



Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama

Characterization of *Fusarium* spp. associated with the basal rot of the green onion

Claudia Salazar González¹; Luz Estela Lagos Mora²; Vanessa Díaz Rodríguez³; Silvana Mora Chaves⁴; Carlos Betancourth García⁵

¹Ing. Agrónoma, M.Sc., Ph.D. Universidad de Nariño, Grupo de Investigación de Sanidad Vegetal. Pasto – Nariño, Colombia; e-mail: claudiasalazarg@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0002-5461-2761>

²Bióloga, M.Sc. Universidad de Nariño, Grupo de Investigación de Sanidad Vegetal. Pasto – Nariño, Colombia; e-mail:luzestelal@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5152-3413-2761>

³Estudiante Ing. Agroforestal. Universidad de Nariño, Grupo de Investigación de Sanidad Vegetal. Pasto – Nariño, Colombia; e-mail: vanessadiazr@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3131-5983>

⁴Estudiante Ing. Agroforestal. Universidad de Nariño, Grupo de Investigación de Sanidad Vegetal. Pasto – Nariño, Colombia; e-mail: silvanita.98@live.com; <https://orcid.org/0000-0003-4057-9478>

⁵Ing. Agrónomo, M.Sc., Ph.D. Universidad de Nariño, Grupo de Investigación de Sanidad Vegetal. Pasto - Nariño, Colombia; e-mail:cbet70@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-6573-4230>

Cómo citar: Salazar González, C.; Lagos Mora, L.E.; Díaz Rodríguez, V.; Mora Chaves, S.; Betancourth García, C. 2020. Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 23(1):e1471. <http://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1471>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de educación superior Acreditada de Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional.

Recibido: Febrero 6 de 2019

Aceptado: Febrero 13 de 2020

Editado por: Ingeborg Zenner de Polonia

RESUMEN

El departamento de Nariño ocupa el cuarto lugar como productor de cebolla de rama, a nivel nacional. En los últimos años, su producción y área de cultivo se han reducido por múltiples limitantes, destacándose, como la más importante, la susceptibilidad al ataque de hongos causantes de pudriciones radicales, los cuales, perjudican el sistema productivo y la rentabilidad. El objetivo del estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente las poblaciones de *Fusarium*, asociados a la enfermedad de pudrición basal de cebolla de rama. Para ello, en los municipios de Pasto, Potosí y Buesaco, se colectaron plantas con síntomas de pudrición basal, acompañada de

necrosis de raíces y ablandamiento de tejido. En el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad de Nariño, se sembraron tejidos en medio PDA y, a continuación, se purificaron los aislamientos para su posterior caracterización morfológica y molecular. El estudio morfológico, se realizó usando claves taxonómicas para el género *Fusarium* y la caracterización molecular con cebadores específicos para el género *Fusarium* y mediante secuenciación. Finalmente, se realizó un análisis filogenético de la variabilidad intraespecífica. Los resultados de la caracterización morfológica y molecular corroboran la presencia de dos especies dentro del género asociadas a esta patología, *F. oxysporum* f. sp. *cepae* y *F. solani*. Los análisis filogenéticos muestran alta variabilidad intraespecífica entre los aislamientos de

F. oxysporum y *F. solani*, formando dos complejos *Fusarium oxysporum* (FOSC) y *Fusarium solani* (FSSC), manifestando que estas especies no parten de un ancestro común.

Palabras clave: cebolla de rama; *Fusarium* spp.; morfología fúngica; espaciador transcribible interno; factor de elongación 1- α ; filogenia.

ABSTRACT

The department of Nariño occupies the fourth place as producer of green onion nationwide. In recent years, its production and cultivation area has been reduced by multiple limitations, highlighting as the most important, the susceptibility to the attack of fungi causing radical problems, which harm the productive system and profitability. This study was carried out in order to morphologically and molecularly characterize *Fusarium* populations associated with green onion basal rot disease. For this, in Pasto, Potosi and Buesaco municipalities, plants were collected with basal rot symptoms, tissue deterioration and root necrosis. In the Plant Health laboratory of the University of Nariño, tissues were planted in PDA medium and subsequently the isolates were purified for further morphological and molecular characterization. The morphological study was carried out using taxonomic keys for the genus *Fusarium* and molecular characterization with specific primers for the genus *Fusarium*, and by sequencing. Finally, a phylogenetic analysis of the intraspecific variability was carried out. Morphological and molecular characterization results corroborate the presence of two species within the genus associated with this pathology, *F. oxysporum* f. sp. *cepae* and *F. solani*. Phylogenetic analyzes show high intraspecific variability between the isolates of *F. oxysporum* and *F. solani*, forming two *Fusarium oxysporum* (FOSC) complexes and *Fusarium solani* (FSSC), evidencing that these species do not start from a common ancestor.

Keywords: Japanese bunching onions; *Fusarium* spp.; fungal morphology; internal transcribed spacers; elongation factor 1- α ; phylogeny.

INTRODUCCIÓN

La producción de cebolla junca o de cebolla de rama *Allium fistulosum* en Colombia, ocupa una de las áreas de mayor siembra dentro de las hortalizas. En el 2017, se estimó en 6.385ha, con una producción de 231.386t/ha. En el ámbito nacional, Nariño ocupa el cuarto lugar en producción de esta hortaliza, representada con 466ha y 2.005 unidades de producción, situándose por encima de otras especies importantes en la región, como tomate de mesa, lechuga, zanahoria, repollo, coliflor y brócoli (Gobernación de Nariño y Corporación Colombia Internacional, 2015).

La pudrición basal de la cebolla de rama ocasionada por *Fusarium* spp. es considerada la enfermedad más limitante en el cultivo. Los síntomas iniciales de plantas afectadas muestran en las hojas coloraciones amarillas, que se van tornando necróticas, especialmente en la punta, hasta alcanzar toda la hoja para, por último, marchitarse. En las raíces, se presentan coloraciones café

oscuras, transparentes, adquiriendo una forma plana y hueca. Al realizar un corte longitudinal en los tallos, se observa una coloración que va de rojiza a café en la capa externa, la cual, se extiende hasta las hojas internas. En el tallo, se produce un micelio blanco que lo cubre por completo; con el tiempo puede llegar a invadir las raíces. En estados avanzados de la enfermedad, las plantas infectadas se arrancan fácilmente, observándose raíces atrofiadas y descompuestas (Kiehr & Delhey, 2005; Sañudo *et al.* 2003).

