tomate en Sinaloa (Vega *et al.*, 2018).

Los aislamientos de *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA mostraron abundante micelio algodonoso, de color blanco a crema, con una pigmentación en el fondo de la colonia que varía de amarillo a marrón (Fig. 18c). Se observaron microconidias de forma cilíndrica a renal, con ausencia de septas, 5-15 × 3-4.5 μm (Fig. 18b). Las macroconidias en forma recta, de pared delgada, 19-30 × 4-6 μm, 3-4 septas (Fig. 18a). Todos los aislamientos mostraron fiálides (Fig. 18e y 18f). Las clamidiosporas no fueron evidentes.



**Figura 18.** Características morfológicas de aislamientos de *Fusarium oxysporum*: **a** Macroconidia y microconidias barra de escala= 5 μm; **b** Microconidias barra de escala= 5 μm; **c** Vista superior de una colonia típica en PDA; **e y f** Fiálides barra de escala= 5 μm; **g** Aislamientos fúngicos de plantas de tomate enfermas.

La presencia de *F. oxysporum* en el tomate en Sinaloa, ha sido reportada por varios autores, Valenzuela *et al.*, (1996), reporto por primera vez a FOL raza 3, Carrillo *et al.*, (2003), informo la presencia de FOL raza 2 y 3 en el valle de Culiacán, Ascencio *et al.*, (2008), informo la presencia de las 3 razas de FOL en el valle de Culiacán, 1 año después Sanchez-Peña *et al.*, (2010) indica que en Sinaloa prevalece la raza 3 de FOL, estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

### 7.3. Pruebas de patogenicidad mediante cultivares diferenciales de tomate

Se utilizaron 149 aislamientos monospóricos identificados morfológicamente como *Fusarium* spp. para esta prueba, de los cuales solamente 15 (10 %) de los aislamientos fueron patogénicos para el tomate. Todas las plantas infectadas mostraron un amarillamiento inicial a partir de la primera y segunda hoja, *F. oxysporum* y *F. falciforme* presentaron síntomas aéreos similares (Figura 17g y 18g).

Al observar la respuesta de los cultivares diferenciales a la inoculación con los aislamientos de Fol colectados, se detectó la presencia de las tres razas conocidas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en 7 lotes muestreados en el estado de Sinaloa. De los 7 aislamientos patogénicos de Fol obtenidos, 5 aislamientos corresponden a la raza 3, 1 aislamiento a la raza 2 y 1 a la raza 1. Las cuales fueron determinadas con las variedades diferenciales antes mencionadas. (Fig. 19).



**Figura 19.** Pruebas de patogenicidad mediante cultivos diferenciales

Con respecto a los síntomas en las plantas inoculadas mostraron amarillamiento, marchitez, clorosis en las hojas, oscurecimiento de los tejidos vasculares y en algunas la muerte de las mismas esto dependiendo de la virulencia de cada aislamiento; mientras que las resistentes no presentaron sintomatología alguna a todas las cepas de *F. oxysporum*. Las plantas infectadas con *F. falciforme* mostraron necrosis vascular y pudrición basal, también se observó blanqueamiento de la lámina foliar. Los aislamientos variaron en la incidencia de severidad de acuerdo con la velocidad con la que causaron los síntomas de la enfermedad.

Los 15 aislamientos antes mencionados se sometieron a un análisis de PCR utilizando cebadores que fueron utilizados previamente por Lievens *et al.* (2009), amplificando las proteínas SIX1, SIX 3 y SIX 4 (Cuadro 9). En el cual los resultados obtenidos fueron similares a los de las pruebas de las variedades diferenciales antes mencionadas. SIX1 se utiliza para la identificación de la forma especial *lycopersici*. SIX4 puede usarse para la identificación de cepas de raza 1, mientras que los polimorfismos en SIX3 pueden usarse para diferenciar cepas de raza 2 de cepas de raza 3.

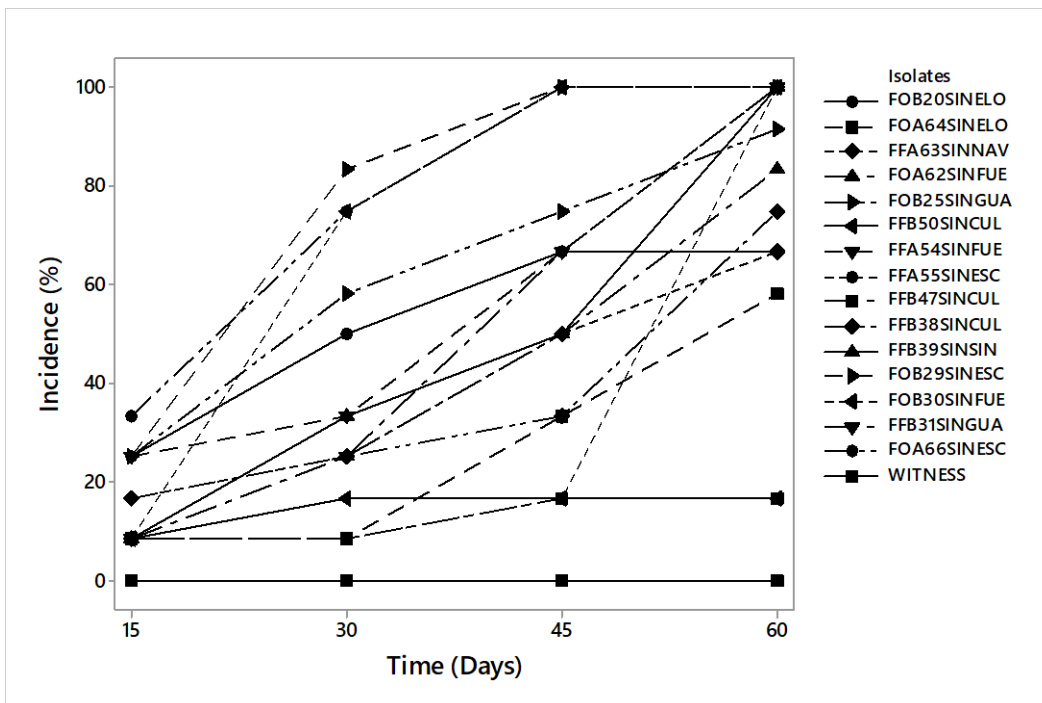
**Cuadro 9.** Diferenciación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por PCR.

| Aislamiento | Raza | Conjunto de cebadores |      |      |       |       |       |
|-------------|------|-----------------------|------|------|-------|-------|-------|
|             |      | TEF                   | SIX1 | SIX4 | SIX3a | SIX3b | SIX3c |
| FOB20SINELO | 1    | +                     | +    | +    | -     | -     | -     |
| FOB25SINGUA | 3    | +                     | +    | -    | +     | -     | -     |
| FOB29SINESC | 3    | +                     | +    | -    | +     | -     | -     |
| FOB30SINFUE | 3    | +                     | +    | -    | -     | +     | -     |
| FOA62SINFUE | 2    | +                     | +    | -    | -     | -     | -     |
| FOA64SINELO | 3    | +                     | +    | -    | -     | -     | +     |
| FOA66SINESC | 3    | +                     | +    | -    | -     | +     | -     |
| FSB31SINGUA | ND   | +                     | -    | -    | -     | -     | -     |
| FSB39SINSIN | ND   | +                     | -    | -    | -     | -     | -     |
| FSB50SINCUL | ND   | +                     | -    | -    | -     | -     | -     |

[+, Amplicón presente; -, amplicón ausente; ND, no determinada]

#### 7.4. Análisis de virulencia

En la prueba de patogenicidad los aislamientos variaron en agresividad de acuerdo con los síntomas que causaron la enfermedad en las plantas (Figura 20). El aislado FFA54SINFUE (*F. falciforme*) fue el más agresivo, el cual causó un 83.3% de severidad de la enfermedad desde la segunda semana después de la inoculación, causando la muerte de las plantas a los 45 días.



**Figura 20.** Incidencia de la enfermedad (%) causada por aislados de *F. oxysporum* y *F. falciforme* en plantas de tomate a los 60 días después de la inoculación.

Los aislamientos FFB47SINCUL y FFA63SINNAV presentaron 75 % de severidad de la enfermedad desde la segunda semana después de la inoculación, causando la muerte también a los 45 después, sin embargo, estos 3 aislamientos fueron estadísticamente iguales. Los aislamientos que mostraron una incidencia de severidad intermedia oscilaron entre 58 % y 75 % a los 45 ddi, y fueron estadísticamente iguales FFB50SINCUL, FOB20SINELO, FOB29SINESC y FOB25SINGUA, mientras que los aislamientos

FFB31SINGUA y FFB39SINSIN fueron los menos agresivos y estadísticamente iguales (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Análisis de varianza no paramétrica con la prueba de Kruskal-Wallis y comparación de medias por Dunn ( $P \leq 0.05$ )

| Muestra <sup>a</sup> | Suma de rangos <sup>b</sup> | Media de rangos <sup>b</sup> | DSI % <sup>c</sup> | Grupos <sup>*</sup> |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------|---------------------|
| FOA64SINELO          | 99,000                      | 33,000                       | 100.00             | A                   |
| FOA66SINESC          | 99,000                      | 33,000                       | 100.00             | A                   |
| FFA55SINESC          | 99,000                      | 33,000                       | 100.00             | A                   |
| FFA54SINFUE          | 99,000                      | 33,000                       | 100.00             | A                   |
| FFA63SINNAV          | 99,000                      | 33,000                       | 100.00             | A                   |
| FFB38SINCUL          | 99,000                      | 33,000                       | 100.00             | A                   |
| FFB47SINCUL          | 99,000                      | 33,000                       | 100.00             | A                   |
| FOA62SINFUE          | 81,000                      | 27,000                       | 91.7               | A                   |
| FOB30SINFUE          | 81,000                      | 27,000                       | 83.3               | A                   |
| FFB50SINCUL          | 75,500                      | 25,167                       | 75.00              | AB                  |
| FOB20SINELO          | 69,500                      | 23,167                       | 66.7               | AB                  |
| FOB29SINESC          | 63,000                      | 21,000                       | 66.7               | ABC                 |
| FOB25SINGUA          | 57,500                      | 19,167                       | 58.3               | ABC                 |
| FFB31SINGUA          | 22,500                      | 7,500                        | 16.7               | BC                  |
| FFB39SINSIN          | 22,500                      | 7,500                        | 16.7               | BC                  |
| TESTIGO              | 10,500                      | 3,500                        | 0                  | C                   |

\*Letras iguales no muestran diferencia significativa

<sup>a</sup> Aislamientos monospóricos de *Fusarium* spp.

<sup>b</sup> Comparación de rangos por Dunn con  $p \leq 0.05$

<sup>c</sup> Índice de severidad de la enfermedad expresado en porcentaje.

Los hongos se recuperaron de plantas sintomáticas y mostraron las mismas características morfológicas de los aislamientos inoculados originalmente, confirmando así su patogenicidad. Las plantas del tratamiento control no mostraron síntomas. Las inoculaciones se realizaron dos veces, mostrando resultados similares.

Los aislamientos de ambos complejos fueron patogénicos y desencadenaron síntomas aéreos similares de amarillamiento y oscurecimiento de los tejidos vasculares en las plantas de tomate. Sin embargo, solo los aislamientos de *F. falciforme* desencadenaron necrosis en las coronas de las plantas (visibles en el interior) que avanzaron a través de la raíz principal, junto con una ligera pudrición de la raíz, mientras que las especies del FSSC muestran colonización local, causando principalmente pudrición de raíces, específicamente en leguminosas. Debido a la colonización de los tejidos, las plantas



muestran síntomas de amarillamiento al interferir con la absorción y la translocación de agua y nutrientes (Aoki *et al.*, 2005).

Las diferencias observadas en la virulencia de los aislamientos pueden ser el resultado de la variabilidad genética dentro de la población, una vez que se obtuvieron aislamientos de diferentes cultivares de tomate. Además de la variación genética, las diferencias en la agresividad entre los aislamientos pueden explicarse por las variaciones en las condiciones climáticas de los sitios de los que se recuperaron los aislamientos, lo que favorece la coevolución genética, independiente del patógeno (Daami-Remadi 2006).

En el cuadro 11 se observan las diferencias en la precipitación media anual, así como temperaturas máximas y mínimas que prevalecieron en los sitios de los que se obtuvieron los aislamientos.

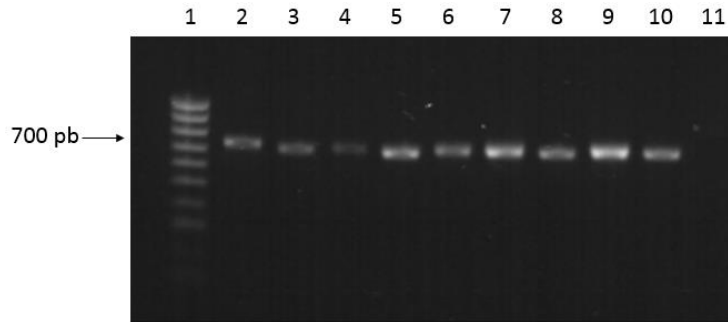
Cuadro 11. Condiciones de precipitación y temperaturas de las zonas de donde se recuperaron los aislamientos.

| <b>Municipio</b> | <b>Precipitación media anual (mm)</b> | <b>Temperatura media máxima (°C)</b> | <b>Temperatura media mínima (°C)</b> |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| El Fuerte        | 491.0                                 | 35.6                                 | 17.2                                 |
| Sinaloa de Leyva | 882.5                                 | 33.2                                 | 15.8                                 |
| Guasave          | 298.7                                 | 32.8                                 | 16.4                                 |
| Culiacán         | 603.4                                 | 32.2                                 | 17.2                                 |
| Elota            | 678.8                                 | 33.4                                 | 17.3                                 |
| Escuinapa        | 1074.2                                | 33.2                                 | 19.2                                 |

Fuente: elaboración propia con datos de Ruiz *et al.*, (2005).

### **7.5. Identificación molecular**

En los análisis de PCR de los aislamientos de *Fusarium* se observó la amplificación del fragmento esperado para el gen TEF-1 $\alpha$  (622 to 675 bp) Fig. 21) y para el gen ITS (465 to 506 bp) (Fig. 22).



