

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium* spp,
CAUSANTES DE LA SECADERA DE GRANADILLA *Passiflora ligularis* Juss.**

**BLADIMIR GOMEZ ESPINOZA
OMAR ARBEY YELA CAICEDO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL
SAN JUAN DE PASTO
2019**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium* spp,
CAUSANTES DE LA SECADERA DE GRANADILLA *Passiflora ligularis* Juss**

**BLADIMIR GOMEZ ESPINOZA
OMAR ARBEY YELA CAICEDO**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
INGENIERO AGROFORESTAL

Presidente:

CLAUDIA SALAZAR GONZALEZ I.A Ph. D.

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL
SAN JUAN DE PASTO
2019**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de Grado, son de responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1° del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma Presidente

Firma Jurado

Firma Jurado

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a Dios por darnos la fortaleza y perseverancia para sacar adelante este trabajo de grado.

A la profesora Claudia Salazar Gonzales I.A Ph.D. Presidente de tesis y líder del grupo de investigación en Sanidad Vegetal por brindarnos su confianza, orientación, compartir sus conocimientos y apoyarnos incondicionalmente en el desarrollo de esta investigación.

A los profesores Claudia Quiroz I.AF M.Sc y Carlos Betancourth I.A Ph.D. Jurados de tesis, por sus acertados aportes para el desarrollo de este trabajo de grado.

A la ingeniera Isabel Rosero, funcionaria del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) por brindarnos su amistad y ayudarnos en la colecta de muestras e identificación morfológica de las mismas.

A todos los integrantes del grupo de investigación en Sanidad Vegetal especialmente a Silvana Vanessa, Carolina y María José, por brindarnos su amistad, compañía y apoyo en el trabajo de laboratorio.

A los propietarios de las fincas, que amablemente nos permitieron coleccionar material vegetal.

A la Vicerrectoría de Investigaciones Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) por la financiación de esta investigación mediante la convocatoria de trabajos de grado 2018.

A la Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Programa de Ingeniería Agroforestal.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron para que este trabajo de grado se lleve a cabo.

DEDICATORIA

A Dios por la vida, por darme fortaleza y entereza para enfrentar este reto y culminarlo con éxito.

A mis padres Froilán y Rubira, que con perseverancia y sacrificio, amor y dedicación logra que mis sueños y mis metas se hagan realidad.

A mi hermana Sthefany, mi gran orgullo, mi motivación.

A mis abuelos, por ser mi apoyo, por alentarme en los momentos difíciles y por estar presente en cada etapa de mi vida, en mis triunfos y por qué sin duda serán partícipes de mis alegrías siempre.

A la memoria de mi tía Madelin, sé que desde el cielo me protegerá y guiara mi camino.

A mi familia que siempre me ha apoyado en este camino.

A mi compañero Omar Yela, por su compromiso y perseverancia en este trabajo.

A mis amigos, gracias por todos los momentos compartidos.

A mis Docentes por quienes el conocimiento que aportaron serán las bases para ser ahora un profesional y un gran ser humano en la vida

Bladimir Gomez Espinoza

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, la salud y la sabiduría para alcanzar este logro tan importante.

A mis padres Jorge y Juana, mi mayor orgullo, mis consejeros y el motivo para alcanzar todas mis metas.

A mi hermana Mónica por ser esa niña tan especial que llena mi vida de alegría.

A mi tía Melva y su esposo Wilson por haberme abierto las puertas de su hogar y convertirse en mis segundos padres en todo el tiempo que duraron mis estudios.

A mis abuelas y abuelos por haberme enseñado el valor que tiene el trabajo honesto y la nobleza.

A mi tío Pedro y todos mis tíos por haberme apoyado incondicionalmente en todo momento.

A mi compañero Bladimir por su incondicional amistad, entrega y responsabilidad para llevar a cabo este proyecto.

A mis amigos, por todos los momentos compartidos.

A todos mis docentes que me transmitieron sus conocimientos, motivación y valores.

Omar Arbey Yela Caicedo

Caracterización molecular de aislamientos de *Fusarium* spp, causantes de la secadera de granadilla *Passiflora ligularis* Juss

Molecular characterization of *Fusarium* spp isolates causants of wilt in sweet granadilla
Passiflora ligularis Juss

Bladimir Gómez Espinoza¹, Omar Yela Caicedo², Claudia Salazar Gonzalez³

¹ Estudiante de Ingeniería Agroforestal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia. bladim98@gmail.com

² Estudiante de Ingeniería Agroforestal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia. omry1995@gmail.com

³ Profesora Asociada I.A. Ph.D. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia. claudiasalazarg@yahoo.com

RESUMEN

La enfermedad conocida como secadera se considera el problema patológico más importante en el cultivo de granadilla en Colombia, ocasionando la perdida de grandes zonas de producción. Debido al desconocimiento del agente causal de esta enfermedad, se planteó esta investigación, con el objetivo de identificar la especie asociada con síntomas como marchitamiento vascular, amarillamiento y muerte de la planta de granadilla. Se recolectaron muestras provenientes de fincas productoras de los municipios de Ancuya, San Pablo y Guaitarilla, en el departamento de Nariño; obteniendo treinta y cuatro (34) aislamientos, los cuales fueron caracterizados morfológica y molecularmente. La identificación morfológica se realizó mediante diferentes claves taxonómicas, teniendo en cuenta caracteres primarios. La caracterización molecular se llevó a cabo haciendo uso de PCR con los primers ITS1 – ITS4 y TEF1 α . Las secuencias de los productos de PCR se compararon con el NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se alinearon usando Clustal W. Los análisis filogenéticos se realizaron empleando el coeficiente de similitud del vecino más cercano con 1000 réplicas (Bootstrap) usando el programa MEGA X. Los resultados de secuenciación para los marcadores indicaron que *Fusarium oxysporum* fue la especie encontrada en todos los aislamientos y puede estar relacionada con la enfermedad de la secadera, en su forma especial *Fusarium oxysporum* f. sp *passiflorae*. El análisis filogenético permitió determinar que existe poca diversidad entre los aislamientos evaluados, no mostrando ningún agrupamiento en relación con el origen geográfico de las muestras. Los caracteres morfológicos confirmaron los resultados del análisis molecular.