Las especies de este género afectan una amplia variedad de hospedantes; en plantas de la familia Alliaceae, se han registrado daños en los semilleros, como el mal del talluelo, la pudrición basal del bulbo de la cebolla (*Fusarium oxysporum* f. ssp. *cepae*) y la pudrición basal del ajo (*Fusarium culmorum*). Asimismo, los daños causados por estos hongos en plantas de cebolla pueden alcanzar el 40% de reducción de rendimientos (Schwartz & Mohan, 1995). Stankovic *et al.* (2007), encontraron a *Fusarium proliferatum* causando daños en cebolla y ajo; por su parte, Dugan *et al.* (2003) asocian a *F. oxysporum*, como el principal causante de la pudrición basal en ajo.

F. oxysporum cuenta con el mayor número de hospedantes y genera daños económicos en cultivos; sus síntomas son amarillamientos, marchitamiento vascular, que es seguido por la muerte de la planta. Este patógeno, se caracteriza por producir micelio de colores púrpura a blancos, de crecimiento rápido en medio de PDA o agar clavel, con tres tipos de esporas: microconidios, macroconidios y clamidosporas, encontrándose en condiciones diversas, desde suelos de tipo ártico como desérticos (Nelson *et al.* 1983; Arbeláez, 2000; Leslie & Summerell, 2006).

El reconocimiento de géneros y de especies puede ser muy complejo. Es así, como la identificación basada en la morfología presenta un importante grado de dificultad, sobre todo, para distinguir especies cercanas, con características fenotípicas muy similares. Los métodos moleculares se han convertido en una herramienta eficiente para confirmar la identidad de especies dentro del género, basada, especialmente, en marcadores específicos, que amplifican una región de su genoma (Unda *et al.* 2011). Por lo anterior, el objetivo del estudio fue aislar e identificar molecularmente las especies de *Fusarium*, encontradas en cebolla de rama, afectadas por pudrición basal, en los municipios productores de Nariño, como son Pasto, Potosí y Buesaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El presente trabajo, se realizó en las instalaciones de La Universidad de Nariño (Pasto-Nariño), en los laboratorios de Sanidad vegetal, microbiología y biología celular.

Material vegetal y Suelo. La colección de muestras de cebolla de rama con síntomas, como marchitamiento y pudrición basal, se efectuó en los municipios de Pasto (Buesaquillo, Cujacal y Santa Lucia); Potosi, (Mueses-Florida, Mueses, Lourdes, Guaracal) y Buesaco (Rosal del monte), referenciando geográficamente cada punto de muestreo. Se escogieron tejidos de plantas sintomáticas y asintomáticas, incluyendo raíces, tallos y hojas. Las muestras

se etiquetaron, se envolvieron en papel toalla y aluminio y se depositaron en bolsas plásticas, para su transporte hasta los laboratorios. El material vegetal, se conservó en nevera, a 4°C, hasta su procesamiento. De igual manera, se seleccionaron muestras de suelo de cada sitio, tomando, aproximadamente, 100g de la zona cercana a la raíz.

Aislamiento de hongos

Aislamiento a partir de suelo. Se pesaron 10g de suelo por muestra y se agregaron 90mL de agua destilada estéril, para obtener una solución de 10^{-1} y, a partir de ésta, se obtuvieron soluciones hasta 10^{-4} . De cada solución, se sembró un mililitro en cajas Petri esterilizadas, que contenían medio de cultivo PDA acidificado (Sañudo *et al.* 2003; Llanos & Sánchez, 1982).

Aislamiento a partir de tejido. Fragmentos de tejido de 5mm, previamente desinfectados, se colocaron en el medio de cultivo, para su posterior purificación, siguiendo la metodología citada por Castella *et al.* (1997) y Agrios (2005).

Purificación. En el mismo medio de cultivo, se purificaron colonias de los hongos, procedentes de los diferentes aislamientos; se incubaron a 28°C, de 7 a 10 días, hasta que el crecimiento de cada aislamiento completó la dimensión de la caja Petri. Para la obtención de cultivos monospóricos, se aplicó la metodología descrita por Nelson *et al.* (1983). En los aislamientos que no se observaron estructuras, se sembraron en medio Agar Clavel, de acuerdo con la metodología usada por Nelson *et al.* (1983).

Identificación. Los aislamientos, se identificaron mediante un microscopio Nikon de luz, por características morfológicas y criterios taxonómicos, propios del género *Fusarium* (Barnett, 1960; Nelson *et al.* 1983; Alexopoulos *et al.* 1996; Samson *et al.* 2004; Leslie & Summerell, 2006).

Caracterización molecular

Extracción de ADN. A partir de cultivos monospóricos, se recogió micelio con una espátula metálica estéril, depositándolo en un tubo Eppendorf de 2mL, punzando hasta deshacerlo. Luego, se añadieron 750µL de solución tampón (Tris-HCl 100mM pH 7.2; EDTA 100mM y dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%), se agitó y se mantuvo en frío. En seguida, se agregaron 3µL de una solución de proteinasa K (20mg/mL), se agitó e incubó a 37°C, durante una hora. Posteriormente, se adicionaron 100µL de NaCl 5M. Luego, se agregaron 80µL de solución CTAB/NaCl (CTAB al 10% en NaCl 0,7M), se agitó en homogenizador vortex y se incubó a 65°C, durante 10 min.

Para la purificación del ADN, se adicionaron 700µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó a 12000rpm, durante 10min. El sobrenadante, se transfirió a un nuevo tubo, al que se incorporó un volumen equivalente (entre 600-700µL) de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), el cual, se centrifugó, a 12000rpm, durante 5 min.

El sobrenadante, se transfirió a otro tubo, al que se le añadió entre 500-600µL de isopropanol, para precipitar el ADN; se agitó

suavemente y se centrifugó a 12000rpm, durante 10 min. Se eliminó el isopropanol y se añadieron 500µL de etanol frío al 70%; se agitó y se centrifugó nuevamente durante 5 min. Finalmente, se eliminó el etanol y se secó el precipitado al vacío. El ADN, se suspendió en 50µL de tampón TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8) y se conservó a -20°C.