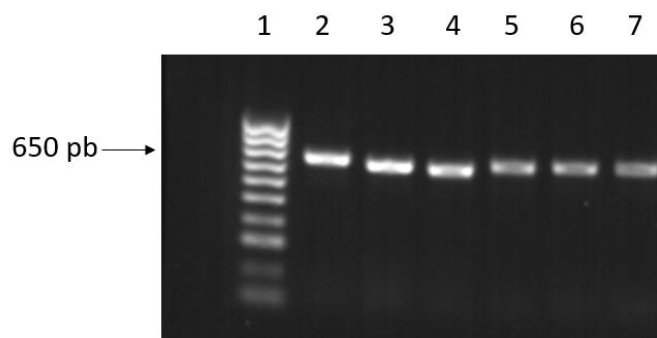
**Figura 21.** Producto PCR obtenido a partir de ADN genómico de aislamientos seleccionados para la identificación de *Fusarium spp.* con el par de cebadores EF-1 y EF-2, visualizados en un gel de agarosa al 1,0 %. Carril 1; Marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2-10; aislamientos seleccionados (FOB20SINELO, FOB25SINGUA, FOB29SINESC, FOB30SINFUE, FFB31SINGUA, FFB38SINCUL, FFB39SINSIN, FFB47SINCUL y FFB50SINCUL). Carril 11; control negativo.

Posteriormente, la búsqueda en las bases de datos del GenBank (NCBI), *Fusarium* ID y *Fusarium* MLST, indicó que las cepas FOB20SINELO, FOB25SINGUA, FOB29SINESC y FOB30SINFUE, presentaron 99 % de similitud con la secuencia de FOL1 con clave de acceso KP964909 (Taylor *et al.*, 2013), sin embargo, al compararlo con el programa *Fusarium* ID mostraron 99.8 % de similitud para *F. oxysporum*. Así, *F. oxysporum* representó el 46.6 % del total de aislamientos analizados (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Origen de los aislamientos, códigos y números de acceso al GenBank del complejo de especies de *Fusarium* encontradas en el estado de Sinaloa.

| Especie              | Código Aislamiento | Hospedante                  | Origen             | Acceso GenBank |
|----------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|----------------|
| <i>F. oxysporum</i>  | FOB20SINELO        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Elota     | MH298326       |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOB25SINGUA        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Guasave   | MH463538       |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOB29SINESC        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Escuinapa | MH463539       |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOB30SINFUE        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, El Fuerte | MH463540       |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOA62SINFUE        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, El Fuerte | MH048074       |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOA64SINELO        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Elota     | MH048079       |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOA66SINESC        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Escuinapa | MH048078       |
| <i>F. falciforme</i> | FFB31SINGUA        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Guasave   | MH463541       |
| <i>F. falciforme</i> | FFB39SINSIN        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Sinaloa   | MH463543       |
| <i>F. falciforme</i> | FFB50SINCUL        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Culiacán  | MH463545       |
| <i>F. falciforme</i> | FFA55SINESC        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Escuinapa | MH048076       |
| <i>F. falciforme</i> | FFA54SINFUE        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, El Fuerte | MH048075       |
| <i>F. falciforme</i> | FFA63SINNAV        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Navolato  | MH048077       |
| <i>F. falciforme</i> | FFB38SINCUL        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Culiacán  | MH463542       |
| <i>F. falciforme</i> | FFB47SINCUL        | <i>Solanum lycopersicum</i> | Sinaloa, Culiacán  | MH463544       |

Las cepas FFB31SINGUA, FFB39SINSIN, FFB50SINCUL, FFB38SINCUL y FFB47SINCUL, presentaron 99 % de similitud con las secuencias del aislamiento FSSC\_3+4\_SF5 de *F. falciforme* con clave de acceso MG272423 en GenBank (Homa *et al.*, 2017), al compararlo también en la base de datos de *Fusarium* ID se observó un 99.8 % de similitud para con *F. falciforme* de igual manera. Así, *F. falciforme* representó el 53.3 % de los aislamientos analizados. Con base en los análisis con el gen ITS, los aislamientos amplificaron un fragmento de aproximadamente de 620 pb para todos los aislamientos de *F. oxysporum* y presentaron un 99 % de similitud con la secuencia del aislamiento F7 de *F. oxysporum* con clave de acceso MF996561 (Valencia *et al.*, 2017). *F. falciforme* resultó con un 99 % de similitud con la secuencia ATS98 con clave de acceso MF411132 (Tupaki *et al.*, 2017).



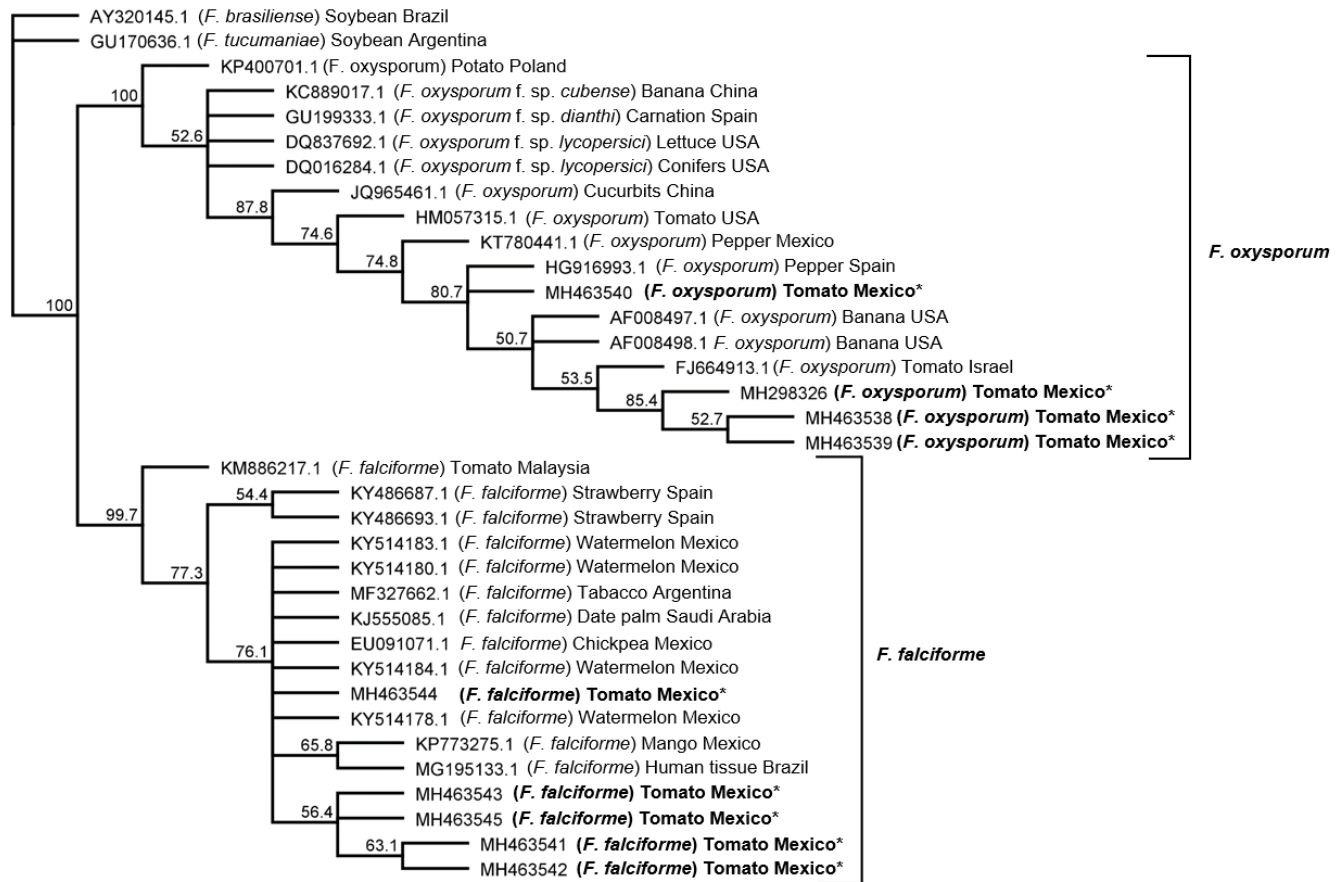
**Figura 22.** Producto PCR obtenido a partir de ADN genómico de aislamientos seleccionados para la identificación de *Fusarium spp.* con el par de cebadores ITS1 y ITS4, visualizados en un gel de agarosa al 1,0%. Carril 1; Marcador de peso molecular de 100 pb, carriles 2-7; aislamientos seleccionados (FFA54SINFUE, FFA55SINESC, FFA63SINNAV, FOA62SINFUE, FOA64SINELO Y FOA66SINESC).

La presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* como el agente causal de la marchitez del tomate en Sinaloa, ha sido reportada por varios autores, Valenzuela-Ureta *et al.* (1996), reportó por primera vez a FOL raza 3, Carrillo-Fasio *et al.* (2003), informó la presencia de FOL raza 2 y 3 en el valle de Culiacán, Ascencio-Álvarez *et al.* (2008), informó la presencia de las 3 razas de FOL en el valle de Culiacán, 1 año después Cauch, (2009) indica que en Sinaloa prevalece la raza 3 de FOL, estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos con esta investigación, además, como resultado del

presente trabajo se reporta por primera vez a *F. falciforme* como agente causal de la fusariosis vascular del cultivo de tomate en Sinaloa (Vega *et al.*, 2018).

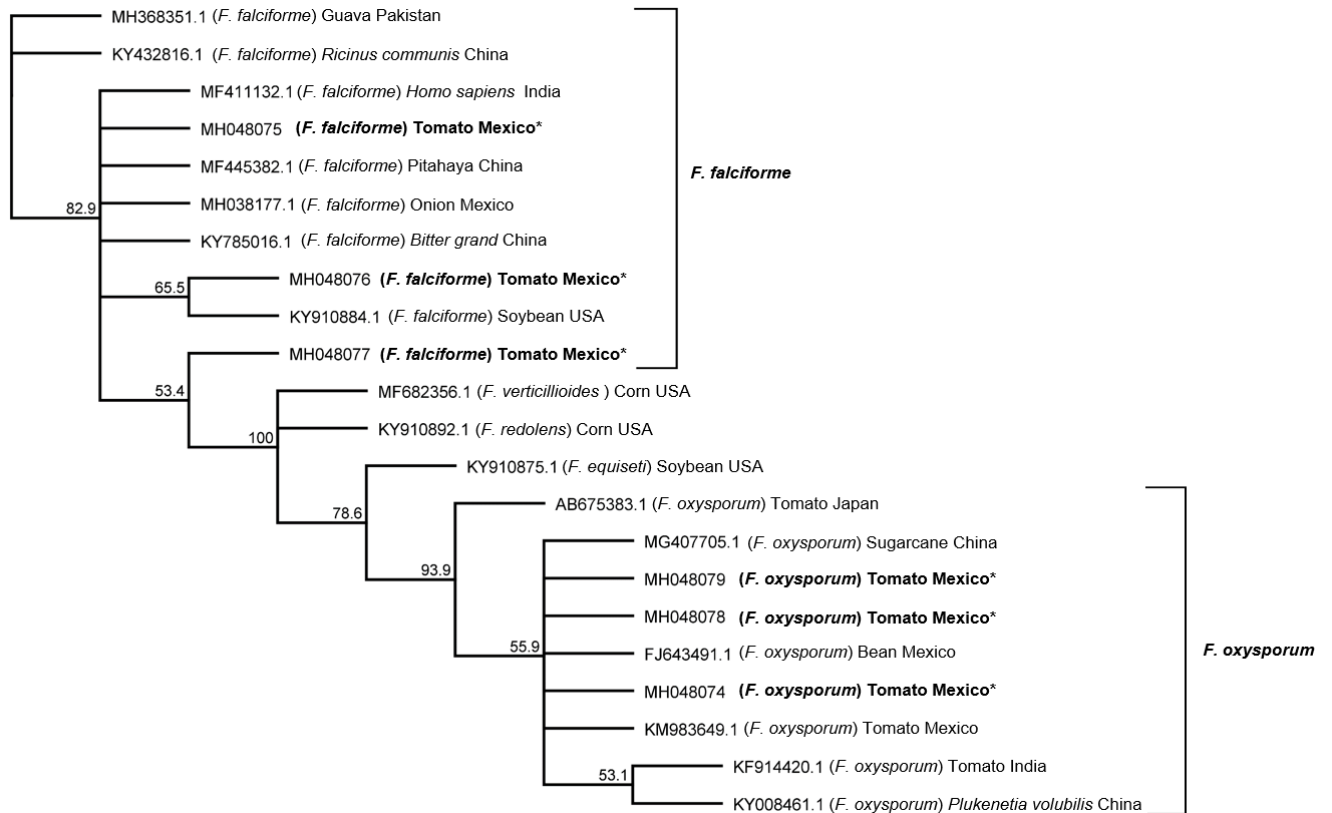
#### **7.6. Análisis filogenético**

El análisis generó dos árboles filogenéticos, uno para secuencias analizadas mediante el gen TEF-1 $\alpha$  y otro mediante el gen ITS comparando las diferentes especies de *Fusarium* reportadas en este estudio, con otras secuencias reportadas en el mundo. El filograma resultante por el gen TEF-1 $\alpha$ , mostró la formación clara de tres grandes grupos con valores de similitud mostrados en las ramas, alineando cada especie de *Fusarium* en cada grupo. El primer clado incluyó dos especies diferentes *F. brasiliense* y *F. tucumaniae*, el cual se estableció como un grupo externo. El grupo de *F. oxysporum* mostró pequeños clados diferentes; el aislamiento con número de acceso HM057315 reportado en tomate en USA, mostró una similitud de 99.8 % con los aislamientos obtenidos en el presente estudio ubicándose en el mismo clado. El grupo de *F. falciforme*, formó pequeños clados, mostrando que los aislamientos obtenidos en este estudio tienen una similitud que varía entre 99.5 y 100 % con los aislamientos reportados en México con números de acceso KY514183, KY514180, KY514184 y KY514178. (Figura 23).



**Figura 23.** Dendrograma filogenético por el método de Neighbour joining en el alineamiento de nucleótidos de secuencias parciales del gen TEF-1 $\alpha$  de *F. falciforme* y *F. oxysporum*. Los valores en los nodos representan el porcentaje de núcleos de arranque (1000 repeticiones).

El filograma resultante por el gen ITS, de igual manera, mostró la formación clara de dos grupos, alineando cada especie de *Fusarium*. En uno de ellos *F. falciforme* mostró una similitud mínima de 82.4 y máxima de 100 % con los aislamientos de *F. falciforme*, en el caso de los aislamientos de *F. oxysporum*, mostró una similitud mínima de 82.5 % y como máxima 100 %. El grupo de *F. oxysporum* mostró pequeños clados diferentes; los aislamientos MH048074, MH048078 Y MH048079, mostraron una similitud de 100 % con el aislamiento reportado en México con número de acceso FJ643491 identificado como *F. oxysporum*, de igual manera 100 % de similitud con el aislamiento reportado en Japón con número de acceso AB675383 aislado también del cultivo del tomate ubicándose de igual manera en el mismo clado. (Figura 24).