Palabras clave: Secadera, *Fusarium oxysporum* f. sp *passiflorae*, morfología, ITS, TEF 1 α , filogenia.

ABSTRACT

The disease known as wilt is considered the most important pathological problem in sweet granadilla crops in Colombia, because it causes the loss of large production areas. Due to the lack of knowledge to the causal agent of this disease, this research was proposed, with the objective of detecting the species associated with symptoms such as vascular wilt, yellowing and death of the sweet granadilla plant. Root samples were collected from plants in farms located in the municipalities of Ancuya, San Pablo and Guaitarilla, in the department of Nariño. Thirty-four (34) isolates were obtained which were characterized morphologically and molecularly. The morphological identification was made with taxonomic keys using primary characters. Molecular characterization was carried out using PCR with primers ITS1 - ITS4 and TEF1 α . The sequences of the PCR products were compared with the NCBI (National Center for Biotechnology Information) and it was aligned using Clustal W. Phylogenetic analysis was made by Neighbor Joining method with 1000 replicates (Bootstrap) using MEGA X program. The sequences for the primers indicated that *Fusarium oxysporum* was the species found in all the isolations and can be related to the disease of wilt in the special form *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*. The phylogenetic analysis determined that there is a certain diversity among the isolates evaluated, and there isn't grouping in relation with the geographical origin of the samples. The morphological characters confirmed the results of the molecular analysis.

Key words: Wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp *passiflorae*, morphology, ITS, TEF 1 α , phylogeny.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
2.1. Localización.....	2
2.2. Procedencia de material vegetal.....	2
2.3. Aislamiento.....	2
2.4. Obtención de cultivos monospóricos.....	3
2.5. Identificación morfológica de <i>Fusarium</i>	4
2.6. Caracterización molecular de <i>Fusarium</i>	5
2.6.1. Extracción de ADN.....	5
2.6.2. PCR para amplificar la región ITS1 – ITS4.....	6
2.6.3. PCR para amplificar la región TEF 1 α	6
2.6.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	6
2.6.5. Secuenciación.....	7
2.6.6. Análisis filogenético.....	7
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
3.1. Obtención de aislamientos.....	7
3.2. Caracterización morfológica de caracteres macroscópicos.....	7
3.2.1 Caracterización morfológica de caracteres microscópicos.....	8
3.3. Caracterización molecular.....	10
3.3.1. Ampliación por PCR de la región ITS y TEF 1 α	11
3.3.2. Secuenciación de la región ITS y TEF 1 α	12
3.3.3. Análisis filogenético de la Región ITS.....	14
3.3.4. Análisis filogenético de la Región TEF 1 α	15
4. CONCLUSIONES.....	17
5. BIBLIOGRAFÍA.....	18
6. ANEXOS.....	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estructuras morfológicas de *Fusarium oxysporum*.....10
- Figura 2:** Gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X para determinar la presencia de ADN en los aislamientos de *Fusarium* evaluados.....11
- Figura 3:** Gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X para determinar la amplificación de la banda de ITS 560 pb en los aislamientos evaluados.....11
- Figura 4:** Gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X para determinar la amplificación de la banda de TEF-1 α a 700 pb en los aislamientos evaluados.....12
- Figura 5:** Árbol filogenético de las secuencias de *Fusarium* con el primer ITS 1-ITS 4 (Espacio interno transcrito) usando el coeficiente de similitud de Neighbor joining NJ.....14
- Figura 6.** Árbol filogenético de las secuencias de *Fusarium* con el primer TEF-1 α (Factor de elongación de la traducción) usando el coeficiente de similitud de Neighbor joining NJ.....15

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Caracterización morfológica de aislamientos evaluados.....8

Tabla 2: Identificación a nivel de especie mediante análisis de porcentaje de similitud y código de acceso (según GenBank) de las secuencias obtenidas en la región ITS (espacio interno transcrito) y TEF-1 α (Factor de elongación de la traducción).....12

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aislamientos obtenidos de plantas de Granadilla con síntomas de la enfermedad conocida como secadera.....	23
Anexo 2. Caracterización morfológica de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp, de acuerdo a la pigmentación del micelio, comparados con el catálogo de colores The online Aduction Color Chart® 2004.....	24
Anexo 3. Tasa de crecimiento radial de las muestras evaluadas.....	31

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los principales productores de granadilla *Passiflora ligularis* Juss a nivel mundial, con una producción que alcanzó las 48.705 toneladas durante el año 2018, obtenidas de 5.720 hectáreas sembradas en todo el territorio nacional, con rendimientos promedios de 12,34 toneladas por hectárea al año (MinAgricultura, 2018). La fruta es comercializada de manera exitosa en los mercados nacionales e internacionales, principalmente en el continente Europeo (Analdex, 2016). El departamento de Nariño para el año 2018 contó con un área sembrada de 814 hectáreas de granadilla, con una producción anual de 2.819 toneladas y rendimiento promedio de 3.80 Ton/ha (MinAgricultura, 2018). El cultivo genera alrededor de 210 jornales/ha por año y contribuye sustancialmente a la economía campesina, por su constante producción y rentabilidad (Rivera *et al.*, 2002).