PCR para amplificar la región ITS1 - ITS4. La región ITS del ADNr fue amplificada con los cebadores universales ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), descritos por White *et al.* (1990); la mezcla para la amplificación, se realizó en un volumen de 25µL, con 5µL de 10X PCR tampón (100mM KCl, 100mM Tris HCl (pH 8.8); 500mM KCl; 3µL de 25mM MgCl₂; 2mM de dNTP; 1µL de ADN, a una concentración de 100ng/µL en total 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Biolabs inc®) y 1µL de 10µM de cada cebador ITS1-ITS4. La amplificación, se realizó en un termociclador programable Labnet®, siguiendo los ciclos de temperatura, así: desnaturalización inicial, a 95°C, por 1 min, seguido de 35 ciclos; desnaturalización, a 95°C, por 30 seg; alineación, a 55°C, por 1min; extensión, de 72°C, por 45 segundos y una elongación final, a 72°C, por 5 min. El producto, se visualizó por electroforesis en gel de agarosa a 1,2%, para obtener fragmentos de 490 pares de bases (pb).

PCR para amplificar la región TEF 1 alfa. Se utilizó el protocolo estándar propuesto por O'Donnell *et al.* (1998), para amplificación del gen Efl 5'-ATGGGTAAGGA (A/G) GACAAGAC-3) y 5'-GA(G/A)GTACCAGT(G/C) ATCATGTT-3'.

La reacción de PCR, se realizó en un volumen final de 25µL, que contenían de 100ng de ADN; la mezcla de los productos de PCR, se hizo en un tubo Eppendorf, al cual, se agregó 12,5µL de Green Master Mix, 0,5µL de cada primer, 1µL de ADN y se completó con agua miliq. El programa de PCR comprendió una desnaturalización inicial a 95°C, por 2 min, seguido de 35 ciclos; desnaturalización, a 95°C, por 30 seg; alineación, a 56°C, por 30 segundos; extensión, de 72°C, por 1 min y una elongación final, de 72°C, por 10 min.

La electroforesis, se realizó con un gel de agarosa al 1,2% con Hydra green ® y TBE al 05X, con un marcador de peso molecular de 100pb (Thermo scientific gene ruler 100pb®); para su visualización, se usó un fotodocumentador (Enduro GDS Labnet, USA), que permitió observar la presencia de fragmentos, entre 600 y 700pb.

Secuenciación. Algunos productos de PCR fueron enviados a secuenciar al instituto de biotecnología de Corea, MACROGEN, para determinar su identidad, a nivel de especie, mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Análisis filogenético. Para el caso del gen TEF, las secuencias fueron alineadas con el programa ClustaW. Los análisis filogenéticos, se realizaron con el coeficiente de similitud de Neighbor joining (NJ) y Máxima parsimonia (MP), con un bootstrap de 1.000 réplicas, usando el programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica

Síntomas asociados a pudrición basal causada por *Fusarium*: Los síntomas observados en campo fueron: plantas de crecimiento bajo;

hojas amarillentas y marchitas, dobladas hacia abajo; tejido de hojas basales con coloración rojiza, que se extiende hacia la parte interna del pseudotallo y raíces necrosadas de color café (Figura 1). Esta sintomatología de la encebolla larga fueron descritas también por otros autores (Conn *et al.* 2012; Ávila *et al.* 1996).



Figura 1. Síntomas de pudrición basal asociados a *Fusarium* en cebolla de rama (*Allium fistulosum*). a. Hojas externas con amarillamiento y dobladas; b. Estado de las plantas con pudrición avanzada; c. y d. Coloración rojiza en tejido basal y raíces con necrosamiento.

Dentro de las características macroscópicas, se observaron colonias con crecimiento rápido y de apariencia algodonosa, con coloraciones blanquecinas y rosadas en los primeros estados de desarrollo; en algunos aislamientos, con el paso de los días, se percibieron colores lilas, violeta oscuro, rosadas, rosado y blancas; en el reverso de la caja de Petri, se advirtieron coloraciones lila y curuba, con crecimiento uniforme en el centro de la caja y un tono más claro hacia el borde.

***Fusarium oxysporum*.** Los aislamientos PO (001,002, 003, 004, 005, 007, 008, 009, 010, 011), PA (012,016, 017, 018, 019) y BU (006, 020), presentan características propias de la especie, como son macroconidias con tres septos, de forma alargada y ligeramente curvadas, el pie basal termina en un punto, las microconidias sin septos y con forma ovalada, partiendo, en algunos casos, de monofálides cortas y se observó alta presencia de clamidosporas (Figura 2). Presentan un rápido crecimiento del micelio aéreo, con coloraciones púrpuras y blancas, con presencia de esporodoquios, forman micelio de color naranja, los colores varían entre claros y oscuros; en algunos aislamientos, se presentaron dos tipos de pigmentación.

***Fusarium solani*.** Los aislamientos PA (013, 014, 015) presentan características, como macroconidias abundantes y redondas, similares a las de *F. oxysporum*, con 3-7 septos, de forma ancha y redonda; la célula apical es redonda y sin definición en el pie basal; las microconidias son abundantes, pueden presentar o no divisiones. Los conidióforos muestran monofálides ramificados o no (Figura

3). La morfología de la colonia en PDA presentó un crecimiento rápido con abundante micelio aéreo; la superficie es cubierta por un micelio denso (pionnotes), que forma coloraciones crema. Algunas cepas pueden mostrar coloración púrpura oscuro.

En los 19 aislamientos de *Fusarium* spp., se observaron colonias con apariencia algodonosa y de color blanquecino y rosado, en los primeros días de crecimiento. Posteriormente, algunos, se tornaron de un color levemente púrpura, en el centro del mismo. Por el reverso de la caja de Petri, se percibió un color morado oscuro hacia el centro y de un tono más claro hacia el borde; colonias de color amarillo y blanco, también fueron observadas. Asimismo, la presencia de estructuras de reproducción y sobrevivencia, propias del género, como: macroconidias, microconidias y clamidosporas, fueron frecuentes en los diferentes aislamientos.

