



UNIVERSIDAD DE GRANMA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

TRABAJO DE DIPLOMA

PRESENTADO EN OPCIÓN AL TÍTULO DE INGENIERO

AGRÓNOMO

TÍTULO: Caracterización de aislamientos de *Fusarium spp* de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) en la finca el Carrizal – México.

AUTOR: Emmanuel Alexander Enríquez Acosta

DIRECTOR INTERNO: MSc. Dany Maikel Sariol Sánchez

CODIRECTORES EXTERNOS: Dr. Juan José Reyes Pérez
Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Bayamo, Cuba
2019

UNIVERSIDAD DE GRANMA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA.
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

TRABAJO DE DIPLOMA

PRESENTADO EN OPCIÓN AL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO

TÍTULO: Caracterización de aislamientos de *Fusarium spp* de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) en la finca el Carrizal – México.

AUTOR: Emmanuel Alexander Enríquez Acosta

DIRECTOR INTERNO: MSc. Dany Maikel Sariol Sánchez

CODIRECTORES EXTERNOS: Dr. Juan José Reyes Pérez
Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Bayamo, Cuba

2019

Pensamiento

“... Y realmente el mundo necesita agrónomos, el mundo necesita agricultores, y va a necesitar agricultores de una preparación muy amplia porque los problemas son infinitos. Y todo buen agricultor debe saber de suelo, debe saber de fertilizantes, debe saber de sanidad vegetal, debe saber de riego, debe saber de muchas cosas, tiene que ser un especialista en agricultura integral...”

Fidel Castro Ruz.



Agradecimientos

En primer lugar, le doy gracias a Dios por la salud, sabiduría y conocimiento adquirido, al mismo tiempo agradecer de la manera más respetuosa a mi madre, así también a Rene Espinoza a mis hermanos y en especial a una persona quien me inculca a seguir formándome como profesional, gracias por sus sabios consejos que día a día fortalecen mi vida.

A mi comité tutorial, MSc. Dany Maikel Saviol Sánchez, Dr. Juan José Reyes Pérez y Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel, por sus contribuciones a este trabajo y su tiempo invertido en mi formación académica.

Al Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo e invitarme a realizar el presente proyecto de investigación, además por sus consejos, tutelaje, solidaridad y participación en cada una de las etapas de mi realización en esta meta profesional.

A todo el personal del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por su ayuda invaluable durante la ejecución de los experimentos de esta tesis.

A mi compañero de estudio Wilmer Juan Lanchimba Sopalo que de una forma u otra me ha ayudado en el transcurso de estos cinco años.

A mi familia, por la dedicación y respeto hacia mí.

Y de forma general a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a mi formación como profesional

¡Muchas gracias!

Dedicatoria

Janeth Acosta León, es una sola y como ella ninguna, a quien mejor que a mi madre dedicarle este trabajo, a ella siempre que en las buenas y en las malas ha estado a mi lado con su amor, apoyo y su cariño incondicional.

Resumen

En el presente estudio, se realizó con el objetivo de caracterizar aislamientos patógenos de *Fusarium* spp. de plantas de tomate en la finca "El Carrizal" México. Para lo cual se realizó un muestreo para la colecta de las plantas con síntomas de infección por *Fusarium* luego se procedió a el aislamiento del patógeno y la obtención del cultivo puro para evaluar la coloración, tamaño, índice de crecimiento micelial, textura, abundancia de las esporas, características morfológicas principalmente de micro y macroconidios. Se determinó que existe una gran variabilidad en cuanto a las variables evaluadas por ejemplo en las coloraciones variaron desde blanquecino a rojo violáceo y rojo vino. *Fusarium* spp es un hongo que presenta la posibilidad de desarrollarse en medio PDA y lograr un desarrollo adecuado. En cuanto a la morfología se confirmó la presencia de estructuras microscópicas típicas de *Fusarium* spp. Se observaron macroconidios curvos o semicurvos con 3-5 septos con célula apical estrecha, papilada o de tipo romo, microconidios predominantemente reniformes y fusiformes, de cero hasta 1 septo, mayormente a partir de monofiálides. En algunos aislamientos se confirmó la producción de clamidosporas pareadas, presentando gran variabilidad, en cuanto a coloración, textura velocidad de crecimiento y forma de las estructuras morfológicas y se comprobó los postulados de Koch.

Abstract

In the present study, it was carried out with the objective of characterizing pathogenic isolated of *Fusarium* spp. from tomato plants on the farm "El Carrizal" Mexico. For which a sampling was carried out for the collection of plants with symptoms of *Fusarium* infection then it was processed to isolate the pathogen and obtain the pure culture to evaluate the coloration, size, mycelial growth rate, texture, abundance of spores, morphological characteristics mainly of micro and macroconidia. It was determined that there is great variability in terms of the variables evaluated, for example, in the colorations ranged from whitish to violet red and wine red. *Fusarium* spp is a fungus that presents the possibility of developing in PDA medium and achieving adequate development. Regarding morphology, the presence of microscopic structures typical of *Fusarium* spp. Curved or semi-curved macroconidia were observed with 3-5 septa with narrow, papillary or blunt-type apical cells, predominantly reniform and fusiform microconidia, from zero to 1 septum, mostly from monofiálides. In some isolates, the production of paired clamidospores was confirmed, presenting great variability, in terms of coloration, texture, speed of growth and shape of morphological structures, and Koch's postulates were verified.

INTRODUCCIÓN	1
I- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.1. Generalidades del cultivo del tomate	4
1.1.1. Importancia y distribución mundial del tomate.....	4
1.1.2. Principales plagas y enfermedades del tomate	5
1.2. Los hongos fitopatógenos	6
1.3. Revisión histórica de <i>Fusarium</i> sp.	8
1.4. Características del género <i>Fusarium</i>	9
1.5. Las fusariosis del tomate	10
1.6. Identificación y características de cepas patógenas del género <i>Fusarium</i> spp. 11	
1.6.1. Caracterización morfológica de <i>Fusarium</i> sp.	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. Aislamiento y caracterización de especies de <i>Fusarium</i>	14
2.2. Prueba de patogenicidad.....	16
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
3.1. Caracterización de aislamientos de <i>Fusarium</i> de plantas de tomate.	18
3.2 Comprobación de los postulados de Koch.....	30
CONCLUSIONES.	32
RECOMENDACIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	

INTRODUCCIÓN

La marchitez en tomate causada por *Fusarium oxysporum* tiene amplia distribución en el Ecuador y en el mundo entero. Los *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular. No obstante, esta producción se ve afectada por problemas fitosanitarios ocasionados por diversos microorganismos, entre los que se encuentran hongos saprófitos, endófitos o patogénicos del género *Fusarium* (Gómez-López *et al.*, 2014). Diversas especies de *Fusarium* se han reportado como patógenos de numerosos cultivos, ocasionando pérdidas leves hasta el total de la producción, incluso se han encontrado pérdidas del 100% cuando los cultivares utilizados son susceptibles y las condiciones ambientales son favorables al patógeno (Parry *et al.*, 1995; Dean *et al.*, 2012; Perniola *et al.*, 2014).

Este género presenta una clasificación taxonómica ampliamente discutida, teniendo en cuenta que los caracteres morfológicos, en muchos casos, resultan insuficientes para una correcta identificación a nivel de especie, por lo que, se ha hecho necesaria la implementación de técnicas moleculares. Entre las cuales se tiene la comparación de pequeñas secuencias de ADN de regiones que son altamente conservadas como la calmodulina, β tubulina, la histona H3, ITS y TEF1- α . Así mismo, el gen TEF1- α o factor de elongación de la traducción, es una de las regiones más empleadas en la identificación molecular de especies de *Fusarium*, por lo tanto muestra un alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas (Gómez-López, 2008; Aoki *et al.*, 2014).

Fusarium es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica y a su vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance (Michielse y Rep 2009). Los principales mecanismos de dispersión del patógeno son los movimientos de suelo infectado, el agua de escorrentía y el uso de almácigo infectado. Este hongo tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo (Daugovish *et al.*, 2008). *Fusarium oxysporum* es un organismo muy amplio a nivel de especie, se han clasificado más de 120 diferentes formas especiales (*formae specialis*). Este término está basado en la

infección que produce el patógeno en un hospedante específico. Las formas especiales a su vez se subdividen en razas, las cuales se basan en la habilidad del patógeno de infectar diferentes haplotipos o variedades en una especie hospedante (Pires da Silva *et al.*, 2014).

Dentro de las enfermedades causadas por patógenos destacan las producidas por el género *Fusarium*, el cual se encuentra naturalmente en el suelo y en ocasiones puede estar asociado a las pudriciones de raíz y tallos de muchas plantas (Hernández *et al.*, 2007). Un gran número de especies han sido descritas dentro del género *Fusarium* por diversos autores, sin embargo 70 especies son consideradas por Leslie y Summerell (2006) y Montiel-González *et al.* (2005) consideran al género *Fusarium* como el más complejo de los que atacan las raíces de las plantas cultivadas, y uno de los más difíciles de clasificar.

Los daños se presentan con mayor severidad cuando las plantas son sometidas a un período de estrés en las etapas de floración y fructificación. La magnitud del daño ocasionada por esta enfermedad en Sinaloa es muy variada, donde se reporta que el rendimiento del tomate cultivado en los lotes infestados, ha disminuido hasta en un 50% debido al ataque de la enfermedad, tanto en campo abierto como en invernadero (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003; García y Valenzuela, 2009). Los síntomas inicialmente se presentan con una clorosis foliar en un sector de la planta y a medida que la enfermedad progresa, el amarillamiento se observa de forma gradual en la mayor parte del follaje, ocasionando la marchitez y posteriormente la muerte de la planta, sin producir fruta o en ocasiones es escasa. El tejido vascular en la base del tallo presenta coloración castaño oscuro, extendiéndose hasta el extremo apical del tallo. El color pardo en la parte interna del tallo es característico de la enfermedad, por lo que es utilizado para su identificación, mientras que la médula permanece libre de la infección. La infección del fruto aparece de forma ocasional mediante coloración café oscuro en el tejido vascular (Jones y Jiménez, 2001).

Problema

Fusarium spp dificulta el buen desarrollo de plantaciones de tomates en la finca "El Carrizal" México, unido a que no se tiene evidencia de caracterizaciones de las especies presentes en esta finca.

Hipótesis científica

La obtención de aislamientos de *Fusarium* spp. que afectan las plantaciones de tomate en la finca "El Carrizal", México, permitirá realizar la caracterización de las especies presentes en el cultivo y por consiguiente el mejor manejo de dicho fitopatógeno.

Objetivo general

Caracterizar aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de las plantaciones de tomate en la finca "El Carrizal" México.

Objetivos específicos

Describir morfológica y culturalmente los aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de plantas de tomate en la finca "El Carrizal" México.

Comprobar la patogenicidad de los aislamientos obtenidos en las plantas de tomate en la finca "El Carrizal" México.

I- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Generalidades del cultivo del tomate

El cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), se encuentra dentro de la familia *Solanaceae*, es originaria de las regiones del sur de Colombia y norte de Chile. Durante el siglo XVI se introdujo por primera vez en Europa, sin embargo, a principios del siglo XIX, se comenzó a cultivar comercialmente, y allí fue donde inició su industrialización y la diferenciación de las variedades para mesa e industria (Infoagro, 2018). Esta es la especie de mayor importancia, pues incluye una amplia diversidad de cultivares, que difieren en color, forma, sabor, tamaño y picor (Eshbaugh, 2012). Estos productos son fuente importante de vitaminas y antioxidantes, los cuales se destacan por sus propiedades anticarcinogénicas (Lin y Saltveit, 2012).

Esta hortaliza a nivel mundial es cultivada aproximadamente en 5 millones de ha, con una producción de 170.08 millones de toneladas de tomate fresco en el año 2014. Actualmente, Asia domina el mercado de tomate, con prácticamente un 60% de la producción mundial, seguido por América, Europa, África y por último Oceanía, con apenas un 0.15% de la producción mundial (FIRA, 2017).

1.1.1. Importancia y distribución mundial del tomate

La importancia del tomate radica en su valor nutricional y su gran prestigio en la alimentación (Vera *et al.*, 2011). En la Actualidad se reconoce su valor debido a su contenido de vitamina C (Mateos *et al.*, 2013). Además posee propiedades terapéuticas como analgésico, anti-inflamatorio y antioxidante (González *et al.*, 2015). Incluso su alto contenido de vitaminas y minerales es apetecido dentro del arte culinario, lo que favorece que esté presente en recetas de cocina a nivel del mundo (Bortolotti, 2013). Su popularidad crece cada día, siendo esta una de las especies vegetales más consumidas en todos los países (Bosland, 2010).

Según FAOSTAT (2016), China ocupó el primer lugar en el mundo con una producción de tomate de 46.2 % del total. Es importante mencionar que México ocupa el décimo lugar a nivel mundial en producción del tomate siendo esta una de las principales hortalizas producidas a nivel nacional (FAOSTAT, 2018).

Según el INEC (2016), en el Ecuador se sembraron 1,353 hectáreas de tomate, las cuales están ubicadas en el régimen de la sierra como: Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo, por lo tanto son cultivadas bajo invernadero. De tal manera, se estima que se perdieron en ese año 27 hectáreas (el 2.7% del total); 8 ha por ataque de plagas y 19 ha por ataque de enfermedades. Además se pierde el 2.5 % de la producción por mal manejo de poscosecha y comercialización.

1.1.2. Principales plagas y enfermedades del tomate

El cultivo de tomate durante su ciclo vegetativo es atacado por distintos agentes causales de plagas, entre los principales se destacan: nematodos, hongos, bacterias, virus, insectos y ácaros; todos ellos son causantes de la baja productividad y calidad del fruto. Sin embargo, la incidencia de enfermedades es un problema muy grande en el desarrollo de este cultivo, gran parte de los hongos fitopatógenos ocasionan pérdidas entre 10 y 100 % de la producción, además la mayor parte de hongos fitopatógenos varían en dependencia de su región, variedades sembradas y condiciones ambientales (Sanogo y Ji, 2012).

Sin embargo, Alvarado *et al.* (2017), plantea que existe una gran diversidad de plagas comunes que afectan al cultivo de tomate, por lo tanto, estas se presentan a temperaturas superiores a 25°C, tales como:

- Ácaros (*Tetranychus urticae*): el daño se observa por un punteado en los bordes de la hoja y toma un color café hasta secarse.
- Barrenador (*Agrotis ipsilon*): la larva se alimenta de los tejidos internos de la planta, debilitándola y volviéndola de color amarillo. En la última etapa, el tallo se parte por efecto del peso del fruto.
- Minador de la hoja (*Tuta absoluta*): ataca a la planta en la noche. Penetrando por la hoja y se alimenta del parénquima provocando cavidades.
- Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*): insecto se encuentra en el envés de la hoja provocando un debilitamiento de la planta.
- Trips (*Frankliniella occidentalis*): es el encargado de transmitir el virus del bronceado y el virus del mosaico del tomate.

Por otra parte, las enfermedades más comunes que afectan al cultivo de tomate pueden ser causadas por hongos, bacterias y virus. De tal manera, que debe existir una temperatura superior a 25°C y una humedad relativa mayor a un 80 %, entre otros factores. Entre las enfermedades más importantes causadas por hongos según Velasco *et al.* (2011), se encuentran:

- Tizón tardío (*Phytophthora infestans*): esta enfermedad se propaga en climas fríos y húmedos, causando la pérdida total del cultivo, lesiones de forma irregular, hundidas y de color verdoso, y ataca a todas las partes de la planta.
- Tizón temprano (*Alternaria solani*): esta enfermedad, es propicia en humedades relativas superiores al 70%. La presencia de los síntomas en las hojas son manchas circulares de color café y negro, en el fruto causan lesiones hundidas y oscuras y debilitan el tallo.
- Moho gris (*Botrytis cinerea*): se presenta cuando existe una humedad relativa superior al 90%, ocasionando daños a las flores, frutos y el tallo causando manchas de color gris.
- *Damping off* o ahogamiento del tallo (*Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* spp.): ataca a las semillas y a las plántulas emergentes, se presenta por condiciones de alta humedad y mal drenaje del sustrato, causando problemas de germinación y mortalidad de plántulas en los semilleros.

1.2. Los hongos fitopatógenos

Por lo general las plantas se encuentran rodeadas por una gran variedad de microorganismos, extremadamente versátiles, de nutrición heterótrofa y ocupan la mayor parte de los ecosistemas terrestres, algunos son capaces de inducir en ellas enfermedades de diversos tipos (Fisher *et al.*, 2012). Tal como lo menciona Agrios (2005), los hongos fitopatógenos causan pérdidas elevadas a nivel mundial tanto económicas como agrícolas. Según, datos relevantes de la FAO, la agricultura mundial, tiene una pérdida anual del 12% de su producción por daños causados por hongos fitopatógenos, más que por cualquier otro agente.

Existen más 100.000 especies de hongos y solo un 8 % son capaces de colonizar los tejidos vegetales causando así una enfermedad en la planta. El estilo de vida de estos hongos fitopatógenos es muy diverso lo que les ha permitido desarrollar estrategias diferentes para interactuar con sus huéspedes (Agrios, 2005). Por lo tanto, se establecen tres grupos de hongos fitopatógenos:

- Saprófitos oportunistas o facultativos: tienen capacidad hasta que encuentran un huésped apropiado.
- Parásitos oportunistas o facultativos: se aprovechan de los recursos nutricionales de la planta.
- Parásitos obligados: adoptan una forma de resistencia para sobrevivir cuando no tienen un huésped sobre el que desarrollarse.

Cabe señalar, que los hongos fitopatógenos se han clasificado tradicionalmente en función de su estilo de vida, de igual manera, se establecen tres grupos, según Horbach *et al.* (2011):

Patógenos biotrofos: colonizan las células vivas de su huésped y toman los nutrientes que necesitan para vivir, el cual le ayuda a completar parcialmente su ciclo de vida, causando daños relativamente diminutos en la pared celular vegetal.

Patógenos necrotrofos: infectan de manera especializada, provocando una muerte celular de los tejidos de su hospedador secretando toxinas y enzimas degradadoras de pared celular. Posteriormente se alimentan de forma saprofítica de esta materia orgánica muerta. *Alternaria spp.*, *Botrytis spp.* y *Verticillium spp.*; son algunos ejemplos de hongos necrotrofos.

Patógenos hemibiotrofos: presentan una primera fase de vida biotrófica durante la cual el hongo penetra dentro del huésped y se establece en el tejido colonizado, en la siguiente fase de su vida necrotrofica utiliza los nutrientes de las células del huésped ya muertas, se incluyen en este grupo hongos como *Fusarium oxysporum*, y *Colletotrichum spp.*

1.3. Revisión histórica de *Fusarium* sp.

En el año de 1809, Link describió por primera vez el género *Fusarium*, el cual lo define como una forma de canoa o banana, el cual era su carácter primario distintivo. Puesto que, esta descripción se basó en las observaciones de *F. rosuem*, primera especie descrita, y debido a su falta de información, se podría aplicar al menos 50 géneros de *Hyphomycetes* (Marasas *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1994). Es por ello que la definición original ha sufrido una serie de modificaciones quedando como; especies con macroconidos fusoides, ligeramente curvados, septados y con una célula basal pedicelada. Con microconidios y clamidosporas terminales o intercalares, que pueden estar ausentes o presentes (Nelson *et al.*, 1994).

Por lo tanto, se han realizado investigaciones que aún existen desacuerdos en la sistemática de *Fusarium*, que exhibe un grado notable de variación con respecto a características morfológicas, culturales y fisiológicas. Esta variación puede explicar, la capacidad de la especie de colonizar lugares ecológicos diversos en la mayoría de las áreas geográficas del mundo. De tal manera, la variación ha conducido a dificultades considerables en el desarrollo de un sistema taxonómico estable y extremadamente aceptado por el género (Summerell *et al.*, 2003; Leslie y Summerell, 2006).

Por lo general, se han descrito más de 1.000 especies, variedades y formas, mencionadas en base a observaciones superficiales (Toussoun *et al.*, 1975). La exigencia de buscar un sistema correcto y fiable de clasificación, se produjo cuando especies del género *Fusarium* causaron serias enfermedades en muchas plantas. A partir de 1913 - 1935 se estudiaron este género, y se redujo el número de especies, variedades y formas de *Fusarium* a 142, agrupados en 16 secciones (Nelson *et al.*, 1994).

La taxonomía de *Fusarium* se ha convertido en referencia estándar en este tema. El trabajo consistió en organizar aproximadamente 1.000 especies del género *Fusarium* en 16 secciones: *Eupionnotes*, *Macroconia*, *Spicarioides*, *Submicrocera*, *Pseudomicrocera*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans*, *Martiella*, y *Ventricosum*. Estas secciones contenían 65 especies, 55 variedades, y 22 formas. Pero en estas se encuentran 77 sinónimos para *Fusarium*

avenaceum (Fr.) Sacc. y 133 sinónimos para *Fusarium lateritium* Nees y su teleomorfo (Nelson *et al.*, 1994).

1.4. Características del género *Fusarium*

El género *Fusarium*, ha variado de 9 a más 1000. Los miembros de este género son extensos y se pueden encontrar como patógenos, endófitos y saprófitos en plantas y suelo de todo el mundo. Su amplia extensión de las especies de *Fusarium* puede atribuirse a la capacidad de estos hongos para crecer en una amplia gama de sustratos y a sus eficientes mecanismos de dispersión (Summerell y Leslie, 2011).

