

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Detección de *Fusarium oxysporum* en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.)
en la Sierra norte y centro del Ecuador**

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

MARTÍN JOSUÉ ARELLANO SOLÓRZANO

QUITO, 2018

DEDICATORIA

Para mi madre, mi hermana y especialmente a mi padre.

Al mundo microbiano que me permitió ver maravillas y me demostró que esta profesión es la
mejor que puede existir.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que siempre hizo todo lo posible para que yo pueda recibir educación de calidad.

Agradezco a la Ingeniera Jeniffer Yánez que confió en mí para colaborar en su proyecto de investigación. Gracias por ser una guía y por ser mi directora de disertación.

A la Doctora Doris Vela por permitirme hacer una parte práctica de la tesis en el Laboratorio de Genética Evolutiva.

Muchas gracias David Silva y Carolina Bósquez por haber estado en todo este largo proceso hasta el final. Fue excelente haberlos tenido de colegas en el proyecto. Como no mencionar a Andrés Sandoval, Francisco Sigcho, Doménica Córdova y a Lucía Delgado que me ayudaron en la parte práctica de la tesis.

A la Licenciada Vismeli Santana, a la Tecnóloga médica María de Lourdes Almeida y al Máster Andrés Zabala que aportaron con sus consejos y ayuda para que pequeñas cosas salgan bien en la parte experimental.

A mis profesores Marco Gudiño, Elena Granda, Jeniffer Yánez, Josefina Egas, Letty García, Verónica Luna y Diana Astorga por transmitirme su conocimiento y porque cada uno me hizo amar a la Microbiología.

A mis compañeros de curso y amigos que me acompañaron no solo en la carrera sino también en la vida universitaria: Andrés, Alejandro, Adriana, Fátima, Francisco, David, Irina y en especial a Leonardo y Daniel por haber estado en todos los momentos.

A todas las personas que conocí en la universidad, siempre se aprende algo nuevo de cada uno de ellos.

Muchas Gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
3.1.	ANTECEDENTES.....	3
3.2.	GENERALIDADES DEL CULTIVO DE UVILLA.....	5
3.2.1.	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	5
3.2.2.	CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO.....	6
3.2.3.	ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE UVILLA.....	6
3.3.	MÉTODOS DE DETECCIÓN PARA <i>Fusarium oxysporum</i>	8
3.4.	OBJETIVOS.....	10
3.4.1.	OBJETIVO GENERAL.....	11
3.4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4.1.	MUESTREO EN CAMPO.....	12
4.2.	AISLAMIENTO DEL AGENTE PATÓGENO	12
4.2.1.	ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL Y AISLAMIENTO DIRECTO DEL HONGO 12	12
4.3.	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DEL HONGO.....	13
4.3.1.	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	13
4.3.2.	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA.....	13
4.4.	CULTIVOS MONOSPÓRICOS.....	14
4.5.	POSTULADOS DE KOCH.....	14
4.6.1.	OBTENCIÓN Y CUIDADO DE PLÁNTULAS	14
4.6.2.	INOCULACIÓN DEL PATÓGENO EN LAS PLÁNTULAS	15
4.6.3.	RECUPERACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO A PARTIR DE LAS PLÁNTULAS.....	16
4.6.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	16
4.7.1.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	16
4.7.2.	AMPLIFICACIÓN DEL ADN.....	16
4.7.3.	ELECTROFORESIS.....	18
4.7.4.	SECUENCIACIÓN	18

4.7.5.	ANÁLISIS DE SECUENCIAS E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	18
5.	RESULTADOS	19
5.1.	AISLAMIENTO DEL HONGO	19
5.2.	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	19
5.3.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	21
5.4.	POSTULADO DE KOCH EN PLÁNTULAS DE UVILLA.....	22
5.4.1.	RECUPERACIÓN DE LOS AGENTES PATÓGENOS A PARTIR DE LAS PLÁNTULAS ENFERMAS.....	24
6.	DISCUSIÓN.....	24
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
8.	FIGURAS	36
9.	TABLAS.....	56
10.	ANEXOS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitios muestreados.....	36
Figura 2. Cultivo axénico.....	37
Figura 3. Colonia de <i>Fusarium</i> sp.	37
Figura 4. Observación microscópica bajo aumento de 40X.	38
Figura 5. Plántulas de uvilla (<i>Physalis peruviana</i>) en sustrato estéril.	38
Figura 6. <i>Physalis peruviana</i>	39
Figura 7. Preparación de suspensión de conidias.	39
Figura 8. Infección de las plántulas para realizar postulados de Koch.....	40
Figura 9. Transcurso de la enfermedad.....	40
Figura 10. Marchitamiento vascular.	41
Figura 11. Presencia e integridad de ADN.	41
Figura 12. Descripción morfológica del aislado denominado OJ – 3.....	42
Figura 13. Descripción morfológica del aislado denominado DAL – 3.1.....	43
Figura 14. Descripción morfológica del aislado denominado DAL – 3.2.	44
Figura 15. Descripción morfológica del aislado denominado DAL – 3.3.....	45
Figura 16. Descripción morfológica del aislado denominado FO – V.	46
Figura 17. Descripción morfológica del aislado denominado FO – P.....	47
Figura 18. Descripción morfológica del aislado denominado MF – 5.	48
Figura 19. Descripción morfológica del aislado denominado VM – 1.1.....	49
Figura 20. Descripción morfológica del aislado denominado VM – 1.2.....	50
Figura 21. Descripción morfológica del aislado denominado VM – 2.1.....	51
Figura 22. Descripción morfológica del aislado denominado VM – 2.2.....	52
Figura 23. Descripción morfológica del aislado denominado YC – 3.....	53
Figura 24. Amplificación del gen ITS.	53
Figura 25. Amplificación del gen COX – 1.....	54
Figura 26. Amplificación del gen EF - 1 α	54
Figura 27. Amplificación del gen TUB.	55
Figura 28. Alineamiento y búsqueda BLAST.	55

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Lista de lugares muestreados.	56
Tabla 2. Codificación de las muestras.	57
Tabla 3. Concentraciones (conidias/ml) de las suspensiones de <i>F. oxysporum</i> para infectar las plántulas de uvilla.	58
Tabla 4. Datos de temperatura y porcentaje de humedad tomadas por el termo higrómetro en los ensayos de postulados de Koch.....	59
Tabla 5. Concentración y calidad de las muestras de ADN de los aislados iniciales y de los aislados recuperados.	59
Tabla 6. Número de acceso de Genbank para los aislados de <i>F. oxysporum</i>	60
Tabla 7. Sintomatología causada por los aislados de <i>F. oxysporum</i> en las plántulas de uvilla. ..	62

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Morfología microscópica de <i>Fusarium</i> sp.	63
Anexo 2. Representación esquemática del Espacio Transcrito Interno (ITS) y localización de <i>primers</i>	63
Anexo 3. Representación esquemática del Citocromo Oxidasa 1 (COX1) y localización de <i>primers</i>	63
Anexo 4. Representación esquemática del Factor de Elongación 1 α (ef-1 α) y localización de <i>primers</i>	64
Anexo 5. Representación esquemática de β – tubulina (TUB) y localización de <i>primers</i>	64
Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN	65

1. RESUMEN

La uvilla (*Physalis peruviana*) es un producto con emergente importancia económica para el Ecuador. Sin embargo, los estudios sobre patógenos que afectan a dicho cultivo en el país son contados. Por dicha razón, el presente estudio tiene como objetivo determinar la presencia de *Fusarium oxysporum*, causante de la marchitez vascular, en las provincias de la Sierra centro y norte del Ecuador, puesto que a futuro puede ser un gran problema fitosanitario como lo ha sido ya en países productores de uvilla. Para esto, se visitaron cultivos y se tomaron muestras de plantas que presentaban sintomatología similar al marchitamiento vascular. A partir de las muestras, se obtuvieron doce hongos con morfología similar a *Fusarium*, en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Mediante la observación macro y microscópica de los hongos obtenidos, se realizó la identificación a nivel de género. Se extrajo el ADN de los aislados y se realizó PCR de cuatro genes: Espaciador Transcrito Interno (ITS), Citocromo Oxidasa 1 (COX1), Factor de Elongación - 1α (EF - 1α) y β - Tubulina para la identificación a nivel de especie. Los amplicones fueron secuenciados. Doce aislados fueron identificados como *Fusarium oxysporum* mediante *BLAST*. A los hongos se les realizaron cultivos monospóricos para posteriormente aplicar postulados de Koch en plántulas de uvillas libres de patógenos y de microorganismos benéficos para que no se vea afectado el experimento. Al cabo de tres semanas, se observaron los síntomas (amarillamiento y marchitamiento en hojas, reducción del tamaño de la planta, debilidad y necrosis del tallo). En total se recuperaron nueve aislados que provocaron marchitamiento vascular en las plántulas. Los postulados de Koch fueron completados con éxito, por lo tanto, se logró detectar por primera vez a *F. oxysporum* como el agente causal de la marchitez vascular en plantas de uvilla en la Sierra centro y norte del Ecuador.

Palabras clave: uvilla, *Physalis peruviana*, marchitamiento vascular, *Fusarium oxysporum*

2. ABSTRACT

The cape gooseberry (*Physalis peruviana*) is a crop with emerging economic importance for Ecuador. However, studies on pathogens that affect this crop in the country are limited. For this reason, the present study aims to determine the presence of *Fusarium oxysporum*, cause of vascular wilt, in the provinces of the central and northern Highland of Ecuador. If detected, it can be a major phytosanitary problem in the future, as it has been in countries that produce the fruit. For this, fields were visited and samples were taken from plants that presented symptoms similar to vascular wilt. From the samples, twelve fungi with morphology similar to *Fusarium* were obtained in Potato Dextrose Agar culture medium. By means of the macro and microscopic observation of the fungi obtained, identification was made at the genus level. DNA was extracted from the isolates and PCR was performed on four genes: Internal Transcribed Spacer (ITS), Cytochrome Oxidase 1 (COX1), Elongation Factor - 1 α (EF - 1 α) and β - Tubulin for the identification at the species level. The amplicons were sequenced. Twelve isolates were identified as *Fusarium oxysporum* by *BLAST*. Fungi monosporic cultures were carried out to later apply Koch postulates in pathogen and beneficial microorganisms-free seedlings. After three weeks, the symptoms were observed (leaf yellowing and wilting, reduction of the size of the plant, weakness and necrosis of the stem). In total, nine isolates were recovered successfully that caused vascular wilt in the seedlings. Therefore, it was possible to detect for the first time *F. oxysporum* as the causal agent of vascular wilt in cape gooseberries in the central and northern Sierra of Ecuador.

Keywords: cape gooseberry, *Physalis peruviana*, vascular wilt, *Fusarium oxysporum*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES

La uvilla o uchuva es un fruto con alta calidad nutricional con una emergente importancia económica para el Ecuador. Sus exportaciones han aumentado progresivamente en los últimos años, siendo los mayores consumidores los países de la Unión Europa y el Reino Unido (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [ProEcuador], 2013). Cabe destacar que la uvilla tiene no más de 6 años en el mercado escandinavo y ha tenido un buen nivel de aceptación puesto que su consumo se mantiene al alza (ProEcuador, 2016).

El cultivo de la uvilla está prosperando en el Ecuador y esto se evidencia en el uso 419 hectáreas para producir 10 000 toneladas al año, siendo Imbabura y Pichincha las provincias más productivas. En el 2009, se obtenían ganancias de 78 000 dólares por las exportaciones, mientras que para el 2013 se alcanzaron 430 000 dólares, mostrando una tasa de crecimiento anual del 53% (ProEcuador, 2014). Uno de los reportes más recientes sobre las exportaciones de uvilla orgánica deshidratada a Alemania presenta un incremento del 160,4% en tan solo un año (del 2015 al 2016), con ingresos de 782 000 dólares para el país (ProEcuador, 2017). Los principales mercados de exportación de la uvilla son: Reino Unido, Alemania, Francia, Holanda y Estados Unidos de América (ProEcuador, 2014).

La uchuva presenta un alto valor nutricional, ya que al consumirla se obtienen: kilocalorías, proteínas, minerales como el fósforo, el calcio y hierro, además vitaminas A, B y C, entre otros (United States Department of Agriculture [USDA], 2016). La importancia nutricional de la uvilla es, por tanto, considerable. Además, dicho fruto no contiene grasas *trans*, lo que lo hace un alimento muy saludable (USDA, 2016).

En Colombia se atribuye a la uvilla la posibilidad de purificar la sangre, aliviar problemas de bronquios y garganta, limpiar cataratas y prevenir la osteoporosis. Además, por su alto contenido en vitamina A y C, promueve el fortalecimiento del sistema inmune (Calvo, 2009).

Sin embargo, existe una amplia variedad de microorganismos patógenos con el potencial de reducir considerablemente la productividad de este cultivo, como se ha comprobado en Colombia (Estupiñán y Ossa, 2007). A pesar de que la uvilla al igual que otras plantas presentan mecanismos de defensa, como: vellosidades, cutículas, una gruesa pared celular, secreción de toxinas, etc. (Agrios, 2005) y sumando la aplicación de plaguicidas, los agentes patógenos son capaces de invadir, evadir el sistema inmune e infectar a la planta. Las enfermedades más comunes son provocadas por hongos y bacterias seguidas en menor cantidad por nematodos y virus (Smith, 2012).

Los patógenos bacterianos que atacan este cultivo provocan manchas y marchitez (Agrios, 2005). Los nematodos que causan enfermedades en la planta afectan específicamente a las raíces. Los hongos generan una amplia gama de síntomas tanto en hojas como en tallos y frutos (Góngora y Rojas, 2006). Cabe recalcar que las enfermedades fúngicas son las más severas, pero se resalta a *Fusarium oxysporum* (marchitamiento vascular) como el hongo patógeno de mayor importancia económica, debido a las grandes pérdidas que provoca en los cultivos colombianos (Estupiñán y Ossa, 2007; Góngora y Rojas, 2006).

Para Colombia, principal competidor de Ecuador en exportaciones de uvilla, *F. oxysporum* es un serio problema puesto que provoca pérdidas en la producción que alcanzan del 10% al 50% o incluso porcentajes mayores (Castro, Puentes y Botía, 2014). Ecuador, al ser vecino de Colombia y disponer de condiciones ambientales similares, debe realizar estudios para identificar posibles patógenos, entre estos, *Fusarium oxysporum*, que por ser muy agresivo puede afectar seriamente a los cultivos nacionales.

En Ecuador, específicamente en las parroquias de Amaguaña y Yaruquí, se han reportado casos de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp. y *Cladosporium* sp. (Chicaiza, 2008). Por otro lado, Díaz (2016) aisló y analizó a nivel molecular una gran variedad de hongos asociados a manchas foliares en cultivos de uvilla ubicados en la provincia de Pichincha, entre estos se encuentran: *Alternaria alternata*, *Cercospora malayensis*, *Phoma* sp., *Fusarium* sp., etc. Sin embargo, los reportes de severidad y pérdidas económicas en el país son limitados.

El presente estudio es necesario, ya que la información sobre fitopatógenos presentes en cultivos de *P. peruviana* en el país es escasa. Como se mencionó anteriormente, Chicaiza (2008) y Díaz (2016) reportan una serie de hongos patógenos solo en parroquias y localidades de Pichincha. Sin embargo, en dichos estudios se desconoce la presencia de *F. oxysporum*. Por lo tanto, el presente estudio aportó con nuevos datos sobre la presencia o ausencia de *F. oxysporum* no solo en Pichincha sino también en provincias de la Sierra centro y norte del Ecuador.

Por este motivo, la presente investigación buscó responder la siguiente pregunta: ¿Está presente *Fusarium oxysporum* en cultivos de uvilla de la serranía centro y norte del Ecuador? Los resultados obtenidos del presente estudio dieron a conocer si dicho hongo se encuentra en la región andina ecuatoriana y también indicaron si *F. oxysporum* es patógeno para las variedades de uvilla cultivadas en el país.

Este estudio beneficiará a productores, exportadores y entidades gubernamentales. Primero, los productores conocerán sobre la potencial importancia económica de esta enfermedad. Segundo, los exportadores y las autoridades de control sanitario podrán contar con una base para establecer planes de prevención primaria en las zonas productoras y se reducirán posibles pérdidas económicas a mediano y largo plazo. Por esta razón es importante dar a conocer la situación actual de *F. oxysporum* en los cultivos de uvilla del país.

3.2. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE UVILLA

La uvilla (*Physalis peruviana*) conocida como uchuva o aguaymanto, es una hierba perenne perteneciente a la familia Solanaceae (Dostert, Roque, Cano, La Torre, y Weigend, 2011).

3.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La planta tiene un tallo cilíndrico, pubescente y de ramificación escasa. La uvilla puede alcanzar una altura de 45 cm hasta 300 cm. Su raíz principal alcanza los 50 cm de profundidad. Las hojas son pubescentes, alternas y poco apiculadas. Sus flores, con corolas amarillas y de forma tubular, se disponen de manera vertical o ligeramente inclinadas. Las bayas, cuando llegan a la madurez, son de color amarillo hasta anaranjado. La uvilla tiene un diámetro de 1 a 2 cm y puede contener en su interior hasta 200 semillas amarillas de 2.25 mm de diámetro (Dostert et al., 2011).

La distribución de la uvilla es amplia en el mundo por lo que se han desarrollado un sin número de variedades o ecotipos. Esto indica que sus características cambian según la locación en la que se encuentre (Dostert et al., 2011; González, 2010).

3.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

En la región andina ecuatoriana se cultivan tres ecotipos o variedades, las cuales son: el *colombiano*, que posee un fruto grande con una tonalidad amarilla intensa y de baja concentración de ácido cítrico; el *ecuatoriano*, de color amarillo intenso y con aroma atractivo que tiene una alta cantidad de vitaminas; y el *ambateño* que tiene un fruto verde amarillento y con sustancias que le brindan un sabor agrídulce (Montalvo, 2000, como se citó en Chicaiza, 2008). La uvilla tiende a crecer en altitudes de 1500 – 3000 m.s.n.m., con alta luminosidad y en suelos con materia orgánica y de pH 5.5 a 6.8 (Smith, 2012). El cultivo requiere una temperatura de crecimiento y producción de frutos entre los 13°C y 18°C. Sin embargo, la temperatura óptima de desarrollo oscila entre los 18 a 22°C. Por otro lado, la temperatura mínima para su crecimiento y desarrollo es de 10°C (Dostert et al., 2011). La uvilla requiere de una humedad relativa entre el 70 al 80 por ciento y precipitaciones anuales de 1000 a 2000 milímetros (Smith, 2012).