Tal como lo mencionan Leslie & Summerell (2006), se requiere de los criterios biológicos, morfológicos y moleculares, para asignar taxonómicamente la posición de las especies de *Fusarium*, lo que permite tener una caracterización más aproximada de las especies, que pueden estar involucradas en las enfermedades de las plantas.

Caracterización molecular

Análisis filogenético

Análisis de la Región ITS: Los cebadores ITS1-ITS4 amplificaron a 560pb. El uso de los cebadores ITS1 –ITS4 determina que los aislamientos PO001, PO002, PO010 y BU020, corresponden

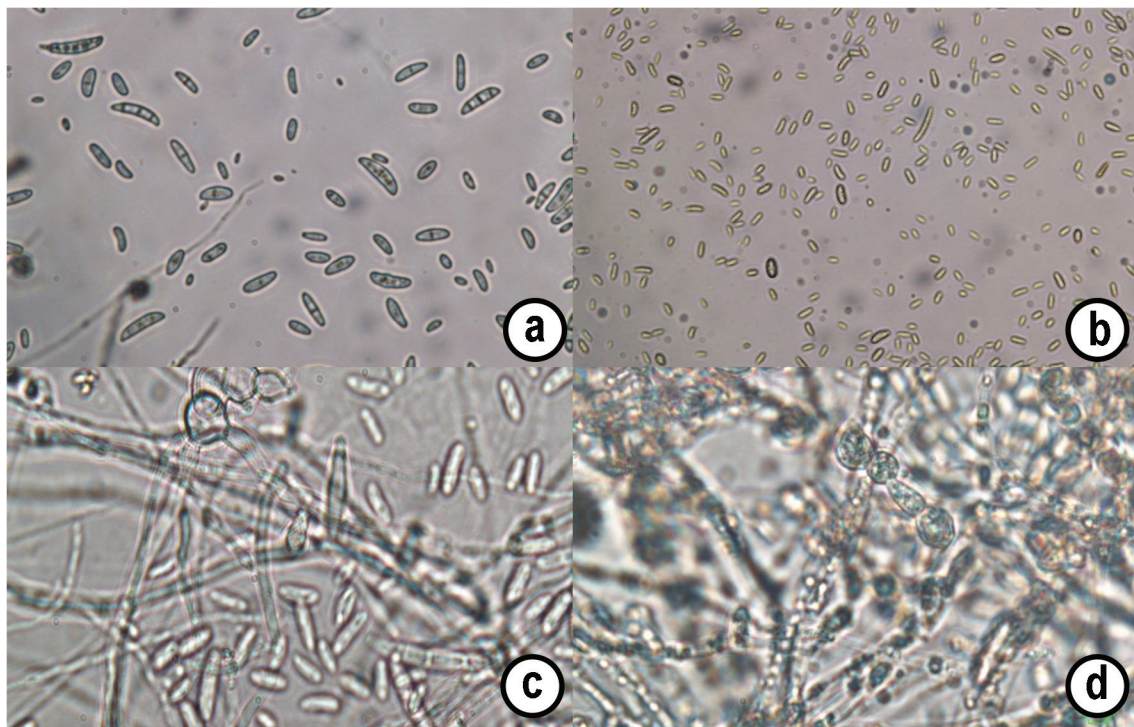


Figura 2. Características microscópicas de los aislamientos de *F. oxysporum*. a. macroconidias; b. microconidias; c. fialides cortas; d. clamidosporas.

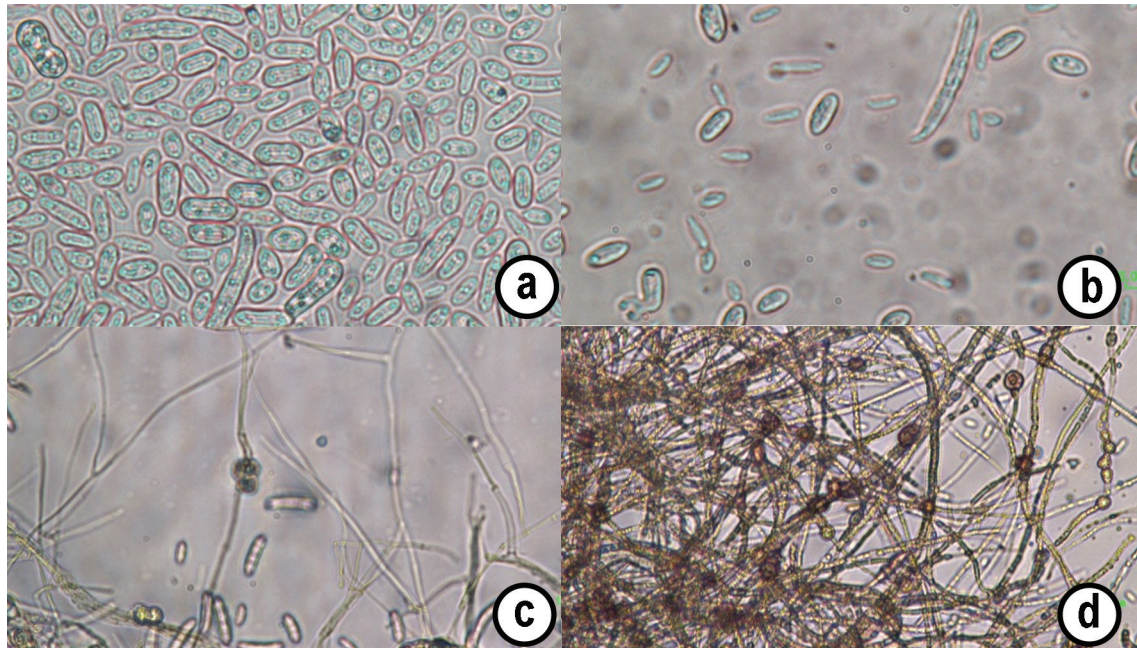


Figura 3. Características microscópicas de los aislamientos de *F. solani*. a. macroconidias; b. microconidias; c. Fialides cortas; d. Clamidosporas.

a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; los aislamientos PO003, PO004, PO005, PO007, PO008, PO011, PA012, PA017, PA018, PA019, a *F. verticillioides* (16); *F. solani* (013, 014, 015) y *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (9).