**Figura 24.** Dendrograma filogenético por el método de Neighbour joining en el alineamiento de nucleótidos de secuencias parciales del gen ITS de *F. falciforme* y *F. oxysporum*. Los valores en los nodos representan el porcentaje de núcleos de arranque (1000 repeticiones).

La variabilidad genética entre los diferentes aislamientos que se muestra en el árbol filogenético puede estar relacionado con los diferentes orígenes geográficos del hospedante del que fueron aisladas, ya que, de acuerdo con los resultados obtenidos en diversos trabajos de filogeografía (Nirmaladevi *et al.*, 2016), señalan que las poblaciones de hongos fitopatógenos que infectan múltiples especies de plantas hospedantes pueden dividirse de acuerdo con su origen geográfico. Mismos resultados fueron reportados por Azevedo *et al.* (2017). Las diversas variaciones genéticas encontradas de acuerdo con la longitud de las ramas del árbol pueden atribuirse a variaciones de las condiciones climáticas que presentan los sitios de donde proceden los aislamientos, favoreciendo a la co-evolución genética independiente del patógeno.

### 7.7. Sensibilidad de los aislamientos obtenidos de *Fusarium* spp. a diferentes fungicidas comerciales.

Los aislamientos patogénicos seleccionados fueron susceptibles a todos los fungicidas evaluados, mostrando diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los PIRG, con las distintas dosis utilizadas (Cuadro 13). Boscalid ejerció un control de 100 % de inhibición de crecimiento micelial a una concentración de 10 ppm, de igual manera en los tratamientos con tiabendazol ejerció una inhibición de 100 % a 100 ppm. En el tratamiento con Tebuconazol todas las concentraciones de fungicida probadas presentó valores arriba del 80 % de inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium* spp., sin embargo, nunca llegó al 100 %. Clorotalonil fue el fungicida con menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* spp. con valores que oscilaron desde 40 (1 ppm) al 71.40 % (1000 ppm). Kopacki y Wagner (2006) probaron fungicidas triazoles, bencimidazoles y mancozeb para el control de *F. avenaceum* y determinaron, también, que estos fungicidas inhibían el crecimiento del micelio *in vitro*. Tebuconazole ha sido reportado como el fungicida más efectivo para controlar *Fusarium* spp. en granos de cereales (Kang *et al.*, 2001).

**Cuadro 13. Porcentaje de inhibición *in vitro* del crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium* spp. bajo diferentes concentraciones de fungicida.**

| Fungicida    | Concentración (ppm) |         |         |          |
|--------------|---------------------|---------|---------|----------|
|              | 1 ppm               | 10 ppm  | 100 ppm | 1000 ppm |
| Clorotalonil | 40.00 c             | 50.74c  | 66.77b  | 71.40b   |
| Tiabendazol  | 11.97d              | 96.16ab | 100.00a | 97.77a   |
| Tebuconazol  | 81.92b              | 91.94b  | 98.33a  | 99.20a   |
| Boscalid     | 99.66a              | 100.0a  | 28.08c  | 20.31c   |

\*Letras iguales no muestran diferencia significativa

## VIII. CONCLUSIONES

### **Identificación de las especies de *Fusarium* spp. causantes de la fusariosis vascular en el estado de Sinaloa**

En el presente estudio, se determinó que *F. oxysporum* y *F. falciforme* son los agentes causales de la marchitez del tomate en el estado de Sinaloa.

Dentro de los 15 aislamientos patógenos de *Fusarium*, 7 aislamientos mostraron marcadores morfológicos típicos para *F. oxysporum* y 8 para *F. falciforme*

*F. falciforme* fue la especie más frecuente en el estudio, sin embargo, no se encontró ninguna relación entre las especies de *Fusarium* identificadas con las áreas muestreadas y el sistema de producción, esto muestra la alta capacidad de las especies de *Fusarium* para afectar el cultivo de tomate establecido en cualquier condición que puede ser debido a la variabilidad genética de *Fusarium*.

### **Patogenicidad y virulencia de las cepas de *Fusarium* spp. causantes de la fusariosis vascular en el cultivo de tomate en el estado de Sinaloa**

De los 7 aislamientos patogénicos de Fol obtenidos; 5 aislamientos corresponden a la raza 3, 1 aislamiento a la raza 2 y 1 a la raza 1.

En la prueba de patogenicidad los aislamientos variaron en agresividad de acuerdo con los síntomas que causaron la enfermedad en las plantas. El aislado FFA54SINFUE (*F. falciforme*) fue el más agresivo, el cual causó un 83.3 % de severidad de la enfermedad desde la segunda semana después de la inoculación, causando la muerte de las plantas a los 45 días. Los aislamientos FFB47SINCUL y FFA63SINNAV presentaron 75 % de severidad de la enfermedad desde la segunda semana después de la inoculación, causando la muerte también a los 45 después, sin embargo, estos 3 aislamientos fueron estadísticamente iguales. Los aislamientos que mostraron una incidencia de severidad intermedia oscilaron entre 58 % y 75 % a los 45 ddi, y fueron estadísticamente iguales FFB50SINCUL, FOB20SINELO, FOB29SINESC y FOB25SINGUA, mientras que los aislamientos FFB31SINGUA y FFB39SINSIN fueron los menos agresivos y estadísticamente iguales.



### **Análisis filogenético de las especies aisladas en el estado de Sinaloa de *Fusarium* spp. para conocer la relación filogenética con otras cepas de *Fusarium* obtenidas de otras partes de México y el mundo**

El análisis filogenético de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium falciforme* confirmaron que ambos complejos están constituidos por distintos linajes filogenéticos.

En el filograma resultate con las secuencias del gen TEF1- $\alpha$ , el grupo *F. oxysporum* mostró pequeños clados diferentes. El grupo de *F. falciforme* formó pequeños clados, donde los aislamientos obtenidos en este estudio tienen una similitud que varía entre 99.5 % y 100 % con los aislamientos reportados en México y registrados con números de acceso del Genbank KY514183, KY514180, KY514184 y KY514178.

En el filograma generado con las secuencias parciales del gen ITS, el árbol filogenético se dividió en grupos, alineando cada especie de *Fusarium* en uno de ellos. El primer grupo fue el de *F. falciforme*, que presentó subgrupos; los aislamientos de *F. falciforme* del presente estudio se ubicaron en diferentes subgrupos; el segundo grupo grande fue el de *F. oxysporum*, observando que los aislamientos del presente estudio se ubicaron junto con otros aislamientos obtenidos de México y uno de China.

### **Sensibilidad de los aislamientos obtenidos de *Fusarium* spp. a diferentes fungicidas comerciales**

Boscalid ejerció un control de 100 % de inhibición de crecimiento micelial a una concentración de 10 ppm, de igual manera en los tratamientos con tiabendazol ejerció una inhibición de 100 % a 100 ppm. Tebuconazol presentó en todas las concentraciones probadas valores arriba del 80 % de inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium* spp. a todas las concentraciones del fungicida, sin embargo, nunca llegó al 100 %. Clorotalonil fue el fungicida con menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* spp. con valores que oscilaron desde 40 (1 ppm) al 71.40 % (1000 ppm).

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Addinsoft. 2008. XLSTAT Software. Version 2018. 451393. Addinsoft 1995-2018.
- Agrios, G.N. 1986. Fitopatología. Editorial Limusa 2ª ed. México, D.F. 756 p.
- Agrios, G.N. 1999. Fitopatología. Editorial Limusa 2ª ed. México D.F. 5ta reimpression, 734-768.
- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. Fifth Ed. Academic Press, Burlington. 635p.
- Alexander L.J. y Tucker C.M. 1945. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. J Agr Res 70: 303–313.
- Alvarez I, Wendel JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution 29: 417–434.
- Amaral D.O.J., Magalhaes M., Vilela L., Vanusa M. 2008. Differential gene expression induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection in tomato. Pesq Agrop Bras. 43(8): 1017-1023.
- Aoki, T., O'Donnell, K., y Scandiani, M.M. 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. Mycoscience, 46, 162–183.
- Apodaca-Sánchez, M.A., Zavaleta-Mejía, E., García-Espinoza, R., Osada-Kawasoe, S., & Valenzuela-Ureta, J. G. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su control. Revista Mexicana de Fitopatología, 20(1): 1-7.
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S.A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F. y Gámez-Vázquez, A.J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 26:114-120.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 2003. Current Protocols in Molecular Biology. Editorial Board.
- Azevedo, D.M., Rocha, F.S., Costa, C.A., Pfenning, L.H., Costa, S.S., Melo, M.P., Silva, J.G., y Fernanades, M.F. 2017. Etiology of root rot and wilt disease of chickpea in Brazil. Tropical Plant Pathology. 42: 273-283.
- Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana. Costa Rica. 17(2): 221-242.
- Bai, Y., y Lindhout, P. 2007. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. Annals of Botany, 100(5): 1085-1094.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82: 247–277.
- Barron, L. G. 1968. The genera of hyphomycetes from soil. The Williams and Wilkins Co. ed. Baltimore, U.S.A. 226-228-364 p.
- Blancard, D. 1992. Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 212 p.
- Blancard, D. 2005. A color Atlas of Tomato Diseases. Observation, Identification and. Control. First Edition, John Wiley and Sons. New York, USA. 212 p.

- Beckman, C.H. 1987. The Nature of Wilt Diseases of Plants. Ed, Society, T. A. P. St. Paul, Minnesota, USA.
- Bohn, G.W., y Tucker, C.M. 1940. Studies of *Fusarium* wilt of tomato. Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* and its inheritance in hybrids. Montana Agricultural Experimental Station Research Bulletin. 311.
- Boix-Ruíz A., Gálvez-Patón L., de Cara-García M., Palmero-Llamas D., Camacho-Ferre F., Tello-Marquina J. 2014. Comparison of analytical techniques used to identify tomato pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*. 43: 471–483.
- Bolkan, H.A. 1980. Las pudriciones radicales. citado en Schwartz F.A. y Galvez G.E. (Eds) Problemas de pudrición del frijol; enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris* L. p. 65-99 CIAT, Cali, Colombia
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Booth, C. 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic, and taxonomic aspects. En the applied mycology of *Fusarium*. Editado por Moss, M.O., y Smith, J.E.: Press Syndicate of the University of Cambridge. 1-13 p.
- Brody, J.R., y Scott, E.K. 2004. Sodium boric acid: A tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36 (2):2-4.
- Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual review of ecology and systematics* 22: 525–564.
- Brundrett, M.C., y Tedersoo, L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*.
- Cabral, C.S., Melo, M.P., Fonseca, M.E.N., Boiteux, L.S., y Reis. A. 2016. A root rot of chickpea caused by isolates of the *Fusarium solani* species complex in Brazil. *Plant Disease*. 100:10, 2171-2171
- Cai, G., Gale, I.R., Scheider, R.W., Kistler, H.C., Davis, R.M., Elias, K.S., y Miyao, E.M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology* 93:1014-1022.
- Carrillo-Fasio, J., Montoya-Rodríguez, T., García-Estrada, R., Cruz-Ortega, J., Márquez-Zequera, I., y Sañudo-Barajas, A. 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 (2), 123-127.
- Castellanos, J. Z. 2004. Manejo de la fertirrigación en suelo. pp. 103-123. In: Manual de producción hortícola en invernadero. J Castellanos Z, R. J. J. Muñoz (eds.). 2a ed. Editorial Intagri. INCAPA. Celaya, Guanajuato, México.
- Carlile, M.J., Watkinson S.C., y Gooday G. 2001. The Fungi. Academic Press, London.
- Carris, L.M., y Glawe, D.A. 1989. Fungi colonizing cystis *Heterodera glycines*. *Report Agric, Illinois, U.S.A.* 93 p
- Cauch, P.S.O. (2009). Determinación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder & Hansen en Sinaloa, México. Tesis de Maestría en ciencias de la producción agrícola. Facultad de Agronomía. Culiacán Sinaloa. 54 p.
- Coleman, J.J. 2016. The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology* 17(2), 146-158.
- Cucuzza, J. Y Waterson, J. 1992. Foot rot of tomato caused by *Fusarium solani* in California. *Plant Dis.* 76: 101.
- Chamarro, L. J. 2001. Anatomía y Fisiología de la planta. In: El cultivo del tomate. F. Nuez. Mundi Prensa. España: 43-91 pp.

- Cho, S.W., Mitchell, A., Regier, J.C., Mitter, C., Poole, R.W., Friedlander, T.P. y Zhao S.W. 1995. A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics-Elongation-Factor-1-Alpha recovers morphology-based tree for Heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 650-656.
- Daami-Remadi, M. 2006. Etude des fusarioses de la pomme de terre [Study of fusariosis of the potato]. These Institut Supérieur. Agronomique de Chott-Mariem. 424.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F.I., Meglecz, E., y Roncero. M.I.G. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*. 39 (5): 1140-1152.
- Dixon, G.R., y Tilston, E.L. 2010. Soil-borne pathogens and their interactions with the soil environment. In: Dixon, G.R.; Tilston, E.L. (Eds) *Soil microbiology and sustainable crop production*. Ed. Springer. (Netherlands): p.197-271.
- Dong, S., Stam, R., Cano, L.M., Song, J., Sklenar, J., y Yoshida, K. 2014. Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen. *343(6170):552-555*.
- Douriet, A.A., López, O.C., López, U.G., Vega, G.T., Tirado, R.M., Estrada, A.M.D., Ayala, T.F., y Yañez, J.M.G. 2019. Maize Stalk Rot caused by *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) in Mexico. *Plant Disease* 2019 103:11
- Ellis, J.G., Dodds, P.N., y Lawrence, G.J. 2007. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annu Rev Phytopathol*. 45: 289-306.
- Enespa, y Dwivedi, S.K. 2014. Effectiveness of some Antagonistic fungi and botanicals against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infecting brinjal and tomato plants. *Asian J. Plant Pathol*. 8(1):18-25.
- Fernández-Valiela, M.M. 2001. Introducción a la Fitopatología. INTA. Buenos Aires, Argentina. 518 p.
- Fishel, F.M. 2013. Fungicide resistance action committee's (FRAC) classification scheme of fungicides according to mode of action.
- Fries, E. 1821. *Systema Mycologicum*.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Statistics Division. [Internet]. [Revisado febrero 2018]. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/>
- Galanihe, L.D., Priyantha, M.G.D.L., Yapa, D.R., Bandara, H.M.S., Ranasinghe, J.A. 2004. Insect pest and diseases incidences of exotic hybrid Chilli pepper varieties grown in the low Country dry zone of Sri Lanka. *Annals of Sri Lanka*. 6:99-106.
- Garcés de Granada, E., Orosque de Amesquiza. Bautista, G. R. 2001. *Fusarium oxysporum*. *Acta Biológica Colombiana*, 6 (1) [http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF'sN6N1/Art1V6N1 .pdf](http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF'sN6N1/Art1V6N1.pdf)
- Geiser, D., Jiménez, G.M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G.A. y O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*. USA. 110: 473-479.
- González, P. 2006. Enfermedades del tomate. Facultad de Agronomía. Montevideo Uruguay. <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/> [En -Línea]. Fecha de consulta. Mayo de 2017.
- González, G.R. y Sánchez, C.M.A. 1980. Principales enfermedades de las hortalizas en el valle de Culiacán. CIAPAN., I.N.I.A. México 79 p.
- González, M.M., Leyva, M.S.G., y Tlapal, B.B. 2010. Etiología de la pudrición de plántulas en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Tecamachalco, Puebla. In: *Memorias del XII Congreso Internacional/XXXVII Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, A. C. Mérida, Yucatán, México del 4 al 8 de julio de 2010.