3.2.3. ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE UVILLA

Muchos son los patógenos que afectan los cultivos de uvilla. Entre los más importantes están las bacterias (*Xanthomonas* sp. que causa manchas grasientas y *Ralstonia solanacearum* que genera marchitez bacteriana), los virus (Virus del Mosaico en *Physalis* o PMV que causa

mosaicos en las hojas), los nematodos (*Meloidogyne* spp. formando nudos en las raíces) y principalmente los hongos (Zapata, Saldarriaga, Londoño y Díaz, 2002). Entre las enfermedades provocadas por hongos están: la mancha gris causada por *Cercospora* sp., la muerte descendente por *Phoma* sp., la esclerotiniosis por *Sclerotinia sclerotiorum* y el mal de semillero causado por *Pythium* sp. y *Rhizoctonia* sp. Una de las enfermedades de mayor importancia económica es el marchitamiento vascular causado exclusivamente por *Fusarium oxysporum*, que llega a afectar a más del 50% de los cultivos (Fischer, Almanza-Merchán, y Miranda, 2014; Góngora y Rojas, 2006; González, 2010; Smith, 2012).

3.2.3.1. MARCHITAMIENTO VASCULAR

Esta enfermedad presenta síntomas en diferentes partes de la planta, de acuerdo a la etapa de infección en la que se encuentre (Estupiñán y Ossa, 2007). Se caracteriza por el amarillamiento de las hojas, como primer síntoma. Luego, las hojas se debilitan, se marchitan y surge la necrosis.

En el tallo se presentan los síntomas en una etapa tardía: la coloración marrón en el sistema vascular; la palidez en el tejido del tallo, debida a las obstrucciones en el xilema; y, finalmente, la necrosis vascular, acompañada de una pudrición seca (Estupiñán y Ossa, 2007).

En la raíz, se presentan taponamientos en el xilema, lo que lleva a la necrosis de la planta. La enfermedad progresa solo en un lado de la planta y sigue desarrollándose hacia la parte superior de la misma (Estupiñán y Ossa, 2007).

3.2.3.1.1. *Fusarium oxysporum*

Es un hongo perteneciente al orden de los Hypocreales y a la familia Nectriaceae de distribución mundial. Al aislarlo en medio Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), se puede observar el crecimiento del micelio aéreo de color blanquecino. Conforme avanza el

tiempo de incubación, el color de la colonia pasa de rosado/violeta a morado oscuro (Gonsalves y Ferreira, 1993). Las colonias presentan un rápido crecimiento, alcanzando un diámetro de 4.5 – 6.5 cm en cuatro días a una temperatura de 25°C. Si el hongo forma abundante esporodocios, la colonia puede ser de color anaranjado y con ligera producción de limo en las macroconidias. Algunos aislados de *F. oxysporum* tienen un olor similar a las flores de lilas (Domsch, Gams y Anderson, 2007). Sus hifas son septadas y presentan tres estructuras de reproducción asexual. La primera es la microconidia, la cual es la más abundante y se encuentran cerca de fialides o de conidióforos. Las microconidias pueden ser elipsoidales, ovales o cilíndricas, nunca forman cadenas y están conformadas por una o dos células. Las medidas promedio son de 5 – 12 x 2.3 – 3.5 µm. La segunda es la macroconidia que presenta una forma fusiforme, es decir, elipsoide y alargada con extremidades estrechas. Las macroconidias están compuesta por tres a cinco células y tienen dimensiones promedio de 20 – 60 x 3.0 – 5.5 µm. La tercera es la clamidospora, redonda, hialina, de pared gruesa hialina y rugosa que se puede ubicar en la parte terminal de las hifas o intercalada en estas. Las clamidosporas miden entre 5 – 15 µm de diámetro (Domsch et al., 2007; Gonsalves y Ferreira, 1993) (Anexo 1).

3.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN PARA *Fusarium oxysporum*

Hay dos metodologías muy empleadas para la detectar e identificar a un microorganismo fúngico. La primera es el aislamiento del hongo en medios de cultivo con la finalidad de describirlo macroscópica y microscópicamente, como lo detallan Agrios (2005), Larone (1976), Leslie y Summerell (2006).

La segunda metodología es la determinación del género y la especie a partir de muestras naturales y se realiza mediante técnicas de biología molecular. Esta incluye una secuencia de pasos que se explican a continuación: a) extracción, electroforesis y espectrofotometría del ADN fúngico, b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y electroforesis, c) secuenciación, y, por último, d) análisis filogenético (Somma, 2007).

Para identificar molecularmente un organismo es esencial el uso de cebadores o *primers*. Sin embargo, la determinación de ciertas especies de hongos es muy complicada por lo que, a

veces, se requiere de marcadores moleculares capaces de diferenciar y caracterizar formas especiales (O'Donnell et al., 2009). Este es el caso del género *Fusarium* que requiere de al menos dos *primers* para llegar a identificar la especie (O'Donnell et al., 2009; Geiser et al., 2004; Rodríguez, 2013). El uso de dos o más cebadores se debe a que el género *Fusarium* presenta pequeñas variaciones o polimorfismos en regiones conservadas lo que puede dar cabida a una especie diferente a la que se desea detectar (Nitschke, Nihlgard y Varrelmann, 2009). Los *primers* más usados son: el Espaciador Transcrito Interno (ITS), Citocromo Oxidasa 1 (COX1), Factor de Elongación 1 α (EF - 1 α) y β - Tubulina (TUB).

Los ITS son secuencias cortas dentro de las unidades de transcripción eucariotas pre-ARNt (5 '18S - ITS - 5.8S - ITS - 28S 3'), y estos grupos están separados por espaciadores transcritos externos (Rédei, 2008). La región ITS, altamente conservada pero variable entre diferentes especies, es a menudo utilizada en taxonomía (Gomes, Kasuya, Barros, Borges y Araújo, 2002) (Anexo 2).

El gen COX1 es catalogado como un *DNA barcoding*, es decir, que amplifica fácilmente un fragmento genético corto para brindar identificaciones a nivel de especie. Cabe acotar que a pesar de que ha sido reciente el uso de COX1 como marcador molecular, su capacidad para distinguir géneros y especies es mucho mejor que ITS. La COX1 posee cerca de 567 pares de bases en el caso de *F. oxysporum* y puede amplificar un mayor número de bases debido a los intrones que presentan otras especies del género *Fusarium* (Gilmore, Gräfenhan, Louis-Seize y Seifert, 2009) (Anexo 3).

La región genética del factor de elongación 1 α (EF-1 α , por sus siglas en inglés), tiene una longitud cercana a 2000 pares de bases y es capaz de brindar información a nivel de especies de *Fusarium*. Los *primers* ef1 y ef2 amplifican una región aproximada de 700 pares de bases, flanqueando así a tres intrones que se encuentran en todos los *Fusarium* conocidos (Geiser et al., 2004; Nitschke et al., 2009; Roger, Sandblom, Doolittle y Philippe, 1999) (Anexo 4).

El gen que codifica para β - tubulina ayuda a construir árboles filogenéticos para determinar relaciones evolutivas, e identificar a hongos a nivel de especie. Se han desarrollado

varios *primers* para amplificar distintas regiones del gen entre los cuales destaca el conjunto de *primers* T1 y T2 que amplifican una región cercana a los 560 pares de bases, conformada por tres intrones y tres exones (Ayliffe, Doods y Lawrence, 2001; O'Donnell y Cigelnik, 1997; Zhao et al., 2014) (Anexo 5).

Finalmente, la identificación molecular del género y especie del hongo usa herramientas que comparan las secuencias problema con secuencias conocidas y disponibles en bases de datos digitales. Una de las bases de datos más conocidas y usadas es *GenBank* que forma parte del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). La herramienta *BLAST* está integrada al *GenBank* y arroja resultados en base al valor E (esperado), porcentaje de cobertura y porcentaje de identidad. El valor E muestra el número de alineaciones esperadas por casualidad con un puntaje particular o mejor que mientras más cercano al cero mayores serán las identidades de las secuencias problema con las encontradas en la base de datos. El porcentaje de cobertura muestra las secuencias de la base datos con longitudes similares a las obtenidas en la investigación. Por último, el porcentaje de identidad indica el mayor porcentaje de identidad para un conjunto de segmentos alineados a la misma secuencia de sujeto (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2006).

3.4. OBJETIVOS

3.4.1. OBJETIVO GENERAL

- Detectar la presencia de *Fusarium oxysporum* en cultivos de uvilla de la serranía centro y norte del Ecuador mediante la aplicación de los postulados de Koch.

3.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar *F. oxysporum* en cajas Petri a partir de plántulas o plantas que presenten sintomatología característica de la enfermedad.
- Describir a *F. oxysporum* mediante técnicas micológicas basadas en macro y micro morfología.
- Identificar a *F. oxysporum* mediante el secuenciamiento de genes y la comparación de secuencias disponibles en *Genbank*.
- Realizar postulados de Koch para confirmar que *Fusarium oxysporum* es el agente causal del marchitamiento vascular en plantas de uvilla.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTREO EN CAMPO

Se visitaron varias localidades productoras de uvilla en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha e Imbabura (Figura 1A, Tabla 1). El muestreo consistió en observar los cultivos y escoger únicamente las plantas que presenten sintomatología similar a la marchitez vascular (Figura 1B) (J. Sánchez, comunicación personal, 17 octubre de 2016). Una vez seleccionada la planta, se cortaron de manera aséptica, secciones del tallo y de ramas con evidente necrosis o tonalidades cafés en los haces vasculares. Las muestras fueron transportadas en cadena de frío al laboratorio de tesis de la carrera de Microbiología para su posterior análisis (máximo 24 horas) (Agrios, 2005).

4.2. AISLAMIENTO DEL AGENTE PATÓGENO

4.2.1. ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL Y AISLAMIENTO DIRECTO DEL HONGO

Las secciones de tallos y ramas fueron lavadas en agua potable hasta quitar cualquier vestigio de tierra, polvo u otro objeto que pudiese causar contaminación cruzada al momento de procesar la muestra. Luego, los cortes de material vegetal se colocaron en un vaso de precipitación y se los sumergió en hipoclorito de sodio al 2% por un minuto, para eliminar microorganismos epífitos. Después, se procedió a realizar tres lavados con agua estéril, de un minuto cada uno, para descartar cualquier tipo de contaminante y eliminar restos de hipoclorito de sodio. Finalmente, se colocaron cuatro cortes del tallo en una caja Petri que contenía aproximadamente 25 ml de medio PDA (Difco) con gentamicina (Acromax) (Agrios, 2005). El medio PDA es uno de los más usados en aislamientos de hongos, ya que contiene los nutrientes necesarios para que el hongo de interés se desarrolle correctamente en un pH ácido de 3.5 a 5.6, que inhibe el crecimiento bacteriano (Difco, 2009a). Este procedimiento se repitió para cada una de las plantas muestreadas. Las cajas Petri fueron incubadas a temperatura ambiente (20– 24°C).

Los cultivos se revisaron por un periodo de cinco a 10 días y los hongos que presentaron morfología macroscópica similar a *Fusarium* se purificaron constantemente hasta conseguir un cultivo axénico (Figura 2).

4.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DEL HONGO

4.3.1. MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA

Los cultivos puros fueron revisados al cabo de una semana para registrar sus características macroscópicas. Se recopilaron las características de los cultivos tanto al anverso como en el reverso de la colonia. Simultáneamente, se revisaron libros y guías descriptivas de morfología fúngica para la identificación del género *Fusarium*. Las guías empleadas fueron la de Domsch et al. (2007) y la de Larone (1976). Los aislados de hongos cuyas descripciones concordaban con las de la literatura, fueron fotografiados al anverso y al reverso de la caja Petri (Figura 3).

4.3.2. MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Para visualizar estructuras microscópicas y especializadas de *Fusarium*, se utilizó un fragmento de cinta adhesiva con la que se rozó levemente el micelio aéreo del hongo y se pegó en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol (Larone, 1976). La placa se observó en un microscopio compuesto (Olympus BX43) en 40X de aumento. También se recurrió a microcultivos empleando discos de agar con medio Czapek (Difco), ya que en este medio se desarrollan de mejor manera las características del micelio y las conidias (Difco, 2009b). En estos discos de agar, se inoculó el micelio de *Fusarium* por los bordes del agar con un asa en punta estéril. Los discos se colocaron entre el portaobjetos y el cubreobjetos, uno por muestra. Se incubaron los discos en cajas Petri de vidrio a modo de cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de 3 – 5 días se desarrollaron los micelios y se desecharon los discos. A las placas se les colocó una gota de azul de lactofenol y se observaron las estructuras del hongo en el microscopio compuesto en 40X. De igual manera, según las guías de Larone (1976) y Domsch et al. (2007) se

logró la identificación a nivel de género del microorganismo. Se tomaron fotografías de la morfología microscópica. Las dimensiones de las conidias se midieron mediante el software *Piximetre* versión 5.9 (Henriot y Cheype, 2017) (Figura 4).

4.4. CULTIVOS MONOSPÓRICOS

Para la realización de los postulados de Koch y la extracción de ADN, se requirió de cultivos monospóricos a partir de los cultivos ya obtenidos. Se realizaron subcultivos a medio PDA y se incubaron las cajas a temperatura ambiente por 5 – 7 días. Pasado este tiempo, se colocaron las cajas Petri en un estereomicroscopio y con una pinza no electrostática desinfectada en alcohol se buscó y se tomó una hifa solitaria. A la hifa cortada se la colocó en una caja Petri con medio PDA y se la incubó por 15 días a temperatura ambiente (Cañedo y Ames, 2004).

4.5. POSTULADOS DE KOCH

Para determinar la identidad del agente causal del marchitamiento vascular de la uvilla se realizaron los postulados de Koch (Fuentes, 2007). Estos son:

1. El microorganismo patógeno deberá aislarse siempre de organismos enfermos y jamás de especímenes sanos.
2. Cuando un organismo esté enfermo el agente patógeno debe aislarse en cultivo puro.
3. Si el microorganismo se inocula a otro ser vivo debe reproducirse la misma enfermedad.
4. El agente patógeno deberá aislarse nuevamente en un cultivo puro.

4.6.1. OBTENCIÓN Y CUIDADO DE PLÁNTULAS

Cien plántulas de uvilla sin sintomatología visual fueron obtenidas de la finca de la empresa Terrafertil en Tabacundo (Figura 5). Las plántulas se sembraron en sustrato que contenía tierra negra y cascarilla de arroz. El sustrato se esterilizó por una hora a 121 °C y a 15 libras de presión para eliminar microorganismos que podían interferir en el experimento. El ensayo se llevó a cabo en el invernadero de Diserlab en la PUCE, Nayón. Las plántulas fueron trasplantadas a tarrinas plásticas (una por tarrina) con tierra negra y cascarilla de arroz en una

proporción de 2:1 hasta cubrir $\frac{3}{4}$ de la tarrina (Rodríguez, 2013). Las plántulas fueron regadas con agua potable cada día y recibían luz natural. La temperatura y el porcentaje de humedad del invernadero fueron monitoreados diariamente, durante todo el experimento. Cuando las plántulas desarrollaron de cuatro a seis hojas verdaderas, se procedió a la infección de las mismas (Urrea et al., 2011) (Figura 6).

4.6.2. INOCULACIÓN DEL PATÓGENO EN LAS PLÁNTULAS

Las raíces de las plántulas fueron sumergidas en una suspensión dada de conidias para que el hongo pueda colonizar y promover la enfermedad (Choi, Kim, Lee, Park y Shin, 2015). Para conseguir esto, la colonia de *Fusarium* sp. fue lavada con la solución de Tween 80 al 0.1% y raspada con un asa de Drigasky estéril. Luego, la solución de esporas fue colocada en un tubo de ensayo, se agitó mediante vortex por 30 segundos y se procedió a cargar la cámara de Neubauer. Se hizo el recuento de esporas siguiendo el protocolo de Cañedo y Ames (2004). Cuando el recuento indica una concentración de 1×10^5 a 1×10^7 conidias ml^{-1} , se considerada que la suspensión es apta para lograr la infección de plántulas (Choi et al., 2015). El cálculo de la concentración de conidias se realizó mediante la siguiente fórmula (Leslie y Summerell, 2006):

$$\text{Conidias}/\text{ml} = \frac{\text{Suma de conidias} * \text{Factor de dilución}}{1\text{mm} * 1\text{mm} * 0.1\text{mm} * 5/25} \times 1000$$

En la mayoría de las suspensiones fue necesario realizar diluciones decimales para obtener la concentración deseada (1×10^5 a 1×10^7 conidias ml^{-1}) (Tabla 3). Con las suspensiones listas se procedió a infectar las plántulas. Este procedimiento se realizó para cada uno de los aislados obtenidos. Las raíces de las plántulas reposaron en la suspensión de conidias por 3 minutos. Pasado este tiempo, se regresó la plántula a su respectivo sustrato estéril. Se realizaron cuatro repeticiones por cada aislado de *Fusarium* sp. y se ubicó cuatro plántulas como control negativo, las cuales fueron suspendidas en agua estéril (Figura 7). Para el cuidado de las plántulas, se regó agua cada día. Al cabo de tres semanas se observaron los resultados de la inoculación de *Fusarium oxysporum*. Las condiciones de temperatura y humedad fueron controladas con un termo-higrómetro (Tabla 4). Así también, se llevó un registro fotográfico diario conforme avanzaba el experimento (Urrea et al., 2011) (Figuras 8 - 10).

4.6.3. RECUPERACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO A PARTIR DE LAS PLÁNTULAS

Pasadas las tres semanas de infección, las plántulas fueron trasladadas al laboratorio de tesis para recuperar los aislados que produjeron marchitamiento vascular. Los procedimientos que se explican en las secciones 4.2., 4.3. y 4.5 fueron realizados para el efecto.

4.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Consistió en la extracción de ADN y, posteriormente, la amplificación de regiones específicas, con la ayuda de *primers*, mediante PCR. Esta parte de la investigación se realizó en el laboratorio de Genética Evolutiva de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE.