La amplificación de las secuencias de *Fusarium* con los marcadores ITS y TEF1 α , confirmaron la presencia del hongo en los aislamientos evaluados, asociados a la pudrición basal de la cebolla de rama.

Las secuencias de los aislamientos con los cebadores ITS, evaluados de las tres zonas productoras de cebolla de rama, correspondieron al género *Fusarium*; se obtuvo un porcentaje de similitud de 94 a 100%. Cabe destacar que, de los 19 aislamientos evaluados, 14 correspondieron a *F. oxysporum* (PO001, PO002, PO003, PO004, PO005, PO007, PO008, PO010, PO011, PA012, PA017, PA018, PA019, BU020), datos que fueron previamente confirmados con la caracterización biológica y las secuencias de los aislamientos; PO001, PO002, PO010, BU020, se ubican dentro de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; los aislamientos PA013, PA014 y PA015, correspondieron a *F. solani*. El aislamiento PA016, a la especie *F. verticillioides* y el aislamiento PO009, a *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, con un porcentaje de similitud del 100% (Tabla 1).

Análisis de la Región de TEF 1 α : Con el cebador TEF 1 α , se observó un fragmento esperado de 700pb. Las secuencias de los aislamientos PO001, PO002, PO005, PO007, PO009, PO010, PO011, PA012, PA019, BU020, se ubican en la especie *F. oxysporum* f. sp. *cepae*; los aislamientos PA013, PA014, PA015, como *F. solani*; *F. oxysporum*, con PA004, PA008, PA018 y el aislamiento 017, como *F. guttiforme*.

Los análisis de secuenciación para TEF1 α , al realizar la alineación de las secuencias, se encontró que, 15 de los aislamientos evaluados, se clasifican como *F. oxysporum* (PO001, PO002, PO003, PO004, PO005, PO007, PO008, PO010, PO011, PA012, PA016, PA018, PA019, BU020); tres, como *F. solani* (PA013, PA014 y PA015) y uno, como *F. guttiforme*, demostrando, para estos marcadores, la alta variabilidad intraespecífica dentro de la población de *Fusarium*, causante de la pudrición basal de la cebolla.

En aliáceas, específicamente en ajo y cebolla, se han registrado, a nivel mundial, varias especies de *Fusarium*, como *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. acuminatum*, *F. culmorum* (Bayraktar *et al.* 2010; Cramer, 2000; Dissanayake *et al.* 2009; Dugan *et al.* 2003; Galván *et al.* 2008; Montes *et al.* 2003; Ochoa Fuentes *et al.* 2012; Stankovic *et al.* 2007).

Se demuestra una consistencia en el concepto filogenético, que se debe a que los aislamientos evaluados presentaron secuencias muy similares a las registradas en el GenBank, como *F. oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Es así, que la base de la variabilidad para las especies de *Fusarium*, en las que no se identifica su teleomorfo o estado sexual, se podría asociar con mutaciones, es decir, que, cuando se presentan estos fenómenos, facilitan la presencia de genes saltarines o elementos transposones, como también la transferencia genética, por vía de anastomosis, lo cual, es un indicio de que en la reproducción asexual de *Fusarium* se establezcan líneas clonales dentro de su población y, por consiguiente, la variabilidad de la misma (Jacobson & Gordon, 1991; Kistler, 1997; Salazar-González *et al.* 2016).

Tabla 1. Número de Accesoión según Genbank y porcentaje de identidad de los aislamientos de *Fusarium*, usando los marcadores ITS y TEF 1 α .

No	ITS	ACCESIÓN	%	TEF 1 ALPHA	ACCESIÓN	%
PO001	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	KY318499.1	99	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP964904.1	99
PO002	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	KY318499.1	96	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP964904.1	93
PO003	<i>F. oxysporum</i>	LC092107	99	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP964904.1	86
PO004	<i>F. oxysporum</i>	MF280117.1	100	<i>F. oxysporum</i>	MH582354.1	91
PO005	<i>F. oxysporum</i>	KU170676.1	100	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP964904.1	93
PO009	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	MH855643	100	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP964904.1	99
P0007	<i>F. oxysporum</i>	KY318483	99	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP964904.1	99
PO008	<i>F. oxysporum</i>	KY318483	99	<i>F. oxysporum</i>	MH582354.1	94
PO010	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	KY318499	99	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KT239476.1	82
PO011	<i>F. oxysporum</i>	KY318483	99	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP674226.1	99
PA012	<i>F. oxysporum</i>	KY318483.1	99	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	EU220397.1	93
PA013	<i>F. solani</i>	Mh857319.1	100	<i>F. solani</i>	KY556524.1	97
PA014	<i>F. solani</i>	KF562122.1	99	<i>F. solani</i>	KY556524.1	99
PA015	<i>F. solani</i>	Mh857319	99	<i>F. solani</i>	KY556524.1	99
PA016	<i>F. verticillioides</i>	HM776426.1	100	<i>F. oxysporum</i>	KF728204.1	96
PA017	<i>F. oxysporum</i>	MG372014.1	94	<i>F. guttiforme</i> .	KF005294.1	96
PA018	<i>F. oxysporum</i>	MG372014.1	95	<i>F. oxysporum</i>	KF728241.1	96
PA019	<i>F. oxysporum</i>	KY073258.1	95	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP964873.1	98
BU020	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	KY318499.1	97	<i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cepae</i>	KP964904.1	99

Para determinar el porcentaje de identidad (superiores al 93%, para ITS y 82%, para TEF1 α), las secuencias fueron analizadas, utilizando el coeficiente del vecino más cercano, con un bootstrap de 1000, en el cual, se obtuvo agrupamientos muy similares, tanto para el factor de elongación de la traducción (TEF1 α) como para el espacio interno transcrito (ITS).

El análisis filogenético, usando cebadores de ITS, agrupó a *F. oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *Cepae*, en un solo brazo (Figura 4), observándose una distancia mínima entre las especies. De igual manera, los aislamientos correspondientes a *F. solani*, se agruparon en otro brazo, mostrando al aislamiento PA013, con una distancia mayor a la presentada por PA014 y PA015, demostrado, para estos aislamientos, que se pueden agrupar en dos complejos muy específicos, como son el CSFO y CSFS (Aoki *et al.* 2014).