La secadera se considera el problema patológico más importante en el cultivo de granadilla. En los años 90's se presentó una devastación ocurrida en cultivos de la zona de Urrao, Antioquia (Tamayo, 1999). Es una enfermedad fungosa cuyo agente causante es *Fusarium* sp. Este hongo puede sobrevivir por mucho tiempo en el suelo y en residuos de cosecha; generalmente requiere heridas para penetrar a la planta y colonizar sus tejidos (García *et al.*, 2007). Estas heridas pueden ser cuarteaduras naturales de la corteza, heridas causadas por insectos, nematodos o por el hombre durante las labores culturales de desyerba y trasplante. Cuando esta enfermedad ataca desde la etapa de semillero, las plántulas presentan amarillamiento, crecimiento deficiente y finalmente la muerte (Tamayo, 2001; Melgarejo *et al.*, 2015).

En Colombia, se han realizado algunos estudios para identificar el agente causal de la secadera en cultivos de pasifloras. De este modo, Henao *et al.* (2017); realizaron la caracterización molecular de *Fusarium* sp. asociado a maracuyá (*Passiflora edulis*) en el Valle del Cauca, obteniendo que las especies causantes de esta enfermedad correspondieron a: *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium solani*, siendo la primera, la de mayor ocurrencia en las muestras evaluadas. Así mismo, Ortiz (2012) realizó el diagnóstico del agente causal de patologías asociadas a fusariosis en gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en la región del Sumapaz (Cundinamarca), dando como resultado que las especies: *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, están asociadas a esta enfermedad.

Los métodos moleculares que se fundamentan en la comparación de secuencias de ADN son actualmente los más utilizados para el estudio de genética de poblaciones, taxonomía, filogenia y sistemática de *Fusarium*. La secuenciación de múltiples loci, como el factor de elongación de la traducción 1 α (EF-1 α , TEF) y las regiones ITS del ADN ribosomal se han utilizado para sistemática molecular (Balajee *et al.*, 2009; Salazar, 2016). El gen EF 1 α , el cual codifica una parte esencial de la maquinaria de traducción de la proteína, tiene una alta utilidad filogenética. Este gen parece que produce una copia única en *Fusarium*, y muestra alto polimorfismo en especies estrechamente relacionadas (Wulff *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2016).

Las investigaciones sobre la variabilidad del hongo que causa la secadera de la granadilla han demostrado que este organismo es muy cambiante pudiendo aumentar o disminuir su agresividad, lo cual hace más difícil el control (Tamayo, 1999). Los estudios dirigidos a evitar la diseminación de la secadera en condiciones de cultivo, demostraron la ventaja de erradicar oportunamente las plantas enfermas y la necesidad de efectuar un seguimiento y detección oportuna de la enfermedad en semilleros y almácigos de granadilla, para evitar llevar las plantas enfermas al campo; cuando una planta de granadilla muere, los residuos de tallos afectados sirven de foco de la enfermedad (Tamayo, 1999).

Es así como la identificación precisa y rápida de la especie de *Fusarium* es crítica para predecir el potencial patógeno de dichos aislamientos y administrar el mejor tratamiento (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008; Landlinger *et al.*, 2009; Sampietro *et al.*, 2010). Por lo tanto, para el establecimiento de estrategias de manejo y control de la secadera se requiere un adecuado conocimiento a nivel taxonómico y filogenético de los organismos causantes de la enfermedad. De esta manera se planteó la presente investigación, en la cual se caracterizó morfológica y molecularmente aislamientos de *Fusarium* provenientes de zonas productoras de granadilla de los municipios de Ancuya, San Pablo y Guaitarilla en el departamento de Nariño.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización. La investigación se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación en Sanidad Vegetal (GRISAV), así como también en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad de Nariño, ubicada a una altura de 2488 msnm; geográficamente localizada a 1°14'00.89" LN y 77°17'38.66" LO, con una temperatura promedio de 14°C.

2.2. Procedencia de material vegetal. Los aislamientos de *Fusarium* sp. se obtuvieron a partir de plantas de granadilla con síntomas de la enfermedad como son: clorosis o amarillamiento de las hojas, necrosis del tallo, con una fuerte marchitez de las hojas y arrugamiento de los frutos (García *et al.*, 2007). El muestreo se realizó al azar en 6 fincas productoras de granadilla de los municipios de Ancuya, San Pablo, y Guaitarilla en el departamento de Nariño (Colombia). Se tomaron muestras de raíces y tallos sintomáticos las cuales se acondicionaron en bolsas ziploc. Todo el material colectado fue transportado al laboratorio para su posterior análisis (Leslie y Summerell, 2006; Gómez, 2008).