4.7.1. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN de los aislados fúngicos fue extraído antes y después de los postulados de Koch. Se utilizó el kit *Wizard® Genomic DNA Purification* siguiendo el protocolo para plantas que sugiere el fabricante (Promega, 2014) (Anexo 6). La presencia e integridad del ADN fue observada mediante electroforesis con gel de agarosa al 2%, teñido con *GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, 2012) (Figura 11). Por otra parte, se empleó el *NanoDrop 2000* para medir la cantidad y calidad del ADN (ThermoScientific, 2015).

4.7.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Para lograr identificar a *Fusarium* a nivel de especie se amplificaron cuatro regiones (Rodríguez, 2013). Para la región ITS, se usaron los *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), descritos por

White, Bruns, Lee y Taylor (1990), que abarcan una sección de alrededor de 500 pb. Para la reacción de PCR, se utilizó el reactivo *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, 2016). El volumen final de la reacción fue de 25 μl , el cual contenía 12.5 μl de *GoTaq® Green Master Mix*, 1 μl de cada uno de los *primers* (10 μM), 8.5 μl de agua libre de nucleasas y 2 μl de ADN fúngico (25 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$). Las condiciones de la PCR se basaron en el protocolo de White et al. (1990) con ligeras modificaciones: una desnaturalización inicial de tres minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación por 30 segundos a 54°C, elongación por 60 segundos a 72°C y la elongación final de 10 minutos a 72°C.

El EF-1 α fue el segundo gen amplificado, mediante el uso de los *primers* ef-1 (5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') y ef-2 (5' GGARGTACCAGTSATCATG 3'). Estos abarcan una región cercana a los 700 pb (Geiser et al., 2004). Las cantidades para preparar el *master mix* son las mismas que para amplificar ITS. Las condiciones de la PCR fueron tomadas del protocolo descrito por Geiser et al. (2004).

El tercer gen en amplificar fue β – tubulina (TUB) usando los *primers* T1 (5' AACATGCGTGAGATTGTAAGT 3') y T2 (5' TAGTGACCCTTGGCCAGTTG 3'), los cuales abarcan una región cercana a los 560 pb (O'Donnell y Cigelnik, 1997). El volumen final de la reacción para la PCR tiene las mismas cantidades que la *master mix* para ITS. Las condiciones de la PCR fueron tomadas del protocolo descrito por O'Donnell, Cigelnik y Nirenberg (1998).

El último gen en ser amplificado fue el COX1, mediante el uso de los *primers* Ahyfu-F (5' CTTAGTGGGCCAGGAGTT 3') y Ahyfu-R (5' ACCTCAGGGTGTCCGAAGAAT 3'), los cuales flanquean una región próxima a los 560 pb (Gilmore et al., 2009). Para la reacción de PCR, se requirió de un volumen final de 25 μl , el cual contenía 12.5 μl de *GoTaq® Green Master Mix*, 0.5 μl de cada uno de los *primers* (10 μM), 10.5 μl de agua libre de nucleasas y 1 μl de ADN fúngico (25 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$). Las condiciones de la PCR se basaron en el protocolo de Gilmore et al. (2009).

4.7.3. ELECTROFORESIS

Los amplicones fueron observados en geles de agarosa *UltraPure™ Agarose* (Invitrogen, 2010) al 2% en TAE 1X y teñidos con *GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, 2012). En los geles se colocaron 2 µl de marcador de peso molecular *100bp DNA Ladder* (Promega, 2017). En el segundo pocillo se colocó 1 µl de control negativo que contenía *Master Mix* sin ADN y en los pocillos siguientes se colocaron 1 µl de los amplicones obtenidos. El tiempo de corrida en la cámara electroforética fue de 45 minutos con un voltaje de 90 voltios. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador UV (Invitrogen). Los productos de PCR que arrojaron resultados positivos fueron purificados con *illustra™ ExoProStar™* (GE Healthcare Life Sciences, 2012).

4.7.4. SECUENCIACIÓN

Los productos de la PCR fueron enviados para su secuenciación a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) bajo el empleo de equipos secuenciadores ABI 3730xl.

4.7.5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Las secuencias fueron editadas en el programa *MEGA* versión 7 (Kumar, Stecher y Tamura, 2016). Para el alineamiento de las secuencias *forward* y *reverse*, se usó el programa *ClustalW* incorporado al software *MEGA 7*. Las secuencias consenso fueron comparadas con las disponibles en la base de datos del NCBI mediante la herramienta *BLAST* (Altschul, Gish, Miller y Lipman, 2011). Las secuencias escogidas fueron las que obtuvieron un porcentaje de cobertura mayor o igual al 99%, un valor E igual a 0 y un porcentaje de identidad mayor o igual al 99%.

5. RESULTADOS

5.1. AISLAMIENTO DEL HONGO

Se muestrearon en total 55 plantas de *Physalis peruviana* en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha e Imbabura (Tabla 1). Doce cepas que presentaron una morfología macroscópica similar a *Fusarium* sp. fueron aisladas y purificadas. En Tungurahua e Imbabura se obtuvieron cinco aislados, mientras que en Cotopaxi se consiguieron dos y en Pichincha no se logró aislar ningún hongo de interés (Tabla 2). A pesar de todos los cuidados procurados para limpiar el material vegetal, aparecieron hongos endófitos que fueron eliminados poco a poco mediante la purificación del posible cultivo de *F. oxysporum*.

5.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Los aislados puros fueron identificados morfológicamente mediante observación y descripción macro y microscópica de las colonias obtenidas.

La colonia del hongo aislado denominado OJ – 3 presentó, al anverso del plato Petri, micelio algodonoso de color rosa claro en el centro y blanco en los bordes, mientras que una coloración blanca en los bordes y rosado claro en el centro se observó al reverso. Microscópicamente se presentaron hifas septadas, microconidias con una o dos células y longitud de 8.07 μm por 3.42 μm de ancho, macroconidias de tamaño mediano (21.76 μm x 4.70 μm) en forma de canoa u hoz, presentando tres septos (Figura 12).

DAL – 3.1 exhibió al anverso de la caja Petri, un micelio algodonoso de color rosa en los bordes y rosa claro con blanco en el centro. Al reverso del cultivo, se observó micelio blanco en los bordes y rosado intenso en el centro. Además, pequeñas hendiduras se formaron en el centro de la colonia. En la microscopía se observaron hifas septadas y microconidias que presentaron una o dos células con dimensiones de 8.25 μm x 4.51 μm (Figura 13).

El aislado DAL – 3.2 mostró un micelio algodonoso de coloración blanca acompañado de un morado claro a lo largo de los bordes y el centro. Al revés, se observaron hendiduras en el centro de la colonia que se expandieron hacia los extremos y mostró un color blanco en toda la circunferencia y rosado con puntos negros en el centro y en las hendiduras del cultivo. Al

microscopio se visualizaron hifas septadas y microconidias con o sin septos en forma de canoa con una longitud de 13.91 μm y un ancho de 3.64 μm (Figura 14).

El hongo llamado DAL – 3.3 lució un micelio algodonoso totalmente blanco y con hendiduras en el centro. Al reverso, predominó por completo la coloración blanca y también se formaron hendiduras en el centro de la colonia. En la microscopía, el hongo presentó hifas septadas, microconidias pequeñas ovaladas con o sin divisiones con dimensiones de 10.58 μm x 4.59 μm y pocas macroconidias, conteniendo tres células de 21.34 μm de largo por 4.71 μm de ancho (Figura 15).

FO – V mostró un micelio algodonoso, de contorno irregular con una coloración morada en el centro y que se aclaraba hacia los bordes mostrando tonalidades rosadas y blanco en el perímetro. Al reverso de la colonia, se observó un morado oscuro en el centro y blanco con rosado en el borde. Con respecto a la morfología microscópica, el hongo mostró hifas septadas y microconidias ovales con una o dos células en su interior (9.84 x 3.61 μm) (Figura 16).

El hongo identificado como FO – P presentó un micelio plano con pocas hifas aéreas, de una tonalidad rosada a lo largo de la circunferencia y un color crema en el borde. Al revés, se observó un color rosado más claro que al anverso y también exhibió el blanco en el borde de la colonia. Al microscopio se visualizaron hifas septadas, clamidosporas y microconidias ovales con un septo y de longitud 8.78 μm por 4.74 μm de ancho (Figura 17).

La colonia del hongo señalado como MF – 5 tuvo un micelio algodonoso con muchas hifas aéreas y mostró una coloración morada oscura en el centro y blanquecina a los bordes. Al reverso, la colonia tuvo una tonalidad rosada/violeta clara en los bordes y un morado oscuro al centro. En la morfología microscópica se observaron hifas septadas y microconidias, con una división, en forma oval y de canoa con dimensiones de 10.90 μm por 3.94 μm (Figura 18).

El aislado denominado VM – 1.1 mostró un micelio algodonoso de color morado mientras que gran parte de sus hifas aéreas fueron de color blanco. En la parte trasera del cultivo, se presentó una coloración blanca en los bordes y rosada en el resto del cultivo. Al microscopio, se observaron hifas septadas, microconidias ovales sin divisiones con una longitud de 9.30 μm por 4.16 μm de ancho y macroconidias en forma de canoa con tres células en su interior, con dimensiones de 27.46 μm por 3.82 μm (Figura 19).

El hongo asignado como VM – 1.2 exhibió un micelio algodonoso morado y, en ciertas secciones de la colonia, resaltaban agrupamientos de hifas aéreas algodonosas de color blanco. Al reverso de la caja Petri, se observaron anillos con tonalidades moradas a rosadas desde afuera hacia adentro del cultivo, el borde era de color blanco y el centro presentó puntos de color negro. La morfología microscópica constó de hifas septadas, grandes cantidades de microconidias ovals con o sin divisiones, presentando una longitud de 9.45 μm por 3.44 μm de ancho y con pocas macroconidias con tres células con dimensiones de 28.14 μm por 5.12 μm (Figura 20).

VM – 2.1 mostró un micelio algodonoso morado y blanco en el centro. A continuación, el micelio se tornó plano y blanco y luego volvió a ser algodonoso y blanco por los bordes. Al reverso, exhibió una tonalidad morada en el centro, luego presentó tres anillos de color blanco, morado y blanco. En el microscopio, se presentaron hifas septadas y gruesas, y microconidias ovals y en forma de canoa con una o dos células en su interior con una longitud de 9.30 μm por 3.17 μm de ancho (Figura 21).

El hongo denominado VM – 2.2 presentó un micelio algodonoso morado con hifas aéreas de color blanco. Al reverso de la caja, se observaron anillos con tonalidades moradas a rosadas desde afuera hacia adentro del cultivo. El borde era de color blanco. La morfología microscópica constó de hifas septadas y microconidias en forma de canoa con una o dos células en su interior con una dimensión de 9.40 μm por 4.22 μm (Figura 22).

YC – 3 exhibió al envés un micelio algodonoso de color morado en el centro y blanco en los bordes. En la parte trasera de la caja Petri, se observó una tonalidad crema en los bordes y un rosado opaco en el centro. Además, hubo la formación de hendiduras en el medio. Al microscopio, se presentaron hifas septadas con macroconidias conteniendo de tres a cuatro células con una longitud de 55.01 μm por 6.13 μm de ancho y también estuvieron presentes algunas clamidosporas (Figura 23).

5.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La lectura en Nanodrop presentó concentraciones entre 153.1 ng μl^{-1} hasta los 682.4 ng μl^{-1} . Las muestras fueron diluidas hasta llegar a una concentración final de 25 ng μl^{-1} y a un

volumen final de 50 μ l. La pureza del ADN alcanzó valores de 1.19 a 2.11, lo que indicó que doce muestras estaban por debajo de los límites aceptables, mientras que las nueve muestras restantes estuvieron dentro del rango 1.80 – 2.00. La calidad del ADN no fue buena (Tabla 5). Sin embargo, al ser utilizadas para amplificar los genes a detectar, los resultados fueron favorables en la mayoría de los casos.

La reacción de PCR para ITS así como para el COX1 y EF – 1 α funcionaron a la perfección, ya que los 12 aislados fueron amplificados y se obtuvieron bandas con los tamaños esperados, cercanos a los 500 pb y a los 650 pb respectivamente (Figura 24, 25 y 26). Por último, la amplificación del gen TUB fue positiva en 10 de las 12 muestras de ADN fúngico (Figura 27).

El uso de *illustra*TM *ExoProStar*TM facilitó la edición y alineamiento de las secuencias abi. recibidas desde Macrogen. Por lo tanto, al realizar el análisis de homología y similitud con la herramienta *BLAST*, los porcentajes de cobertura y de identidad fueron mayores al 99%. Asimismo, el valor E siempre fue de 0,0. Los 12 aislados fueron identificados como *Fusarium oxysporum* para todos los genes amplificados (ITS, COX1, TUB y EF – 1 α). La mayoría de las secuencias analizadas en el estudio coincidieron con el mismo número de acceso presentado por secuencias ya disponibles en *Genbank* (Tabla 6).

5.4. POSTULADO DE KOCH EN PLÁNTULAS DE UVILLA

Cinco días después de la inoculación de *F. oxysporum* en las plántulas de uvilla, se registraron fotográficamente los síntomas del desarrollo del marchitamiento vascular.

El aislado DAL – 3.1 provocó el marchitamiento temprano de hojas verdaderas y la debilidad del tallo era evidente en dos de las cuatro plántulas.

DAL – 3.2 causó que pocas hojas marchiten ligeramente por los bordes de las mismas, pero no provocó daños en el tallo. Esta sintomatología se repitió en las cuatro plántulas.

La muestra DAL – 3.3 generó marchitez en algunas hojas e impidió que dos de las cuatro plántulas no crecieran favorablemente.

El hongo denominado OJ – 3 marchitó las hojas, debilitó el tallo y redujo el tamaño en una de las plántulas, mientras que en las tres restantes se observó una decoloración leve de las hojas.

El aislado FO – V causó marchitamiento en las hojas, palidez en los tallos, coloración marrón en los mismos y reducción del tamaño en dos plántulas. En las dos restantes, generó una ligera decoloración de las hojas.

FO – P no provocó sintomatología clara, solo se presentó clorosis y marchitamiento de pocas hojas en las cuatro plántulas.

El hongo MF – 5 tuvo la capacidad de marchitar y decaer algunas hojas y frenar el crecimiento de una plántula. En otra solo provocó marchitez en una hoja y en las dos plántulas restantes no causó ningún síntoma.

La muestra VM – 1.1 causó decoloración en las hojas y debilitamiento del tallo en una plántula. En otra plántula solo se evidenció el decaimiento del tallo, mientras que en las plántulas restantes no se presenciaron síntomas alguna.

El aislado llamado VM – 1.2 causó lesiones en tres de las cuatro plántulas. Se observaron hojas decoloradas y marchitas, palidez y pérdida de vigor del tallo, y reducción del tamaño de las plántulas. En una plántula no hubo presencia de síntomas.

El hongo VM – 2.1 marchitó poco a las hojas de dos plántulas. Sin embargo, el crecimiento de las cuatro plántulas fue vigoroso.

VM – 2.2 provocó marchitamiento, decoloración y deformación de hojas en las cuatro plántulas. Además, hubo debilidad y palidez del tallo, y un crecimiento limitado de las plántulas.

Por último, el hongo YC – 3 provocó la marchitez absoluta de una de las plántulas. Se observó la clorosis de las hojas, la debilidad, palidez y tonalidad café en el tallo. En otra plántula limitó el crecimiento y decoloró ligeramente las hojas, mientras que las dos plántulas restantes no se vieron afectadas por la enfermedad (Tabla 7).

5.4.1. RECUPERACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO A PARTIR DE LAS PLÁNTULAS ENFERMAS

Se recuperaron nueve de 12 aislados fúngicos inoculados (DAL – 3.1, FO – P, FO – V, MF – 5, OJ – 3, VM – 1.1, VM – 2.1, VM – 2.2 y YC – 3), los cuales presentaron la misma morfología macroscópica y microscópica que se detalla en la sección 5.2.

Asimismo, los hongos recuperados presentaron el mismo tamaño de bandas en los geles de agarosa. Sin embargo, algunas muestras no amplificaron para ciertos genes a pesar de haber seguido los mismos protocolos de extracción de ADN y de PCR. La muestra MF – 5 dio negativo para los genes EF - 1 α y TUB, mientras que las muestras FO – V, OJ – 3 y VM – 2.2 no amplificaron para el gen TUB.. Los aislados recuperados a partir de los postulados de Koch y los aislados iniciales coinciden con los mismos números de acceso de *Genbank* asignados a secuencias disponibles en esta base de datos (Tabla 6).

6. DISCUSIÓN

Fusarium oxysporum fue identificado como el agente causal de la marchitez vascular en plantas de *Physalis peruviana* en la Sierra centro y norte del Ecuador, por lo tanto, se completaron satisfactoriamente los postulados de Koch. Esta investigación podrá dar paso al primer reporte sobre el marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum* en plantas de uvilla en el Ecuador.

Es importante destacar que los 12 aislados que se obtuvieron en campo presentaron la morfología macroscópica y microscópica que se detallan en las guías de Domsch et al. (2007) y la de Larone (1976), permitiendo llegar a identificar a los hongos hasta nivel de género. Los 12 aislados presentaron microconidias con un promedio de longitud de 9.79 μm por 3.95 μm . En lo que respecta a las macroconidias, solo los aislados DAL -3.3, OJ - 3, VM - 1.1, VM - 1.2 y YC - 3 fueron capaces de producir estas estructuras con un promedio de dimensiones de 30.72 μm por 4.89 μm , valores similares a los que expone Rodríguez (2013). La investigación realizada por Arroyo, Llergo, Aguado, y Romero (2009) reporta microconidias ovals con medidas de 5.9 a 9.2 \times 2.1 a 3.4 μm y macroconidias fusiformes con tres a cinco septos y con dimensiones de 28.8 a 37.3 \times 3.2 a 4.3 μm . Giesbrecht y McCarthy (2013) describen a las microconidias de *F. oxysporum* como ovals con uno a dos septos y con medidas de 5 a 18 \times 2.5 a 5 μm , mientras que las macroconidias eran curvas y delgadas con tres células en su interior, y sus medidas eran de 22 a 37 \times 2.5 a 5 μm . Por lo tanto, las medidas de microconidias y macroconidias concuerdan con la literatura y con las investigaciones mencionadas con anterioridad. Esto permitió confirmar la identificación morfológica de *F. oxysporum*.