El uso del cebador TEF1 α , permitió determinar que las secuencias correspondientes a *F. oxysporum* y *F. oxysporum* f. sp. *cepae* fueron homólogas, con alto grado de similitud y que la distancia encontrada agrupó a las secuencias en una sola especie (Figura 5). Autores, como Leslie & Summerell (2006), O'Donnell *et al.* (2008), Balajee *et al.* (2009), señalan que dentro del mismo complejo de especies es común encontrar diferencias genéticas, adquiridas de un origen filogenético diferente. La utilización del cebador TEF1 α es amplia,

ya que codifica una parte esencial de las proteínas que hacen parte de la maquinaria de traducción; a su vez, muestra una afinidad en las secuencias polimórficas evaluadas, siendo altamente informativo, a nivel de especie (O'Donnell *et al.* 1998; Geiser *et al.* 2004). En este estudio, se determinó que varios de los aislamientos del CSFO provienen de diferentes linajes.

Por otro lado, diez aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *cepae* son ubicadas en el CSFO, pero también sus secuencias son homólogas a las obtenidas a partir de aliáceas; esto determina, que existen secuencias muy cercanas en *F. oxysporum*, las cuales, no se agruparon en otros grupos, como se observó con el cebador TEF1 α . La alta diversidad del genoma en las especies de *F. oxysporum*, se puede inferir, que se debe a los elementos transposones que ejercen un papel definitivo en la generación de diversidad, ya que su presencia y la continua actividad puede producir mutaciones espontáneas y, por consiguiente, variabilidad en el genoma (Daboussi *et al.* 1992; McDonald, 1993). Edel *et al.* (2001) consideran que la presencia del elemento transposon Fot1 es el causante de dicha diversidad. Además de la presencia de aislamientos pertenecientes al CSFO, también el estudio demuestra que tres de sus aislamientos pertenecen al CSFS, siendo uno de ellos con una distancia genética diferente a sus homólogos. Es posible que el aislamiento PA013 provenga de un linaje diferente.

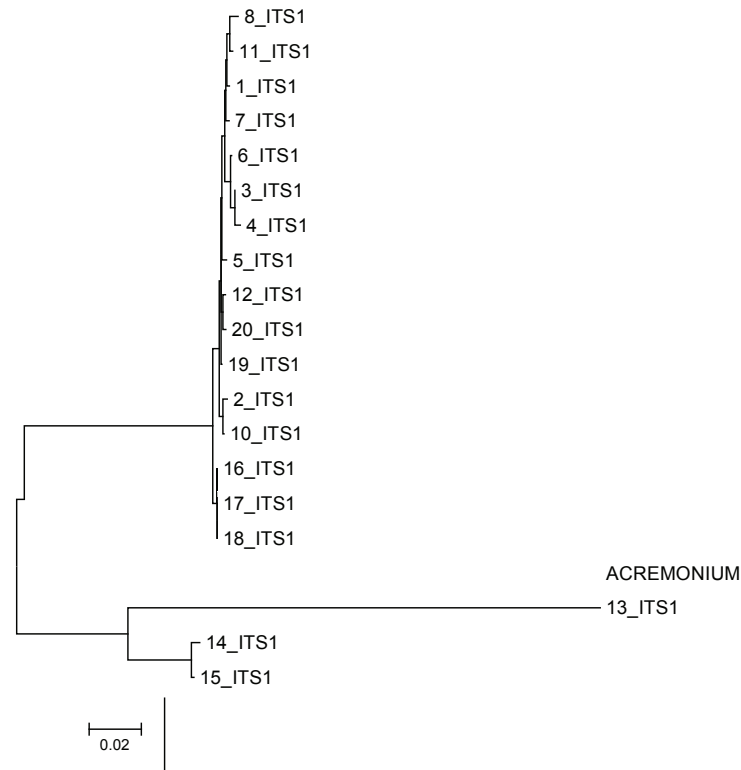


Figura 4. Árbol filogenético de los complejos de especies *F. oxysporum* y *F. solani* con el primer ITS, usando el coeficiente de similitud de Máxima parsimonia. El árbol se elaboró con un bootstrap de 1000 réplicas. Universidad de Nariño, Pasto, noviembre de 2018.

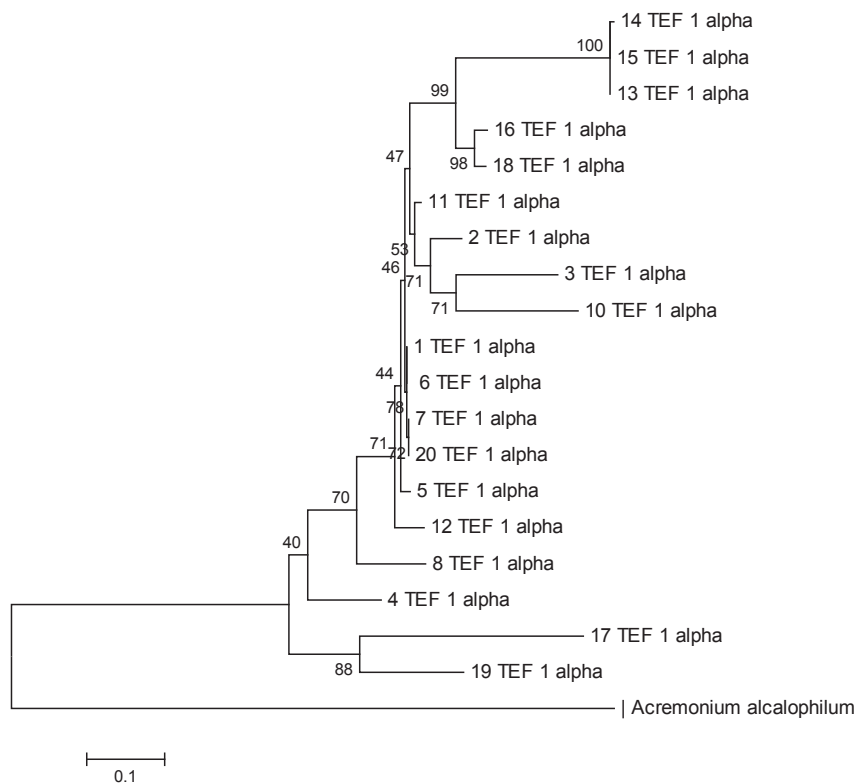


Figura 5. Árbol filogenético de los complejos de especies *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. fujikoroii* con el primer TEF 1 α , usando el coeficiente de similitud de Máxima parsimonia. El árbol se elaboró con un bootstrap de 1000 réplicas. Universidad de Nariño, Pasto, noviembre de 2018.