2.3. Aislamiento. El aislamiento se hizo mediante siembra directa del tejido afectado, según la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). En la cámara de flujo laminar, y con un bisturí estéril, se realizaron cortes de tejido enfermo y sano. Las muestras se depositaron en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5 % por un minuto, luego en alcohol al 70% durante un minuto y finalmente se realizó un lavado intenso con agua destilada estéril. Posteriormente, de tres a cuatro secciones se sembraron por cada caja Petri de 100 X 15 mm que contenía medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar), previamente tratado con antibiótico (Rifampicina, 1 ml/Litro) para evitar el crecimiento de bacterias. Las cajas Petri se sellaron con Vinipel y se colocaron en una cámara de incubación marca Thermo Scientific por 48 horas a 25°C (Nelson *et al.*, 1994).

2.4 Obtención de cultivos monospóricos. Con el objetivo de tener aislamientos puros generados a partir de una sola espora; se obtuvo una suspensión de baja concentración de conidios de *Fusarium* sp. en agua estéril, por medio de diluciones, a partir del cultivo inicial. Posteriormente se tomó 0.5 mL de dicha suspensión, se colocó en una caja Petri con medio agar-agua y se dispersó con una varilla de vidrio estéril. Luego se observó la germinación de los conidios bajo el estereoscopio a intervalos de tiempo regulares (24, 48 y 72 horas). Cuando éstos iniciaron su germinación, con una aguja previamente esterilizada a la flama, se ubicaron los conidios encontrados en forma aislada. Luego, se transfirió uno por uno los conidios en germinación a cajas Petri individuales que contenían medio PDA y por último se descartó aquellos que mostraron un crecimiento concéntrico doble o triple, ya que este patrón indicó que fue transferida más de una espora durante el trabajo con la aguja bajo el estereoscopio (Ortega *et al.*, 2008).

2.5. Identificación morfológica de *Fusarium* spp. Los aislamientos monospóricos se caracterizaron de forma macroscópica teniendo en cuenta el diámetro de crecimiento de la colonia en 8 días y el color del micelio; comparando la pigmentación presentada en el anverso y reverso de las cajas Petri con el catálogo de colores (The online Aduction Color Chart®, 2004). Los parámetros microscópicos evaluados fueron: forma de macroconidios (célula basal y célula apical), microconidios, presencia o ausencia de clamidosporas y fiálides (Leslie y Summerell, 2006).

Para el cálculo de la tasa de crecimiento radial (TCR, mm día⁻¹), los aislamientos se almacenaron en incubadora a 25°C, durante ocho días (Garcés *et al.*, 2001); en este tiempo se tomaron registros donde se hizo una comparación del crecimiento de cuatro días con el de tres días, el de seis días con el de cinco días. La TCR se calculó mediante la fórmula propuesta por Osorio-Gutiérrez y Castaño-Zapata (2011).

$$TCR = \left[\frac{Cf - Ci}{Tf - Ti} \right]$$

Dónde

TCR = Tasa de crecimiento radial

Cf = Crecimiento final (diámetro en mm)

Ci = Crecimiento inicial (diámetro en mm)

Tf = Tiempo final (días)

Ti = Tiempo inicial (días)

Los valores de crecimiento inicial (Ci) y final (Cf), así como el tiempo inicial (Ti) y final (Tf) corresponden a la diferencia de un día en crecimiento y tiempo transcurrido. Los aislamientos se agruparon teniendo en cuenta las categorías de crecimiento: lento (<10 mm de crecimiento por día), medio (>10-12 mm de crecimiento por día) y rápido (>12 mm de crecimiento por día) (Dubey *et al.*, 2010).

Para la caracterización microscópica, se realizó la preparación de medio agar hojas de clavel (CLA), teniendo en cuenta que las hojas estuvieran frescas y libres de residuos de fungicidas o insecticidas. Inmediatamente después de la recolección, las hojas de clavel se cortaron en pedazos y se secaron en un horno microondas (Electrolux 0.7PC EMDN20) durante tres minutos. Las piezas secas se empacaron en un contenedor de aluminio y se esterilizaron con luz UV durante 15 minutos (Leslie y Summerell, 2006). Luego, se preparó agar agua al 2% (20g de agar en 1 L de agua) y se añadieron de 4 a 6 piezas de hojas de clavel estériles de 3 a

5 mm² por cada caja Petri, en las cuales fueron sembrados los aislamientos (Nelson *et al.*, 1983).

La caracterización se llevó a cabo después de 8 días de crecimiento de los aislamientos; de los cuales se tomó una porción de micelio y se colocó sobre un portaobjetos con una gota de agua. Este se observó al microscopio con los objetivos 4, 10, 40 y 100 x. A partir de las observaciones realizadas se identificó las especies de *Fusarium*, de acuerdo a las claves taxonómicas de Leslie y Summerell (2006) y Nelson *et al.* (1994).

2.6. Caracterización molecular de *Fusarium* spp.

2.6.1. Extracción de ADN. Los aislamientos seleccionados de cultivos monospóricos y sembrados en medio de cultivo PDA en una cámara de flujo laminar, fueron incubados a una temperatura de 24°C durante 10 días, tiempo suficiente para el desarrollo del hongo. Transcurrido el tiempo de incubación, y utilizando una espátula metálica estéril, se recogió el micelio del aislado de *Fusarium*, depositándolo en microtubo Eppendorf de 1.5 mL, y se mantuvo en hielo (0°C) (Gómez, 2008).