- González, I., Yailén, A., y Peteira, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7.
- Gordon, T.R., y Martyn, R.D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35(1), 111-128.
- Grattidge, R.A. 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease*, 66:165-166.
- Gupta, A.K., Choudhary, R, Bashyal, B.M., Rawat, K., Singh, D., y Solanki, I.S. 2019. First report of root and stem rot disease on papaya caused by *Fusarium falciforme* in India. *Plant Disease* 2019 103:10, 2676.
- Hansen, H.N., y Smith, R.E. 1932. The mechanisms of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 37: 369-371.
- Hawksworth, D.L., y Lücking, R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol. Spectrum*; 5(4):1-17. DOI: 10.1128/microbiolspec.
- Hein, I., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., y Birch, P.R. 2009. The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Mol. Plant Pathology*.10(4):547-562.
- Henríquez, S., Sarmiento, V., y Alarcon, C. 2011. Sensitivity of *Venturia inaequalis* Chilean isolates to difenoconazole, fenarimol, mancozeb, and pyrimethanil. *Chil. J. Agric. Res.* 71 (1): 39-44.
- Hogenhout, S.A., Hoorn, R.A., Terauchi, R., y Kamoun, S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22:115–122.
- Holguín, 2005. *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in Baja California Sur, México. *Plant Disease* 89:1360.
- Holliday, P. 1980. *Fungus diseases of tropical crops*. University of Cambridge. New Cork, USA. 607 p.
- Holmes, S. 2003. Bootstrapping Phylogenetic Trees: Theory and Methods. *Statistical Science* 18 (2): 241-255.
- Homa, M., Shobana, C.S., Singh, Y.R., Manikandan, P., Selvam, K.P., y Kredics, L. 2013. *Fusarium keratitis* in South India: causative agents, their antifungal susceptibilities and a rapid identification method for the *Fusarium solani* species complex. *Mycoses* 56, 501–511.
- Houterman, P.M., Speijer, D., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C., y Rep, M. 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* 8: 215–221.
- Houterman, P.M., Cornelissen, B.J.C., y Rep, M. 2008. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathog* 4: e1000061.
- Houterman, P.M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M.J., Cornelissen, B.J.C., Takken, F.L.W., y Rep, M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J* 58: 970–978.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2010. Guía técnica para el cultivo del tomate en el Valle de Culiacan.
- ITIS. 2017. Sistema Integrado de Información Taxonómica. [www.itis.gov/w.itis.gov/](http://www.itis.gov/w.itis.gov/) [En –Línea]. Fecha de consulta. Marzo de 2017.
- Jahanshir, A., y Dzhaililov, F.S. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *J. Plant Protect. Res.* 50 (2): 172-177.
- Jiménez-Gasco, M.M. y Jiménez-Díaz, R.M. 2003. Development of a specific PCR-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6. *Phytopathology* 107:200-209.

- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., y Zitter, T.A. 1993. Compendium of Tomato Diseases, American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 46 p.
- Kang, Z., Huang, L., y Buchenauer, H. 2001. Ultrastructural and cytochemical studies of effects of the fungicide metconazole on *Fusarium culmorum* in vitro. J. Plant Dis. Protect. 108: 419-432.
- Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C.J., Islam, R., y Pauls, K.P. 2011. Integration of biotechnologies: disease resistance pathology *Fusarium*. In: Moo-Young M. (ed.). Comprehensive Biotechnology, second edition, Elsevier, Amsterdam. p.729-743.
- Karp, A. y Edwards, K. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano- Anollés, P. M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gresshoff. New York. p. 1-13.
- Kopacki, M., y Wagner, A. 2006. Effect of some fungicides on mycelium growth of *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., pathogenic to chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Agron. Res. 4 (Special issue): 237-240.
- Kistler, H.C. 2001. Evolution of the Host specificity in *Fusarium oxysporum*. En *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium, p. 70-96. Edited by Summerell, A., Leslie, J. F., Badihouse, D., Bryden, W. L. y Burgess, L. W.
- Krasikov, V., Dekker, H.L., Rep, M., Takken, F.L.W. 2010. The tomato system sap protein XPS10 is required for full susceptibility to *Fusarium* wilt disease. J Exp Bot. 1-11.
- Krebs, C.J. 1999. Ecological methodology. 2ed. Benjamin Cummings. California, EE. UU. 620 pp.
- Leslie, J.F., y Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Ltd.
- Lievens, B., Houterman, P. M., y 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, 201–215.
- Link, H.F. 1809. Observationes in ordines plantarum natural. Dissetatio I. Mag Ges Naturf Freunde Berlin 3: 3-42.
- Madrid, M.P, Di Pietro, A, Roncero, M.I.G. 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. Mol Microbiol. 47(1): 257-266.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., y Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* Species. Pennsylvania State Univ. Press, University Park.
- Marlatt, M.L.J., Correll, J.C., Kaufman, P. y 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.
- Martínez-Ruiz, F.E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C.E., Hernández-Montiel, L.G., Sánchez, C.L.D.T., y Rueda-Puente, E.O. 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, 12(18).
- Martínez-Pacheco, J. 2017. Proteínas r y percepción de efectores patogénicos en la familia *Solanaceae*. Rev. Protección Veg., Vol. 32, No. 1.
- Martius, C.F.P. 1842. Die Kartoffeln-epidemie der letzten Jahre oder die Stockfäule und Räude der Kartoffeln, geschildert und in ihren ursachlinchen Verhaltissen erörtert. Akademie der Wissenschaften.
- Massee, G. 1895. The "sleepy disease" of tomatoes. Gard Chron Ser. 3:707-708.
- Mendoza, Z.C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. p. 7-8 y 21-24.

- Miyao, B., Falk, B., Subbarao, K. y Stapleton, J. 2000. Tomato Fusarium foot rot. U.C. Pest Management Guidelines.
- Nakaya, K., Tohyama, J., Naik, S., Tanigawa, H., Jaye, M., MacPhee, C., Billheimer, J.T., y Rader, D.J. 2011. PPAR  $\alpha$  activation promotes macrophage reverse cholesterol transport through an LXR-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(6): 1276-1282.
- NCBI. 2017. Base de datos sobre la taxonomía de *Fusarium oxysporum*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5507> [En -Línea]. Fecha de consulta. Marzo de 2017.
- Nei, M. 1996. Phylogenetic Analysis in Molecular Evolutionary Genetics. *Annu. Rev. Genet.* 30:371-403.
- Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum* [Vascular wilt, host plants, soils, nematode interactions].
- Nelson, P.E. Toussoun, T.A., y Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 p.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C., y Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 479-504.
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Rivastava, R.K., Uppalapati, S.R., Gupta, V.K., Yli-Mattila, T., Clement, K.M., Srinivas, C., Niranjana, S.R., Chandra, N.S. 2016. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Sci. Rep.* 6: 21367; doi: 10.1038/srep21367.
- Odds, F.C., Brown, A.J.P., y Gow, N.A.R. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11: 272-279.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. y Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 95: 2044-2049.
- O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia.* 92:919-938.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Robert, V.A.R.G., Crous, P.W., Geiser, D.M., y Kang, S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica.* 43, 583-595. doi: 10.1007/s12600-015-0484-z
- Moine, L.M., Labbe, C., Louis-Seize, G, Seifert, K.A., y Belanger, R.R. 2014. Identification and detection of *Fusarium striatum* as a new record of pathogen to greenhouse tomato in northeastern America. *Plant Dis.* 98:292-298.
- O'Meara, B.B. 2012. Evolutionary Inferences from Phylogenies: A Review of Methods. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 43:267-85.
- Ortega, M.L.D. 2010. Efecto de los sustratos en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. 129 p.
- Ortega, G.J.G., Bravo, L.L., Arzufii, B.A.R., y Guigón, L.C. 2010. Actividad antagonista de *Trichoderma asperellum* sobre *Fusarium* spp., aislados de jitomate de Morelos, México. In: Memorias del XII Congreso Internacional/XXXVII Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Mérida, Yucatán, México del 4 al 8 de julio de 2010.
- Pagel, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature.* Vol 401.125-132.
- Pandey, D.K., Tripatti, N.N., Tripatti, R.D., y Dixit, R.D. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oils of *Hypitis suaveolens* Z. *PflKrankh. Pfl. Schutz* 94: 585-588.

- Pareja-Jaime, Y., Roncero, M.I.G., y Ruiz-Roldán, M.C. 2008. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Mol Plant Microbe In.* 21(6): 728-736.
- Pelegrín, L.S., Arias, A.P., Fajardo, J.P., y Vega, C.T. 2004. Diferenciación de variedades de tomate frente al tizón temprano (*Alternaria solani*) en dos épocas de siembra en el Valle del Cauto. *Granma Ciencia*, 2, 1-3. Culiacán, Sinaloa, México. 9 p.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., Razdan, M.K., y Mattoo, A.K. 2007. Genetic improvement of solanaceous crops. Vol. 2. Enfield, Nueva Hampshire: Science Publishers. V.2, p.1-27.
- Perea, S.J.M., García, E.R.S., Carrillo, F.J.A., Allende, M.R., y León, F.J. 2010. Identificación de razas y patovares de cepas de *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) Yabuuchi, aisladas en cultivos de tomate del Valle de Culiacán. In: Memorias del XII Congreso Internacional/XXXVII Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Mérida, Yucatán, México del 4 al 8 de julio de 2010.
- Porter, T.M., Golding, G.B. 2011. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons. *New Phytol.* 192, 775–782.
- Pii, Y., Astegno, A., Peroni, E., Zaccardelli, M., Pandolfini, T., y Crimi, M. 2009. The *Medicago truncatula* N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe In.* 22:1577-1587.
- Price, D. 1984. *Fusarium* and plant pathology: the reservoir of infection. In *The Applied mycology of Fusarium*, p. 71-93. Edited by Moss, M. O. y Smith, J. E.: Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Quiroga, M.R., Rosales, E.M., Rincón, E.P., Hernández, G.E., y Garrido, R.E. 2007. Enfermedades causadas por hongos y nematodos en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el municipio de Villaflores, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:114-119.
- Ramírez, V.J. 1998. Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México, 29-49.
- Ramírez-Villapudua, J. y Sainz-Rodríguez, R.A. 2010. Manejo Integrado de la Enfermedades del Tomate. Segunda Edición.
- Reis, A., Costa H., Boiteux L. S. y Lopes C. A. 2005. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*. 30:426-428.
- Rentería, M.E., Guerra, C.A., Ochoam M.A., Morenom S.S., Varelam R.A., Gutiérrez. M.L, y Meza, M.A. 2018. Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 233-255.
- Rep, M., Van Der Does, H.C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P.M., y Dekker, H.L. 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.
- Rep, M. 2005. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 19–27.
- Rivera, C.G. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. San José de Costa Rica. EUNED. 346 p. [Consultado septiembre 2019].
- Rodríguez, D.A., y Montilla, J.O. 2002. Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de citrus paradisi... *Manejo Integrado de plagas (Costa Rica)* 63:46-47.
- Rodríguez, R. Tavares, R. y Medina, 2001. Cultivo moderno del tomate. 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 255 p.
- Roger, A.J., Sandblom, O., Doolittle, W.F., y Philippe, H. 1999. An Evaluation of Elongation Factor 1-Alpha as a Phylogenetic Marker for Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. 16(2):218-233.



- Ruiz C., J.A., G. Medina G., J. Macías C., M. M. Silva S., y G. Diaz P. 2005. Estadísticas climatológicas básicas del estado de Sinaloa (Período 1961-2003). Libro Técnico Núm. 2. INIFAP-CIRNO. Cd. Obregón, Sonora, México. 154 p.
- SAGARPA. (2005). Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín Informativo.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* Jul;4(4):406-25.
- Sampath-Kumar, A.N.P., Eswara-Reddy, K., y Charitha-Devi, M. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in agri export zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathol. Bull.* 16: 157-160.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., y Frisvad, J.C. 2004. Introduction to food borne fungi, 7th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Samuels, G.J., y Blackwell, M. 2001. Pyrenomycetes, Fungi with Perithecia. En *The Mycota. Systematics and evolution Part A*, p. 221-255. Edited by McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G. y Lemke, P. A. Berlin: Springer-Verlag.
- Sánchez-Peña, P., Cauich-Pech, S.O., Núñez-Farfán, J., Núñez-Cebreros, R.D., Hernández-Verdugo, S., Parra-Terrazas, S., y Villarreal-Romero, M. 2010. Incidence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Races in Tomato in Sinaloa, Mexico. *Plant. Dis.* 04-10-0255.
- Sarris, P.F., Cevik, V., Dagdas, G., Jones, J.D., y Krasileva, K.V. 2016. Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC Biology* 14(8):1-18.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México (SIAP). 2018. [Internet]. [Revisado septiembre 2018]. Disponible en: [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)
- Seifert, K. A., y Gams, W. 2001. The taxonomy of anamorphic fungi. En *The Mycota. Systematics and evolution Part A*, p. 307-347. Edited by McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G. y Lemke, P. A. Berlin: Springer-Verlag.
- Seifert, K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. In: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota. 15 -28 p.
- Seifert, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9: 83–89.
- Sims, W.L. 1979. History of tomato production for industry around the world. In *Symposium on Production of Tomatoes for Processing* 100 (pp. 25-26).
- Smith, E. 1899. Wilt Diseases of Cotton, Watermelon and Cowpea. *U.S. Department Agricultural Burman Plant Industrial.*, Bulletin 17.
- Srivastava, S., Singh, V.P., Kumar, R., Srivastava, M., Sinha, A., y Simon, S. 2011. In vitro evaluation of carbendazim 50% WP, antagonists and botanicals against *Fusarium oxysporum* f. sp. *psidii* associated with rhizosphere soil of guava. *Asian J. Plant Pathol.* 5: 46-53.
- Speth, E.B., Lee, Y.N., y He, S.Y. 2007. Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Curr Opin Plant Biol.* 10: 580-586.
- Stall, R.E., y Walter, J.M. 1965. Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of race 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology* 55:1213-1215.
- Sousa, E.S, Melo, M.P, Mota, J.M., Sousa, M.J., Beserra Jr. J.E.A., y Matos, K.S. 2017. First report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) causing root rot in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. *Plant Disease* 2017 101:11, 1954-1954