En este estudio, la variación encontrada con el aislamiento PA013 con el cebador ITS, se explica por la complejidad que se genera, no solo en la morfología, sino que el complejo CSFS agrupa sus especies, teniendo en cuenta el origen geográfico y el hospedante afectado. Se clasificó, inicialmente, dentro de la sección Martiella, que produce enfermedades, como la pudrición de raíz y tallo de arveja, el síndrome de muerte súbita, en soya; pudrición de pie en frijol y pudrición húmeda, en papa. En esta morfoespecie, se estima que existen alrededor de 60 especies filogenéticamente distintas (O'Donnell *et al.* 2008). En un estudio filogenético, morfológico y fenotípico en muerte súbita de la soya, se habían clasificado a las especies, inicialmente, dentro de formas especiales de *F. solani*, es decir, *F. solani* f. sp. *glycines*; se demostró, que estas no correspondían a las formas especiales, sino a siete nuevas especies filogenéticamente diferentes.

Esto agrupó a las especies de *F. solani* en clados, geográficamente delimitados, generando un sistema alfanumérico de nomenclatura (Nalim *et al.* 2011; O'Donnell *et al.* 2000; O'Donnell *et al.* 2008). Los estados teleomórficos, por ejemplo, *F. striatum* Sherb. [syn. = *Haematonectria ipomoeae* (Halst.) Samuels & Nirenberg] y *F. neocosmosporiellum* (syn. = *Neocosmospora vasinfesta*), se ubican en un cuarto clado y *Nectria haematococca* fue transferido a un nuevo género, *Haematonectria* (Rossman *et al.* 1999). Posteriormente, *H. haematococca* (Berk. & Br.) Samuels & Rossman fue recombinada como *Neocosmospora haematococca* (Berk. & Br.) Samuels, Nalim & Geiser y, finalmente, su anamorfó fue descrito como *F. haematococcum* Nalim, Samuels & Geiser, con diferencias filogenéticas distintas a *F. solani* (Nalim *et al.* 2011) Esta serie de confusiones y desacuerdos en cuanto a la clasificación de especies del complejo de *F. solani* han provocado propuestas para formar un nuevo género (Geiser *et al.* 2013).

Con el cebador TEF1 α , se encontró el aislamiento PA017, correspondiente a *F. guttiforme*, que se ubica dentro del complejo de especies de *F. fujikuroi*, CSFF; esta especie está registrada como causante de la fusariosis de la piña en Sur y Centroamérica y aparece en complejos de enfermedades donde intervienen especies, como *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. graminearum*, entre otras (Salazar-González *et al.* 2016). También es causante de enfermedades en piel y ojos en humanos (Migheli *et al.* 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio proveen una detección confiable de diagnóstico de *Fusarium*, usando dos tipos de marcadores moleculares, que permiten establecer las diferencias intra e interespecíficas de las especies de este género. Asimismo, genera una herramienta valiosa que conduce a determinar, a futuro, cuál de las especies encontradas están relacionadas directamente con la patogenicidad en la planta.

Agradecimientos: Los autores expresan su agradecimiento al Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño y a la convocatoria docente 2017 de la Vicerrectoría de Investigaciones, por la financiación de este proyecto. A la Ingeniera Agrónoma Isabel Rosero Montaña, por su colaboración en las fotos de este estudio. **Conflicto de Intereses:** El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no

existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

REFERENCIAS

1. AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology. University of Florida. Fifth edition. 356p.
2. ALEXOUPOLUS, J.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory micology. New York: Wiley y Sons. 1378p.
3. AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D.M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. J. General Plant Pathology. 80:189-201. <http://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
4. ARBELÁEZ, G. 2000. Algunos aspectos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agronomía Colombiana. 17(1-3):11-16.
5. ÁVILA, C.; VELANDIA, J.; LOPÉZ, A. 1996. Enfermedades y plagas de las hortalizas y su manejo. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Subgerencia de Prevención y Control, División de Sanidad Vegetal, Unidad Proyectos de Prevención. Bogotá, Colombia. 68p.
6. BALAJEE, S.A.; BORMAN, A.M.; BRANDT, M.E.; CANO, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DANNAOUI, E.; GUARRO, J.; HAASE, G.; KIBBLER, C.C.; MEYER, W.; O'DONNELL, K.; PETTI, C.A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; SUTTON, D.; VELEGRAKI, A.; WICKES, B.L. 2009. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and Mucorales species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? J. Clinical Microbiology. 47:877. <http://doi.org/10.1128/JCM.01685-08>
7. BARNETT, H. 1960. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Co., Minneapolis. 215p.
8. BAYRAKTAR, H.; TÜRKKAN, M.; DOLAR, S.F. 2010. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* from onion in Turkey based on vegetative compatibility and rDNA RFLP analysis. J. Phytopathol. 158:691-697. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01685.x>
9. CASTELLA, G.; BRAGULAT, M.; BUBIALES, M.; CABAÑES, F. 1997. Development of a selective culture medium for *Fusarium moniliforme*. Microbiol. 13(4):493-498.
10. CONN, K.E.; LUTTON, J.S.; ROSENBERGER, S.A. 2012. Onion diseases. A practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. SEMINIS. 72p. Disponible desde Internet en: <http://www.seminis.com/SiteCollectionDocuments/Onion-Disease-Guide.PDF> (con acceso 02/04/2018).