Los síntomas presentes en las plántulas de uvilla concuerdan con los descritos en la literatura (Estupiñán y Ossa, 2007, Urrea et al., 2011). Hanson (2006) sugiere utilizar una suspensión de conidias con una concentración de 10^4 esporas/ml y suspender las raíces por ocho minutos. Mientras que, Arroyo et al. (2009) proponen remojar las raíces de las plántulas durante quince minutos en una suspensión de conidias con una concentración de 10^7 esporas/ml. Aquí, cabe destacar que la metodología mencionada por Choi et al. (2015) es efectiva para contaminar plántulas, ya que las concentraciones de las suspensiones de conidias obtenidas (Tabla 3) y el tiempo de infección permitieron que el agente patógeno se establezca dentro del hospedero y

provoque los síntomas esperados (Tabla 7). A pesar de que todos los aislados de *F. oxysporum* fueron capaces de generar la enfermedad en la mayoría de las plántulas de *Physalis peruviana*, no fue posible recuperar tres de las 12 cepas de hongos (DAL – 3.2, DAL – 3.3, VM – 1.1), lo que indica que el porcentaje de recuperación de los aislados fue del 75%. Esto puede deberse a varios factores como el hecho de que las muestras de tallo no fueran correctamente lavadas y/o desinfectadas, por lo que otros microorganismos endófitos (no controlados) con mayor facilidad de crecimiento pudieron competir contra *F. oxysporum* por espacio y nutrientes en el medio PDA, inhibiendo así el desarrollo del hongo de interés (Agrios, 2005).

Otro factor a tomar en cuenta para que la enfermedad se haya desarrollado favorablemente es que se cumplieron las condiciones ambientales. Como se muestra en la Tabla 4, hay homogeneidad en la temperatura y porcentaje de humedad durante la realización de postulados de Koch. Según Reynolds, Pask, Mullas y Chávez (2011), las ventajas de tener condiciones controladas en invernaderos son: menor riesgo de bajas temperaturas o heladas, un porcentaje de humedad constante permite que no se frene la fotosíntesis. Asimismo, una temperatura estable favorece el desarrollo del microorganismo y evita la reducción de su población. Además, la mayoría de las plántulas se encontraban susceptibles al agente patógeno, por lo que se cumplió el triángulo para el desarrollo de la enfermedad (Agrios, 2005). Adicionalmente, el marchitamiento vascular se presentó a lo largo de tres semanas como lo mencionan Urrea et al. (2011).

Durante los procesos para la identificación molecular, se obtuvieron los tamaños de bandas esperados para los cuatro genes analizados, concordando así con lo que describen Geiser et al. (2004) para el EF - 1 α y el ITS, Gilmore et al. (2009) para el COX1, y Zhao et al. (2014) para el gen TUB. En BLAST, las secuencias de los 12 aislados fúngicos iniciales y los nueve aislados recuperados presentaron un porcentaje de identidad mayor o igual al 99% con las secuencias de *Fusarium oxysporum* presentes en la base de datos del NCBI.

Como se mencionó con anterioridad, se logró re-aislar nueve cepas de *F. oxysporum* a las cuales se les realizó el mismo protocolo de extracción de ADN, pero ciertas muestras no amplificaron para los genes de EF – 1 α y TUB. Esto puede darse por la degradación y/o mala calidad del ADN (Tabla 5), también a la posible presencia de inhibidores de la PCR (A. Zabala, comunicación personal, 11 diciembre de 2017). Estos problemas se pueden corregir mediante la modificación o repetición de ciertos pasos del protocolo de extracción y evitar contaminar la muestra y reactivos al momento de preparar la *master mix* (Somma, 2007; Zavala, 2005). De igual manera, pudieron presentarse posibles polimorfismos en las muestras no amplificadas y requieren de *primers* ligeramente modificados, como lo explican Ayliffe et al. (2001) y Zhao et al. (2014).

La presente investigación solo realizó postulados de Koch para detectar a *F. oxysporum*, como agente causal de la enfermedad, mas no para estudios de patogenicidad, por lo que se sugiere a futuras investigaciones efectuar dichas pruebas para conocer la agresividad y severidad de este agente patógeno en el país, como lo ha realizado Rodríguez (2013) en Colombia.

Además, se sugiere hacer estudios sobre el “gusano alambre” (*Agrotis* sp.). En las provincias de Cotopaxi e Imbabura se muestrearon plantas que presentaban el marchitamiento vascular y lo interesante es que, en algunas de estas plantas, se encontraba el “gusano del alambre” a nivel de raíz y parte inferior del tallo. Por lo tanto, se sugiere hacer estudios sobre este agente patógeno para determinar si existe una relación entre la presencia del gusano y *F. oxysporum* para la promoción del desarrollo del marchitamiento vascular.

El hecho de confirmar a *F. oxysporum* como el agente causal del marchitamiento vascular en *P. peruviana* permitirá crear programas epidemiológicos y, diseñar planes fitosanitarios para ejecutar medidas de control por parte de las autoridades competentes, evitando así la diseminación de este agente patógeno. Actualmente, los aislados reportados en este estudio no son agresivos como se reporta en Colombia, por tanto es importante desarrollar estrategias de prevención y promover buenas prácticas en la agricultura como: el uso de abonos orgánicos,

descartar el uso de químicos, evitar los monocultivos, etc. Así, la economía de los productores y del país en general no se verá afectada por este hongo fitopatógeno.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5ta Ed.). DOI: 10.1016/B978-0-08-047378-9.50002-6
- Altschul, S., Gish, W., Miller, E., y Lipman, D. (2011). BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.
- Arroyo, F., Llergo, Y., Aguado, A., y Romero, F. (2009). First Report of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* on Strawberry in Spain. *Plant Disease*, 93(3), 323. DOI: 10.1094/PDIS-93-3-0323B
- Ayliffe, M., Dodds, P., y Lawrence, G. (2001). Characterization of a b-tubulin gene from *Melampsora lini* and comparison of fungal b-tubulin genes. *Mycol. Res.*, 105(7), 818-826. DOI: 10.1017/S0953756201004245
- Calvo, I. (2009). *El cultivo de la uchuva (Physalis peruviana) Área: Manejo integrado de cultivos / frutales de altura*. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00170.pdf>
- Cañedo, V., y Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para manejo de hongos entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.
- Castro, A., Puentes, G., y Botía, Y. (2014). Alternativas de procesamiento de uchuva (*Physalis peruviana L*) para el aprovechamiento de frutos no aptos para la comercialización en fresco. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 5(1), 121-130. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5344966.pdf>
- Chicaiza, G. (2008). *Inventario de enfermedades fungosas de la uvilla (Physalis peruviana) en las parroquias de Yaruquí y Amaguaña del cantón Quito, provincia de Pichincha* (Tesis de grado). Recuperado de <http://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/73/3/02.pdf>
- Choi, I., Kim, J., Lee, W., Park, J., y Shin, H. (2015). First Report on Fusarium Wilt of Zucchini Caused by *Fusarium oxysporum*, in Korea. *Mycobiology*, 43(2), 174-178. DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.2.174
- Díaz, J. (2016). *Caracterización molecular y análisis filogenético de hongos microscópicos asociados a manchas foliares en hojas de uvilla (Physalis peruviana L.) en varias*

- localidades del cantón Quito, Pichincha* (Tesis de grado). Recuperado de http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12516/TESIS_JLDIAZ_final.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Difco. (2009a). *Potato Dextrose Agar • Potato Dextrose Broth*. Recuperado de http://www.humeau.com/media/blfa_files/213300.pdf
- Difco. (2009b). *Czapek-Dox Broth • Czapek Solution Agar*. Recuperado de http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/233810.pdf
- Domsch, K., Gams, W., y Anderson, T. (2007). *Compendium of Soil Fungi* (2da Ed.). Koenigstein, Alemania: IHV-Verlag Eching.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M., y Weigend, M. (2011). *Hoja botánica: Aguaymanto (Physalis peruviana L.)*. Recuperado de http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Aguaymanto_2012.pdf
- Estupiñán, H., y Ossa, J. (2007). *Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (Physalis peruviana) el hongo Fusarium oxysporum Schlecht sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo* (Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia). Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis293.pdf>
- Fischer, G., Almanza-Merchán, P., y Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana L.*). *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, 36(1), 1-15. Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452014000100003&lng=en&m=iso&tlng=en
- Fuentes, C. (2007). Los postulados de Koch: Revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 262-266. Recuperado de <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/download/.../22655>
- GE Healthcare Life Sciences. (2012). *illustra™ ExoProStar™*. Recuperado de https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/132676518989/litdoc29010216_20161014200429.pdf

- Geiser, D., Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Malakowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., ... y O'Donnell, K. (2004). *Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence for identifying Fusarium. European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6), 473-479. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>
- Giesbrecht, M., y McCarthy, M. (2013). First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *palmarum* in Texas Causing Fusarium Wilt of *Washingtonia robusta*. *Plant disease*, 97(11), 1511. DOI: 10.1094/PDIS-05-13-0488-PDN
- Gilmore, S., Gräfenhan, T., Louis-Seize, G., y Seifert, K. (2009). Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources*, 9(Suppl. 1), 90-98. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02636.x
- Gomes, E., Kasuya, M., de Barros, E., Borges, A., y Araújo, E. (2002). Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*, 24(4), 477-483. DOI: 10.1590/S1415-47572002000400018
- Góngora, A., y Rojas, P. (2006). *Incidencia de las enfermedades en uchuva Physalis peruviana L. por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de Cundinamarca* (Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia). Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis244.pdf>
- Gonsalves, A., y Ferreira, S. (1993). *Fusarium oxysporum*. Recuperado de http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/f_oxys.htm
- González, M. (2010). *Conservación de mora, uvilla y frutilla mediante la utilización del aceite esencial de canela (Cinnamomum zeynalicum)* (Tesis de grado). Recuperado de <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/737/1/56T00255.pdf>
- Hanson, L. (2006). First Report of Fusarium Yellows of Sugar Beet Caused by *Fusarium oxysporum* in Michigan. *Plant Disease*, 90(12), 1554. DOI: 10.1094/PD-90-1554B
- Henriot, A., y Cheype, J. (2017). Piximetre: Measure of images (versión 5.9) [software de cómputo]. Francia: ACH Logiciels.

- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [ProEcuador]. (2013). *Boletín de comercio exterior*. Recuperado de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROECUADOR_IC_03-31.pdf
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [ProEcuador]. (2014). *Análisis sectorial: Frutas exóticas 2014*. Recuperado de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/01/PROEC_AS2014_FRUTASEXOTICAS11.pdf
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [ProEcuador]. (2016). *Estudio introductorio de uvilla en Suecia*. Recuperado de https://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/09/PROEC_EI2015_UVILLA_SUECIA1.pdf
- Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [ProEcuador]. (2017). *Incrementa la exportación de uvilla deshidratada hacia Alemania en un 160%*. Recuperado de <https://www.proecuador.gob.ec/2017/01/31/incrementa-la-exportacion-de-uvilla-deshidratada-hacia-alemania-en-un-160/>
- Invitrogen. (2010). *UltraPure™ Agarose*. Recuperado de https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/ultrapure_agarose.pdf
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874. DOI:10.1093/molbev/msw054
- Larone, D. (1976). *Medically Important Fungi a Guide to Identification*. Nueva York, Estados Unidos: Harper and Row Publishers.
- Leslie, J., y Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, Estados Unidos: Blackwell Publishing Professional.
- Lonza. (2012). *GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain*. Recuperado de http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_GelStar_Nucleic_Acid_Gel_Stain_-_Protocol.pdf
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2006). New Database and View Options for Nucleotide BLAST Services. *NCBI News*, 15(2). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/V15N2/BLView.html>

- Nelsen, M. (2017). *Primer Maps*. Recuperado de <https://sites.google.com/site/mpnelsen/primermaps>
- Nitschke, E., Nihlgard, M., y Varrelmann, M. (2009). Differentiation of Eleven *Fusarium* spp. Isolated from Sugar Beet, Using Restriction Fragment Analysis of a Polymerase Chain Reaction–Amplified Translation Elongation Factor 1 α Gene Fragment. *Phytopathology*, 99(8), 921-929. DOI: 10.1094/PHYTO-99-8-0921
- O'Donnell, K., y Cigelnik, E. (1997). Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103-116. DOI: 10.1006/mpev.1996.0376
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., y Nirenberg, H. (1998). Molecular Systematics and Phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* Species Complex. *Mycologia*, 90(3), 465-493. DOI: 10.2307/3761407
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P., Crous, P., Glenn, A., ... y Sarver, B. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 936-948. DOI: 10.1016/j.fgb.2009.08.006
- Promega. (2014). *Technical manual: Wizard® Genomic DNA Purification: Isolation Genomic DNA from Plant Tissue*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/wizard%20genomic%20dna%20purification%20kit%20protocol.pdf>
- Promega. (2016). *GoTaq® Green Master Mix*. Recuperado de <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf>
- Promega. (2017). *100bp DNA Ladder*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight-markers/100bp-dna-ladder/?catNum=G2101>
- Rédei, G. (2008). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. DOI: 10.1007/978-1-4020-6754-9

- Reynolds, M., Pask, A., Mullan, D., y Chávez P. (2011). *Fitomejoramiento fisiológico I: Enfoques interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo*. Recuperado de <http://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/3207/97923.pdf?sequence=6>
- Rodríguez, E. (2013). Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de zonas productoras de uchuva (*Physalis peruviana*) en Cundinamarca y Boyacá (Trabajo de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/44420/1/07790760.2013.pdf>
- Roger, A., Sandblom, O., Doolittle, W., y Philippe, H. (1999). An Evaluation of Elongation Factor 1a as a Phylogenetic Marker for Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 16(2), 218-233. Recuperado de <http://mbe.oxfordjournals.org/content/16/2/218.long>
- Smith, A. (2012). Reconocimiento de las enfermedades y plagas en el cultivo de la uchuva. En A. Díaz (Ed.), *Avances en el manejo y control de Fusarium oxysporum en el cultivo de uchuva (Physalis peruviana)* (pp. 9-12). Bogotá, Colombia: Produmedios.
- Somma, M. (2007). Sesión No. 4: Extracción y purificación de ADN. En M. Querci, M. Jermini y G. Van den Eede (Eds.), *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos* (pp. 1-18). Italia: Comunidades Europeas.
- ThermoScientific. (2015). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers*. Recuperado de <http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/nanodrop-2000-2000c-spectrophotometers.html>.
- United States Department of Agriculture [USDA]. (2016). *Full Report (All nutrients): 09138, Groundcherries, (cape gooseberries or pohá), raw*. Recuperado de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2245?fgcd=&manu=&lfacet=&format=Full&cunt=max=35&offset=&sort=&qlookup=09138>
- Urrea, R., Cabezas, L., Sierra, R., Cárdenas, M., Restrepo, S., y Jiménez, P. (2011). Selection of antagonistic bacteria isolated from the *Physalis peruviana* rhizosphere against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 707-716. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05092.x

- White, T., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, J. y White, T. (Eds.), *PCR protocols, a guide to methods and applications* (pp. 315-322). New York: Academic Press.
- Zapata, J., Saldarriaga, A., Londoño, M., y Díaz, C. (2002). *Manejo del cultivo de la uchuva en Colombia*. Recuperado de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/jspui/bitstream/11348/6407//Manejo%20del%20cultivo%20de%20la%20uchuva.pdf>
- Zavala, J. (2005). *Manual de técnicas básicas de biología molecular, volumen 7* (1era Ed.) (pp. 43-49). Mérida, México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán
- Zhao, Z., Liu, H., Luo, Y., Zhou, S., An, L., Wang, C., ... y Xu, J. (2014). Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *Scientific Reports*, 4(6746), 1-13. DOI: 10.1038/srep06746

8. FIGURAS

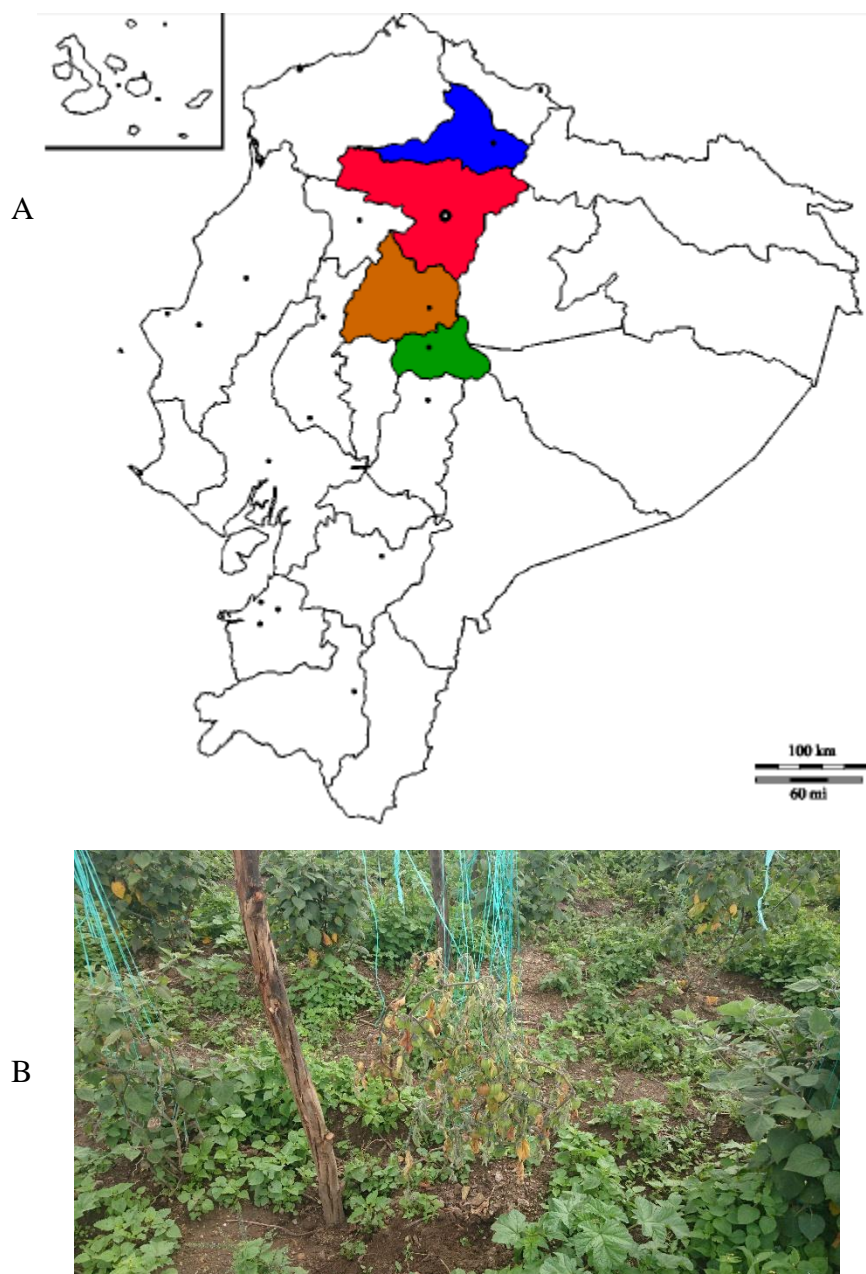


Figura 1. Sitios muestreados. (A) Provincias visitadas a lo largo del estudio. En color azul se encuentra Imbabura, en rojo Pichincha, en café Cotopaxi y en verde Tungurahua. (B) Planta de uvilla enferma por marchitamiento vascular.