- Summerell, B. A., Salleh, B., y Leslie, J.F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 87(2):117-128.
- Takken, F., y Rep, M. 2010. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 11(2): 309-314.
- Tamay, D.I. 2013. Fundamentos de la Reaccion en Cadena de Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigacion en Discapacidad* , 70-78.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics.* 27:205-233. 44.
- Taylor, A., Vagany, V. Barbara, D.J., Thomas, B., Pink, D.A.C., Jones, J.E. y Clarkson, J.P. 2013. Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion. Effect of solar heating and soil amendments of cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* and other organisms. *Disease Control and Pest Management* 78: 289-295.
- Tirado-Ramírez, M., López-Orona, C., Velázquez-Alcaráz, T, Díaz-Valdés, T, Velarde-Félix, S., Martínez-Campos, A. y Retes-Manjarréz J. 2018. First Report of Onion Basal Rot Caused by *Fusarium falciforme* in Mexico. *Plant Disease* 102:12, 2646
- Tupaki-Sreepurna, A., Thanneru, V., Sharma, S., Hemanth, B., Gopi, A., y Sathyamoorthy, S. 2017. Multilocus sequence typing and phylogenetic analysis of clinical *Fusarium* strains isolated from South India. *Mycoses.* 60, 42–43.
- Valadez, E. y Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa México S.A. México. 141 p.
- Valenzuela-Ureta, J. G., Lawn D. A., Heisey R. F., y Zamudio-Guzman V. 1996. First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. *Plant Dis.* 80:105.
- Van Loon, L.C., Rep, M., y Pieterse, C.M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Ann Rev Phytopathol.* 44: 135-162.
- Vega-Gutierrez, T.A., López-Orona, C.A., López-Urquídez, G.A., Velarde-Félix, S. Amarillas-Bueno, A, Martínez-Campos, A, y Allende-Molar, R. 2018. Foot rot and wilt in tomato caused by *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) in Mexico. *Plant Disease* 2019 103:1, 157
- Vega-Gutierrez, T.A., Tirado-Ramírez, M., López-Urquídez, G.A., Angulo-Castro, A, Martínez-Gallardo, J, y López-Orona, C.A. 2019. *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) causing root and stem rot in papaya (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Disease* 2019 103:10, 2681-2681
- Vincenlli, O., y Tisserat, N. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Dis.* 92: 660-669.
- White, T.J., Innis, M.A., Gelfand, D.H., y Sninsky, J.J. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA. pp 482.
- Walker, J. 1971. *Fusarium* Wilt of Tomato. The American Phytopathological Society Monograph No. 6. , 56 p.
- Weitang, S., Ligang, Z., Chengzong, Y., Xiaodong, C., Liqun, Z., y Xili, L. 2004. Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Protect.* 23: 243–247.
- Wien, H. 1997. The physiology of vegetable crops. CAB International, London, UK. 651 p.
- Wolcan, S. y Lori, G. (1991). Podredumbre del pie del tomate, causada por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Plata* 12: 47-51.
- Yadeta, K.A., y Thomma, B.P. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science.* 4:97.
- Yang, Z., y Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews. Genetics.* Volume 12.

Yossen, V., Segota, V., y Conles, M. 2010. Relevamiento y avances en el estudio de las enfermedades que afectan al cultivo de orégano (*Origanum vulgare*) en Córdoba. Análisis de Semillas, R. Argentina, 4 (16): 57-60.

## **X. ANEXOS**

A continuación, se agregan los artículos derivados de la presente tesis.




[< Previous](#)[Next >](#)

DISEASE NOTES



# Foot Rot and Wilt in Tomato Caused by *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) in Mexico

T. A. Vega-Gutiérrez, C. A. López-Orona , G. A. López-Urquidez, S. Velarde-Félix, L. A. Amarillas-Bueno, A. R. Martínez-Campos, and R. Allende-Molar

Affiliations 

## Authors and Affiliations

T. A. Vega-Gutiérrez

C. A. López-Orona <sup>†</sup>

G. A. López-Urquidez, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, CP 80000, Sinaloa, México

S. Velarde-Félix, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (Campus Culiacán), 80000, Culiacán, Sinaloa, México

L. A. Amarillas-Bueno, Instituto de Investigación Lightbourn A. C., CP 33981, Cd. Jiménez, Chihuahua, México

A. R. Martínez-Campos, Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, CP 50000, México

R. Allende-Molar, Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz, CP 92895, México.

Published Online: 29 Oct 2018 | <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1001-PDN>

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is an important staple food crop in Mexico, with an estimated production of 1.375 million metric tons in 2016 (SIAP 2017). Sinaloa is the principal production state with 740,294 metric tons. In November 2016, unusual disease symptoms

[Details](#) [Figures](#) [Literature Cited](#)

Vol. 103, No. 1  
January 2019

[Subscribe](#)

ISSN: 0191-2917  
e-ISSN: 1943-7692

## Metrics

Downloaded 328 times



|   |     |                         |
|---|-----|-------------------------|
|  | 2   | Total citations         |
|  | 2   | Recent citations        |
|  | n/a | Field Citation Ratio    |
|  | n/a | Relative Citation Ratio |

## Article History

were observed in commercial tomato crops in the state of Sinaloa (Mexico). The symptoms included wilting, leaf yellowing, defoliation, vascular tissue darkening, and drying and death of branches and the entire plant. Plant crowns exhibited necrosis (visible in the interior) that advanced through the main root, along with slight root rot. To identify the causal agent, vascular tissue fragments from symptomatic plants collected were surface sterilized in 2.5% sodium hypochlorite solution, placed on potato dextrose agar (PDA), and incubated at 26°C in darkness. White to cream-colored aerial mycelium of typical *Fusarium* colonies were observed from all samples on PDA (Leslie and Summerell 2006). From 10-day-old cultures grown on carnation leaf agar medium, macroconidia were falciform, hyaline, with three septa and measured 29.5 to 50.3 × 5.0 to 8.1 μm (*n* = 50); microconidia were hyaline, unicellular, oblong, with zero to two septa, measured 9.6 to 14.9 × 4.0 to 6.3 μm (*n* = 50), and were borne in false heads that measured 8.2 to 18 × 3.1 to 8.0 μm (*n* = 50). The Translation elongation factor 1 alpha (EF1-α) gene was amplified by polymerase chain reaction and sequenced using the primers EF-1/EF-2 (O'Donnell et al. 1998) in the five monosporic isolates (FFB31SINGUA, FFB38SINCUL, FFB39SINSIN, FFB47SINCUL, and FFB50SINCUL). The sequences were deposited in GenBank under accession numbers MH463541 to MH463545. Maximum likelihood analysis was carried out using the EF1-α gene from the five isolates and other species from the *Fusarium solani* species complex (FSSC). Phylogenetic analysis revealed the five isolates were most closely related to *F. falciforme* (100% bootstrap). The pathogenicity tests were performed on the tomato cultivars Bony Best, Manapal, Walter, and I3R3. Roots of 20 plants per genotype at the two-true-leaf stage grown in autoclaved peat were washed and soaked in a conidial suspension ( $1 \times 10^5$  CFU/ml) of each isolate for 10 min and then transplanted into a pot containing sandy loam soil mix. The suspension was obtained by collecting the spores of each isolate grown on PDA, with 10 ml of an isotonic saline solution. Ten control plants of each genotype washed and soaked in water prior to

transplanting served as a negative control. Plants were maintained for 60 days in a growth chamber with a 12-h photoperiod at 23 to 26°C. Foot rot and wilt similar to those observed on the infected plants in the field were observed on the tomato plants. No symptoms were observed on noninoculated control plants after 60 days. The assay was conducted twice. The pathogen was reisolated from the necrotic tissue from inoculated plants and was identified by sequencing the partial EF1- $\alpha$  gene again and was identified as *F. falciforme* (FSSC 3 + 4) (O'Donnell et al. 2008). The molecular identification was confirmed via BLAST on the FUSARIUMID and *Fusarium* MLST databases. Although FSSC has been previously reported causing foot rot and wilt in tomato in Australia, the United States, Turkey, India, and Israel, this is the first report of foot rot and wilt in tomato caused by *F. falciforme* in Mexico. New strategies need to be developed for effective management of this disease.

---

**Funding:** The research was funded by the Universidad Autónoma de Sinaloa through the project PROFAPI2015/152 to C. A. López Orona.

---



**The American Phytopathological Society (APS)**

3340 Pilot Knob Road, St. Paul, MN 55121 USA

+1.651.454.7250

FAX +1.651.454.0766



APS



# Aggressiveness and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with foot rot and wilt in Tomato in Sinaloa, Mexico

Tomás Aarón Vega-Gutiérrez<sup>1</sup> · Guadalupe Alfonso López-Urquidez<sup>1</sup> · Raúl Allende-Molar<sup>2</sup> · Luis Alfonso Amarillas-Bueno<sup>3</sup> · Sergio de Jesús Romero-Gómez<sup>4</sup> · Carlos Alfonso López-Orona<sup>1</sup>

Received: 21 January 2019 / Accepted: 12 June 2019  
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2019

## Abstract

*Fusarium* wilt is one of the main limiting factors for tomato production in Mexico. One thousand and fifty isolates were obtained from vascular tissues tomato plants showing wilt and yellowing symptoms in Sinaloa, Mexico. The pathogenic isolates were evaluated through phylogenetic analysis of the TEF-1 $\alpha$  gene and ITS region, morphological markers and pathogenicity tests. Within the 15 pathogenic *Fusarium* isolates, 7 were identified as *F. oxysporum* and 8 as *F. falciforme*. Phylogenetic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Fusarium falciforme* isolates confirmed that both populations are constituted by distinct phylogenetic lineages. The isolates showed differences in aggressiveness; *F. falciforme* was the most aggressive. Isolates of both complexes triggered similar aerial symptoms of yellowing and darkening of the vascular tissues in tomato plants. But only *F. falciforme* isolates triggered necrosis in the plant crowns. Morphological markers allowed differentiating isolates from distinct complexes but not differentiating between lineages.

**Keywords** *Fusarium falciforme* · *Fusarium oxysporum* · *Solanum lycopersicum* · TEF-1 $\alpha$  gene · Vascular necrosis

## Introduction

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important staple food crops in Mexico, with an estimated production of 2.1 million metric tons in 2017 (SIAP 2017). Sinaloa State is the main producer and exporter of tomato in Mexico with 744, 824 metric tons, which represents the 35.46% of the national production. This crop represents an economic, cultural and food importance in Mexico.

Several diseases have threatened tomato production, which highlights the fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). *Fusarium oxysporum* is a species complex of morphologically indistinguishable strains by only morphological markers (Lievens et al. 2008). This complex comprehends nonpathogenic and pathogenic isolates designated as formae speciales, characterized based on their host specificity (Armstrong and Armstrong 1981). The *F. oxysporum* species complex (FOSC) contains several phylogenetic lineages that are known to cause important plant diseases such as vascular wilt in various plants of economic interest (Di Pietro et al. 2003). Fusarium wilt is attributed to species such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; this fungus is among the most important and diverse phytopathogenic fungi due to its specificity and virulence. This variability is also manifested by the presence of physiological races numbered from one to three (R1, R2 and R3) (Blancard 1997).

In the state of Sinaloa, the presence of *Fusarium oxysporum* as the causal agent of tomato wilt has been reported by several authors. Valenzuela et al. (1996), reported for the first time to Fol race 3, Carrillo-Fasio et al. (2003) reported the presence of Fol race 2 and 3 in the valley of Culiacan, and 5 years later, Ascencio-Álvarez

✉ Carlos Alfonso López-Orona  
clopezorona@uas.edu.mx

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, C.P. 80000 Culiacán, Sinaloa, Mexico  
<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Carretera Tuxpan-Tampico S/N Colonia Universitaria, C.P. 92895 Tuxpan, Veracruz, Mexico  
<sup>3</sup> Instituto de Investigación Lightbourn A.C, Carretera Las Pampas Km. 2.5, C.P. 33981 Cd. Jiménez, Chihuahua, Mexico  
<sup>4</sup> Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Centro Universitario, C.P. 76010 Santiago de Querétaro, Querétaro, Mexico



et al. (2008) reported the presence of the 3 races of *Fol* in the valley of Culiacan, from all the isolates obtained: 24% corresponded to race 1, 14% to race 2 and 62% to race 3. 1 year later, Cauich (2009) indicates that race 3 of *Fol* prevails in Sinaloa; out of a total of 26 isolates, 23 corresponded to race 3 and three isolates were of race 2 of the same fungus, where race 1 was not found.

*Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) causing foot rot and wilt in tomato in Sinaloa, Mexico has previously been reported (Vega-Gutierrez et al. 2019), which highlights the emergence of new species causing wilt in tomato crops. Members of the *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) are capable of causing disease in many agriculturally important crops in different parts of the world, including Argentina, California, Australia, India, Turkey and Israel (Cucuzza and Waterson 1992; Miyao et al. 2000). In Australia, *Fusarium solani* is the main cause of wilt in tomatoes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Wolcan and Lori 1991).

Characterization of the population structure of *Fusarium* spp. using molecular techniques is also useful for clarifying the disease etiology and devising more effective management strategies.

The taxonomy of *Fusarium* at the species level is based on molecular identification of Internal Transcribed Spacer (ITS) region and Translation Elongation Factor 1- $\alpha$  (TEF-1 $\alpha$ ) gene. The ITS region can provide valuable marker information in the investigation of phylogenetic relationships. ITS regions have been sequenced in many fungi and are used in phylogenetic studies or for the development of species-specific diagnostic probes (Guarro et al. 1999), and have become the primary genetic marker in fungi (Schoch et al. 2012). In the genus *Fusarium*, the ITS regions have been used to study both inter- (O'Donnell and Cigelnik 1997) and intraspecific (Baleman et al. 1996) variations.

The translation elongation factor 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) gene, which encodes an essential part of the protein translation machinery, provides highly useful phylogenetic information at the species level for *Fusarium* and was used as a marker for resolving inter- and intra-species relationships within the *Fusarium* species complex (Geiser et al. 2004; Kristensen et al. 2005; Stewart et al. 2006).