Para la extracción de ADN se utilizó el método descrito por Caetano *et al.* (2015) con algunas modificaciones; así, en cada tubo con micelio se añadió 500 µl de solución tampón (250 ml Tris-HCl 100 mM pH 7,2; 250 EDTA 100 mM pH 8 y 250 ml dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% pH 7,2). Posteriormente, se realizó un macerado utilizando puntas de micropipeta estériles, con el fin de romper las paredes celulares. Luego los tubos se incubaron a 65°C durante una hora a baño maría (memmert WNB 7). Transcurrida la incubación se adicionó a cada tubo 500 µl fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, en proporción de 25:24:1, los tubos se agitaron por inversión durante cinco minutos y se centrifugaron a 13000 rpm durante 12 minutos, en una centrífuga (HERMLE Z 216 M). Los sobrenadantes fueron transferidos a microtubos, a los cuales se les adiciono 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), por tubo; posteriormente, se agitaron por inversión durante cinco minutos y se centrifugaron a 13000 rpm durante 12 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a microtubos, luego se añadieron 50 µl de acetato de sodio y 800 µl de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Los tubos se dejaron a una temperatura de -20°C durante una noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 13000 rpm durante 12 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y el pellet contenido en la fase inferior del tubo se dejó secar a temperatura ambiente durante dos horas

en la cámara de flujo laminar. Finalmente, el ADN fue diluido en 30 µl de agua miliq, para luego determinar mediante apreciación visual en gel de agarosa su integridad. Posteriormente, se almacenó a -20°C hasta su uso para amplificar la región ITS y TEF1 α .

2.6.2. PCR para amplificar la región ITS1 – ITS4. La región ITS del ADNr se amplificó con los primers universales descritos por White *et al.*, (1990) y Salazar, (2016); ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4. (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), sintetizados por Macrogen, Corea. La mezcla para la amplificación se realizó en un volumen de 30 µl, se adicionaron 15 µL de Green Master mix (Biolabs®), 1 µL de cada primer (10µM), se agregaron 3 µL de ADN y se completó con el agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador (Labnet MultiGene™ OptiMax, de 96 pozos programable). Se siguieron los ciclos de temperatura así: 95°C por un minuto, para desnaturalizar las muestras, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, 55°C por un minuto para alineamiento, extensión de 72°C por 45 segundos, finalmente, elongación a 72°C por cinco minutos y terminación a 4°C por cinco minutos.

2.6.3. PCR para amplificar la región TEF 1 α . Se amplificó la región del gen TEF Efl α y Ef2 α con los cebadores 5'ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3 y 5'-GGAGGTACCAGTGCATCATGTT-3, sintetizados por Macrogen, Corea (O'Donnell *et al.*, 1998; Salazar, 2016).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 30 µl, se adicionó 15 µl de Green Master mix (Biolabs®) 1 µl de cada iniciador, 3 µl de ADN y se completó con el agua libre de nucleasas que contiene el kit. El programa de PCR comprendió una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 56°C por 30 segundos, extensión de 72°C por 1 minuto y una elongación final de 72°C por 10 minutos y la terminación a 4°C por cinco minutos. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Labnet, MultiGene™ OptiMax, de 96 pozos programable).

2.6.4. Electroforesis en gel de agarosa. Para la lectura se usó un marcador de peso molecular de 100pb (Biolabs®) en un gel de agarosa al 1,2%, revelando con HydraGreen™ (HydraGene), luego este gel se corrió a 70 Voltios por 40 minutos en una cámara de electroforesis horizontal. Los geles obtenidos fueron observados en un transiluminador (Fotodyne 3-3500 Foto/PrepI UV) para determinar la amplificación de la banda esperada en las regiones ITS y TEF 1 α .

2.6.5. Secuenciación. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar mediante el método de Sanger en el laboratorio de Macrogen, Corea y se utilizó el software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2019) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para la comparación de las especies.

2.6.6. Análisis filogenético. Los resultados de la secuenciación fueron editados con el programa informático BioEdit (versión 7.0.5.3). Tras la edición de las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple por ClustalW, mediante el programa informático MEGA X (versión 10.0). Con el mismo programa y a partir del alineamiento múltiple se construyó el árbol filogenético, mediante el coeficiente de similitud del “vecino más cercano” (Neighbor - joining tree) (Lin *et al.*, 2014); con un Bootstrap de 1000 réplicas y empleando el modelo de 2 parámetros (Kimura, 1980).

Las secuencias de *Trichoderma* sp (Accesión N°MF185948.1) para TEF 1 α y (Accesión N° MK108405.1) para ITS, depositadas en la base del GenBank, fueron seleccionadas para tener una especie de referencia en la construcción del árbol filogenético.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de aislamientos. En total se obtuvieron 34 aislamientos de *Fusarium* sp. De estos, 23 provinieron del municipio de San Pablo, seis del municipio de Ancuya y cinco del municipio de Guaitarilla (Anexo 1). Se descartaron aquellos aislamientos que tenían características distintas a las que presenta el género *Fusarium*.

3.2. Caracterización morfológica de caracteres macroscópicos. A nivel macroscópico, se observó diversidad en cuanto a color de las colonias, presentando apariencia algodonosa y color blanquecino-rosado a un rojo púrpura en los primeros estados de desarrollo. Posteriormente, conforme el micelio se desarrolló, se tornó de un color levemente púrpura en el centro del mismo y otros tomaron un color rojo más intenso. Por el reverso de la caja de Petri, se observó un color morado oscuro hacia el centro en la mayoría de aislamientos y de un tono más claro hacia el borde externo (Anexo 2); estos resultados concuerdan con lo registrado por Retana *et al.*, (2017) como características de *Fusarium oxysporum*.