Figura 2. Cultivo axénico. Los hongos con morfología similar a *Fusarium* sp. fueron aislados y purificados hasta que exista una sola colonia en la caja Petri.

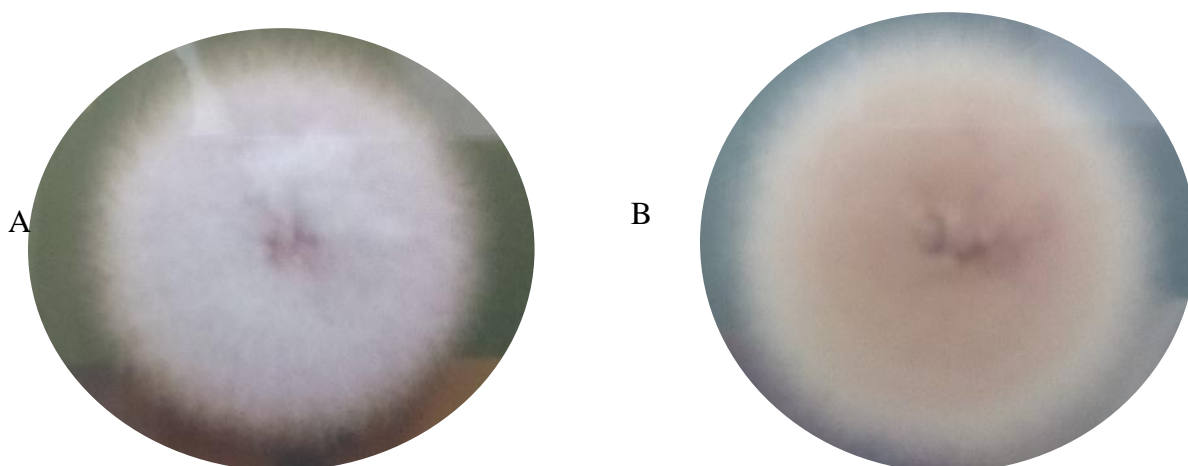


Figura 3. Colonia de *Fusarium* sp. Morfología macroscópica al (A) anverso, donde se observa el micelio aéreo, algodonoso de color violáceo y (B) reverso del aislado fúngico de color morado con borde blanquecino.

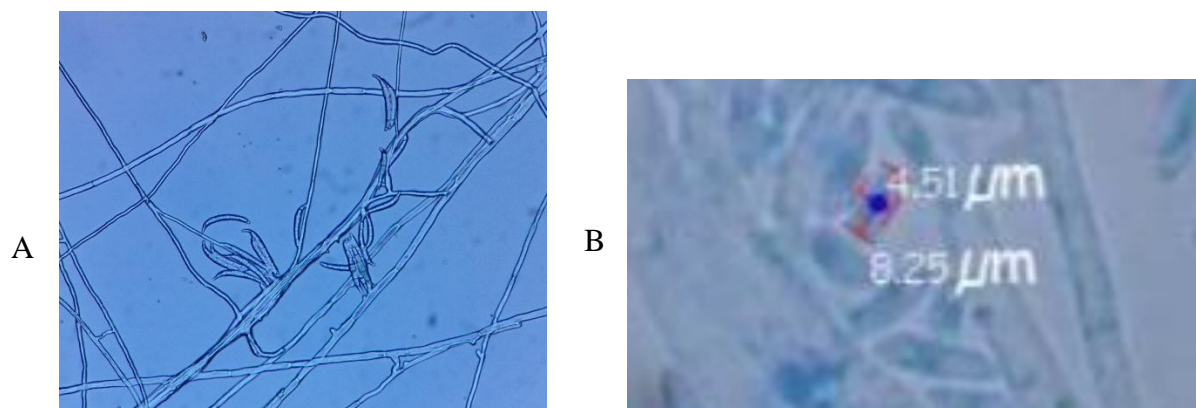


Figura 4. Observación microscópica bajo aumento de 40X. (A) Morfología microscópica de un aislado de *Fusarium* sp. empleando tinción con azul de lactofenol. (B) Medición de microconidias.



Figura 5. Plántulas de uvilla (*Physalis peruviana*) en sustrato estéril.



Figura 6. *Physalis peruviana*. Plántulas presentando de 4 a 6 hojas verdaderas listas para su uso en postulados de Koch.



Figura 7. Preparación de suspensión de conidias. Lavado y raspado del micelio de *Fusarium oxysporum* con Tween 80 con un asa para obtener un concentrado de conidias.



Figura 8. Infección de las plántulas para realizar postulados de Koch. (A) Plántulas en remojo en la suspensión de conidias. (B) Se infectaron cuatro plántulas de uvilla por cada aislado de *F. oxysporum*, en este caso se muestran dos aislados por cuadruplicado.



Figura 9. Desarrollo del marchitamiento vascular (A) en la primera y (B) en la tercera semana.



Figura 10. Marchitamiento vascular. Pasadas las tres semanas de la infección, se observa que los aislados de *Fusarium oxysporum* fueron los causantes de la enfermedad, cumpliendo con éxito los postulados de Koch.

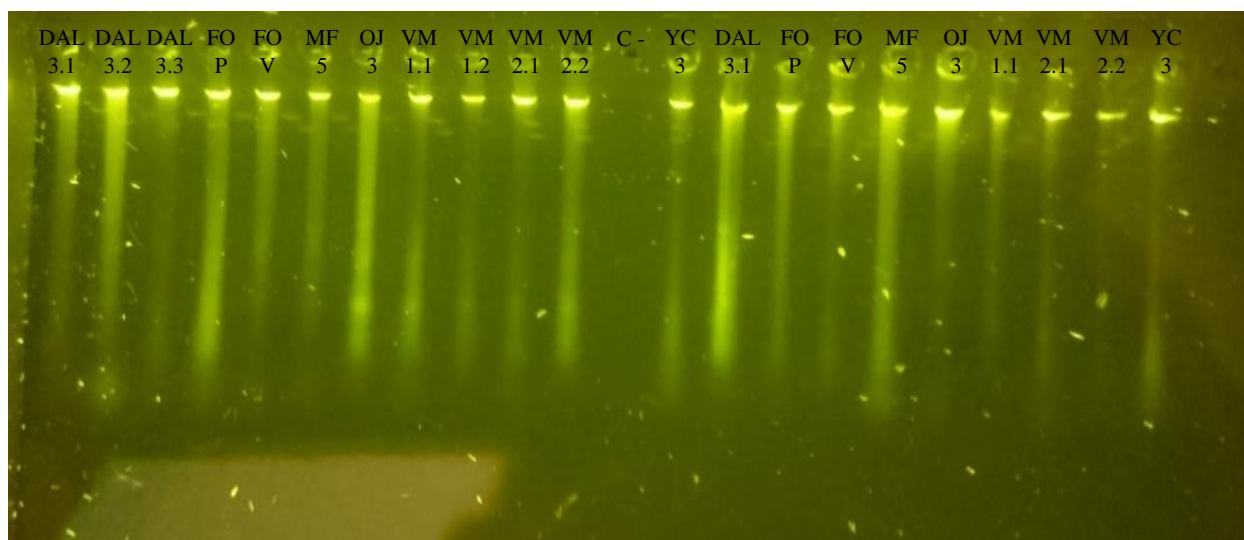


Figura 11. Presencia e integridad de ADN. Al extraer el ADN de los 12 aislados iniciales y de los 9 aislados recuperados se observa en el gel que hay presencia de material genético, sin embargo hay algunas muestras que presentan barrido debido a la degradación del ADN. Desde el carril 1 hasta el 11 y carril 13 están las muestras: DAL – 3.1, DAL – 3.2, DAL – 3.3, FO – P, FO – V, MF – 5, OJ – 3, VM – 1.1, VM – 1.2, VM – 2.1, VM – 2.2, YC – 3. En el carril 12 se encuentra un control negativo (C -). Desde el carril 14 hasta el 22 están las muestras: DAL – 3.1, FO – P, FO – V, MF – 5, OJ – 3, VM – 1.1, VM – 2.1, VM – 2.2, YC – 3.

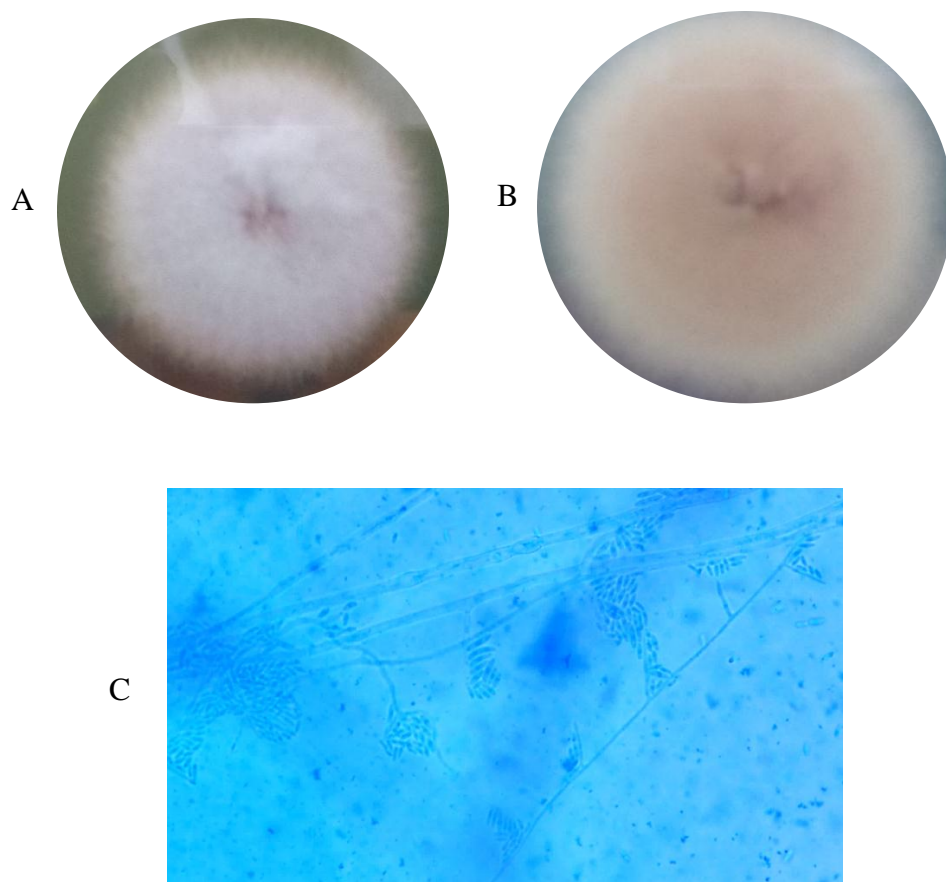


Figura 12. Descripción morfológica del aislado denominado OJ – 3. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso, micelio rosa claro en el centro y blanco en los bordes, como al (B) reverso, una coloración blanca en los bordes y rosado claro en el centro, y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se presentaron hifas septadas, microconidias y macroconidias.

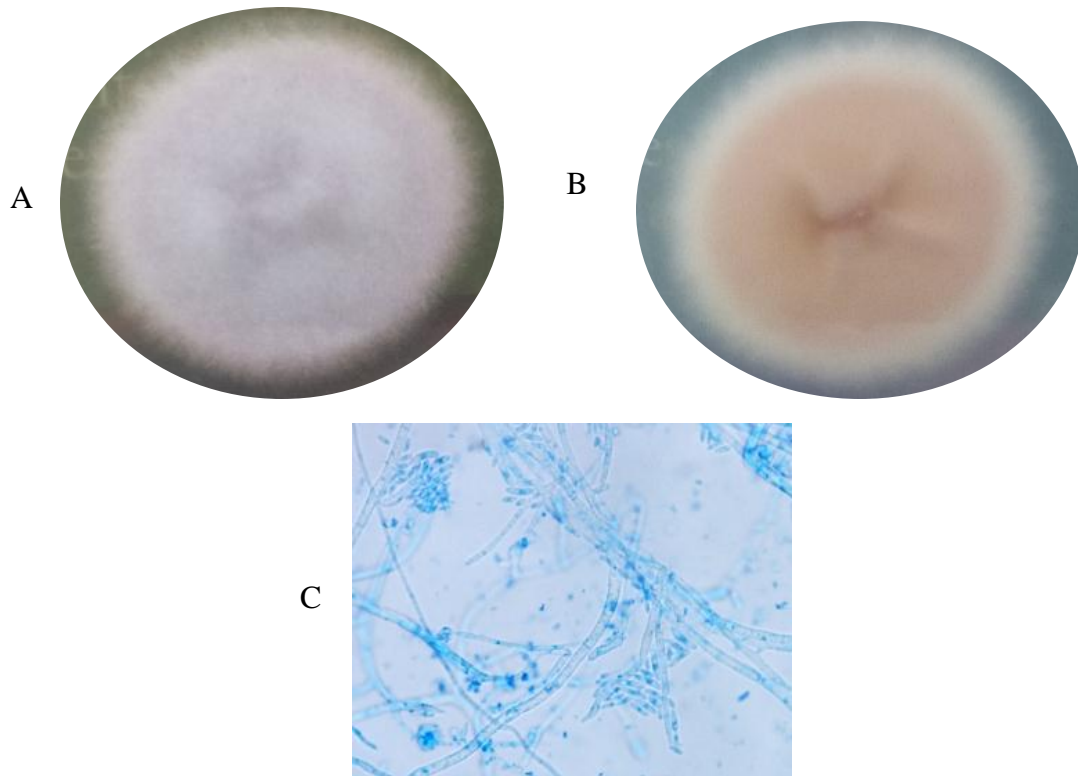


Figura 13. Descripción morfológica del aislado denominado DAL – 3.1. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso, micelio algodonoso de color rosa en los bordes y rosa claro con blanco, como al (B) reverso, pequeñas hendiduras formadas en el centro de la colonia, y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se observan hifas septadas y microconidias.

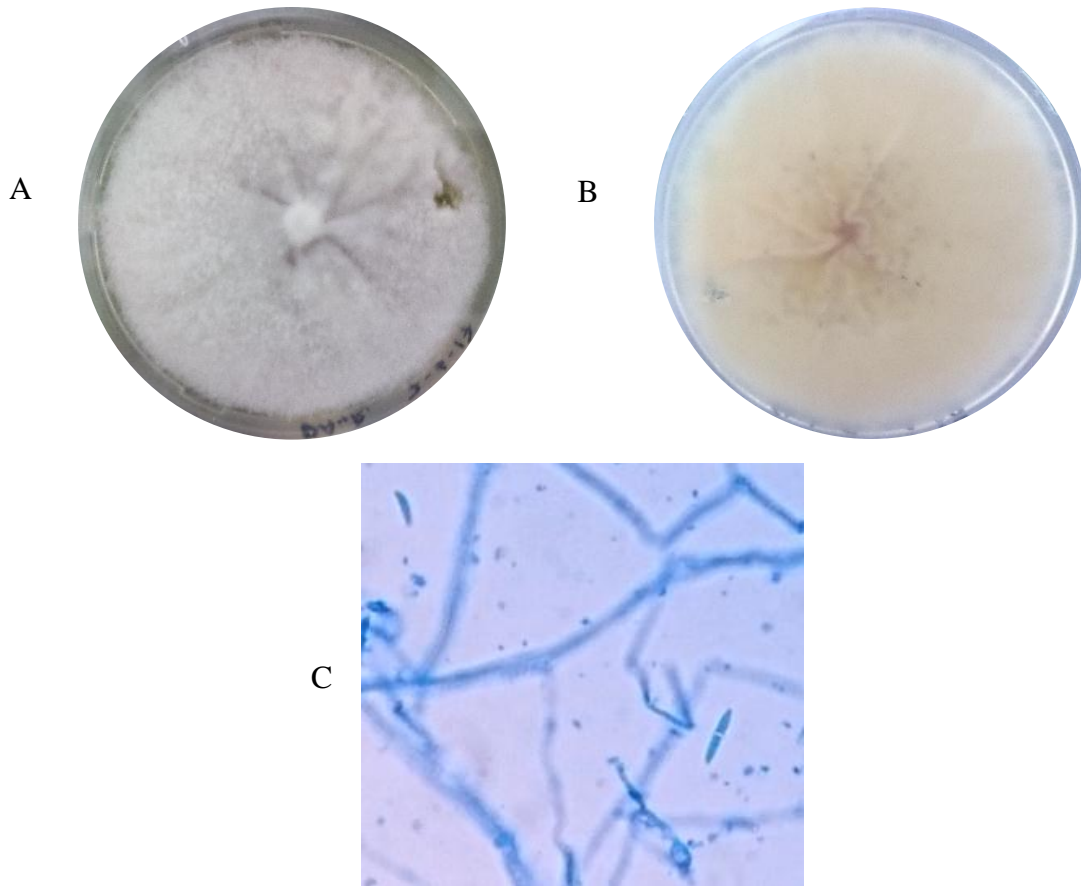


Figura 14. Descripción morfológica del aislado denominado DAL – 3.2. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso como al (B) reverso, hendiduras en el centro de la colonia que se expandieron hacia los extremos, y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se visualizaron hifas septadas y microconidias con o sin septos en forma de canoa.