Sin embargo, se pueden producir en tres fases de esporas asexuales denominadas macroconidios, microconidios y clamidosporas. Algunos géneros o especies producen los tres tipos de esporas, mientras que otras especies no, por tanto, estas estructuras son fundamentales para la caracterización de las especies. Cabe señalar, que los patógenos correspondientes al género *Fusarium*, liberan una serie de metabolitos secundarios, o micotoxinas, que son tóxicos para la salud humana y los animales. Sin duda esta especie, causa una escala de enfermedades que afectan a la agricultura y horticultura a nivel mundial. Varias de estas enfermedades, como la marchitez en las plantas, han tenido grandes impactos económicos y sociológicos casi devastadores en los agricultores y las comunidades que dependen de estos cultivos para su subsistencia (Summerell y Leslie, 2011).

Clasificación para *Fusarium sp.* Según Leslie & Summerell, 2006.

Reino: Fungi

Phylum: *Ascomycota*

Clase: *Deuteromycete*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Hypocreaceae*

Género: *Fusarium*

Especies: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *Fusarium oxysporum*.

1.5. Las fusariosis del tomate

El tomate es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial, por lo tanto, es atacada por distintas enfermedades, tales como la marchitez vascular, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Cabe señalar, que dicho patógeno, habita en el suelo, y es difícil de contrarrestar. Además, una vez que el suelo se infesta puede permanecer con el patógeno por tiempo indefinido (Vásquez y Castaño, 2017).

Sin embargo, esta enfermedad continúa apareciendo como consecuencia del cultivo intensivo de tomate y otras especies vegetales, causando pérdidas entre 21 y 47% en campos a libre exposición y bajo cubierta (Ramyabharathi *et al.*, 2012). De tal manera, que la forma de infección de este patógeno penetra por las raíces tanto activa como por aberturas naturales (Enespa y Dwivedi, 2014). Por lo tanto, la producción de clamidosporas, microconidios y macroconidios; se relaciona con la diseminación de la aérea, lo que sugiere una fase policíclica, no común en patógenos habitantes del suelo (Katan *et al.*, 1997). Las clamidosporas le permiten al hongo que sobreviva por un largo tiempo, estas se producen a partir de la modificación de hifas o células conidiales. Además, está relacionada con factores de estrés, como la ausencia del hospedante, agotamiento de nutrientes y ambientes adversos (Smith, 2007).

Sin embargo, las clamidosporas germinan en condiciones favorables, lo cual permite la presencia de exudados radicales; además se ha demostrado que resisten temperaturas altas y sobreviven más tiempo en el suelo que los conidios (Mc Govern, 2015). La forma especial (f. sp.) *lycopersici* infecta solo a plantas de tomate susceptibles (Inami *et al.*, 2014); no obstante, Fassihiani (2000) comprobó que esta forma especial es capaz de colonizar las raíces de plantas pertenecientes a otros géneros, como *Oryzopsis*, *Digitaria*, *Amaranthus* y *Malva*; además de plantas de zanahoria (*Daucus carota*), trigo (*Triticum*), berenjena (*Solanum melongena*), ají (*Capsicum annuum*).

De tal manera, que el uso de variedades resistentes reduce la incidencia de la enfermedad; por lo tanto, la presencia de nuevas razas del hongo y de nuevos biotipos dentro de las razas, supera su resistencia, lo que conlleva a la búsqueda de nuevas estrategias (Horinouchi *et al.*, 2011).

En 1940, se exhibió un cultivar resistente a la enfermedad y además este presentaba un gen I, que confería resistencia a la raza 1 del *FOL*. Seguidamente, apareció una segunda raza (raza 2) el cual interactúa en cultivares resistentes a la raza 1. Por lo tanto, esta raza fue controlada por los hallazgos y posterior incorporación, de un nuevo gen dominante para la resistencia, el gen I-2. En 1981, en Brasil se identificó una nueva raza, a la que se denominó raza 3. Se asume que la interacción entre *FOL* y el tomate sigue la teoría de Flor, gen por gen (Flor, 1956), dado que se han descrito resistencias monogénicas dominantes para las tres razas.

Por lo tanto, se han descrito tres razas del hongo 1, 2 y 3 o 0, 1 y 2, las cuales, se han identificado en los loci: I-1, I-2 e I-3, otorgando resistencia al patógeno, a través de genes dominantes (Scott *et al.*, 2004; Panthee y Chen, 2010). Según Inami *et al.* (2012), la raza 2 de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* surgió de la raza 1, por la pérdida del gen *avr1*, por inserción de un trasposón, mientras que la raza 3 emergió cuando un punto de mutación ocurrió en el gen *avr2*. Diferentes razas del hongo portan en varias combinaciones tres genes de avirulencia, a saber: *avr1*, *avr2* y *avr3*, que activan respuestas de defensa contra el hongo, al ser reconocidos por los correspondientes genes de resistencia en tomate.

1.6. Identificación y características de cepas patógenas del género *Fusarium* spp.

En la actualidad existen numerosas enfermedades vegetativas lo cual representa la disminución de los rendimientos en los cultivos; de tal manera, que se mencionan los hongos más importantes del suelo, como son: *Fusarium sp.*, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Macrophomina phaseolina*, sin embargo, por los daños que producen, y la frecuencia con que se presentan, *Fusarium sp.* (Duarte *et al.*, 2016).

Los síntomas que causa el género *Fusarium* pueden llegar a confundirse con otros agentes fitopatógenos o bacterianos. Además, dicho hongo puede llegar afectar en distintas etapas del desarrollo de la planta y en distintas zonas de ella, incluso en la emergencia de la plántula, interfiriendo en el cuello de la planta. De tal manera, que se desarrolla, el problema más común como la marchitez vascular (Agrios, 1996).

Sin embargo, la caracterización de *Fusarium* sp. se realiza con la finalidad de obtener la base de caracteres cualitativos y cuantitativos, expresados por los aislamientos los cuales son examinados, para muestrear su patogenicidad, produciendo la mayor parte de los síntomas típicos de fusariosis, como son; necrosis en la raíz y marchitez en la parte aérea de la planta joven. Estos síntomas en la raíz comienzan con una decoloración externa del tejido que se torna café-rojizo, al igual que en el tejido vascular (Duarte *et al.*, 2016).

La mayor parte de las especies de *Fusarium* presentan distintas características en medios de cultivo sintéticos, como pueden ser; colonias blancas, cremas, naranjas, pardo, pardorojizo, rojo carmín, rosa, púrpura e incluso azuladas. Esta pigmentación puede estar dada por la coloración del micelio o por la difusión de algún pigmento en el medio de cultivo en el cual se desarrolla el hongo (Arvayo *et al.*, 2011).

De forma general, dichas investigaciones sobre *Fusarium* spp. tiene una gran importancia para la identificación de especies, así como para la determinación de presencia de biotipos del patógeno. Estos resultados tienen importancia para el programa de selección de cultivares y para la evaluación de estos, así como para el manejo de la enfermedad (Duarte *et al.*, 2016).

1.6.1. Caracterización morfológica de *Fusarium* sp.

F. oxysporum se forma por un micelio de textura algodonosa, de tal manera, que varía de color, desde blanco a rosa pálido hasta un púrpura intenso, según el aislado o especie. Cabe señalar, que las condiciones ambientales, pueden afectar en el crecimiento, así como la forma, tamaño y abundancia de esporas y número de septos de sus hifas (Agrios, 1996). Los microconidios, poseen de una o dos células, incluso logran producirse con mayor frecuencia y en cualquier circunstancia y presentan formas ovaladas y cilíndricas. Los macroconidios son menos abundantes, de aspecto fusiforme, septadas, constituidas por 2 a 5 células, puntiagudas e inclinadas hacia los extremos. Las clamidosporas se forman por la tabicación y engrosamiento de una parte de una hifa. Presentan una forma esférica y con pared engrosada y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo dependiendo de las condiciones ambientales (Nelson *et al.*, 1994; Agrios, 1996).

Sin embargo, los medios de cultivo son utilizados con el intención de poder identificar, algunos de ellos pueden ser: Agar Extracto de Malta (MEA), en el cual se pueden valorar aspectos morfológicos tanto macro y microscópicos; además, de conseguirse una buena esporulación. con Agar Papa Dextrosa (PDA) se valora muy bien el aspecto morfológico y coloración de la colonia; su alto contenido en carbohidratos ejerce un mayor crecimiento en la esporulación, que suele retrasarse y los conidios pueden ser atípicos. El medio Agar Harina de Avena (OA) se utiliza para valorar la velocidad de crecimiento, color, aspecto de la colonia y características microscópicas. Agua agar (WA) es un medio recomendado para la germinación inicial de conidios de cultivos de *Fusarium spp.*, y el Suelo Agar (SA), se usa para la formación de clamidosporas, por lo general es utilizado para la identificación de algunas especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

Algunas especies de *Fusarium* producen las tres formas de esporas (macroconidios, microconidios y clamidosporas), mientras que otras no. Por lo tanto, el macroconidio es el órgano primario para la caracterización, su forma y tamaño varía según la especie Este se puede formar en una estructura especializada llamada esporodoquio, como también en monofiálides, polifiálides y en el micelio aéreo. Para algunas especies es una característica relativamente constante y estable, pero se debe utilizar cuidadosamente como criterio taxonómico. La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica de *Fusarium*, pero varios géneros de *Coelomycetes* también la tienen (Leslie y Summerell, 2006).

El microconidio es el carácter principal en la taxonomía del género *Fusarium*, su presencia está formada por el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides, por lo tanto, se pueden observar en masa o en cadenas. Según Samson *et al.* (2004), se pueden observar de mejor manera en un medio saturado de agar-clavel.

Por otra parte, las clamidosporas en *Fusarium*, están presentes en grupos, pares, cadenas, incluso pueden estar solas. La pared puede ser gruesa, rugosa o lisa; por lo tanto, es una spora resistente a condiciones ambientales adversas y que garantiza la propagación y supervivencia del hongo (Samson *et al.*, 2004; Leslie y Summerell, 2006).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento y caracterización de especies de *Fusarium*

Para la realización del presente trabajo se realizaron dos estancias de trabajo una se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México (CIBNOR) durante el periodo de Febrero – Junio del 2019 donde se realizaron los muestras y pruebas de laboratorios y parte de la escritura del documento y otra estancia en la Universidad de Granma, Granma, Cuba (UDG) durante el periodo de Octubre – Noviembre del 2019 donde se procesaron y escribieron los resultados y se completó la escritura del documento

Aislamiento

Se realizó un muestreo de campo siguiendo la metodología descrita por Leslie *et al.* (2006), se colectaron 14 plantas de tomate variedad saladette las cuales estaban infectadas fúngicamente, y presentaban los principales síntomas de afectación de *Fusarium spp.*, como marchitez, amarillamiento y reducción de crecimiento. Las cuales se colocaron en bolsas de plástico estériles, se depositaron en un contenedor térmico y se transportaron al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

El patógeno fúngico se aisló de los tejidos infectados empleando métodos de aislamiento estándar (Sidharthan *et al.*, 2018). Los tejidos infectados de raíces se cortaron en trozos pequeños y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% durante 30 s. Luego se lavaron en tres cambios de agua destilada estéril y se secaron entre dos capas de papeles secantes. Los trozos se sembraron en medio de Agar de Papa dextrosa (PDA, OXOID) con antibióticos cloranfenicol, estreptomina y ampicilina (0,1g.L⁻¹) en placas de Petri estériles y se incubaron a 28 ± 2°C, se observó diariamente, hasta la aparición de estructuras fúngicas. Se realizaron observaciones al microscopio óptico Zeiss (200x) para confirmar su identidad con el género *Fusarium*.