La tasa de crecimiento radial (TCR) dio como resultado un crecimiento rápido (>12 mm de crecimiento por día), en 29 aislamientos; esto concuerda con estudios realizados por Rodríguez (2013) quien afirma que el crecimiento rápido en medio PDA es una característica de *Fusarium oxysporum*. Además en cinco aislamientos se encontró un crecimiento medio (10- 12 mm de crecimiento por día), correspondientes a SP 19, 21, 22, AN 24 y 26, esto posiblemente se debió a la influencia del medio de cultivo utilizado, generando una variación en la expresión de los caracteres macroscópicos, como lo demuestran López y López, (2004) en su investigación, donde indican que el pH y el tipo de medio son determinantes en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Anexo 3).

3.2.1. Caracterización morfológica de caracteres microscópicos.

Tabla 1. Morfología microscópica de aislamientos evaluados.

Aislamiento	Macroconidios				Microconidios			Clamidiosporas	Especie
	No. Septos	Forma	Apical	Pie	No. Septos	Forma	Fíalides		
SP1	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	1	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP2	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	0	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP3	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	0	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP4	4	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	0	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP5	4	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	0	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP5	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	0	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP7	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	0	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP8	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	0	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP9	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	0	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP10	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	1	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>
SP11	3	Medianas ligeramente curvada	Redondeada	Levemente curvado	1	Ovalada	Monofialides cortas	Abundantes	<i>F. oxysporum</i>

A nivel microscópico, los macroconidios presentaron la forma típica de *Fusarium oxysporum*, aunque con algunas diferencias entre ellos, puesto que unos fueron un poco más cortos y otros menos curvos. En promedio cada uno tenía de 3 a 5 septos, con una célula apical redondeada y una célula basal ligeramente curvada (Figura 1A). En el caso de los microconidios se observó más comúnmente la forma oval, en la mayoría sin septos (Figura 1B), también se formaron monofialides cortas (Figura 1C). Además se pudo observar clamidiosporas de pared lisa, de manera intercalar o terminal sencillas, en pares o en cadenas (Figura 1D) y la formación de microconidios creciendo en falsas cabezas (Figura 1E). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Nelson *et al.*, (1983), donde en sus estudios realizó la caracterización morfológica de las especies de *Fusarium* sp.

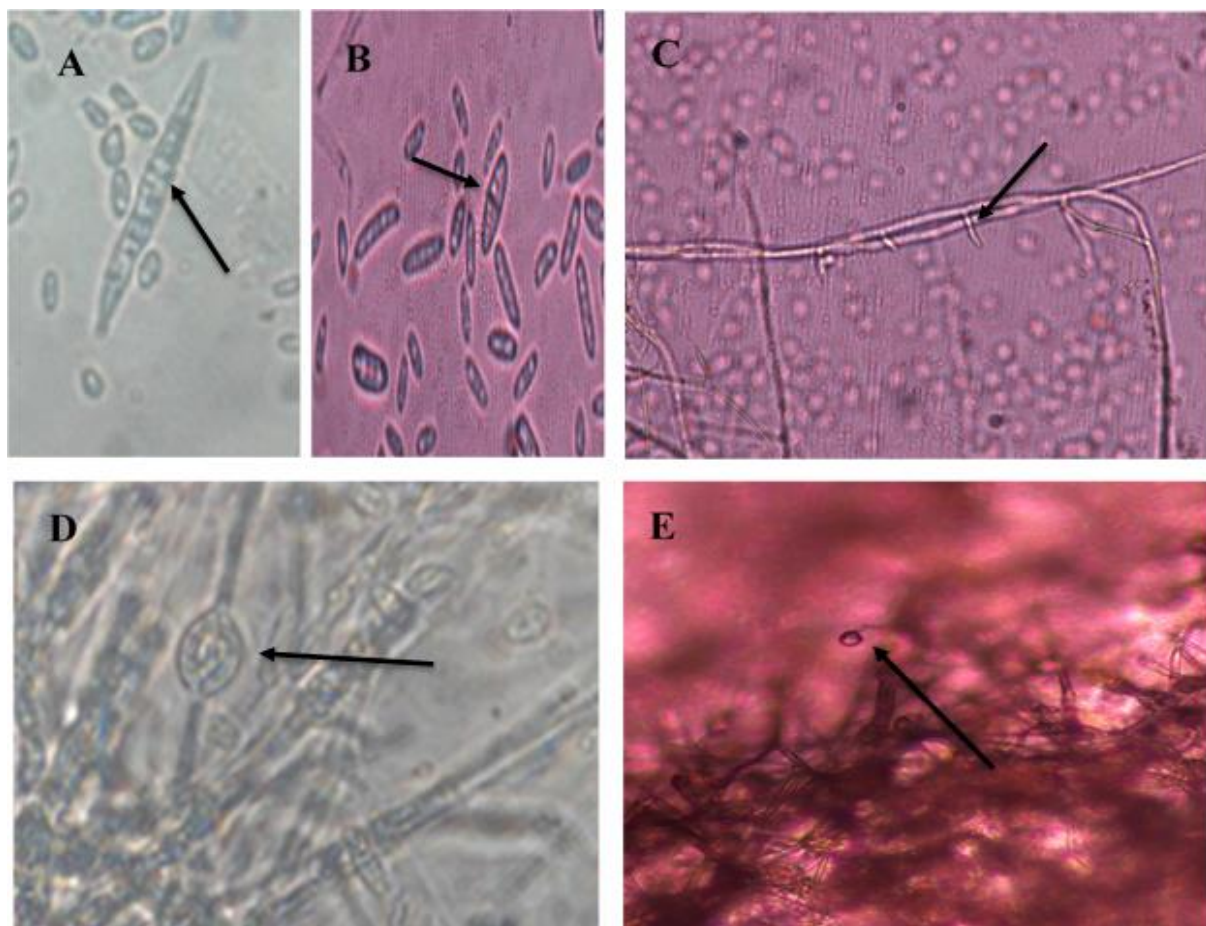


Figura 1. Estructuras morfológicas de *Fusarium oxysporum*. **A.** Macroconidio septado, con célula apical y basal alargada y ligeramente curvada. **B.** Microconidios ovales septados. **C.** Monofialides cortas. **D.** Clamidiosporas de pared lisa. **E.** Microconidios creciendo en falsas cabezas.