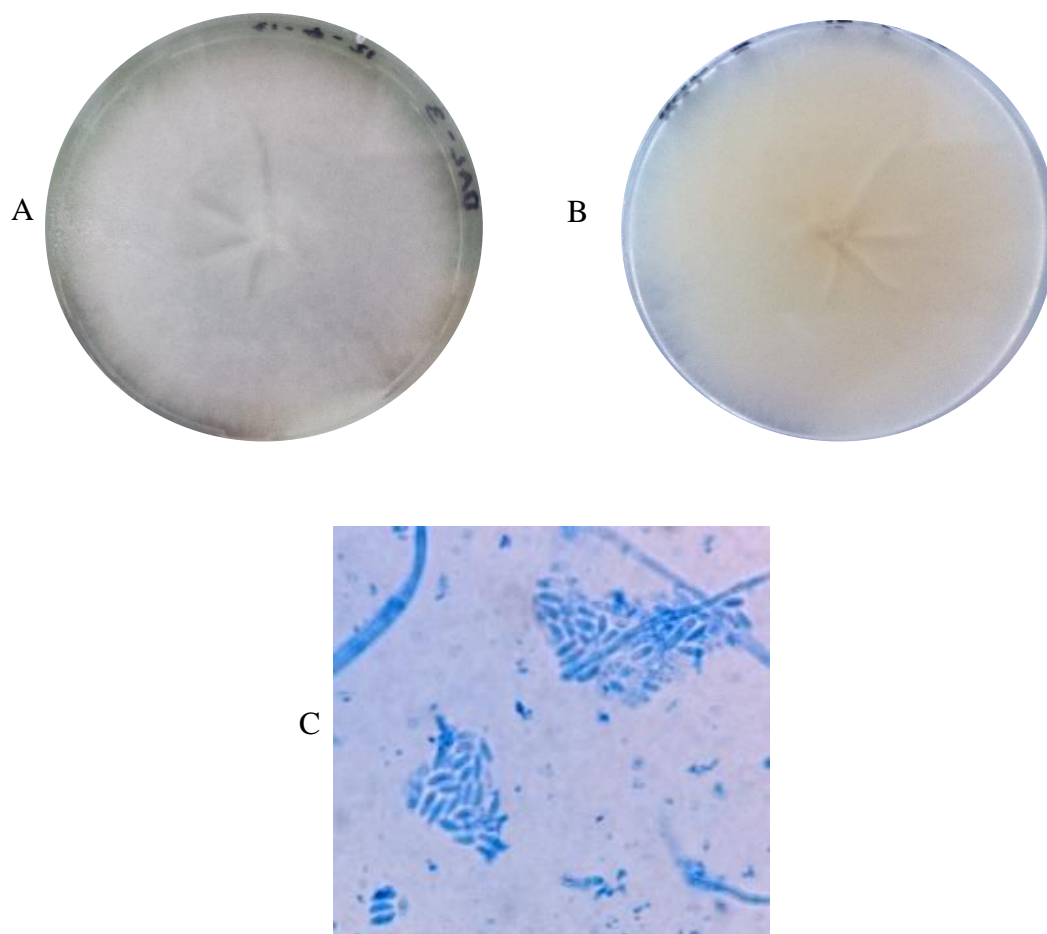


Figura 15. Descripción morfológica del aislado denominado DAL – 3.3. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso como al (B) reverso, coloración blanca del micelio y formación de hendiduras en el centro de la colonia, y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se presentaron hifas septadas, microconidias pequeñas ovaladas con o sin divisiones y pocas macroconidias, conteniendo tres células.

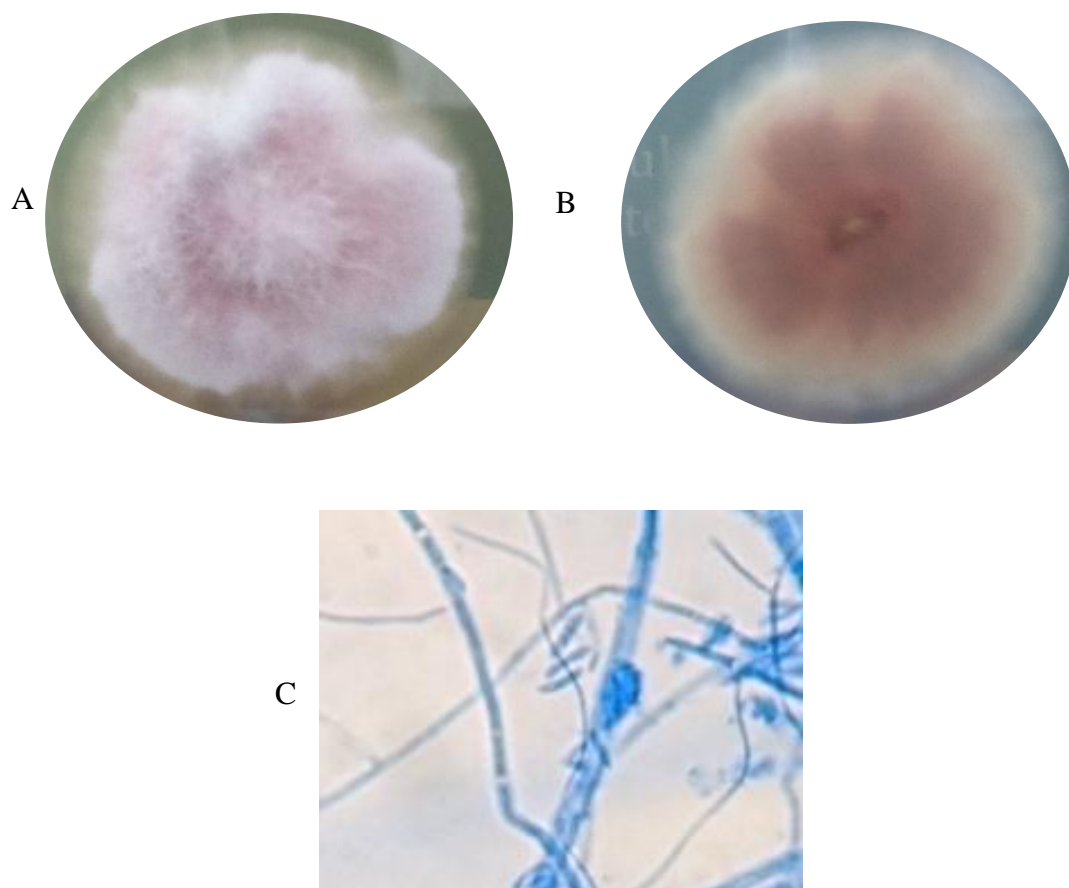


Figura 16. Descripción morfológica del aislado denominado FO – V. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso, contorno irregular con una coloración morada en el centro y que se aclaraba hacia los bordes mostrando tonalidades rosadas y blancas en el perímetro, como al (B) reverso y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X.

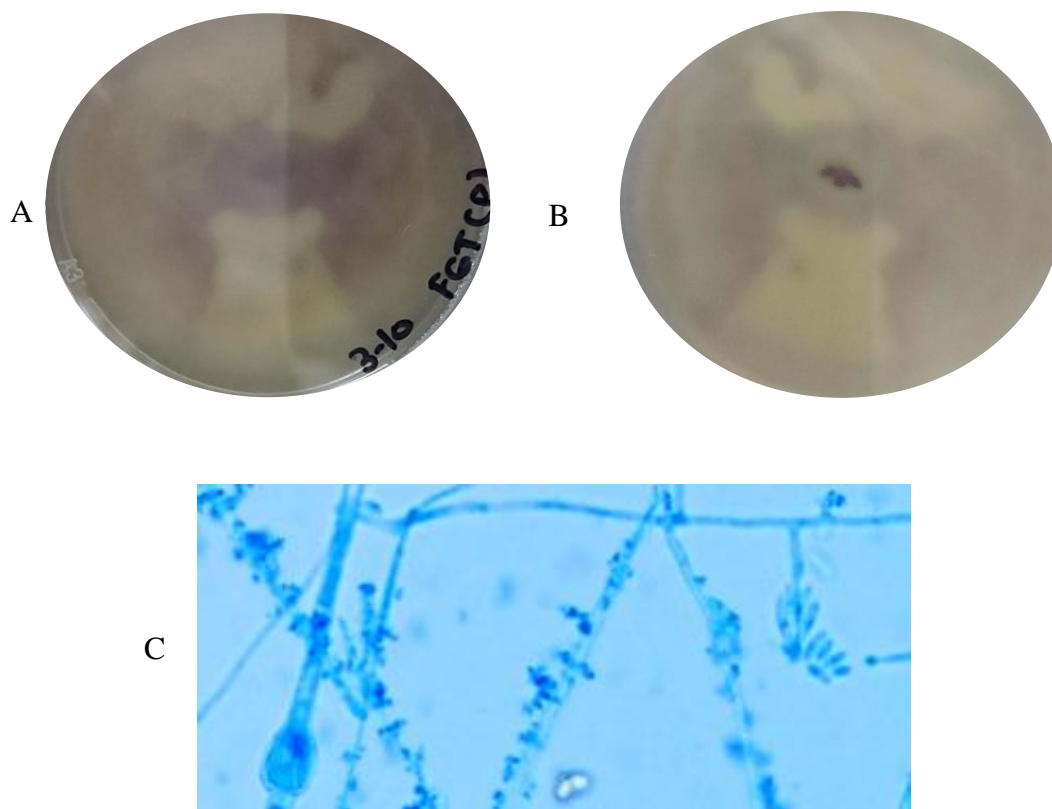


Figura 17. Descripción morfológica del aislado denominado FO – P. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso, micelio plano con pocas hifas aéreas, como al (B) reverso y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se visualizaron hifas septadas, clamidosporas y microconidias ovales.

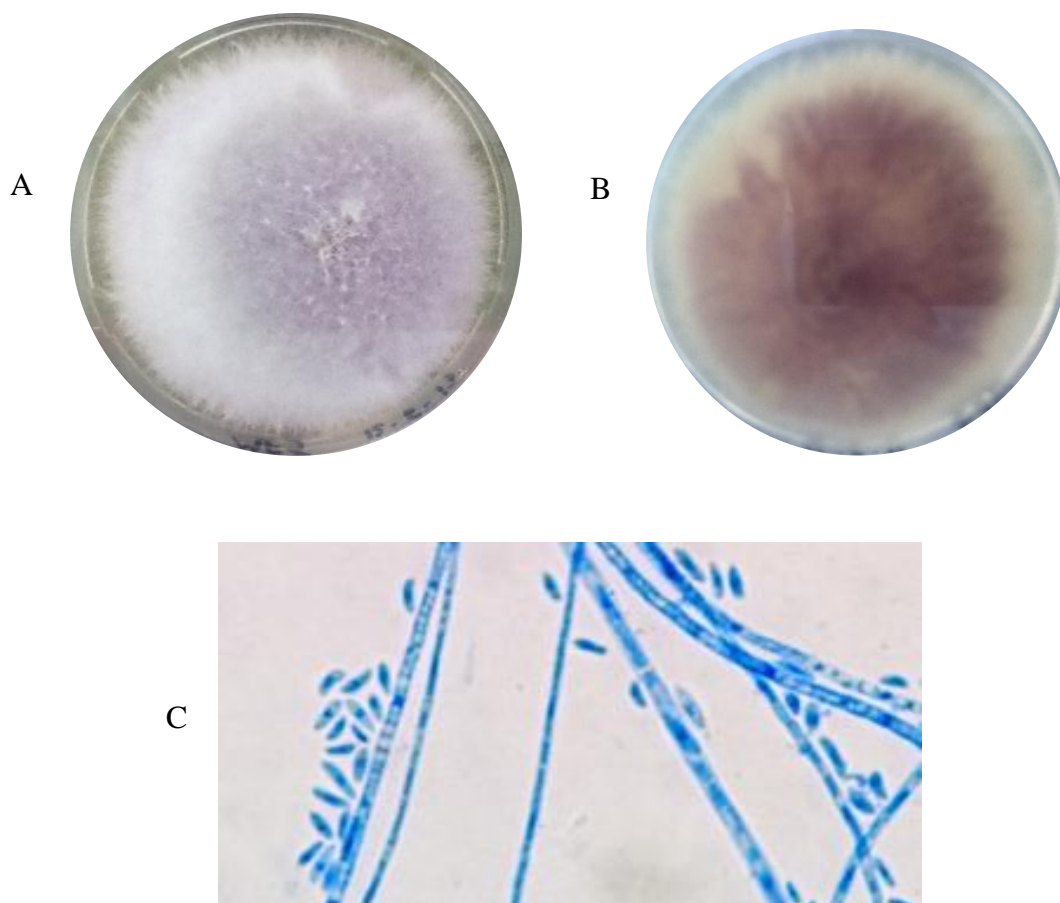


Figura 18. Descripción morfológica del aislado denominado MF – 5. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso, micelio algodonoso con muchas hifas aéreas y mostró una coloración morada oscura en el centro y blanquecina a los bordes, como al (B) reverso, una tonalidad rosada/violeta clara en los bordes y un morado oscuro al centro y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se observaron hifas septadas y microconidias, con una división, en forma oval y de canoa.

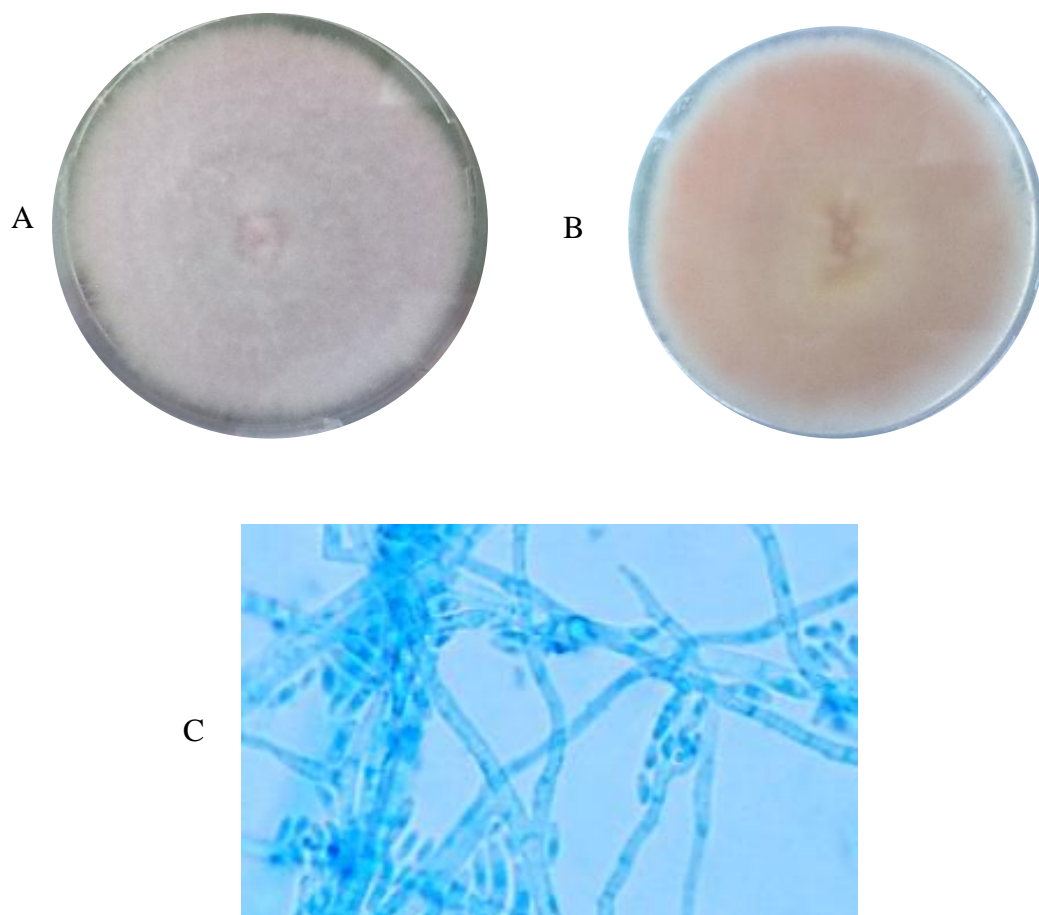


Figura 19. Descripción morfológica del aislado denominado VM – 1.1. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso como al (B) reverso y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se observaron hifas septadas, microconidias ovales sin divisiones macroconidias en forma de canoa con tres células en su interior.