Obtención de cultivos puros

De las muestras donde se corroboró la presencia de *Fusarium* se tomaron fragmentos de micelio se sembraron en placas Petri ($\varnothing=90$ mm) con medio PDA (esterilizado a 121°C por 15 min y pH 6) con antibióticos cloranfenicol, estreptomicina y ampicilina ($0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad constante. Los aislados se purificaron mediante siembras sucesivas empleando el mismo medio y las mismas condiciones, hasta la obtención de cultivos puros que, posteriormente, se transfirieron a tubos de ensayos con medio PDA en forma de cuña y se conservaron a 4°C para los posteriores análisis.

Caracterización cultural y morfológica de los aislamientos de *Fusarium*

A partir de los cultivos puros de cada aislamiento, se tomó una asada de esporas y se preparó una suspensión en un tubo de ensayo con nueve ml de agua destilada estéril y se homogeneizaron en agitador Vortex por 30 s, luego se tomó una alícuota ($100\ \mu\text{l}$) y se depositó en el centro de una placa Petri con medio PDA y se dispersó con una espátula de Drigalsky, para la obtención de cultivos monospóricos (Sidharthan *et al.*, 2018). Las placas se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad constante, durante 24 h. Se hicieron tres réplicas por aislamiento. A las 24 horas se seleccionaron colonias monospóricas de cada aislamiento, y con ayuda de una aguja de siembra flameada se transfirió el fragmento de agar, donde se encontraba un conidio germinado a una placa Petri con medio de cultivo PDA (Biocen) más antibióticos (cloranfenicol, estreptomicina y ampicilina ($0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)). Las placas se sellaron con parafilm e incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante siete días.

Cultural

De los aislamientos monospóricos de *Fusarium* spp., se tomó un disco ($\varnothing= 5$ mm) de micelio, proveniente de la periferia de la colonia monospórica y se inoculó en el centro de placas Petri con PDA. Se prepararon tres réplicas de cada aislamiento y se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad constante, durante 7 días. La coloración de la colonia en el anverso y reverso se determinó por observación visual y se documentó mediante fotografías tomadas con una cámara digital Sony y se describió la textura de las colonias, forma de los bordes y presencia de anillos.

Se midió el crecimiento lineal (diámetro promedio de la colonia sobre la base del crecimiento horizontal en una dirección, expresado en milímetros por día, este diámetro se midió por la parte más esférica de la colonia), con una regla graduada. A partir del crecimiento lineal, se calculó el índice de crecimiento micelial diario hasta llegar al quinto día de incubación, empleando la fórmula siguiente:

$$\text{ICM} = \text{DC}_{(2)} - \text{DC}_{(1)}$$

Donde:

DC₍₂₎: Diámetro de la colonia del día que se evalúa

DC₍₁₎: Diámetro de la colonia del día anterior

Los datos del diámetro y del índice de crecimiento micelial de los aislados se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) y las medias se compararon según la Dócima de Rangos Múltiples de tukey para $p \leq 0,05$, empleando el paquete estadístico INFOSTAT Profesional ver. 2.1. (Di Rienzo *et al.*, 2016)

El conteo de esporas se realizó al quinto día de crecimiento de las colonias de cada aislamiento en el medio de cultivo PDA. A las placas con los cultivos desarrollados se les adicionaron 15 ml de agua destilada estéril y se homogeneizaron con una espátula de Drigalsky. Las esporas se colectaron en un tubo de ensayo por réplica. Las suspensiones se homogeneizaron en agitador Vortex por 30 s y se depositaron gotas de estas (de cada aislamiento por separado), en una cámara de Neubauer para determinar la concentración de conidios. Se compararon los resultados según la cantidad de conidios por área de la colonia, y la esporulación se clasificó como escasa, moderada o abundante

Morfológica

Para determinar las características morfológicas del hongo se visualizaron utilizando un microscopio de luz LMI BM con aumento (40x), teniendo en cuenta las características de las esporas (clamidosporas, micro y macroconidios), en cuanto a forma, tamaño, color (Sidharthan *et al.*, 2018).

2.2. Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad de los aislados fúngicos se realizó en una cámara de crecimiento Convairon, mediante la inoculación de las raíces, se empleó la metodología propuesta por Cruz *et al.* (2018) con modificaciones. El inóculo fúngico se preparó bajo condiciones asépticas, a partir de cultivos de los aislamientos monospóricos de 7 días a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A cada placa de Petri, se añadieron 2 ml de agua destilada estéril y se ajustó la concentración a 1×10^6 esporas. ml^{-1} en una cámara de Neubauer.

Se utilizaron plantas sanas de tomate de 25 días de edad cultivadas en condiciones controladas para la inoculación. Las raíces se lesionaron y se sumergieron en la suspensión de esporas durante 15 minutos, previo al trasplante. Como tratamiento control se utilizó agua destilada estéril. De las plantas afectadas se hicieron aislamientos del agente causal, según se describió anteriormente, y se compararon las características de la colonia (color, forma, textura), así como de las estructuras fúngicas del reaislamiento y se compararon con las del aislado respectivo que se utilizó como inóculo. Se evaluaron los síntomas ocasionados por los aislados en las plantas y se seleccionó el aislamiento más agresivo sobre la base de la cantidad de plantas afectadas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de los aislados de *Fusarium* de plantas de tomate.

Características Culturales

Se confirmó la presencia de ocho aislamientos naturales de *Fusarium* spp a partir de muestras de raíces, provenientes de plantaciones de tomate, mediante el crecimiento de colonias típicas del hongo en medio de cultivo PDA. Se observaron colonias con crecimiento rápido, bordes regulares, de textura algodonosa o flocosa, también presentaron hifas blancas que formaban un denso crecimiento aéreo similar al algodón, pero los pigmentos producidos y liberados al medio eran muy variables, tanto en color como en intensidad. Se observó variabilidad en la coloración desde gris pálido, amarillo claro, blanco-rosáceo y violeta oscuro como se muestra en la Figura 1.

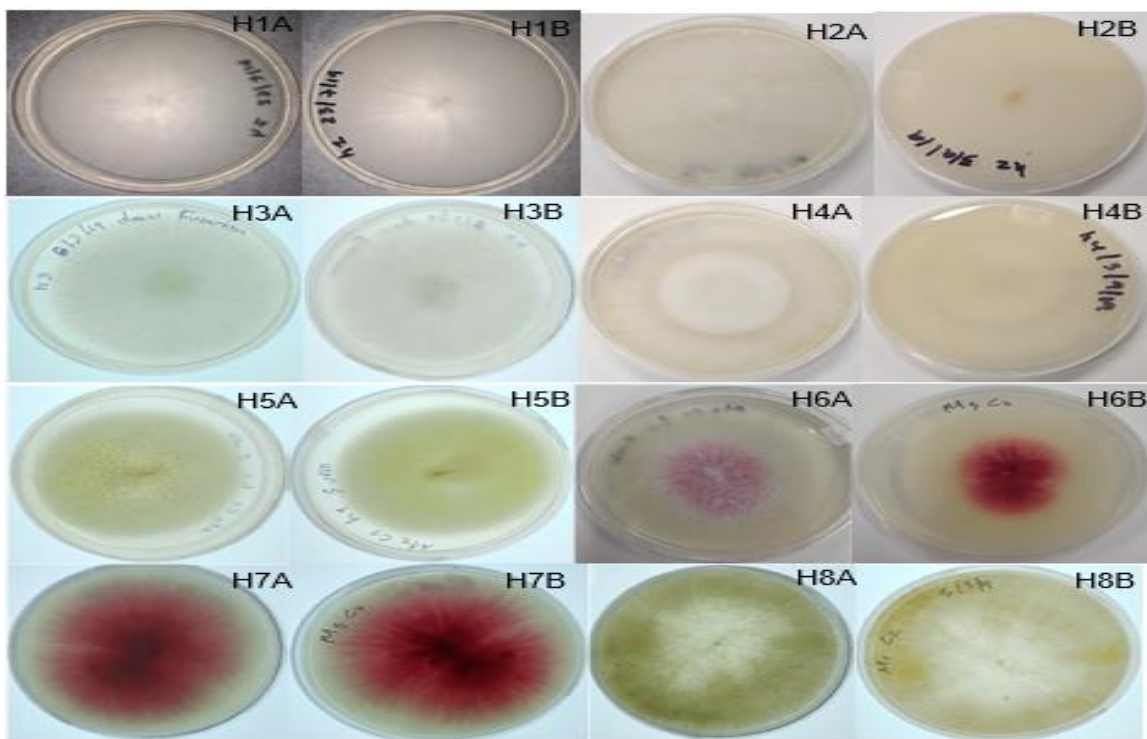


Fig 1. Características culturales de los aislamientos de *Fusarium* spp., procedentes de tomate a los 6 días a 28 °C en medio PDA (Aislamientos: H 1-8; A: anverso, B: reverso)

Esta variabilidad en la pigmentación de los aislamientos obtenidos, es común entre aislamientos de diferentes especies de *Fusarium*, como de la misma especie, lo cual coincide con las descripciones realizadas por Leslie y Sammurell (2006) y se expresa por la coloración del micelio o la difusión de pigmentos en el medio de cultivo.

Estos resultados son similares a los que obtuvieron Villanueva *et al.* (2013) al informar variabilidad entre especies de *Fusarium* que presentaron, colonias blancas, cremas, naranjas, pardo, pardo-rojizo, rojo carmín, rosa, púrpura, e incluso azuladas.

De igual manera Duarte *et al.* (2016) informaron aislamientos de *Fusarium* spp. de garbanzo en medio de cultivo PDA, donde la coloración varió desde violáceo, amarillento, blanquecino, rojo, lila, violeta, salmón, rojo violáceo y rojo vino.

También Chehri *et al.* (2011) reportó resultados similares respecto a la pigmentación en PDA, obteniendo coloración desde marrón, blanco, violeta y rojo.