11. CRAMER, C.S. 2000. Breeding and genetics of *Fusarium* basal rot resistance in onion. *Euphytica*. 115(3):159-166.
12. DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T.; BRYGOO, Y. 1992. Fot1, a new family of fungal transposable elements. *Mol. Gen. Genet.* 232:12-16. <https://doi.org/10.1007/BF00299131>
13. DISSANAYAKE, M.L.M.; KASHIMA, R.; TANAKA, S.; ITO, S. 2009. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J. General Plant Pathology*. 75:37-45. <https://doi.org/10.1007/s10327-008-0135-z>
14. DUGAN, F.M.; HELLIER, B.C.; LUPIEN, S.L. 2003. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology*. 52:426. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00852.x>
15. EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; RECORBET, G.; ALABOUVETTE, C. 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiology Ecology* 36:61-71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00826.x>
16. GALVÁN, G.A.; KONING-BOUCOIRAN, C.F.S.; KOOPMAN, W.J.M.; BURGER-MEIJER, K.; GONZÁLEZ, P.H.; WAALWIJK, C.; KIK, C.; SCHOLTEN, O.E. 2008. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *European J. Plant Pathology*. 121:499-512. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9270-9>
17. GEISER, D.M.; AOKI, T.; BACON, C.W.; BAKER, S.E.; BHATTACHARYYA, M.K.; BRANDT, M.E.; SHORT, D.P. 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103(5):400-408. <http://dx.DOI.org/10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE>.
18. GEISER, D.M.; JIMÉNEZ-GASCO M.DEL M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T.J.; ZHANG, N.; KULDAU, G.A.; O'DONNELL, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying *Fusarium*. *European J. Plant Pathology*. 110:473-479. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>
19. GOBERNACIÓN DE NARIÑO Y CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL. 2015. Consolidado agropecuario de Nariño. Colombia. 127p.
20. JACOBSON, D.J.; GORDON, T.R. 1991. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: a case study of diversity within a *formae specialis*. *Phytopathology* 81:1064-1067.
21. KIEHR, M.; DELHEY, R. 2005. *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. XII Congreso Latinoamericano- XXVIII Congreso Argentino de Horticultura, Argentina pp. Hv13.
22. KISTLER, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87: 475-479.
23. LESLIE, J.; SUMMERELL, A. 2006. The *Fusarium* lab manual. Blackwell Publishing, Ames. 278p.
24. LLANOS, C.; SÁNCHEZ, M. 1982. Experimentos con microorganismos. Ed. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, p.77-80.
25. MAGAN, N.; ALDRED, D.; MYLONA, K.; LAMBERT, R.J.W. 2010. Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 27(5):644-650. <https://doi.org/10.1080/19440040903514523>
26. MCDONALD, J.F. 1993. Evolution and consequences of transposable elements. *Current Opinion in Genetics and Development*. 3:855-864. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(93\)90005-A](https://doi.org/10.1016/0959-437X(93)90005-A)
27. MIGHELI, Q.; BALMAS, V.; HARAK, H.; SANNA, S.; SCHERM, B.; AOKI, T.; O'DONNELL, K. 2010. Molecular Phylogenetic Diversity of Dermatologic and Other Human Pathogenic Fusarial Isolates from Hospitals in Northern and Central Italy. *J. Clinical Microbiology*. 48(4):1076-1084. <https://doi.org/10.1128/JCM.01765-09>
28. MONTES, R.; NAVA, R.A.; FLORES, H.E.; MUNDO, M. 2003. Mundo Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el estado de Morelos, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21(3):300-304.
29. NALIM, F.A.; SAMUELS, G.J.; WIJESUNDERA, R.L.; GEISER, D.M. 2011. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the old world tropics. *Mycologia* 103:1302-1330. <https://doi.org/10.3852/10-307>
30. NELSON, P.; TOUSSON, T.; MARASAS, F. 1983. An Illustrated Manual for Identification. Penn. State Press University. Pennsylvania. United State of America. 206p.
31. OCHOA FUENTES, Y.M.; CERNA CAVEZ, E.; GALLEGOS MORALES, G.; LANDEROS FLORES, J.; DELGADO ORTIZ, J.C.; HERNÁNDEZ CAMACHO, S.; RODRÍGUEZ GUERRA, R.; OLALDE PORTUGAL, V. 2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo, en Aguascalientes, México. *Rev. Mex. Micol.* 36:27-31.
32. O'DONNELL, K.; KISTLER, H.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus

- causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl Acad. Sci.* 95(5):2044-2049.
33. O'DONNELL, K.; KISTLER, H.C.; TACKE, B.K.; CASPER, H.H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:7905-7910. <https://doi.org/10.1073/pnas.130193297>
34. O'DONNELL, K.; SUTTON, D.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M.; BRANDT, M. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clin. Microbiology.* 46:2477-2490. <https://doi.org/10.1128/JCM.02371-07>
35. ROSSMAN, A.Y.; SAMUELS, G.J.; ROGERSON, C.T.; LOWEN, R. 1999. Genera of Bionectraceae. Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies Mycology.* 42:1-248.
36. SALAZAR-GONZÁLEZ, C.; SERNA-COCK, L.; GÓMEZ-LÓPEZ, E. 2016. Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en Pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agron. Mesoam.* 27(2):277-285. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i2.21269>
37. SAMSON, R.; HOESKTRA, E.; FRISVAD, J. 2004. Introduction to food borne fungi. 7th edition. Central Bureau voor Schimmecultures. Utrecht.
38. SAÑUDO, B.; ARTEAGA, M.; VALLEJO, W.; FIGUEROA, R.; BURBANO, E. 2003. Fundamentos de Micología agrícola. Ed. Universidad de Nariño. Pasto, Colombia. 201p.
39. SCHWARTZ, H.F.; MOHAN, S.K. 1995. Compendium of Onion and Garlic Diseases. The American Phytopathological Society, Minnesota. 54p.
40. STANKOVIC, S.; LEVIC, J.; PETROVIC, T.; LOGRIECO, A.; MORETTI, A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European J. Plant Pathology.* 118(2):165-172. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9126-8>
41. TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 30:2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
42. UNDA, F.; AGÜERO, J.; FARIÑAS, M.C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. 2011. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29(4):282-285. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.12.011>
43. WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). *PCR Protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press. London, England. p. 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>