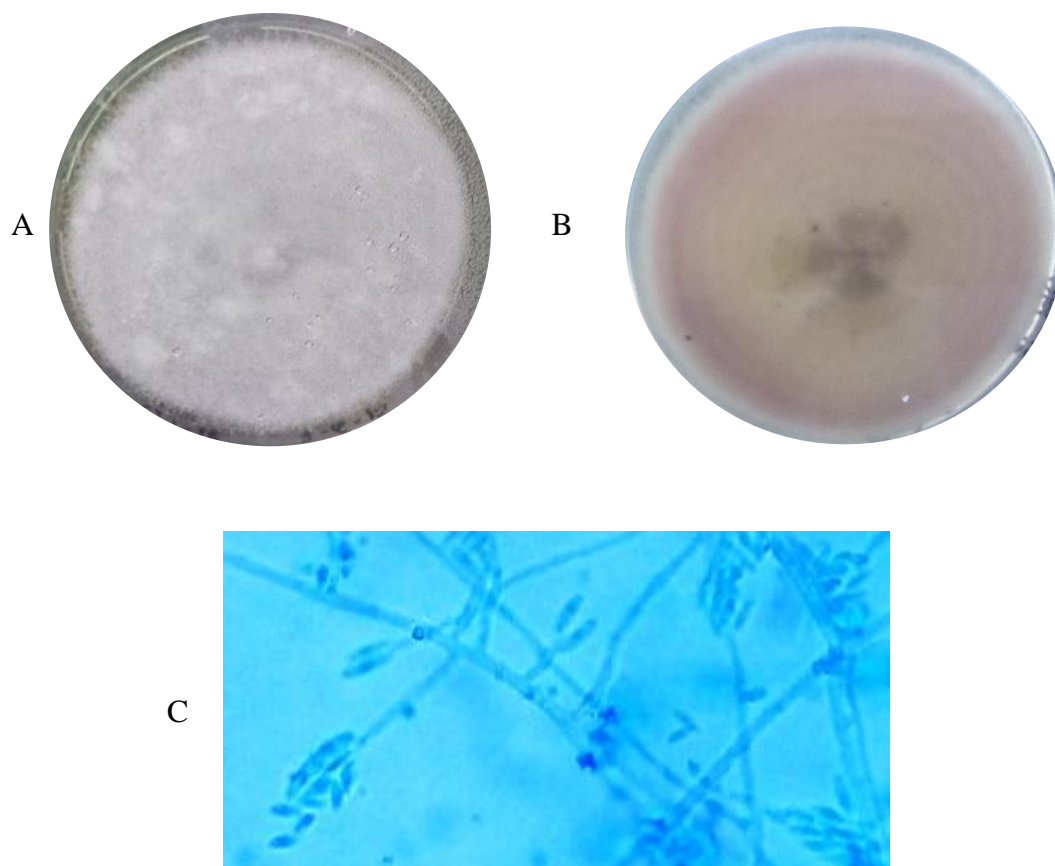


Figura 20. Descripción morfológica del aislado denominado VM – 1.2. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso, micelio algodonoso morado y, en ciertas secciones de la colonia, resaltaban agrupamientos de hifas aéreas algodonosas de color blanco, como al (B) reverso y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se observan hifas septadas, grandes cantidades de microconidias ovales con o sin divisiones y con pocas macroconidias con tres células

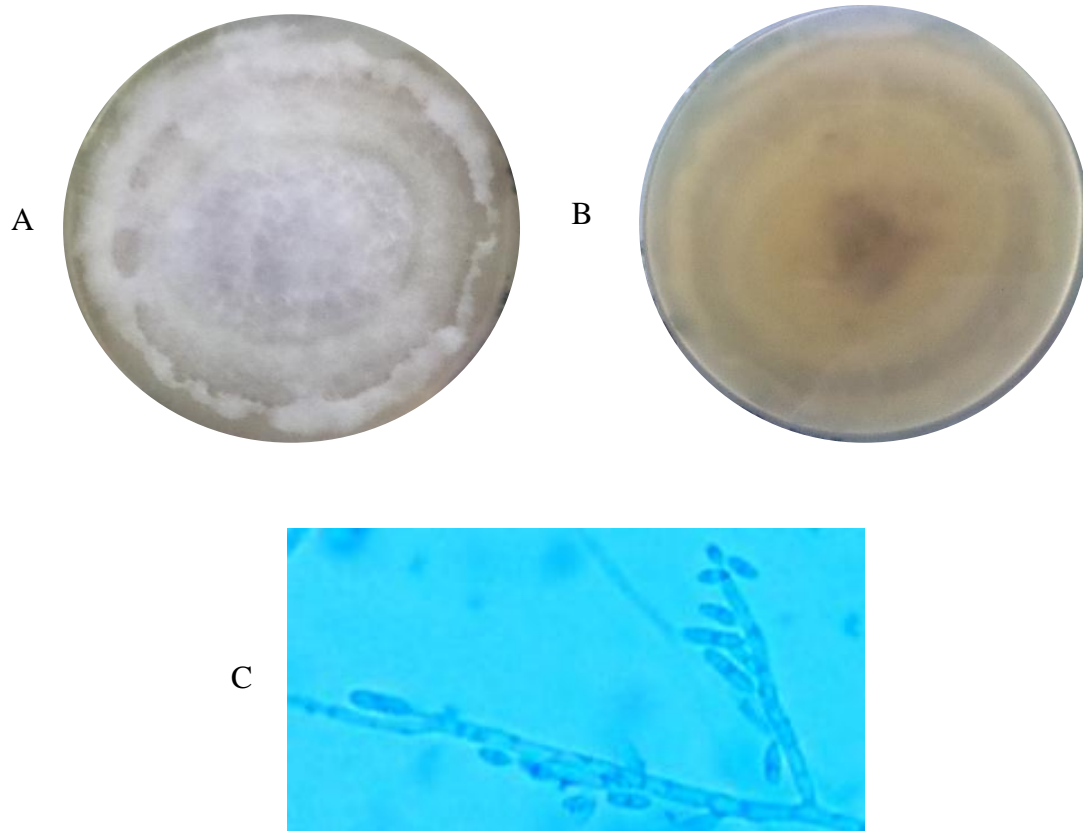


Figura 21. Descripción morfológica del aislado denominado VM – 2.1. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso, micelio algodonoso morado y blanco en el centro, como al (B) reverso, donde presentó tres anillos de color blanco, morado y blanco, y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X.

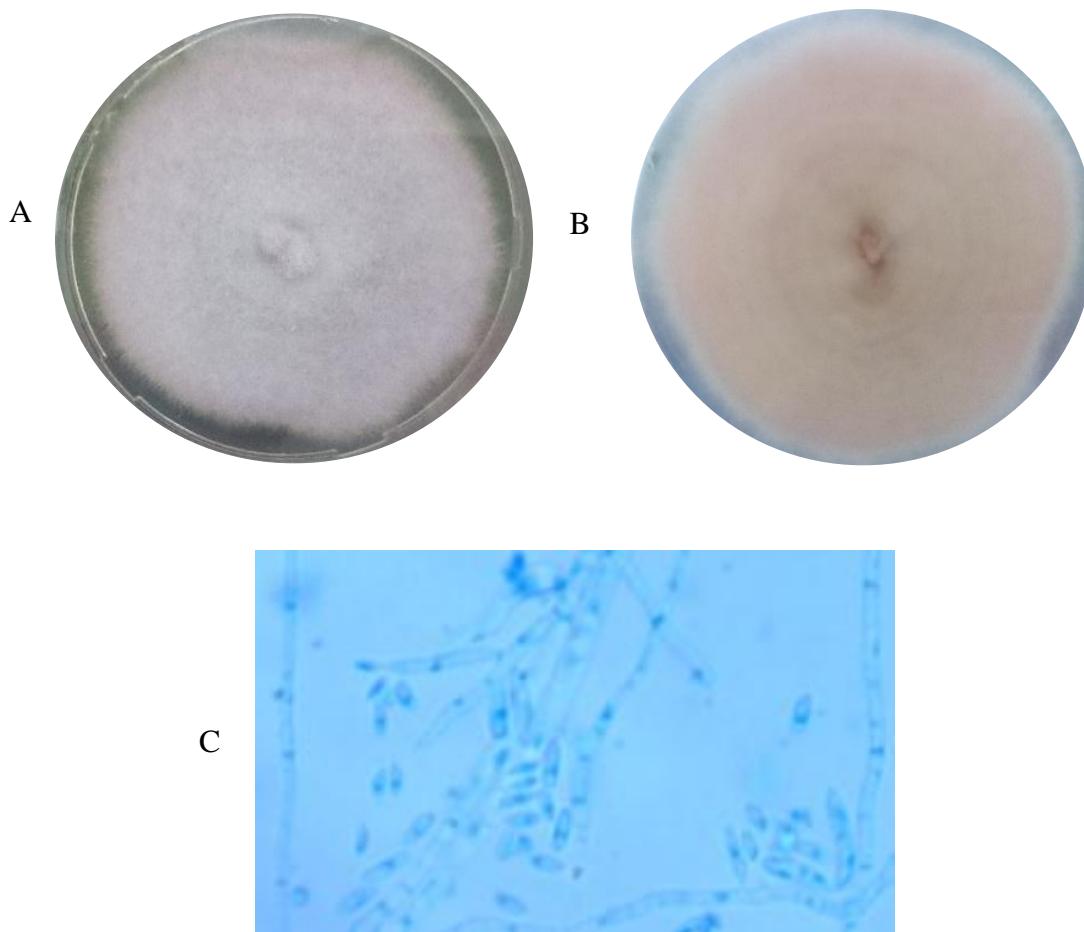


Figura 22. Descripción morfológica del aislado denominado VM – 2.2. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso como al (B) reverso, se observaron anillos con tonalidades moradas a rosadas desde afuera hacia adentro del cultivo, y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X.

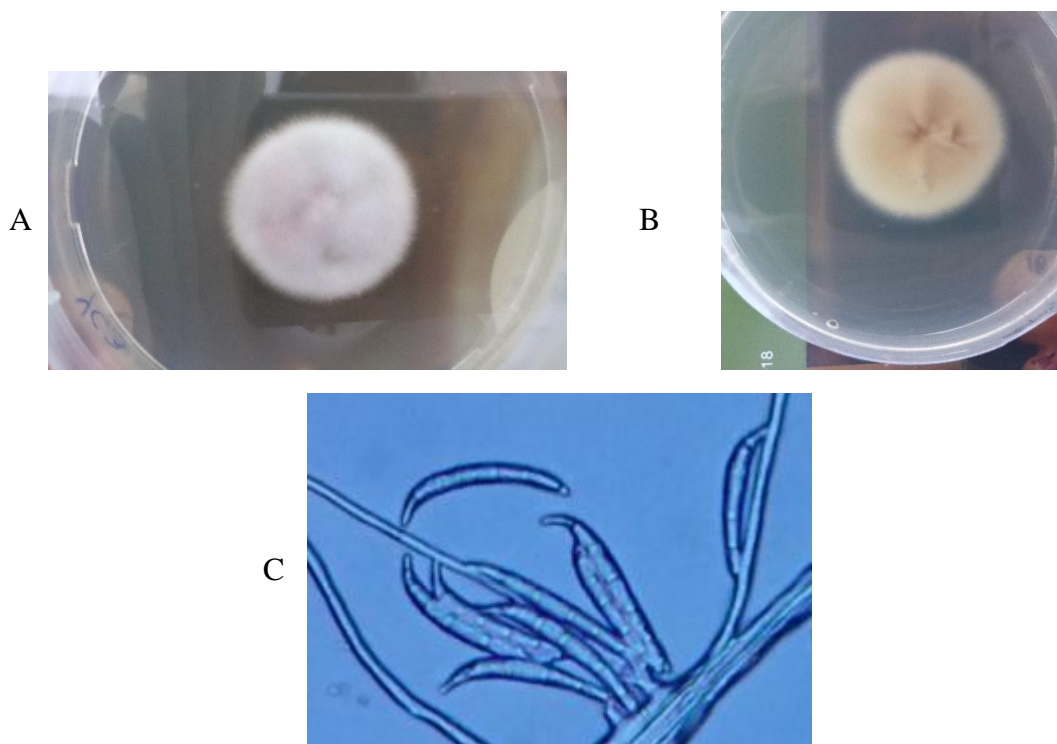


Figura 23. Descripción morfológica del aislado denominado YC – 3. Se muestra la morfología macroscópica tanto al (A) anverso como al (B) reverso, formación de hendiduras en el medio, y (C) la morfología microscópica vista bajo aumento de 40X, donde se presentaron hifas septadas con macroconidias conteniendo de tres a cuatro células.

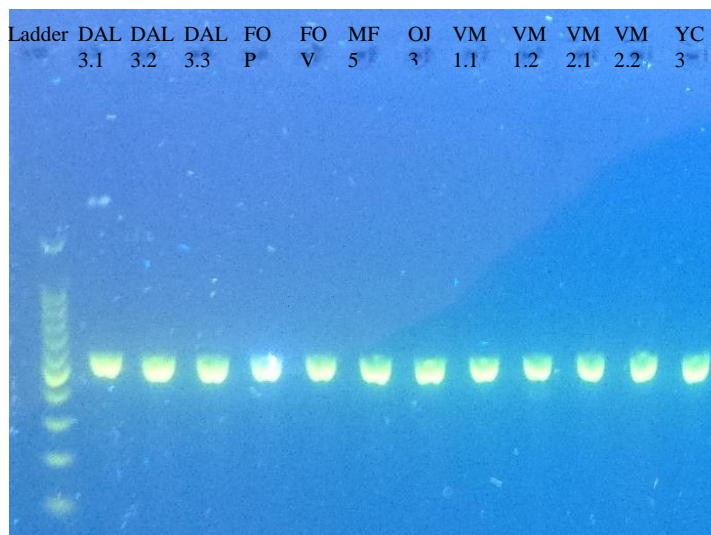


Figura 24. Amplificación del gen ITS. Se puede apreciar en el gel que las bandas ubicadas en los carriles del 2 al 13 tienen un peso aproximado de 500pb a 600pb, pertenecientes a las muestras DAL – 3.1, DAL – 3.2, DAL – 3.3, FO – P, FO – V, MF – 5, OJ – 3, VM – 1.1, VM – 1.2, VM – 2.1, VM – 2.2, YC – 3, respectivamente. El carril 1 pertenece al marcador de peso molecular.

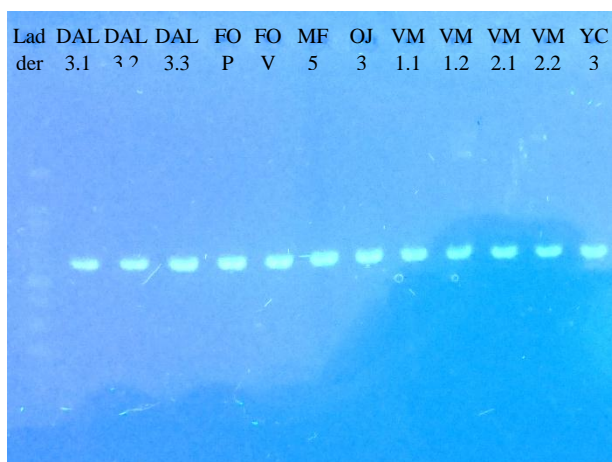


Figura 25. Amplificación del gen COX – 1. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular, el cual no tiene mucha intensidad. Desde el carril 2 hasta el 13 se encuentran las muestras DAL – 3.1, DAL – 3.2, DAL – 3.3, FO – P, FO – V, MF – 5, OJ – 3, VM – 1.1, VM – 1.2, VM – 2.1, VM – 2.2, YC – 3, las cuales tienen un peso aproximado de 500pb a 600pb.



Figura 26. Amplificación del gen EF - 1α. El gel colocado en el transiluminador reveló bandas de aproximadamente 650pb. Sin embargo, como se puede apreciar en la imagen, algunas bandas no fueron tan intensas como otras que resaltan y se observan fácilmente. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular y en los carriles subsiguientes las muestras amplificadas DAL – 3.1, DAL – 3.2, DAL – 3.3, FO – P, FO – V, MF – 5, OJ – 3, VM – 1.1, VM – 1.2, VM – 2.1, VM – 2.2.

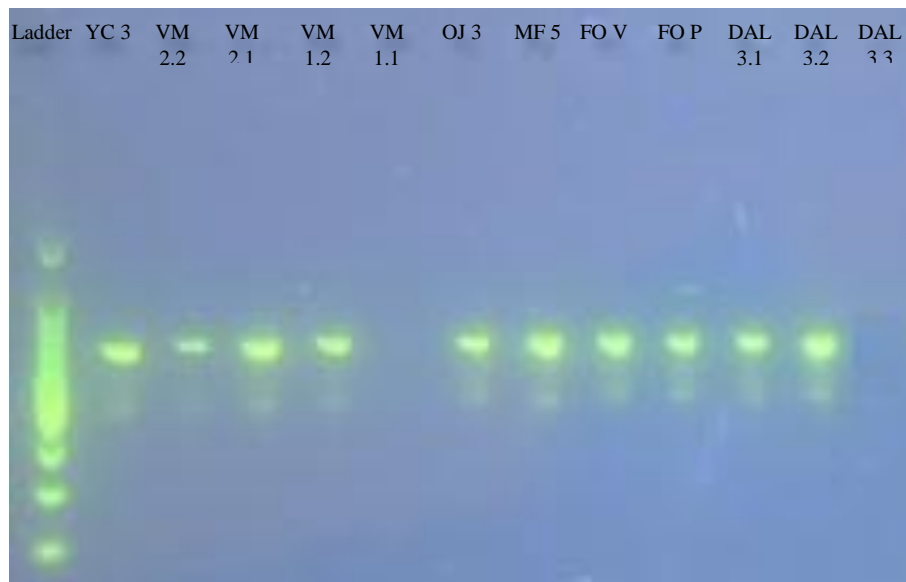


Figura 27. Amplificación del gen TUB. El gel mostró bandas de un tamaño aproximado a las 600pb. El carril 1 fue ocupado por el marcador de peso molecular y en los siguientes carriles se encuentran las muestras amplificadas. En el carril 5 y 12 se encuentran las muestras que arrojaron resultados negativos (VM – 1.1 y DAL – 3.3).

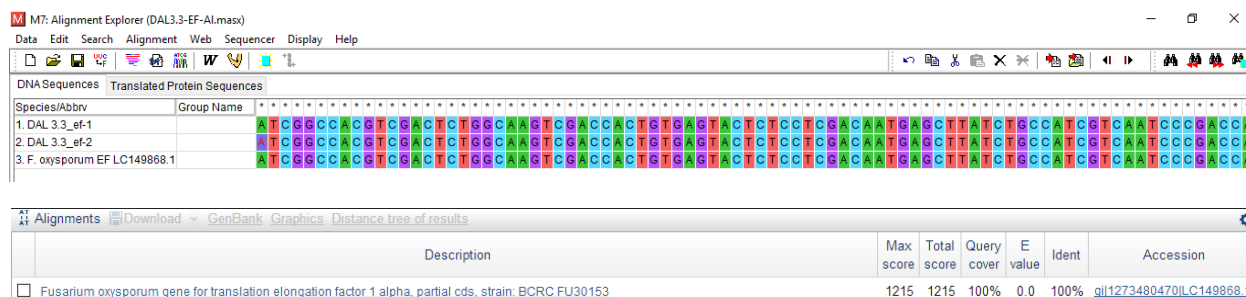


Figura 28. Alineamiento y búsqueda BLAST. Ejemplo de alineación de secuencias forward y reverse, búsqueda e identificación de la secuencia problema mediante BLAST con un porcentaje de cobertura y de identidad del 100%, y un valor E de 0.0.

9. TABLAS

Tabla 1. Lista de lugares muestreados.