En la tabla 1 se muestra la descripción de algunas características morfológicas observadas en los aislamientos de *Fusarium* spp. En la misma se aprecia que existe diferencia en la coloración y esporulación entre aislamientos, aunque los 8 aislamientos corresponden a *Fusarium* spp., según las características macroscópicas de los aislamientos, y están acorde a los reportados por Leslie y Sammurell (2006) para dicha especie.

Como podemos ver se observan considerables variaciones con todos los caracteres culturales evaluados en los aislamientos de *Fusarium* spp. Los aislamientos H2, H3, H4, H5 y H8 produjeron un crecimiento algodonoso abundante, con micelio de color blanco, que se extendía en la periferia de la placa. Los aislamientos H-6 y 7 produjeron micelio blanco con pigmentación central rojo vino sobre el sustrato, abundante y un margen de micelio blanco púrpura regular en el borde de la placa, mientras que el aislamiento 1 produjo una capa delgada y liviana con un hilo similar al micelio blanco que se extendía en la periferia, con pigmentación blanca pálida en el sustrato. Los aislamientos H4, H5, H6, H7 y H8

produjeron una esporulación abundante, mientras que los aislamientos H1 y H2 presentaron esporulación escasa y el aislamiento H3 produjo una esporulación moderada.

Tabla 1. Características morfológicas de los aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de raíces de tomate.

H	Color micelio	Esporulación	Tipo de micelio
H1	Color gris, gris pálido inverso	Escasas	Micelio aéreo escaso, es blanco de color crema
H2	Color amarillo, marrón pálido inverso	Escasas	Micelio aéreo abundante, blanco, algodonoso
H3	Color blanco a color crema	Moderadas	Micelio aéreo escaso, blanco, algodonoso y hialino
H4	Café claro con tendencia a blanco	Abundante	Micelio aéreo denso, blanco, algodonoso y hialino
H5	Marrón amarillento claro	Abundante	Micelio aéreo abundante, blanco, algodonoso
H6	Violeta pálido (anverso) rojo vino (reverso)	Abundante	Micelio aéreo blanco rosado, flocoso y abundantes
H7	Rojo vino oscuro	Abundante	Micelio aéreo blanco rosado, flocoso y abundantes
H8	Verdoso (anverso) amarillo pálido (reverso)	Abundante	Micelio aéreo denso, blanco, algodonoso, hialino

Nuestros resultados coinciden con los alcanzados por, Quilambaqui. (2005) quien observó las colonias de *F. oxysporum*, el cual desarrollaron un micelio de color violeta a púrpura. De tal manera, pudo observar colonias identificadas como *F. moniliforme*, desplegándose un micelio aéreo blanco, que a menudo se tornó púrpura. En corroboración a esto, *Fusarium solani*, expandió un micelio blanco que en ocasiones tornaban tonalidades amarillas.

De acuerdo con Leslie y Summerell (2006), *F. oxysporum* produce pigmentos que varían en color desde blanco, violeta pálido, púrpura-oscuro hasta rosa-magenta.

Por otra parte, Arvayo *et al.* (2011), al informar variaciones en la coloración de las colonias de *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA, desde blanquecino, parduzco-blanco, rosáceo-blanco y púrpura-parduzco.

Además, Lezcano *et al.* (2012) determinaron que *Fusarium oxysporum*, presentó un micelio aéreo abundante y algodonoso, de color blanquecino, con tonalidades rosa violáceo y púrpura, a en el anverso de la placa, y azul grisáceo-verdoso en el reverso de esta.

Otros autores como, Villanueva *et al.* (2013) verificaron sobre la presencia de algunas especies de *Fusarium* que pueden presentar, en medios de cultivo sintético, colonias blancas, cremas, naranjas, pardo, pardorojizo, rojo carmín, rosa, púrpura e incluso azuladas.

Por otra parte, Camacho *et al.* (2014) determinaron el aislamiento de *F. tricinctum*, estas cepas produjeron una pigmentación roja en el anverso y reverso de la colonia en medio PDA. Además, *F. incarnatum* y *F. equiseti* están estrechamente relacionadas con la producción de manchas marrón en el anverso de la colonia en PDA.

Del mismo modo, Macías *et al.* (2015) diferenciaron que *F. oxysporum* posee un micelio blanco, algodonoso con una ligera pigmentación rosada. Sin embargo *F. verticilloides* presentó un micelio blanco y algodonoso, que a diferencia de *F. oxysporum* mantuvo una coloración rosa-salmón más intensa.

De igual manera, Robles *et al.* (2016) obtuvieron seis aislados, de los cuales los de mayor frecuencia fueron de dos tipos: *Fusarium oxysporum*, mostró crecimiento micelial blanco-amarillento, y *Fusarium solani*, obtuvo un crecimiento micelial inicialmente blanco, pero con el paso del tiempo se tornó de color rojo-violáceo.

Por otra parte, Castro *et al.* (2018) mostraron que las colonias de *F. oxysporum*, presentan tipos de micelio lanoso y húmedo (47,5 %) y en algunos casos afelpado (23,8 %). Sin embargo, los colores del anverso fue variable, aunque prevalecieron los colores: púrpura blanquecino (52,5 %) y rosa blanquecino (42,5 %) y por el reverso la pigmentación de las colonias fue violeta blanquecino (40 %) y rosa magenta (20 %) equitativamente.

En este mismo sentido, Retana *et al.* (2018) observaron el crecimiento de colonias algodonosa y de color blanquecino-rosado en los primeros estados de desarrollo de *Fusarium oxysporum f. sp. apii*. Posteriormente, conforme el micelio se tornó de un color levemente púrpura.

En este mismo sentido Leyva *et al.* (2018) observaron que *Fusarium oxysporum*, muestra un color crema con ligera pigmentación violeta y con crecimiento algodonoso.

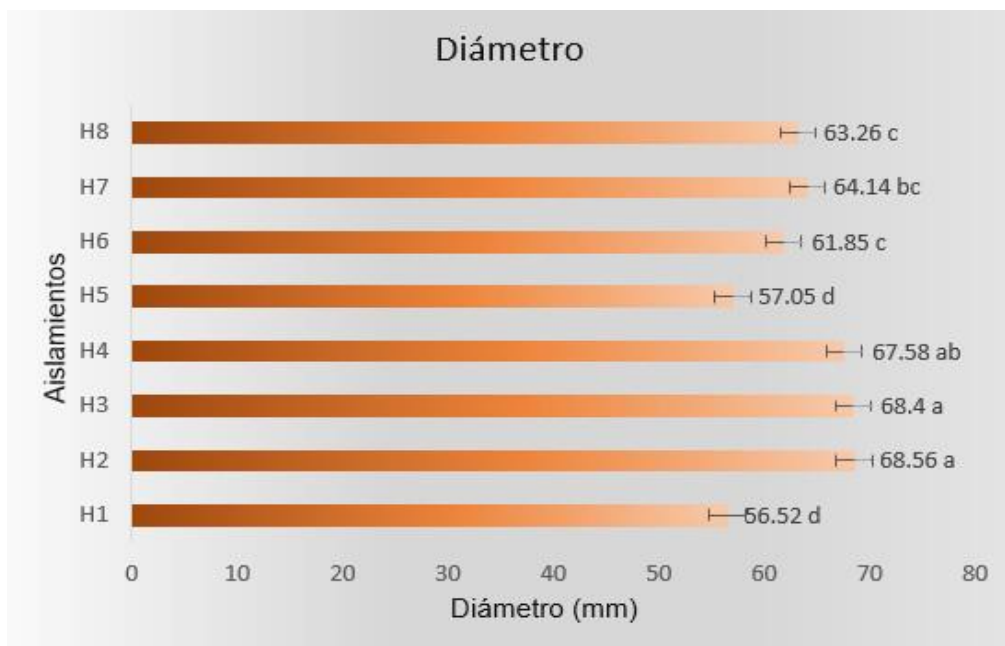
Teniendo en cuenta todo lo antes planteado coincidimos con, Duarte *et al.* (2016) quienes determinaron que *Fusarium sp* posee una gran variabilidad, cuyas coloraciones variaron desde violáceo a ligeramente amarillenta, de blanquecino a rojo ladrillo, a lila, a violeta, a rosa salmón; además, tomaron coloraciones rojo violáceo y rojo vino.

Al realizar el análisis de la información aportada en la evaluación del crecimiento nos percatamos que no todos los hongos tuvieron la misma velocidad de crecimiento y no lograron crecer hasta cubrir completamente el fondo de la placa Petri, destacándose con mayor velocidad de crecimiento los aislamientos H2, H3 y H4 con valores superiores a los 12.50 mm por día, sin presentar diferencia significativas entre ellos y si con el resto, seguido por H7, H8 y H6 con valores alrededor de los 11,65 mm por día y los aislamientos H1 y H5 con menor crecimiento tal como se muestra en la fig 2. En el caso del diámetro se comportó de igual manera lo que se muestra en la fig 3.



Medias con letras iguales no difieren significativamente ($p \leq 0.05$). Error: 0.06

Fig 2. Evaluación del índice de crecimiento micelial de las colonias de *Fusarium* spp. obtenidas de raíces de tomate.



Medias con letras iguales no difieren significativamente ($p \leq 0.05$). Error 1.65

Fig 3. Evaluación del diámetro de las colonias de *Fusarium* spp. obtenidas de raíces de tomate.

Estos resultados pudieron estar dado por el tiempo a que se evaluó el aislamiento que fue al 5 día lo cual el mismo no ha alcanzado su mayor crecimiento teniendo en cuenta que el medio que se empleó (PDA) presenta combinación de la infusión de papa con la glucosa que proporciona la fuente de energía perfecta para que exista un crecimiento satisfactorio del hongo. Por otra parte la temperatura a la que se incubo el hongo es la óptima para la multiplicación del hongo es del orden de 28°C, temperatura que fue empleada en dicha investigación, en lo referente al pH podemos decir que se ajustó en correspondencia con lo establecido para el mismo ya que los hongos dentro de su condición fisiológica manejan pH ácidos en un rango de 5 a 6,5, sin embargo, es importante resaltar la capacidad de *Fusarium* para crecer a pH ácidos y alcalinos, condición que favorece la colonización dentro de las células del hospedero.

Igualmente, Walker *et al.* (2016) determinaron en el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, que su crecimiento fue más lento en relación a la otra especie (aproximadamente 1,12 cm a cada 24 h). Sin embargo, en relación al índice de velocidad del crecimiento micelial (IVCM), observaron que *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides*, obtuvieron un crecimiento máximo de 0,84 cm y 0,77 cm. Los resultados obtenidos por, Dueñas *et al.* (2007) determinaron que los aislamientos de *Fusarium sp.*, procedentes de garbanzo son de rápido crecimiento, entre 0,30-0,54 mm.h⁻¹ en medio PDA. Además, Lezcano *et al.*, (2012) analizaron el aislamiento de *F. oxysporum* procedente de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit cv. Perú, el cual mostró una velocidad de crecimiento de 0,38 mm.h⁻¹ en este mismo medio.