Also, to better understand the importance of tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Fusarium falciforme* in Sinaloa, Mexico, it is critical to study the genetic variation within the fungal populations and study their aggressiveness on tomato crops.

The aims of the present study were to: (1) identify the species of *Fusarium* spp. that cause tomato wilt through biological, morphological and molecular methods; (2) study the aggressiveness of the isolates of *Fusarium* spp.; and (3) know the phylogenetic relationship of isolated species with other species from Mexico and the world.

## Materials and methods

### *Fusarium* Isolates

Isolates were obtained from vascular tissue fragments from commercial tomato plants exhibiting wilting, leaf yellowing, defoliation, vascular tissue darkening, and drying and death of branches and the entire plant. Vascular tissue fragments were surface sterilized in 2.5% sodium hypochlorite solution and placed on potato dextrose agar (PDA) to obtain pure cultures. Monosporic cultures were obtained from pure colonies according to the methodology of Hansen and Smith (1932). The coordinates of the sampling sites are described in Table 1.

### Evaluation of morphological markers

Morphological characterization was performed according to the characters described by Leslie and Summerell (2006). Isolates were cultivated on PDA medium at 25 °C in the dark for 6 days. Colony color and formation of aerial mycelium were observed after 14 days of growth on PDA incubated at 20 °C. In Carnation Leaf Agar (CLA), under the same previously mentioned conditions, microconidial and macroconidial shape and septation, arrangement of conidiogenous cells and presence or absence of chlamydospores were observed and measured (50 n).

### Pathogenicity test

The pathogenicity tests were conducted using the tomato cultivars Bony Best, Manapal, Walter, and I3R3. Roots of 20 plants per genotype at the two-true-leaf stage grown in autoclaved peat were washed and soaked in a conidial suspension ( $1 \times 10^5$  CFU/ml) of each isolate for 10 min and then transplanted into a pot containing sandy loam soil mix. The suspension was obtained by collecting the spores of each isolate

**Table 1** Geographic locations in Sinaloa and samples collected

| Municipality     | Geographical coordinates |             | Number of samples |
|------------------|--------------------------|-------------|-------------------|
|                  | Longitude                | Latitude    |                   |
| Sinaloa de Leyva | 25°76'52"N               | 108°27'55"O | 12                |
| El Fuerte        | 26°05'00"N               | 108°45'56"O | 148               |
| Angostura        | 25°37'47"N               | 108°13'25"O | 32                |
| Culiacan         | 24°50'12"N               | 107°35'42"O | 245               |
| Mocorito         | 25°45'43"N               | 108°03'11"O | 43                |
| Guasave          | 25°47'26"N               | 108°38'59"O | 99                |
| Elota            | 24°03'25"N               | 106°47'55"O | 110               |
| Navolato         | 24°46'07"N               | 107°31'46"O | 134               |
| Escuinapa        | 22°45'0"N                | 105°50'16"O | 27                |
| El Rosario       | 23°2'51"N                | 105°56'54"O | 200               |
| Total of samples |                          |             | 1050              |

grown on PDA, with 10 ml of an isotonic saline solution. Ten control plants of each genotype washed and soaked in water prior to transplanting served as a negative control. Plants were maintained for 60 days in a growth chamber with a 12-h photoperiod at 23 to 26 °C.

Complete randomized design was used with three replicates and the same trial was repeated twice. Isolates aggressiveness was determined by the increase of severity during the whole period of evaluation. The first evaluation of pathogenicity was performed 15 days after the inoculation and then every 15 days after the first evaluation. The disease was assessed based on the presence or absence of symptoms of the disease, using the severity scale from 0 to 100% proposed by Marlatt et al. (1996) (Table 2).

The Disease Severity Index (DSI) was calculated with the formula proposed by Galanihi et al. (2004):

$$DSI = \sum [P \times Q/M \times N] \times 100$$

where *P* is the severity point, *Q* is the number of plants infected with some scale, *M* is the total number of plants

**Table 2** Severity scale of *Fusarium* wilt according to Marlatt et al. (1996)

| Value | Symptom   |
|-------|---|
| 0     | Healthy plant   |
| 1     | First symptoms of chlorosis of leaves                       |
| 2     | Severe chlorosis of the leaves, initial symptoms of wilting |
| 3     | Serious symptoms of wilting and chlorosis of the leaves     |
| 4     | Plant totally withered, completely necrotic                 |

observed, and *N* is the maximum classification in the number of the scale.

## DNA extraction and PCR amplification

The mycelium of each isolate was collected by scraping the surface of growing colonies on PDA medium (previously incubated for 1 week at 25 °C). After grinding 100 mg of fungal mycelia from each isolate in liquid nitrogen, the genomic DNA was extracted based on the method described by Ausubel et al. (2003). The DNA concentration and quality were estimated using a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Fisher Scientific).

The DNA extracted from the *Fusarium* isolates was analyzed by PCR with the primers listed in Table 3. The final reaction mixture (25 µL) contained 100 ng DNA template, an equimolar mixture of dNTPs, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, PCR buffer, 1U Taq DNA polymerase and 40 pmol of each oligonucleotide (Bioline®). The sequences of all the primers and PCR conditions used are provided in Table 3.

For the detection and race discrimination of *Fol*, three predicted avirulence genes from the SIX proteins were used in this study, including AVR1 = SIX4, AVR2 = SIX3 and AVR3 = SIX1 (Rep et al. 2004; Houterman et al. 2008, 2009). All isolates were subjected to PCR analysis using primers that were previously used by Lievens et al. (2009), amplifying the SIX1, SIX 3 and SIX 4 proteins (Table 3).

PCR products (ITS and EF-1α DNA) were purified and sequenced by Macrogen Inc. The ITS and EF-1α DNA sequences were used to search for sequence similarity

**Table 3** Conditions of annealing temperatures and sequences of primers for PCR analysis of *Fusarium* spp.

| Primer                 | Sequence (5' → 3')            | Annealing (°C) | Amplicon length (bp) | Species-specificity                       |
|------------------------|-------------------------------|----------------|----------------------|---|
| D: EF1                 | ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC      | 53 °C          | 700pb                | All <i>Fusarium</i> species <sup>ab</sup> |
| R: EF2                 | GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT |                |                      |   |
| D:ITS1                 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG           | 55 °C          | 600 a 650pb          | All Fungal species <sup>c</sup>           |
| R:ITS4                 | TCCTCCGCTTATTGATATG           |                |                      |   |
| R: Six1 P12-R1         | AATAGAGCCTGCAAAGCATG          | 967pb          |                      | Fol race 1 <sup>f</sup>                   |
| D: Six4 Six4-F1        | TCAGGCTTCACCTTAGCATAAC        |                |                      |   |
| R: Six4 Six4-R2        | GCCGACCGA AAAACCCTAA          | 608pb          |                      | Fol race 3 <sup>df</sup>                  |
| D: Six3a Six3-G121A-F2 | ACGGGGTAACCCATAT TGCA         |                |                      |   |
| D: Six3b Six3-G134A-F2 | TTGCGTGTTCCTCCGGCCA           |                |                      |   |
| D: Six3c Six3-G137C-F1 | GCGTGTTCCTCCGGCCGCCC          |                |                      |   |
| R: Six3-R2             | GGCAATTAACCACTCTGCC           |                |                      |   |

D: Direct, R: Reverse

<sup>a</sup>O'Donnell et al. (1998)

<sup>b</sup>Geiser et al. (2004)

<sup>c</sup>White et al. (1990)

<sup>d</sup>Van Der Does et al. (2008)

<sup>e</sup>Rep et al. (2004)

<sup>f</sup>Lievens et al. (2009)

**Table 4** Origin, codes and GenBank accession numbers of the *Fusarium* spp. isolates from tomato plants

| Species              | Isolation code | Origin             | GenBank accession |
|----------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| <i>F. oxysporum</i>  | FOB20SINEL0    | Sinaloa, Elota     | MH298326          |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOB25SINGUA    | Sinaloa, Guasave   | MH463538          |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOB29SINESC    | Sinaloa, Escuinapa | MH463539          |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOB30SINFUE    | Sinaloa, El Fuerte | MH463540          |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOA62SINFUE    | Sinaloa, El Fuerte | MH048074          |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOA64SINEL0    | Sinaloa, Elota     | MH048079          |
| <i>F. oxysporum</i>  | FOA66SINESC    | Sinaloa, Escuinapa | MH048078          |
| <i>F. falciforme</i> | FFB31SINGUA    | Sinaloa, Guasave   | MH463541          |
| <i>F. falciforme</i> | FFB39SINSIN    | Sinaloa, Sinaloa   | MH463543          |
| <i>F. falciforme</i> | FFB50SINCUL    | Sinaloa, Culiacán  | MH463545          |
| <i>F. falciforme</i> | FFA55SINESC    | Sinaloa, Escuinapa | MH048076          |
| <i>F. falciforme</i> | FFA54SINFUE    | Sinaloa, El Fuerte | MH048075          |
| <i>F. falciforme</i> | FFA63SINNAV    | Sinaloa, Navolato  | MH048077          |
| <i>F. falciforme</i> | FFB38SINCUL    | Sinaloa, Culiacán  | MH463542          |
| <i>F. falciforme</i> | FFB47SINCUL    | Sinaloa, Culiacán  | MH463544          |

against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLASTN program. The molecular identification was confirmed via BLAST on the FUSARIUM ID and *Fusarium* MLST databases. Species were identified based using 100% sequence identity as the threshold. Sequences generated in this study were deposited in GenBank with accession numbers also listed in Table 4.

The ITS and the EF-1 $\alpha$  sequences were aligned with reference sequences of the FOOSC obtained from GenBank using the multiple alignment in ClustalW of the software Geneious R9, and phylogenetic relationships were inferred based on the nucleotide sequence alignment of the gene among the *Fusarium* isolates. Trees were constructed by the neighbor-joining method based on distances determined by the method of Jukes and Cantor using 1000 bootstrap replicates.

## Data analysis

The data obtained from the pathogenicity test were subjected to a non-parametric analysis of variance with the Kruskal–Wallis and Dunn test ( $p \leq 0.05$ ). All statistical analyses were performed with the XLSTAT software.

## Results and discussion

### Morphological markers

149 monospore isolates were identified as *Fusarium* spp. based on the morphology of their colonies using the *Fusarium* synoptic keys for species identification of Leslie and

Summerell (2006) and Nelson et al. (1983). Within the 15 pathogenic *Fusarium* isolates, 7 isolates showed typical morphological markers for *F. oxysporum* and 8 for *F. falciforme* (Table 5).

Isolates of *F. oxysporum* in PDA showed a white or creamy cottony mycelium with pigmentation at the bottom of the colony that varies from yellow to brown (Fig. 1c). Microconidia were observed in a cylindrical to renal manner, with 0–1 septa, 4–16  $\times$  3.5–6  $\mu$ m (Fig. 1b). The macroconidia are in straight, thin-walled form, 16–40  $\times$  5–7  $\mu$ m, 3–4 septa (Fig. 1a). All the isolates showed short phialides (Fig. 1e, f). Chlamydospores were not evident.

*Fusarium falciforme* colonies were white to cream-colored aerial mycelium from all samples on PDA. From 10-day-old cultures grown on CLA medium, macroconidia were falciform, hyaline, with three septa and measured 29.5 to 50.3  $\times$  5.0 to 8.1  $\mu$ m ( $n=50$ ); microconidia were hyaline, unicellular, oblong, with zero to two septa, measured 9.6 to 14.9  $\times$  4.0 to 6.3  $\mu$ m ( $n=50$ ), and were borne in false heads that measured 8.2 to 18  $\times$  3.1 to 8.0  $\mu$ m ( $n=50$ ) (Fig. 2b). Chlamydospores were not evident.

### Pathogenicity test

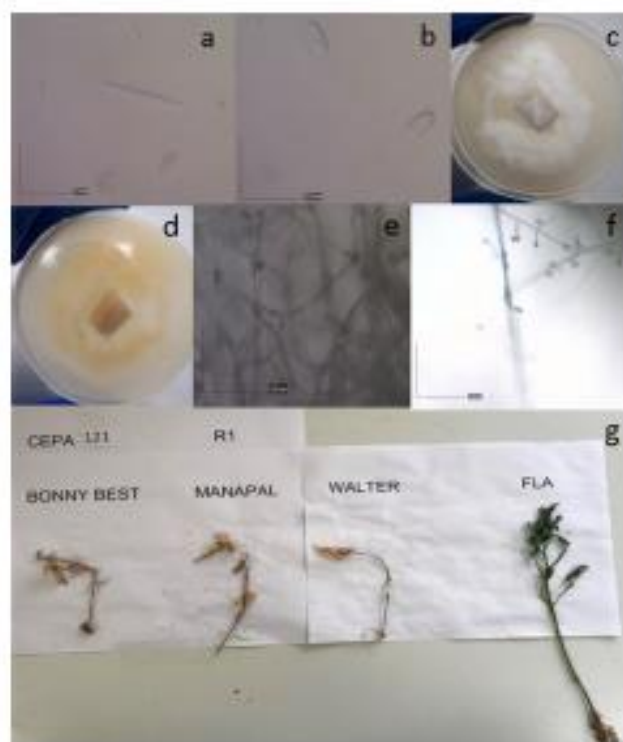
In the present study, the results of the pathogenicity test revealed that only 15 isolates (10%) among a total of 149 isolates of *Fusarium* spp. were found to be pathogenic and the others were weakly or not pathogenic. All the infected plants showed an initial yellowing from the first and second leaves, *F. oxysporum* and *F. falciforme* presented similar aerial symptoms (Figs. 1g, 2g). The symptoms caused by *F. falciforme* isolates included wilting, vascular tissue darkening, and drying and death of leaf and the entire plant. Also, plant crowns exhibited necrosis (visible in the interior) that