Lugar	Coordenadas	Aplica químico	Tipo de Abono	Número de muestras tomadas
Quero, Tungurahua	S 1°23'18.782"; O 78°36'15.874"	No	Humus, restos de frutas	2
Quero, Tungurahua	S 1°23'34.736"; O 78°36'37.979"	Si, Fungicida	Bioles, humus, compost	2
La Esperanza, Yaruquí, Pichincha	S 4°42'73.700"; O 79°26'30.000"	Si, Fungicida	Compost y humus	3
Ascázubi, Pichincha	S 4°42'13.700"; O 79°26'33.000"	No	Humus	3
Belén, Parque industrial de Ambato, Tungurahua	S 1°10'55.239"; O 78°36'34.170"	Si, Fungicida	Humus y compost	4
Vía a Mocha, Tungurahua	S 1°24'34.162"; O 78°37'49.254"	No	Bioles, compost, té de frutas	4
Pataín, Cotopaxi	S 1°04'93.500"; O 78°35'07.700"	No	Humus y Compost	4
Pataín, Cotopaxi	S 1°04'96.500"; O 78°35'04.900"	Si, Fertilizante químico	Ninguno	4
Pataín, Cotopaxi	S 1°04'77.500"; O 78°34'62.800"	Si, Fertilizante químico	Ninguno	4
Sector Aeropuerto de Latacunga, Cotopaxi	S 1°04'70.000"; O 68°34'62.800"	No	Humus y Compost	5
Barrio San Marcos, Salcedo, Cotopaxi	S 1°03'72.700"; O 78°34'68.000"	Si, fungicida y Fertilizante químico	Compost	5
Barrio San Marcos, Salcedo, Cotopaxi	S 1°03'79.700"; O 78°34'62.000"	No	Bioles y Compost	5
Quiroga, Imbabura	N 0°16'35.316"; O 78°36'34.170"	No	Bioles y Humus	5
Quiroga, Imbabura	N 0°16'48.400"; O 78°17'61.300"	No	Bioles y Compost	5
Total				55

Tabla 2. Codificación de las muestras.

Provincia	Código de la muestra	Número de hongos de interés aislados
Tungurahua	FO – 1	Ninguno
Tungurahua	FO – 2	2
Tungurahua	BN – 1	Ninguno
Tungurahua	BN – 2	Ninguno
Pichincha	TOM – 1	Ninguno
Pichincha	TOM – 2	Ninguno
Pichincha	TOM – 3	Ninguno
Pichincha	MT – 1	Ninguno
Pichincha	MT – 2	Ninguno
Pichincha	MT – 3	Ninguno
Tungurahua	DAL – 1	Ninguno
Tungurahua	DAL – 2	Ninguno
Tungurahua	DAL – 3	3
Tungurahua	JS – 1	Ninguno
Tungurahua	JS – 2	Ninguno
Tungurahua	JS – 3	Ninguno
Tungurahua	JS – 4	Ninguno
Cotopaxi	LA – 1	Ninguno
Cotopaxi	LA – 2	Ninguno
Cotopaxi	LA – 3	Ninguno
Cotopaxi	LA – 4	Ninguno
Cotopaxi	LA2 – 1	Ninguno
Cotopaxi	LA2 – 2	Ninguno
Cotopaxi	LA2 – 3	Ninguno
Cotopaxi	LA2 – 4	Ninguno
Cotopaxi	PB – 1	Ninguno
Cotopaxi	PB – 2	Ninguno
Cotopaxi	PB – 3	Ninguno
Cotopaxi	PB – 4	Ninguno
Cotopaxi	JN – 1	Ninguno
Cotopaxi	JN – 2	Ninguno
Cotopaxi	JN – 3	Ninguno
Cotopaxi	JN – 4	Ninguno
Cotopaxi	JN – 5	Ninguno
Cotopaxi	OJ – 1	Ninguno
Cotopaxi	OJ – 2	Ninguno
Cotopaxi	OJ – 3	1
Cotopaxi	OJ – 4	Ninguno
Cotopaxi	OJ – 5	Ninguno
Cotopaxi	MF – 1	Ninguno
Cotopaxi	MF – 2	Ninguno

Tabla 2. Codificación de las muestras (continuación).

Provincia	Código de la muestra	Número de hongos de interés aislados
Cotopaxi	MF – 3	Ninguno
Cotopaxi	MF – 4	Ninguno
Cotopaxi	MF – 5	1
Imbabura	YC – 1	Ninguno
Imbabura	YC – 2	Ninguno
Imbabura	YC – 3	1
Imbabura	YC – 4	Ninguno
Imbabura	YC – 5	Ninguno
Imbabura	VM – 1	2
Imbabura	VM – 2	2
Imbabura	VM – 3	Ninguno
Imbabura	VM – 4	Ninguno
Imbabura	VM – 5	Ninguno
Total		12

Tabla 3. Concentraciones (conidias/ml) de las suspensiones de *F. oxysporum* para inocular en las plántulas de uvilla.

Código de la muestra	Conidias/ml
DAL – 3.1	$1,5 \times 10^7$
DAL – 3.2	$3,5 \times 10^6$
DAL – 3.3	$2,0 \times 10^7$
FO – P	$1,0 \times 10^7$
FO – V	$2,5 \times 10^6$
MF – 5	$3,0 \times 10^7$
OJ – 3	$1,5 \times 10^7$
VM – 1.1	$5,0 \times 10^6$
VM – 1.2	$2,5 \times 10^7$
VM – 2.1	$7,0 \times 10^6$
VM – 2.2	$1,5 \times 10^7$
YC – 3	$2,0 \times 10^6$

Tabla 4. Datos de temperatura y porcentaje de humedad tomadas por el termo higrómetro en los ensayos de postulados de Koch.

Fecha	Temperatura (°C)	% Humedad
04/07/2017	22	28
05/07/2017	22	27
06/07/2017	23	26
07/07/2017	21	27
08/07/2017	22	28
10/07/2017	22	28
11/07/2017	22	26
12/07/2017	23	27
13/07/2017	24	26
14/07/2017	23	26
15/07/2017	22	28
17/07/2017	21	27
18/07/2017	22	28
19/07/2017	22	26
20/07/2017	23	27
21/07/2017	23	28
22/07/2017	22	29
24/07/2017	22	28
25/07/2017	23	28
26/07/2017	23	26
27/07/2017	24	27
28/07/2017	22	28
29/07/2017	21	27
31/07/2017	22	29
01/08/2017	22	28
02/08/2017	21	28
03/08/2017	23	27
04/08/2017	22	28
05/08/2017	22	27
07/08/2017	23	27

Tabla 5. Concentración y calidad de las muestras de ADN de los aislados iniciales y de los aislados recuperados.

Código de la muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
DAL – 3.1	682,4	1,69	0,64
DAL – 3.2	547,4	1,83	0,74
DAL – 3.3	333,5	1,76	1,09
FO – P	489,4	1,88	0,90
FO – V	211,9	1,91	0,90
MF – 5	407,6	1,94	0,40

Tabla 5. Concentración y calidad de las muestras de ADN de los aislados iniciales y de los aislados recuperados (continuación).

Código de la muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
OJ – 3	537,9	1,85	0,98
VM – 1.1	313,1	1,89	0,45
VM – 1.2	620,8	1,73	0,67
VM – 2.1	497,7	1,84	0,81
VM – 2.2	153,1	2,11	1,40
YC – 3	540,7	2,00	1,49
DAL – 3.1 REC	265,7	1,50	1,23
FO – P REC	142,1	1,19	1,73
FO – V REC	412,3	1,35	0,72
MF – 5 REC	250,3	1,27	0,96
OJ – 3 REC	36,4	1,45	0,47
VM – 1.1 REC	357,3	1,69	0,99
VM – 2.1 REC	206,9	1,28	0,76
VM – 2.2 REC	118,0	1,79	1,19
YC – 3 REC	125,1	1,72	0,94

*REC: aislado recuperado de los postulados de Koch

Tabla 6. Número de acceso de Genbank para los aislados de *F. oxysporum*.

Aislado	N° acceso Genbank para ITS	N° acceso Genbank para COX 1	N° acceso Genbank para EF - 1α	N° acceso Genbank para TUB
DAL – 3.1	MG571602.1	LT906349.1	KP400740.1	LT841201.1
DAL – 3.2	KY008461.1	LT906352.1	KY508354.1	KT323826.1
DAL – 3.3	MG020429.1	LT906358.1	LC149868.1	-----
FO – P	MG020429.1	LT906358.1	LC149868.1	LT841201.1
FO – V	KU321554.1	LT906358.1	KY508354.1	KT323826.1
MF – 5	KU527803.2	LT906358.1	KY508354.1	LT841201.1
OJ – 3	MG571602.1	LT906358.1	HM057295.1	LT841201.1
VM – 1.1	KU321551.1	LT906358.1	LT841203.1	-----
VM – 1.2	KC304800.1	LT906353.1	LC149868.1	LT841201.1
VM – 2.1	MG020429.1	LT906358.1	LT841203.1	KT323826.1
VM – 2.2	KY073258.1	LT906358.1	KY508354.1	KF624779.1
YC – 3	KY008461.1	MF155191.1	KP400740.1	MF197729.1
DAL – 3.1 REC	MG571602.1	LT906349.1	KP400740.1	LT841201.1
FO – P REC	MG020429.1	LT906358.1	LC149868.1	LT841201.1
FO – V REC	KU321554.1	LT906358.1	KY508354.1	-----
MF – 5 REC	KU527803.2	LT906358.1	-----	-----
OJ – 3 REC	MG571602.1	LT906358.1	HM057295.1	-----
VM – 1.1 REC	KU321551.1	LT906358.1	LT841203.1	LT841201.1
VM – 2.1 REC	MG020429.1	LT906358.1	LT841203.1	KT323826.1

Tabla 7. Número de acceso de *Genbank* para los aislados de *F. oxysporum* (continuación).

Aislado	N° acceso Genbank para ITS	N° acceso Genbank para COX 1	N° acceso Genbank para EF - 1α	N° acceso Genbank para TUB
VM – 2.2 REC	KY073258.1	LT906358.1	KY508354.1	-----
YC – 3 REC	KY008461.1	MF155191.1	KP400740.1	MF197729.1

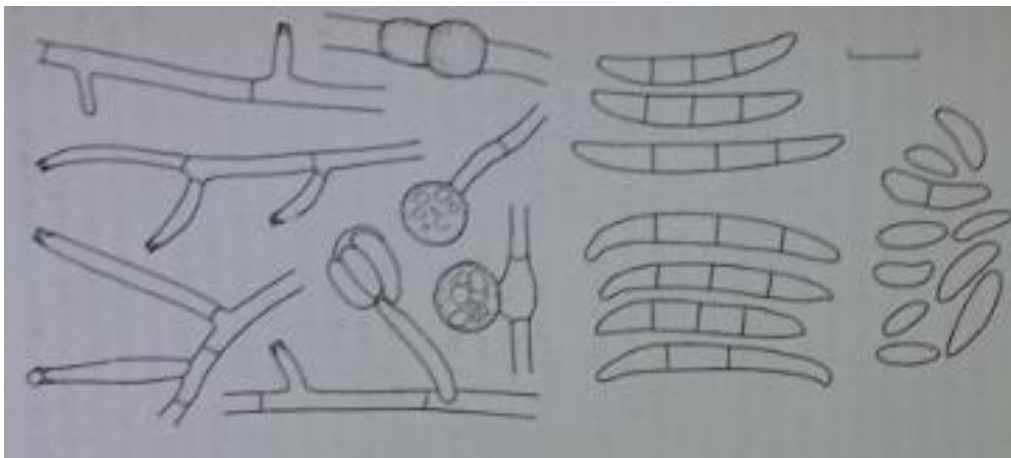
***REC:** aislado recuperado de los postulados de Koch

Tabla 8. Sintomatología causada por los aislados de *F. oxysporum* en las plántulas de uvilla.

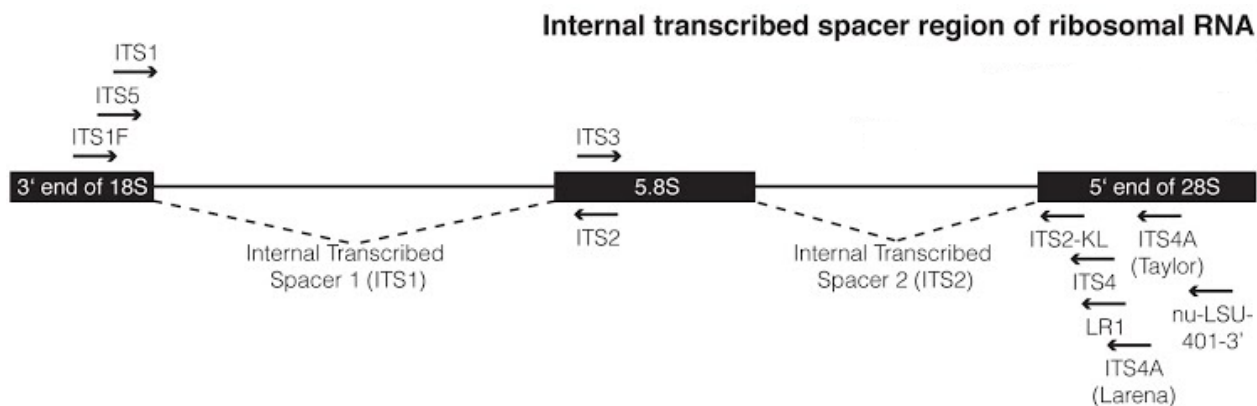
Código del aislado	Número de plántulas afectadas	Sintomatología de las plántulas					
		Marchitamiento	Reducción de tamaño	Decoloración / clorosis de hojas	Defoliación	Decaimiento del tallo	Coloración marrón del tallo
DAL – 3.1	2	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
DAL – 3.2	4	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
DAL – 3.3	2	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo
FO – P	4	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
FO – V	4	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo
MF – 5	2	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
OJ – 3	4	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo
VM – 1.1	2	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
VM – 1.2	3	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo
VM – 2.1	2	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
VM – 2.2	4	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo
YC – 3	2	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo

10.ANEXOS

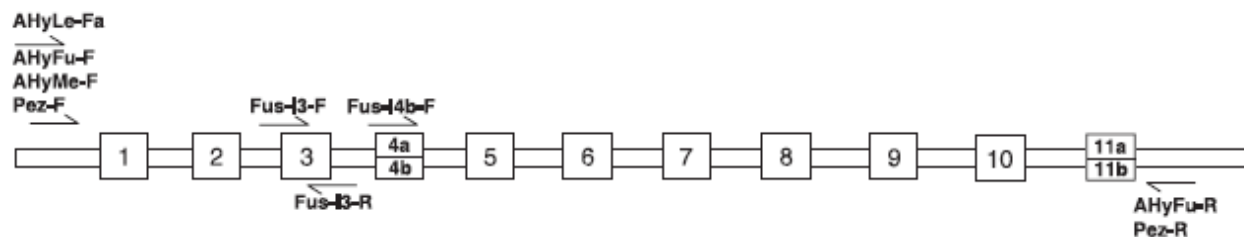
Anexo 1. Morfología microscópica de *Fusarium* sp (Domsch et al, 2007).



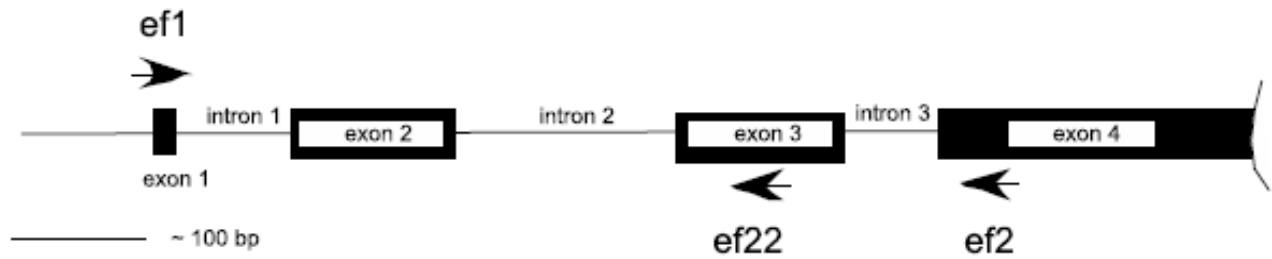
Anexo 2. Representación esquemática del Espacio Transcrito Interno (ITS) y localización de *primers* (Nelsen, 2017).



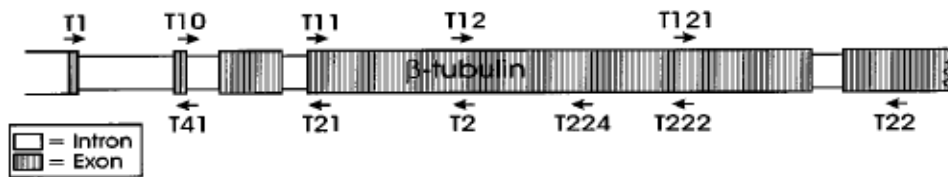
Anexo 3. Representación esquemática del Citocromo Oxidasa 1 (COX1) y localización de *primers* (Gilmore et al., 2009).



Anexo 4. Representación esquemática del Factor de Elongación 1 α (ef-1 α) y localización de los *primers* (Geiser et al., 2015).



Anexo 5. Representación esquemática de β - tubulina (TUB) y la localización de los *primers* (O'Donnell, y Cigelnik, 1997).



Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN (Promega, 2014).

3.E. Isolating Genomic DNA from Plant Tissue

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
 - liquid nitrogen
 - microcentrifuge tube pestle or mortar and pestle
 - water bath, 65°C
 - water bath, 37°C
 - isopropanol, room temperature
 - 70% ethanol, room temperature
1. Process leaf tissue by freezing with liquid nitrogen and grinding into a fine powder using a microcentrifuge tube pestle or a mortar and pestle. Add 40mg of this leaf powder to a 1.5ml microcentrifuge tube.
 2. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution, and vortex 1–3 seconds to wet the tissue.
 3. Incubate at 65°C for 15 minutes.
 4. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate, and mix the sample by inverting the tube 2–5 times. Incubate the mixture at 37°C for 15 minutes. Allow the sample to cool to room temperature for 5 minutes before proceeding.
 5. Add 200µl of Protein Precipitation Solution, and vortex vigorously at high speed for 20 seconds.
 6. Centrifuge for 3 minutes at 13,000–16,000 × *g*. The precipitated proteins will form a tight pellet.
 7. Carefully remove the supernatant containing the DNA (leaving the protein pellet behind) and transfer it to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600µl of room temperature isopropanol.
Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
 8. Gently mix the solution by inversion until thread-like strands of DNA form a visible mass.
 9. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 1 minute at room temperature.
 10. Carefully decant the supernatant. Add 600µl of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 1 minute at room temperature.
 11. Carefully aspirate the ethanol using either a drawn Pasteur pipette or a sequencing pipette tip. The DNA pellet is very loose at this point and care must be used to avoid aspirating the pellet into the pipette.
 12. Invert the tube onto clean absorbent paper and air-dry the pellet for 15 minutes.
 13. Add 100µl of DNA Rehydration Solution and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
 14. Store the DNA at 2–8°C.