De igual modo en una investigación realizada por, Lezcano *et al.* (2012) en cuanto a la caracterización cultural de los aislamientos de *Fusarium oxysporum*, reportaron colonias de crecimiento rápido con 64 mm como promedio al séptimo día de incubación, cuando se cultivaron en PDS a 25°C.

Con respecto a esto Duarte *et al.* (2016) evaluaron la velocidad de crecimiento de *Fusarium sp.*, en distintos medios de cultivos PDA y CzD; destacándose que el medio CzD, pudo incrementar la velocidad de crecimiento en un promedio de 0,63

mm.h-1. Sin embargo los resultados alcanzados en el medio PDA no limitan o interfieren óptimo el desarrollo de *Fusarium sp.*

De igual manera los resultados obtenidos por, Walker *et al.* (2016) observaron que *Fusarium acuminatum*, presentó un crecimiento de la colonia cerca de 1,60 cm a cada 24 h, disminuyendo la velocidad a partir de las 96 h.

De manera semejante, Castro *et al.* (2018), evaluaron los aislados de *Fusarium oxysporum*, el cual alcanzaron un menor crecimiento micelial diario, al final del período de evaluación. Sin embargo estos mantuvieron una velocidad promedio de los aislados de 6,59 mm por día. Además, determinaron el diámetro de crecimiento de *F. oxysporum*, con un promedio de 79,08 a los 12 días.

A partir del análisis realizado y teniendo en cuenta los conocimientos adquiridos durante este proceso nos atrevemos a decir que *Fusarium spp* es un hongo que presenta la posibilidad de desarrollarse en medio PDA y lograr un desarrollo adecuado.

Características Morfológicas

En los aislamientos obtenidos se confirmó la presencia de estructuras microscópicas típicas de *Fusarium spp.* Se observaron macroconidios curvos o semicurvos con 3-5 septos con célula apical estrecha, papilada o de tipo romo, microconidios predominantemente reniformes y fusiformes, de cero hasta 1 septo, mayormente a partir de monofiálides. En algunos aislamientos se confirmó la producción de clamidosporas pareadas (Fig 4).

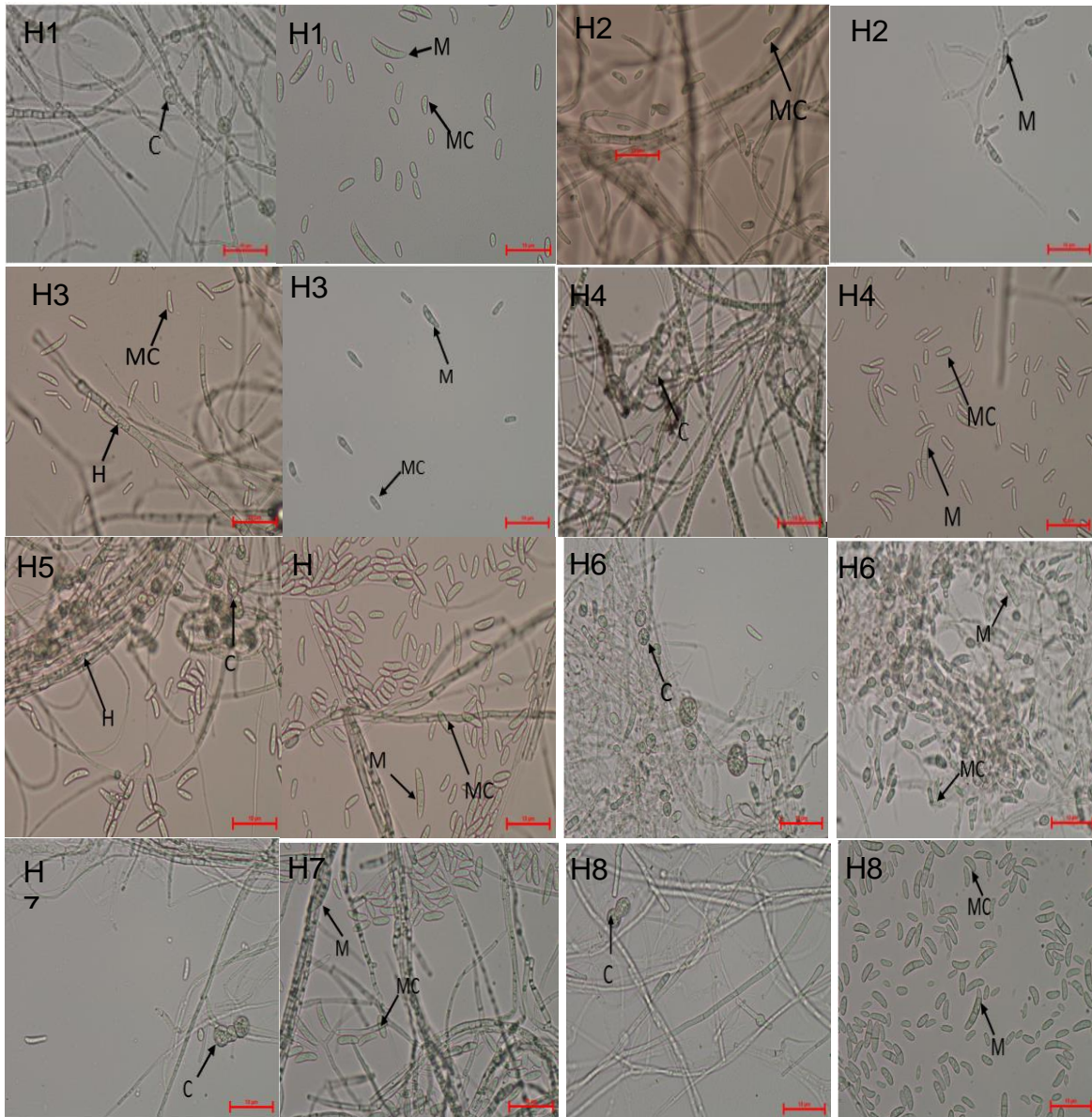


Fig 4. Características morfológicas de los aislamientos de *Fusarium* spp., procedentes de tomate (Aislamientos: 1-8, H: Hifas, M: macroconidios, MC: microconidios, C: clamidiosporas)

Estas estructuras, se consideran características primarias en la identificación de especies de *Fusarium*, unido a los caracteres secundarios como la presencia o ausencia de esporodoquios y la morfología y pigmentación de la colonia (Leslie y Summerell, 2006).

En investigaciones realizadas por diferentes autores como, Quilambaqui. (2005) se verificó que *F. oxysporum* desarrollaba macroconidios, clamidiosporas esféricas

y microconidios producidos en fiálides cortas y ramificadas. Sin embargo, determinó que *F. moniliforme* presenta microconidios en cadenas en fiálides simples y ausencia de clamidosporas. Además, diversos grupos de aislamientos presentaron macroconidios en fiálides alargadas y clamidosporas simples y en pares correspondiendo a *Fusarium solani*.

En la tabla 2 se muestran las características morfológicas de la estructura de macroconidios, respecto a la forma, número de septo, tipo de célula apical y célula basal, en la misma se aprecia que existe diferencias en estas estructuras en los 8 aislamientos obtenidos de las plantas infestadas lo que nos indica que se aisló *Fusarium* pero que no está presente una sola especie. Predominando la forma semicurvos, seguido por la curvatura dorsiventral, con células apical en forma de romo y la basal en forma de pie y apenas con muescas.

Tabla 2. Características morfológicas de los macroconidios de especies de *Fusarium* aisladas de tomate

Aislamiento	MACROCONIDIO			
	Forma	Septo	Célula apical	Célula basal
H1	semicurvos	3	romo	forma de pie
H2	rectos, delgados	3-4	romo	apenas con muescas
H3	semicurvos	3	romo	forma de pie
H4	curvatura dorsiventral	4-5	estrechamiento	forma de pie
H5	semicurvos	3	romo	apenas con muescas
H6	curvatura dorsiventral	3-5	papilado	forma de pie
H7	curvatura dorsiventral	3-5	papilado	forma de pie
H8	semicurvos	3	romo	apenas con muescas

Estos resultados son similares a los obtenidos por Garcia *et al.* (2018) pero en el cultivo de melón, el cual estudio estructuras similares a las obtenidas en esta investigación para la identificación de especies de *Fusarium* spp. Singha *et al.* (2016) también en cultivo de tomate en la India, utilizó para la identificación de especies de *Fusarium* spp. estructuras similares a las analizadas en esta investigación, como conidios y clamidosporas.

También Chehri *et al.* (2011) para la identificación de especies de *Fusarium* spp. en plántulas de pepino utilizó estructuras como macroconidios, microconidios, evaluando, número de septos, forma, morfología de la célula apical y basal, para poder realizar una caracterización morfológica, encontrando variabilidad de estas estructuras entre los aislamientos obtenidos

En la tabla 3 se muestran las características morfológicas de la estructura de microconidios, respecto a la forma, número de septo, tipo de célula conidiógena y la presencia o ausencia de clamidospora, estructuras básicas para la identificación de especies de *Fusarium*, en la misma que en los macroconidios aquí se aprecia que existe diferencias en estas estructuras en los 8 aislamientos obtenidos aunque en menor variabilidad. Pues la mayoría se encontraron con forma reniforme, con célula conidiógena con monofiálides y con presencia de clamidosporas pareadas de paredes lisas.

Varios trabajos como los reportados por (Reddy & Chaudhary, 1985; Gupta *et al.*, 1986; Gaur & Sharma, 1989; Rajendra & Patil, 1992) han informado sobre la variabilidad entre los aislados de *Fusarium* spp. con respecto a sus características culturales y morfológicas. De igual manera Santha Lakshmi *et al.* (2008) notaron la variabilidad en las características de las colonias, como el crecimiento micelial, la pigmentación, la esporulación, la producción de macro y micro conidios, los resultados obtenidos en nuestra investigación corroboran dichos resultados.

Tabla 3. Características morfológicas de los microconidios y clamidosporas de especies de *Fusarium* aisladas de tomate

Aislamientos	MICROCONIDIO			Clamidospora
	Forma	Septo	Célula conidiógena	
H1	reniforme	0	Polifiálides cortas	pareadas, de paredes lisas
H2	reniforme	0-1	Monofiálides cortas	---
H3	reniforme	0	Monofiálides	---
H4	reniforme	0	Monofiálides	pareadas, de paredes lisas
H5	reniforme	0-1	Monofiálides	verrugosas simples
H6	reniforme y fusiforme	0	Monofiálides cortas	pareadas, de paredes lisas
H7	reniforme y fusiforme	0	Monofiálides	pareadas, de paredes lisas
H8	reniforme	0-1	Monofiálides	pareadas, de paredes lisas

Estudios realizados por, Macías *et al.* (2015) observaron la presencia de monofiálides con microconidias en cadena. En este sentido, en nuestra investigación no se observaron la presencia de dichas estructuras.