**Table 5** Morphological characterization of pathogenic isolates of *Fusarium* spp.

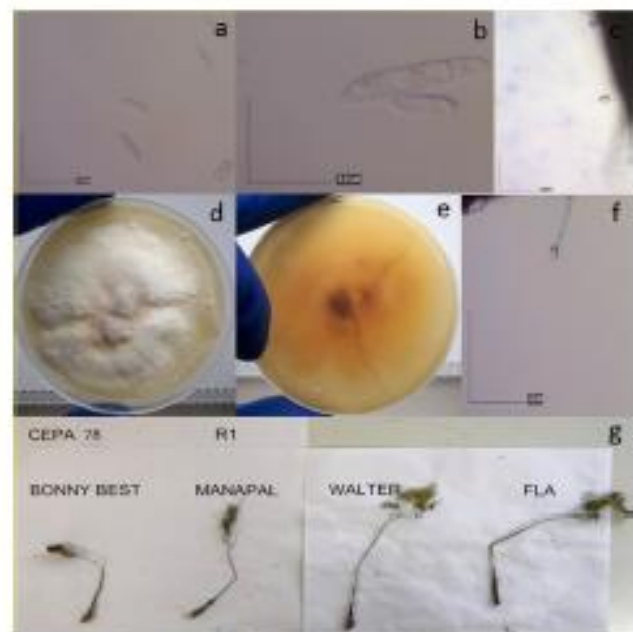
| Isolates             | Color of Mycelium <sup>a</sup> |  | Macroconidia <sup>b</sup> |       | Microconidia <sup>b</sup> |       |
|----------------------|--------------------------------|--|---------------------------|-------|---------------------------|-------|
|                      | Front/back                     |  | Length/width (µm)         | Septs | Length/width (µm)         | Septs |
| <i>F. oxysporum</i>  |                                |  |                           |       |                           |       |
| FOB20SINEL0          | White/yellow                   |  | 18–37 × 5–6               | 3–4   | 4–16 × 3.5–5              | 0–1   |
| FOB25SINGUA          | White/brown                    |  | 17–35 × 5–7               | 3–4   | 4–15 × 3–5                | 0–1   |
| FOB29SINESC          | Cream/yellow                   |  | 17–32 × 4–6               | 3–4   | 6–14 × 3–4.2              | 0–1   |
| FOB30SINFUE          | White/yellow                   |  | 16–30 × 5–6               | 3–4   | 4–15 × 4–6                | 0–1   |
| FOA62SINFUE          | White/yellow                   |  | 16–35 × 5–7               | 3–4   | 4–16 × 4–5                | 0–1   |
| FOA64SINEL0          | White/yellow                   |  | 17–30 × 5–6               | 3–4   | 5–15 × 4–5                | 0–1   |
| FOA66SINESC          | White/brown                    |  | 19–40 × 6–7               | 3–4   | 6–15 × 4–6                | 0–1   |
| <i>F. falciforme</i> |                                |  |                           |       |                           |       |
| FSB31SINGUA          | White/brown                    |  | 29–42 × 5–6.5             | 2–4   | 10–12 × 4.7–6             | 1–3   |
| FSB39SINSIN          | White/cream                    |  | 31–46 × 5–7               | 2–4   | 10.2–15 × 4.3–6.1         | 1–3   |
| FSB50SINCUL          | White/brown                    |  | 29–41 × 5–7               | 3–4   | 9.6–14 × 5–6              | 1–3   |
| FSA55SINESC          | White/brown                    |  | 29–48 × 6–7.7             | 3–4   | 10.5–14 × 4.5–5.9         | 1–3   |
| FSA54SINFUE          | White/yellow                   |  | 35–45 × 5.2–7             | 2–4   | 11–14.6 × 4.8–6.2         | 1–3   |
| FSA63SINNAV          | White/brown                    |  | 30–47 × 5–7               | 3–4   | 9.9–14.5 × 5–6.1          | 1–3   |
| FFB38SINCUL          | White/brown                    |  | 35–50 × 5–7               | 3–5   | 10.1–13.2 × 4.5–5.5       | 1–3   |
| FFB47SINCUL          | White/yellow                   |  | 30–37 × 5.5–6.9           | 3–5   | 12.1–14.8 × 4–6.3         | 1–3   |

<sup>a</sup>Characterized 14 days after incubation on PDA medium at 25 °C in a 12 h photoperiod

<sup>b</sup>Characterized 14 days after incubation on CLA medium at 25 °C in a 12 h photoperiod



**Fig. 1** Morphological characteristics of *Fusarium oxysporum* isolates: **a** macroconidia and microconidia, bar=5 µm; **b** microconidia, bar=5 µm; **c** top view of a typical colony in PDA; **d** reverse view of a colony on PDA; **e** and **f** Phialides, bar=5 µm; **g** diseased tomato plants



**Fig. 2** Morphological characteristics of *Fusarium falciforme* isolates: **a** macroconidia, bar=5 µm; **b** macroconidia and microconidia, bar=5 µm; **c** and **f** Phialides, bar=5 µm; **d** top view of a typical colony on PDA; **e** reverse view of a colony growing on PDA; **g** fungal isolations of disease d tomato plants

advanced through the main root, along with slight root rot. But *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* only included wilting, vascular tissue darkening, and drying and death of leaf and the entire plant.

The results indicated that one isolate of Fol was race 1, one isolate was race 2 and 5 isolates were race 3. These results coincide with those reported by Grattidge and O'Brien (1982), Marlatt et al. (1996) and Volin and Jones (1982), who also reported 'Bony Best' as susceptible to all races of Fol, 'Manapal' as susceptible to Fol race 2 and 3, 'Walter' as susceptible to Fol race 3 and 'I3R3' as resistant to all races of Fol.

The identification of the races of *Fusarium oxysporum* was confirmed by PCR based on those proposed by Lievens et al. (2009) and Boix-Ruiz et al. (2015), confirming the identity what agrees with the biological pathogenicity tests

(Table 6). These results agree with Lievens et al. (2009) and Boix-Ruiz et al. (2015) who used these sets of primers to discriminate among Fol races. SIX 1 is used for the identification of the formae speciales *lycopersici*. SIX4 can be used for the identification of race 1 strains, while polymorphisms in SIX3 can be used to differentiate race 2 from race 3 strains.

All the isolates of *Fusarium falciforme* were pathogenic on the four differential cultivars. Therefore, *F. falciforme* is able to kill tomato cultivars resistant to the three races of Fol, and not only that, *F. falciforme* was the most aggressive, which represents a very important problem in the production of this important crop.

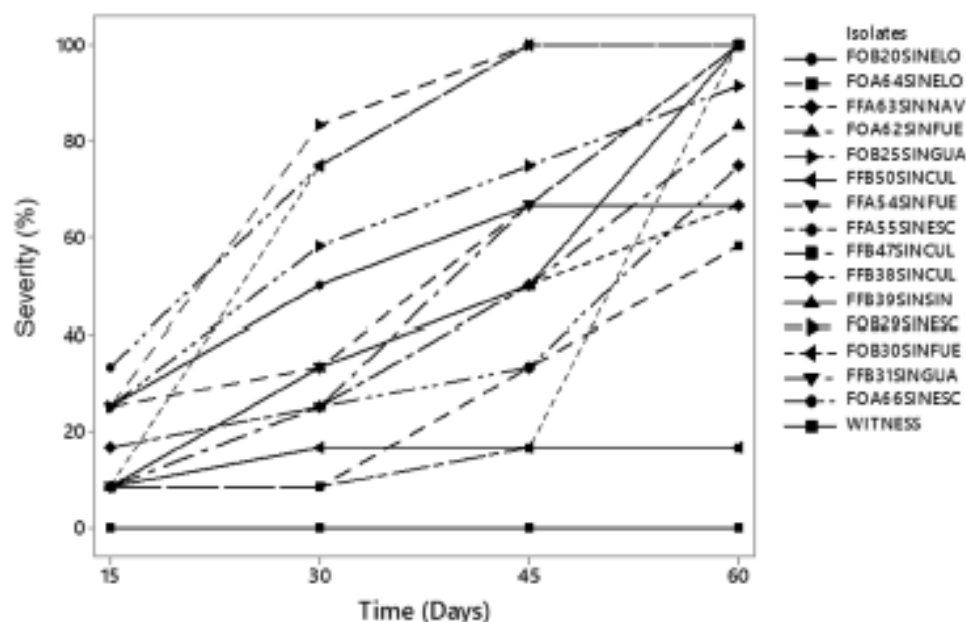
Isolates varied in aggressiveness according to the symptoms they caused disease on plants (Fig. 3). The isolate FFA54SINFUE (*F. falciforme*) was the most aggressive

**Table 6** Differentiation of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by PCR

| Isolate     | Race | Primer complex |      |      |       |       |       |
|-------------|------|----------------|------|------|-------|-------|-------|
|             |      | TEF            | SIX1 | SIX4 | SIX3a | SIX3b | SIX3c |
| FOB20SINELO | 1    | +              | +    | +    | -     | -     | -     |
| FOB25SINGUA | 3    | +              | +    | -    | +     | -     | -     |
| FOB29SINESC | 3    | +              | +    | -    | +     | -     | -     |
| FOB30SINFUE | 3    | +              | +    | -    | -     | +     | -     |
| FOA62SINFUE | 2    | +              | +    | -    | -     | -     | -     |
| FOA64SINELO | 3    | +              | +    | -    | -     | -     | +     |
| FOA66SINESC | 3    | +              | +    | -    | -     | +     | -     |
| FSB31SINGUA | -    | +              | -    | -    | -     | -     | -     |
| FSB39SINSIN | -    | +              | -    | -    | -     | -     | -     |
| FSB50SINCUL | -    | +              | -    | -    | -     | -     | -     |

+ Amplicon present; - amplicon absent

**Fig. 3** Severity of the disease (%) caused by isolates of *F. oxysporum* and *F. falciforme* in tomato plants at 60 days after inoculation



**Table 7** Analysis of disease severity by the Kruskal–Wallis test and comparison of means by Dunn ( $p \leq 0.05$ )

| Isolate <sup>a</sup> | DSI % <sup>b</sup> | Groups <sup>c</sup> |
|----------------------|--------------------|---------------------|
| FOA64SINELO          | 100.00             | A                   |
| FOA66SINESC          | 100.00             | A                   |
| FFA55SINESC          | 100.00             | A                   |
| FFA54SINFUE          | 100.00             | A                   |
| FFA63SINNAV          | 100.00             | A                   |
| FFB38SINCUL          | 100.00             | A                   |
| FFB47SINCUL          | 100.00             | A                   |
| FOA62SINFUE          | 91.7               | A                   |
| FOB30SINFUE          | 83.3               | A                   |
| FFB50SINCUL          | 75.00              | AB                  |
| FOB20SINELO          | 66.7               | B                   |
| FOB29SINESC          | 66.7               | B                   |
| FOB25SINGUA          | 58.3               | BC                  |
| FFB31SINGUA          | 16.7               | C                   |
| FFB39SINSIN          | 16.7               | C                   |

<sup>a</sup>Monosporic isolates of *Fusarium* spp.

<sup>b</sup>Index of severity of the disease expressed as a percentage

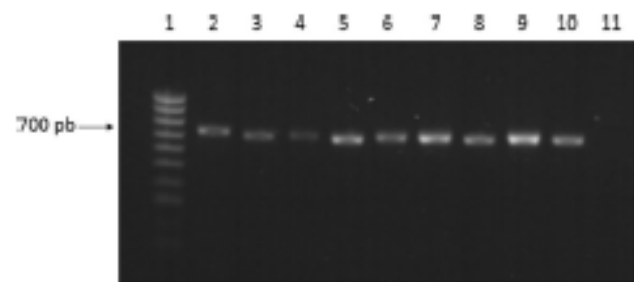
<sup>c</sup>Comparison of ranges by Dunn with  $p \leq 0.05$ . Equal letters show no significant difference

and caused high disease severity (83.3%) 15 days after the inoculation (dai), causing the death of the plants at 45 dai (Fig. 3).

The isolates that showed an incidence of intermediate severity which oscillated between 58% and 75% at 45 dai, and were statistically equal were FFB50SINCUL, FOB20SINELO, FOB29SINESC and FOB25SINGUA, while the isolates FFB31SINGUA and FFB39SINSIN were the least aggressive and statistically equal (Table 7).

Fungi were recovered from symptomatic plants and showed the same morphological characteristics from the originally inoculated isolates, thus confirming their pathogenicity. Control plants showed no symptoms at all. Inoculations were performed twice, showing similar results.

Isolates of both complexes were pathogenic and triggered similar aerial symptoms of yellowing and darkening of the vascular tissues in tomato plants. But only *F. falciforme* isolates triggered necrosis in the plant crowns (visible in the interior) that advanced through the main root, along with slight root rot, while species from FSSC show local colonization, mainly causing rot roots, specifically in leguminous. Due to tissues colonization, the plants exhibit reflexes symptoms of yellowing by interfering with the absorption and translocation of water and nutrients (Aoki et al. 2005, 2012). Differences observed in aggressiveness from isolates may be a result of genetic variability within the population, once isolates were obtained from different tomato cultivars. As well as the genetic variation, the differences in aggressiveness



**Fig. 4** PCR product obtained from genomic DNA of selected isolates for the identification of *Fusarium* spp. with the pair of primers EF-1 and EF-2, visualized on a 1.0% agarose gel. Carril 1; 100 bp molecular weight marker, lanes 2–10; Selected isolates (FOB20SINELO, FOB25SINGUA, FOB29SINESC, FOB30SINFUE, FFB31SINGUA, FFB38SINCUL, FFB39SINSIN, FFB47SINCUL y FFB50SINCUL). Lane 11; negative control

between isolates may be explained by the variations in the climatic conditions of the sites from which the isolates were recovered, which favor genetic co-evolution, independent of the pathogen (Daami-Remadi 2006).