3.3. Caracterización molecular. Se pudo determinar que en la mayoría de aislamientos se obtuvo una buena cantidad de ADN, observando bandas claras e íntegras, de entre 260/ 280 (ng/0.5µg).

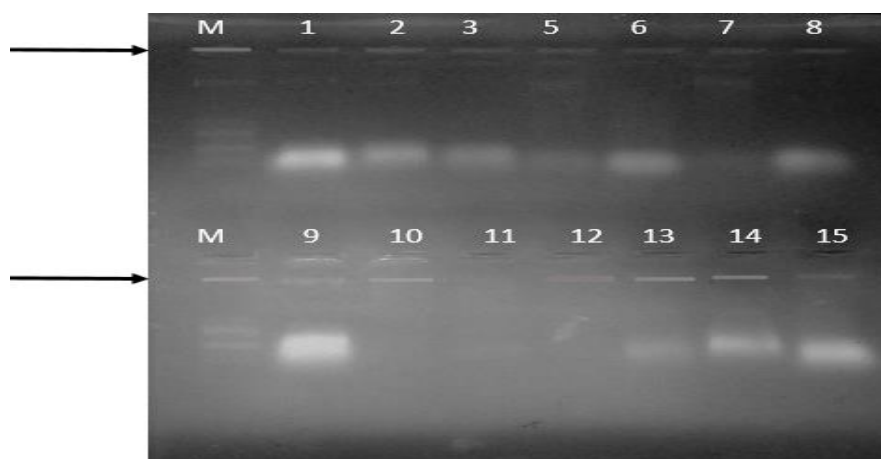


Figura 2. Gel de agarosa al 1.2 % en TBE 0.5X para determinar la presencia de ADN en los aislamientos de *Fusarium* evaluados (No. 1-15), (M) Marcador Lambda DNA, (Thermo scientific™).

3.3.1. Amplificación por PCR de la región ITS y TEF 1 α . La amplificación por PCR, con los cebadores ITS1 - ITS4 confirmaron la presencia de aislamientos del género *Fusarium* en los aislamientos evaluados, dando como resultado amplificados de aproximadamente 560 pares de bases (Figura 4). La región ITS es sin duda la más usada a nivel mundial para la amplificación y detección de hongos como *Fusarium* sp. El NCBI (2019) registra alrededor de 908145 secuencias de nucleótidos de las cuales 250764 corresponden a hospedantes de plantas. Encontrándose cerca de 3856 artículos publicados hasta la fecha. Sin embargo, el número de estos en los últimos cinco años se ha reducido debido a la introducción de nuevos primers que ofrecen mayor especificidad en los genes de interés (Salazar, 2016).

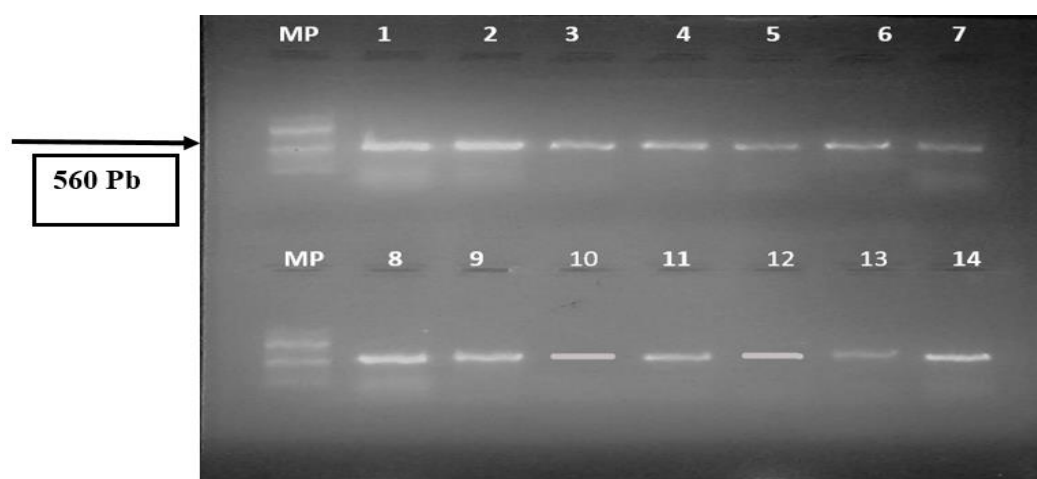


Figura 3. Gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X para determinar la amplificación de la banda de ITS 560 pb en los aislamientos evaluados. MP (Marcador de peso molecular 100pb ADN ladder, (Thermo scientific™). N (negativo) + (Positivo).