Por su parte, Robles *et al.* (2016) observaron que *Fusarium oxysporum*, presenta macroconidios falcados, hialinos, con pared delgada, de 3-5 septos, de 19-43 x 3.1-5.4 μm y con célula basal en forma de pie. Al igual que los microconidios poseen unas formas elípticas y unicelulares, por lo tanto las clamidosporas se apreciaron en pares, intercalares y terminales.

De igual manera establecieron que *Fusarium solani*, muestra macroconidios hialinos, fusiformes, robustos, con 5-6 septos, con la célula apical levemente encorvada y puntiaguda. Además, los microconidios fueron ovales y reniformes, hialinos, con 1-2 septos. Por lo tanto las clamidosporas se formaron rápidamente, ovales, intercalares entre las hifas.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Sivakumar, Balabaskar, & Sanjeevkumar, (2018) los cuales utilizaron para la identificación de especies de *Fusarium* spp. en el cultivo de tomate variables como macroconidios, microconidios, pigmentación de la colonia, esporulación, reportando variación de acuerdo a estas características entre los aislamientos obtenidos.

No obstante, Castro *et al.* (2018) observaron que *F. oxysporum*, desplegabamicroconidios hialinos con diámetro (11,84 a 5,96 μm de largo x 3,06 a 1,5 μm de ancho) de forma globosa, oval y elíptica, usualmente no septados. Por otra parte, los aislados de macroconidios presentaron una longitud corta a media (21,44 a 28,3 μm de largo x 2,86 a 3,34 μm de ancho) en forma de bote, ligeramente curvados a casi rectos que se van estrechando sucesivamente hacia ambos extremos. Además, determinaron abundantes clamidosporas (entre 8,00 y 9,50 μm de diámetro) en cultivos de 2-3 semanas en el medio CLA, las cuales usualmente aparecieron solas o en parejas.

Sin embargo, Retana *et al.* (2018) Determinaron la producción de macroconidios que presentaron su forma típica de *Fusarium*, aunque con algunas diferencias entre ellos, puesto que unos son un poco más cortos y otros menos curvos. Seguidamente en el caso de los microconidios observaron comúnmente la forma oval, la mayoría sin septos y que se forman sobre monofiálides cortas.

Por otra parte, Leyva *et al.* (2018) informaron que *Fusarium oxysporum*, presenta microconidios hialinos, de forma oval a elipsoidal, de 5.1-9.8 x 2.3-2.9 μm . Los macroconidios fueron hialinos, de 20.2-30.2 x 2.5-4.7 μm , de forma alargada y curvada, con la célula apical ligeramente aguda, la célula basal con forma de pie y presentando de 3 a 5 septos. Se observaron clamidosporas individuales y en par, distribuidas de manera terminal e intercalar en las hifas.

3.2 Comprobación de los postulados de Koch

El patógeno fúngico se reaisló de los tejidos infectados a partir de los síntomas procedentes de las inoculaciones realizadas (Figura 3). De los cuales, se

obtuvieron aislamientos con características culturales y morfológicas similares a las de los agentes inoculados.

De los aislamientos, el más agresivo fue el H8 y los resultados obtenidos de la microscopía electrónica de barrido de las estructuras como microconidios, macroconidios y clamidosporas como se muestra en la figura 5. Presenta similitud a las encontradas en el aislamiento primario.

Observándose delgados macroconidios con una longitud de 18-25 μm , con células semicurvas de 3 septos, los microconidios presentaron un septo y tuvieron una longitud de 5-8 μm . En la misma figura también se muestra que las estructuras como microconidios y macroconidios se encontraban en los sistemas vasculares. Lo que demuestra el cumplimiento de los postulados de Koch.

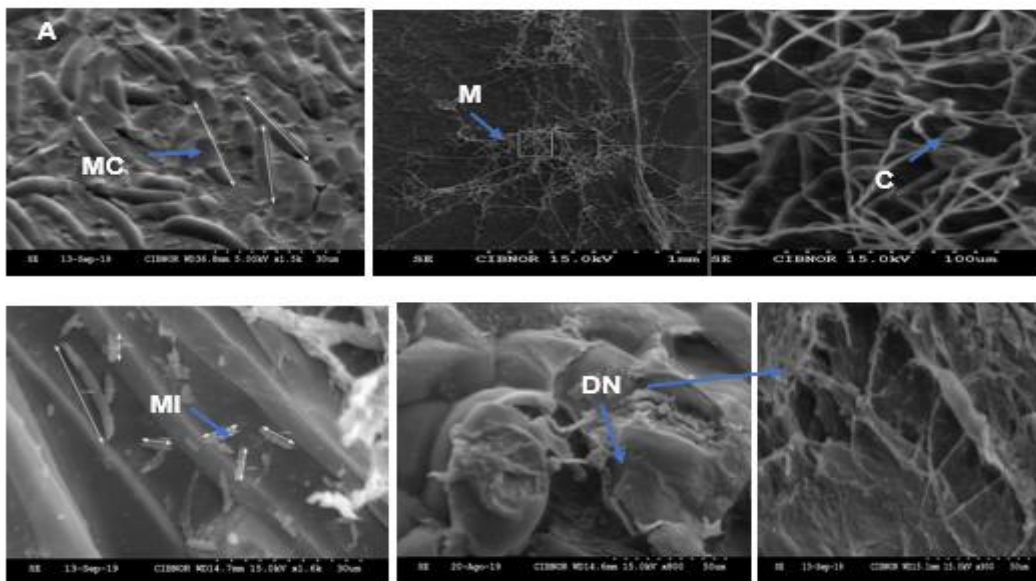


Fig 5. Características microscópicas de la cepa H8 de *Fusarium* spp., macroconidio [MC], microconidio [MI], micelio [M], clamidosporas [C], DN: daños en el tejido vegetal.

Dado que las especies de *Fusarium* pueden persistir en el suelo o en los restos del cultivo después de la cosecha, durante mucho tiempo sin huéspedes, dificulta su manejo y control (Leslie *et al.*, 1990 ; Bateman *et al.*, 2007). Además de tener en cuenta que la virulencia de *Fusarium* spp., va a depender de la susceptibilidad

particular del hospedante que va a determinar el establecimiento de la infección en la planta. También es importante recordar que *Fusarium* spp. posee varios atributos celulares y moleculares, que en conjunto pueden conferir grados diferentes de virulencia, inherente en estos organismos. La combinación de estos factores de virulencia y la susceptibilidad del hospedero, contribuyen al desarrollo invasivo de *Fusarium* spp. en la planta (Nelson *et al.*, 1994). Además de las características intrínsecas del hongo, las condiciones medioambientales, pueden favorecer el desarrollo y adaptación del hongo (Backhouse, 2014).

CONCLUSIONES.

Los aislamientos de *Fusarium* spp obtenidos de plantas de tomate en la finca "El Carrizal" México presentaron gran variabilidad, en cuanto a coloración, textura velocidad de crecimiento y forma de las estructuras morfológicas.

Los aislamientos de *Fusarium* spp obtenidos al realizar la reinfeksi3n mostraron los mismos s3ntomas presentados en las plantas de tomate en la finca "El Carrizal" México, adem3s de la similitud de las caracter3sticas culturales y morfol3gicas determinadas inicialmente.

RECOMENDACIONES.

Continuar con el estudio hasta la caracterización molecular lo cual conjuntamente con las características culturales y morfológicas nos permitiría clasificar los aislamientos a nivel de especie.

BIBLIOGRAFÍA.

- Agrios, G. 1996. Fitopatología. México. Limusa. 2 ed. 838p.
- Agrios, G. 2005. Plant pathology. Academic Press. 819p.
- Alvarado, F.;Sook, Y.; Sang, C.; Dong, S. 2017. A Robust deep-learning-based detector for real-time tomato plant diseases and pests recognition. Journal Sensors. 1(1): 1-21.
- Aoki, T.; O'Donnell, K.; Geiser, D.M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. J. Gen. Plant Pathol. 80:189-201.
- Arvayo, R.;Esqueda, M.;Acedo, E.; Sanchez, A.; Gutierrez, A. 2011. Morphological variability and races of *Fusarium oxysporum*f.sp.ciceris associated with Chickpea (*Cicer arietinum*) crops. Am J Agri&Biol Sci. 6 (1):114-121.
- Bateman, G. L., Gutteridge, R. J., Gherbawy, Y., Thomsett, M. A., & Nicholson, P. (2007). Infection of stem bases and grains of winter wheat by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and effects of tillage method and maize-stalk residues. Plant Pathology, 56(4), 604-615
- Bortolotti, M. 2013. Red pepper: from the kitchen to the pharmacy. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases. 22: 253-256.
- Bosland, P. 2010. An American in Spain. In: Prohens J., Rodríguez-Burruezo A. (eds). Advances in genetics and breeding of Capsicum and eggplant. Valencia, Spain. pp 21-29.
- Camacho, M., Valenzuela, C., Hernández, R. 2014. *Fusarium spp.* associated with carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in Baja California, Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 8(1): 1409-1415.
- Carrillo-Fasio,J.; Montoya-Rodríguez, A.; García-Estrada, T.; Cruz Ortega, R.; Márquez, J.; Zequera, I.; Sañudo-Barajas A.J. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen, en tomate en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 123-127.

- Castro, W., Carrera, K., Lidcay, F., Cupull, R. 2018. Identification of isolates of *Fusarium spp.* associated with *Solanum quitoense* Lam in Pastaza, Ecuador. *Revista Centro Agrícola*, 45(4):5-11
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K. R. N., & Abbasi, S. 2011. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.01.007>
- Daugovish, O.; Smith, R.; Cahn, M.; Koike, S.; Smith, H.; Aguiar, J.; Quiros, C.; Cantwell, M.; Takele, E. 2008. Celery production in California. The Regents Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. Publication 7220:4 p.
- Dean, R.; Van-Kan, J.A.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Di-Pietro, A.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414-430.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión (2016). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Duarte, Y.; Echevarría, A.; Martínez, B. 2016. Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium spp.* Presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 31(3):173-183.
- Dueñas, G., Shagarodsky, T., Fresneda, J., Hernández, F., González, J. 2007. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias Ciudad Habana y la Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 11(32):63-66.
- Enespa, J.; Dwivedi, S. 2014. Effectiveness of some Antagonistic fungi and botanicals against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infecting brinjal and tomato plants. *Asian J. Plant Path.* 8(1):18-25.
- Eshbaugh, W.H. 2012. The taxonomy of the genus *Capsicum*. In: Russo, V. (ed.), *Peppers: botany, production and uses*. pp. 14-28. CABI, Wallingford.
- FAOSTAT. 2016. FAO Statistical Databases. Disponible en: <http://apps.fao.org>
Fecha de consulta: [Consultado 16-01-19].