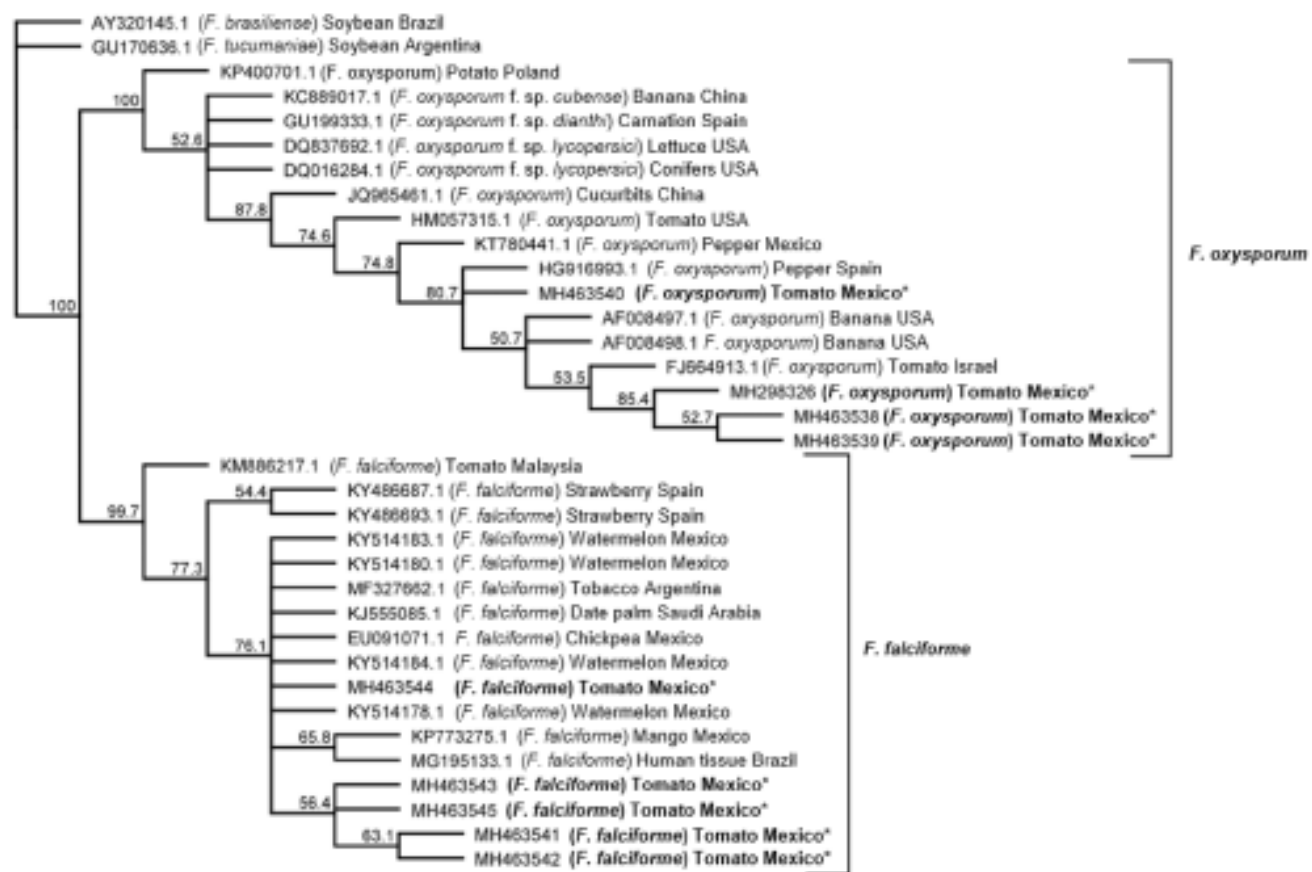
### PCR assays

PCR analysis of the 15 pathogenic isolates of *Fusarium* spp. amplified the expected fragment of the TEF-1 $\alpha$  gene (622 to 675 bp) (Fig. 4) and the ITS region (465 to 506 bp).

The identity of the 15 pathogenic *Fusarium* isolates was confirmed by sequencing the amplified fragment of internal transcribed spacer region using the ITS universal primers ITS1 and ITS4 and the gen TEF-1 $\alpha$  (Table 1). The analysis of ITS and TEF-1 $\alpha$  sequences of these isolates by BLAST in the GenBank, Fusarium ID and Fusarium MLST databases has shown that 8 of them were affiliated to the species *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) with 99.9% homology and seven isolates were identified as *Fusarium oxysporum* with a homology of 99.9 to 100%.

### Phylogenetic analyses

Phylogenetic tree resulting from neighbor-joining analysis for the TEF-1 $\alpha$  (Fig. 5) showed clustering of isolates into different groups; it showed the formation of three large groups with values of similarity shown in the branches, aligning each species of *Fusarium* in each group. The first major clade includes two different species, *F. brasiliense* and *F. tucumaniae*, which were established as an external group. The *F. oxysporum* group showed small different clades; the isolate with accession number HM057315 reported in tomato in the USA showed a similarity of 99.8% with the isolates obtained in the present study, located in the same clade. The group of *F. falciforme* formed small clades, where the isolates obtained in this study have a similarity that



**Fig. 5** Phylogram of neighbor joining for TEF-1 $\alpha$  gene from *F. falciforme* and *F. oxysporum* complexes. Values at the nodes represent the percentage bootstrap scores (1000 replicates). This tree has *F. brasiliense* (AY320145) and *F. tucumaniae* (GU170636) as root

varies between 99.5% and 100% with the isolates reported in Mexico with accession numbers KY514183, KY514180, KY514184 and KY514178 (Fig. 5).

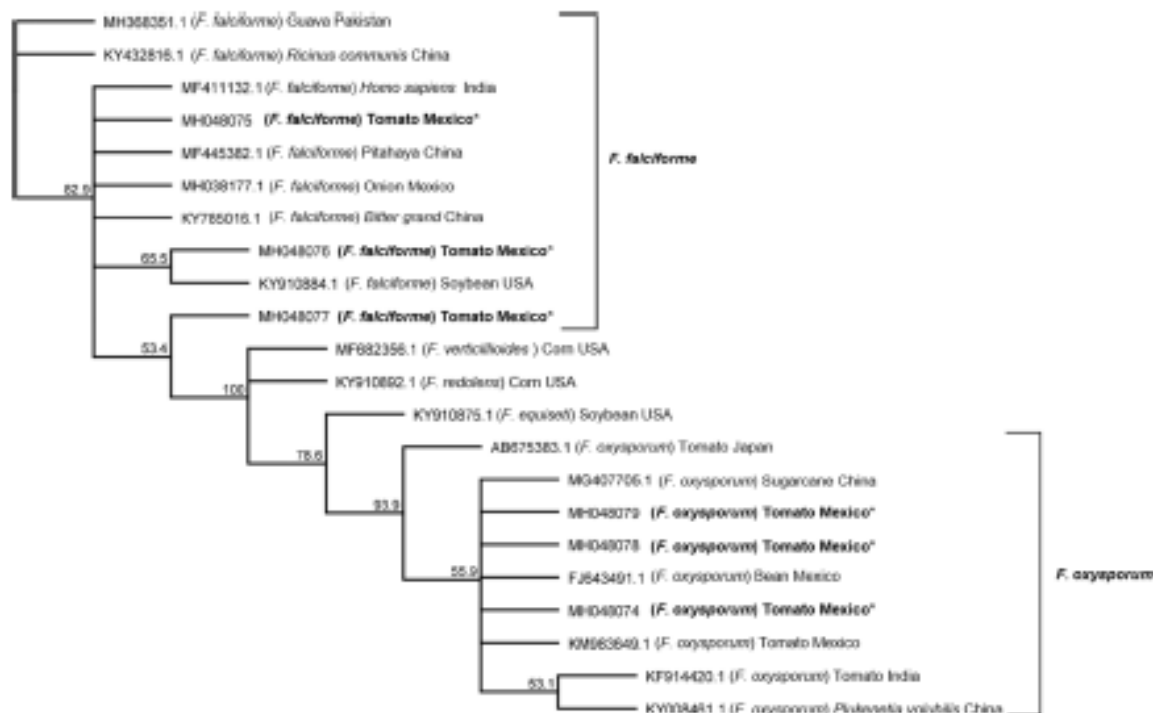
In the phylogram generated with the partial sequences of the ITS gene (Fig. 6), the phylogenetic tree was divided into groups, aligning each species of *Fusarium* in one of them. The first group was that of *F. falciforme*, which presented subgroups; the isolates of *F. falciforme* of the present study were located in different subgroups; the second large group was that of *F. oxysporum*, observing that the isolates of the present study were located together with other isolates obtained from Mexico and one from China. *F. verticilloides*, *F. redolens* and *F. equiseti* were located in independent groups.

The presence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* infecting tomato plants in Sinaloa, Mexico was reported by several authors. However, the identification was based only on morphological markers, which are not enough to make distinctions between species within the FOSC. In the present study, isolates identified as belonging to the FOSC formed a clade with highly supported, clearly separated from *F. falciforme*. Phylogenetic analysis of *Fusarium oxysporum* f.

sp. *lycopersici* and *Fusarium falciforme* isolates confirmed that both populations are constituted by distinct phylogenetic lineages. These observations evidence the importance for using the phylogenetic concept to identify fungi from the genus *Fusarium*.

The genetic variability between the different isolations observed in the phylogenetic tree may be related to the different geographic origins of the host from which they were isolated, since, according to the results obtained in several phylogeography works, they indicate that the populations of phytopathogenic fungi that infect multiple host species of plants can be divided according to their geographical origin. The genetic variations found according to the length of the branches of the tree can be attributed to variations in the climatic conditions of the sites from which the isolates were recovered, which favor genetic co-evolution independent of the pathogen.

According to the history of the tomato crop in Sinaloa state (Mexico), recently the cultivars have been gradually replaced with new cultivars (resistant to the 3 races of FoI), while a decade ago that had not happened. Thus, it could be expected that increased host diversity would contribute



**Fig. 6** Phylogram of neighbor joining for ITS gene from *F. falciforme* and *F. oxysporum* complexes. Values at the nodes represent the percentage bootstrap scores (1000 replicates)

to increased genetic diversity and aggressiveness between *Fusarium* isolates.

## Conclusions

Isolates varied in aggressiveness according to the symptoms they caused disease on plants, and *F. falciforme* is able to kill tomato cultivars resistant to the three races of FoI and was the most aggressive, which represents a very important problem in the production of this important crop. It was not find any relationship between the identified *Fusarium* species with the sampled areas and the production system; this shows the high capacity of this pathogen to affect tomato established under any condition due to the genetic variability of *Fusarium*, which affected the high variability of the infection period and aggressiveness rate as observed in this study. This is of significant importance to continue monitoring and evaluating crop diseases development to avoid high losses in tomato production. Studies must be performed to evaluate the pathogenic capacity of the isolates on different tomato cultivars. New DNA regions have been discovered and linked to virulence genes, so future molecular studies will be based on more specific genomic regions in the *Fusarium* isolates.

**Acknowledgements** Thanks are extended to CONACYT for the scholarship granted to Tomás Aarón Vega-Gutiérrez to carry out his Doctoral's studies. The research was funded by Universidad Autónoma de Sinaloa through the Project PROFAP 2015/152 for Carlos Alfonso López-Orona.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Aoki T, O'Donnell K, Scandiani MM (2005) Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience* 46:162–183
- Aoki T, Tanaka F, Suga H, Hyakumachi M, Scandiani MM, O'Donnell K (2012) *Fusarium azukicola* sp. nov., an exotic azuki bean root-rot pathogen in Hokkaido, Japan. *Mycologia* 104:1068–1084
- Armstrong GM, Armstrong JK (1981) Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ (eds) *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park, pp 391–399
- Ascencio-Álvarez A, López Benítez A, Borge-Escalante F, Rodríguez-Herrera SA, Flores-Olivas A, Jiménez-Díaz F, Gámez-Vázquez AJ (2008) Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.)



- Snyder y Hansen en Culiacan, Sinaloa, Mexico. *Rev Mex Fitopatol* 26:114–120
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (2003) Current protocols in molecular biology. Wiley, New York, p 4648
- Bateman GL, Kwasna H, Ward E (1996) Relationships among *Fusarium* spp. estimated by comparing restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified nuclear rDNA. *Can J Microb* 42:1232–1240
- Blancard D (1997) A color Atlas of tomato diseases. Observation, identification and control, 1st edn. Wiley, New York, p 212
- Boix-Ruiz A, Gálvez-Patón L, de Cara-García M, Palmero-Llamas D, Camacho-Ferre F, Tello-Marquina JC (2015) Comparison of analytical techniques used to identify tomato pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* 43:471–483
- Carrillo-Fasio JA, Montoya-Rodríguez TJ, García-Estrada RS, Cruz-Ortega JE, Márquez-Zequera I, Sañudo-Barajas AJ (2003) Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Rev Mex Fitopatol* 21(2):123–127
- Cauich PS (2009) Determinación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder and Hansen en Sinaloa, México. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción Agrícola. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía de Culiacán Sinaloa
- Cucuzza J, Waterson J (1992) Foot rot of tomato caused by *Fusarium solani* in California. *Plant Dis* 76:101
- Daami-Remadi M (2006) Étude des fusarioses de la pomme de terre [Study of fusariosis of the potato]. Thèse, Institut Supérieur 424 Agronomique de Chott-Mariem, Tunisie
- DiPietro A, Madrid MP, Caracul Z, Delgado JJ, Roncero MIG (2003) *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* 4:315–325
- Galanthe LD, Priyantha MGD, Yapa DR, Bandara HMS, Ranasinghe J (2004) Insect pest and diseases incidences of exotic hybrid Chilli pepper varieties grown in the low Country dry zone of Sri Lanka. *Ann Sri Lanka* 6:99–106
- Geiser D, Jiménez GM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K (2004) FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol* 110:473–479
- Grattidge R, O'Brien RG (1982) Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Dis* 66:165–166
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 12:454–500
- Hansen HN, Smith RE (1932) The mechanisms of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 37:369–371
- Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathog* 4(5):e1000061
- Houterman PM, Ma L, van Ooijen G, de Vroomen MJ, Cornelissen BJC, Takken HLW, Rep M (2009) The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J* 58:970–978
- Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst JA (2005) Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycol Res* 109:173–186
- Leslie JF, Sumner BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing Ltd, Oxford
- Lievens B, Rep M, Thomma BPHJ (2008) Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Manag Sci* 64:781–788
- Lievens B, Houterman PM, Rep M (2009) Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiol Lett* 300:201–215
- Marlatt ML, Correll JC, Kaufman P, Cooper PE (1996) Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Dis* 80(12):1336–1342
- Miyao B, Falk B, Subbarao K, Stapleton J (2000) Tomato *Fusarium* foot rot. U.C. Pest management guidelines. <http://www.ipm.ucdavis.edu> Accessed 12 Oct 2018
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas W (1983) *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, pp 142–145
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 7:103–116
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2044–2049
- Rep M, Van Der Does HC, Meijer M, Van Wijk R, Houterman PM, Dekker HL (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol Microbiol* 53:1373–1383
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W (2012) Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6241–6246
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance de Siembras y cosechas, Resumen nacional por estado. (2017). [http://infos.iap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do](http://infos.iap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do) Accessed 05 Oct 2018
- Stewart JE, Kim MS, James RL, Dumroese RK, Klopfenstein NB (2006) Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* isolates from a conifer nursery. *Phytopathology* 96:1124–1133
- Valenzuela UJG, Lawn DA, Heisey RF, Zamudio GV (1996) First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in Mexico. *Plant Dis* 80:105
- Van Der Does HC, Lievens B, Claes L, Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M (2008) The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environ Microbiol* 10:1475–1485
- Vega-Gutiérrez TA, López-Orona CA, López-Urquidez GA, Velarde-Félix S, Amarillas-Bueno LA, Martínez-Campos AR, Allende-Molar R (2019) Foot rot and wilt in tomato caused by *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) in Mexico. *Plant Dis* 103:157. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-18-1001-pdn>
- Volin RB, Jones JP (1982) A new race of *Fusarium* wilt of tomato in Florida and sources of resistance. *Proc Fla State Hort Soc* 95:268–270
- White TJ, Burns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocol, a guide to methods and application. Academic Press, New York, pp 315–322
- Wolcan S, Lori G (1991) Podredumbre del pie del tomate, causada por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Rev la Fac Agron* 12:47–51