- FAOSTAT. 2018. Anuario estadístico de la FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Fecha de consulta: [Consultado 20-01-19].
- Fassihiani, A. 2000. Symptomless carriers of the causal agent of tomato wilt pathogen. *J. Agric. Sci. Tech.* 2:27-32.
- FIRA. 2017. Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y evaluación económica y sectorial. Disponible en: <https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=65310>. Fecha de consulta: [Consultado 16-12-18].
- Fisher, M.; Henk, D.; Briggs, C.; Brownstein, J.; Madoff, L.; McCraw, S.; Gurr, S. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature.* 484:186–194.
- Flor, H. 1956. The complementary genic system in flax and flax rust. *Adv In Gen.* 8:29-54.
- García, E.R.; Valenzuela, U.G. 2009. Marchitez del Tomate y Pudrición de la Corona y raíz. En: Manual de Producción de Tomate en Invernadero. Celaya, Guanajuato, México. Ed. Intagri. 458p.
- García, T. R., Montiel, L. G. H., Amador, B. M., Garibay, A. N., Contreras, R. G. C., & Enriquez, G. R. 2018. Identification and characterization of *Fusarium spp.* from muskmelon in northwest Mexico. *Biotecnia*, 20(3), 71-75.
- Gaur, V. K., & Sharma, L. C. 1989. Variability in single spore isolates of *Fusarium udum* Butler. *Mycopathologia*. <https://doi.org/10.1007/BF00437585>.
- Gómez-López, E.D. 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Gómez-López, E.D.; Mesa N.C.; Hernández, C.A.; Mena, Y.M.; Imbachi, K.; Salazar, J.A.; Benítez, S.; López, R.; Estrada, E.I.; Reina, R.; Henao, E.D.; Sánchez, O.E.; García, Y.; Huertas, C.A.; Rodríguez, I.; Cobo, G.M.; Velasco, M.L.; Vásquez, D.; Sánchez, E.Y.; Ramos, P.; Peteche, Y.; Piza, Y.; Rodríguez, S.; Barinas, E.P.; Álvarez, L.; Vega, C.; Marulanda, H.; Londoño, L.A.; Sánchez, O.; Gamboa, P.E; Romero, R. 2014. Programa de manejo fitosanitario en el

maracuyá en el Departamento del Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia, COL.

- González, A.; Sierra, E.; Pérez, R.; Vázquez, C.; Gallegos, A.; López, J.; García, J. 2015. Measurement of capsaicinoids in chiltepin hot pepper: a comparison study between spectrophotometric method and high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chemistry*. 1-10.
- Gupta CP, Dubey RC, Kang SC, Maheswari DK. 1986. Antibiosis – mediated nectotrophic effect of pseudomonas GRL2 against two fungal plant pathogens. *Current Science*, 81:91-94.
- Hernández, D.S.; Reyes, L.A.; García, O.G.J.; Mayek, P.N.; Reyes, M.C.A. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos de maíz (*Zea mays* L.) Almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:127-133.
- Horbach, R., Navarro, A., Knogge, W., Deising, H. 2011. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *J. Plant Physiol*. 168, 51–62.
- Horinouchi, H.; Watanabe, H.; Taguchi, Y.; Muslim, A.; Hyakumachi, M. 2011. Biological control of Fusarium wilt of tomato with *Fusarium equiseti* GF191 in both rock wool and soil systems. *Biocontrol*. 56(6):915-923.
- Inami, K.; Kashiwa, T.; Kawabe, M.; Onokubo, A.; Ishikawa, N.; Pérez, E.; Madadi, K. 2014. The tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* shares common ancestors with nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from wild tomatoes in the Peruvian Andes. *Microbes and Environments*. 29(2):200-210.
- Inami, K.; Yoshioka-akiyama, C.; Morita, Y.; Yamasaki, M.; Teraoka, T. 2012. A Genetic mechanism for emergence of races in *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici*: inactivation of avirulence gene AVR1 by transposon insertion. *PLoS One* 7(8):11-24.
- INEC. 2016. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Obtenido de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac%202013/PRESENTACIONESPAC2013.pdf. Fecha de consulta: [Consultado 25-12-18].

- InfoAgro. 2018. El cultivo del Pimiento. Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.htm>. Fecha de consulta: [Consultado 23-12-18].
- Jones, J.B.; Jiménez, G.M. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Mundi-Prensa Libros. Madrid, España. 74p.
- Katan, T.; Shlevin, E.; Katan, J. 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology*. 87:712-719.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A., Nelson, P. E., & Toussoun, T. A. (1990). *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Ecological studies*, 44(63), 66.
- Leslie, J.; Summerell, B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing. 369 p.
- Leyva, S., Gutiérrez, J., Camacho, M., Aguilar, L., García, E., Tovar, J. 2018. *Fusarium oxysporum*, agente causal de la marchitez de estevia en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(1): 245-250.
- Lezcano, J., Martínez, B., Alonso, O. 2012. Cultural and morphological characterization and identification of ten *Fusarium* isolates from stored *Leucaena leucocephala* cv. Peru sedes. *Revista de Pastos y Forrajes*, 35(2): 187-196.
- Lin, W.; Saltveit, M. 2012. Greenhouse production. En: Russo, V. (ed.) *Peppers: botany, production and uses*, pp. 57-71. CABI, Wallingford.
- Macías, S., Cuevas, A., Fernández, A., Huitrón, M., Cortés, J., Delgado, F. 2015. Aislamiento e identificación de *Fusarium* sp. a partir de planta de melón injertada en el municipio de Colima, Col. *Academia Journals*, 1(1): 857-862.
- Mateos, R.; Jiménez, A.; Román, P.; Romojaró, F.; Bacarizo, S.; Leterrier, M. 2013. Antioxidant Systems from Pepper (*Capsicum annum* L.): Involvement in the Response to Temperature Changes in Ripe Fruits. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 9556-9580.
- Mc Govern, R. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*. 73:78-92.

- Michielse, C.; Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology. 10(3):311-324.
- Montiel-González, L.; González-Flores, F.; Sánchez-García, B.M.; Guzmán-Rivera, S.; Gámez-Vázquez, F.P.; Acosta-Gallegos, J.A.; Rodríguez-Guerra, R.; Simpson, W.J.; Cabral-Enciso, M.; Mendoza-Elos, M. 2005. Especies de *Fusarium* (Link) presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudriciones, en cinco estados del centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología. 23: 1-10.
- Nelson, P.; Dignani, M.; Anaissie, E. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clin. Microbiol. Rev. 7(4):479-504.
- Panthee, D.; Chen, F. 2010. Genomics of fungal disease resistance in tomato. Curr. Genomics. 11:3039.
- Parry, D.W.; Jenkinson, P.; McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. Plant Pathol. 44:207-238.
- Perniola, O.S.; Staltari, S.; Chorzempa, S.E.; Astiz-Gassó, M.M.; Molina, M.d.C. 2014. Control biológico de *Fusarium graminearum*: utilización de *Trichoderma* spp. y biofumigación con parte aérea de *Brassica juncea*. Rev. Fac. Cienc. Agrar. Univ. Nac. Cuyo. 46(2):45-56.
- Pires da Silva, F.; Vechiato, M.; Harakava, R. 2014. EF-1 α gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. Tropical Plant Pathology. 39(1):064-073.
- Quilambaqui, M. 2005. Aislamiento e Identificación de Especies de *Fusarium spp* Asociadas al Declinamiento del Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Cinco Municipios de Guanajuato, México. Revista Tecnológica ESPOL, 18(1):135-140.
- Rajendra, M., Patil, P. 1992. Morphological, cultural and physiological variation in *Fusarium udum* Butlar. Journal of Maharashtra Agricultural Universities (India).
- Ramyabharathi, S.; Meena, B.; Raguchander, T. 2012 Induction of chitinase and β -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through h liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. Journal of Today's Biological Sciences: Research & Review. India. 1(1):50-60.
- Reddy PP, Chaudhary B. 1985. Studies on the morphological characters of

- Fusarium udum*. isolates. Ann. Rev. Phytopathol, 23:57-60.
- Retana, K., Ramírez, J., Castro, O., Blanco, M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía Costarricense, 42(1): 115-126.
- Robles, L., Leyva, S., Cruz, A., Camacho, M., Nieto, D., Tovar, J. 2016. *Fusarium oxysporum* Schlttdl. and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. cause wilting of *Pinus* spp. seedlings in the nursery. Revista Mexicana de Ciencias Forestales, 7 (36): 25-36.
- Robles, L., Leyva, S., Cruz, A., Camacho, M., Nieto, D., Tovar, J. 2016. *Fusarium oxysporum* Schlttdl. and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. cause wilting of *Pinus* spp. seedlings in the nursery. Revista Mexicana de Ciencias Forestales, 7 (36): 25-36.
- Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J. 2004. Introduction to food borne fungi, 7th edition. Centraalbureauvoor Schimmel cultures, Utrecht.
- Sanogo, S.; Ji, P. 2012. Integrated management of *Phytophthora capsici* on solanaceous and cucurbitaceous crops: current status, gaps in knowledge and research needs. Canadian Journal of Plant Pathology. 34(4):479-492.
- Scott, J.; Agrama, H.; Jones, J. 2004. RFLP based analysis of recombination among resistance genes to *Fusarium* wilt races 1, 2, and 3 in tomato. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 129 (3):394-400.
- Sivakumar, T., Balabaskar, P., & Sanjeevkumar, K. 2018. Variability in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causing wilt of tomato. ~ 3655 ~ *International Journal of Chemical Studies*, 6(2), 3655–3659
- Smith, S. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. Plant Pathol. Bull. 16:97-120.
- Summerell, B.; Leslie, J. 2011. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? Fungal Diversity. 50(1): 135-144.
- Summerell, B.; Salleh, B.; Leslie, J. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Dis. 87:117-128.

- Toussoun, T.; Nelson, P. 1975. Variation and speciation in the fusaria. Annu. Rev. Phytopathol. 13: 71-82.
- Vásquez, L.; Castaño, J. 2017. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 20(2):363-374.
- Velasco; Nieto; Navarro. 2011. Cultivo del tomate en hidroponía e invernadero. México: BBA.
- Vera, A.; Chávez, J.; Carrillo, J.; López, M. 2011. Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) from Oaxaca, México. Chilean Journal of Agricultural Research. 71:578-585.
- Villanueva, R., Aguilar, C., Gómez, Y., Valencia, G., Piña, A., Bautista, S. 2013. Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). Revista Agrociencia, 47(7): 691-705.
- Villanueva, R., Aguilar, C., Gómez, Y., Valencia, G., Piña, A., Bautista, S. 2013. Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). Revista Agrociencia, 47(7): 691-705.
- Walker, C., Gonzatto, C., Mendes, P., Brião, M., Mezzomo, R., Schultz, C. 2016. Morphological, molecular and pathogenicity characterization of *fusarium acuminatum* and *fusarium verticillioides* to *cordia americana* seed. Journals Ciência Florestal, 26(2): 463-473.