La amplificación por PCR, con los cebadores Ef1 α y Ef2 α presentaron como resultado amplificados de aproximadamente 700 pares de bases (Figura 5), siendo esta la banda esperada

para el género *Fusarium*. La región TEF-1 α posee un alto nivel de polimorfismo y genera una sola copia que permite encontrar información de gran utilidad filogenética a nivel de especie (O'Donnell *et al.*, 1998).

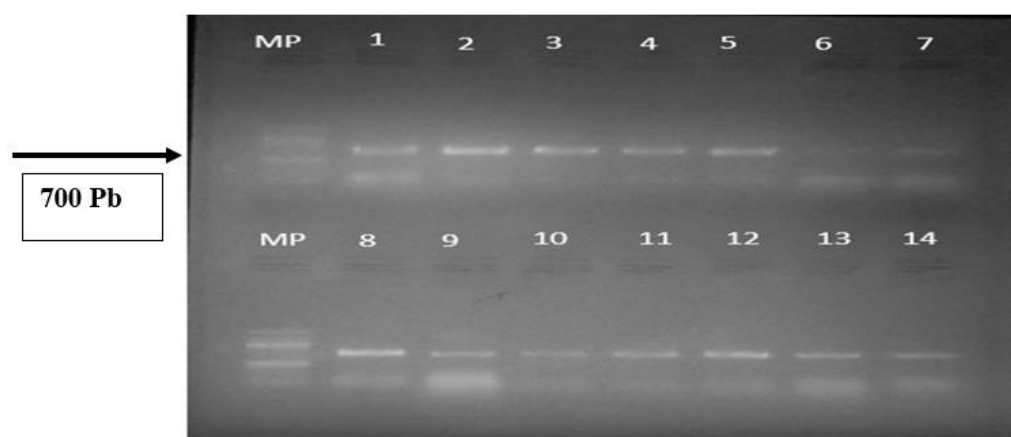


Figura 4. Gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X para determinar la amplificación de la banda de TEF-1 α a 700 pb en los aislamientos evaluados. MP. Marcador de peso molecular 100pb ADN ladder, (Thermo scientific™).

3.3.2. Secuenciación de la región ITS y TEF-1 α . Para la región ITS, se pudo identificar que los 34 aislamientos evaluados pertenecieron a *Fusarium oxysporum*. Se observó una coincidencia absoluta en 22 aislamientos con 100 % de identidad, 10 aislamientos presentaron un porcentaje mayor a 95% y dos aislamientos presentaron valores de 77 y 85 % de identidad.

El análisis de BLAST para la región TEF-1 α en los 34 aislamientos dio como resultado que todos pertenecieron a *Fusarium oxysporum*; de estos, se pudo determinar que 14 aislamientos presentaron forma especial *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae*. Se observó que 25 aislamientos presentaron un alto nivel de identidad con un porcentaje mayor a 98%, seis aislamientos tuvieron un porcentaje mayor a 95% y tres aislamientos presentaron valores de identidad de 85,90 y 91 % (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación a nivel de especie mediante análisis de porcentaje de similitud y código de acceso (según GenBank) de las secuencias obtenidas en la región ITS (espacio interno transcrito) y TEF-1 α (Factor de elongación de la traducción).

código	ITS	Accesión	%	TEF	Accesión	%
SP1	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK246922.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH582354.1	99
SP2	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK271759.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	JF332039.1	98

SP3	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK246922.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	JF332039.1	96
SP4	<i>Fusarium oxysporum</i>	MG251531.1	98	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	KX434919.1	99
SP5	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK212364.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH582354.1	97
SP6	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH752510.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	KU361438.1	99
SP7	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK246922.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	MF327628.1	90
SP8	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH221085.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH401561.1	99
SP9	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK246922.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	KY657530.1	99
SP10	<i>Fusarium oxysporum</i>	KY910856.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	EU091046.1	100
SP11	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH115588.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	JF332039.1	98
SP12	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK239978.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH172303.1	100
SP13	<i>Fusarium oxysporum</i>	MG975622.1	95	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	FJ985362.1	99
SP14	<i>Fusarium oxysporum</i>	LS479732.1	95	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH582353.1	99
SP15	<i>Fusarium oxysporum</i>	GQ121320.1	77	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	FJ985362.1	99
SP16	<i>Fusarium oxysporum</i>	KU982608.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	JF332039.1	100
SP17	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH913119.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	KX434919.1	99
SP18	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH115588.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	KX434919.1	99
SP19	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK246922.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH401561.1	99
SP20	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK212364.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	HQ731058.1	91
SP21	<i>Fusarium oxysporum</i>	MG798785.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH582354.1	97
SP22	<i>Fusarium oxysporum</i>	KX823406.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	EU091046.1	85
SP23	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK156696.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	KX215038.1	96
AN24	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK204578.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH119941.1	96
AN25	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK185381.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	KX434919.1	99
AN26	<i>Fusarium oxysporum</i>	MF280112.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	JF332039.1	99
AN27	<i>Fusarium oxysporum</i>	MG407704.1	96	<i>Fusarium oxysporum</i>	HQ731058.1	99
AN28	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH752510.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF794777.1	96
AN29	<i>Fusarium oxysporum</i>	JN859839.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	KX434919.1	99

GU30	<i>Fusarium oxysporum</i>	MG975622.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	KX434919.1	99
GU31	<i>Fusarium oxysporum</i>	MG975622.1	98	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	JF332039.1	98
GU32	<i>Fusarium oxysporum</i>	MG272267.1	85	<i>Fusarium oxysporum</i>	LS423229.1	99
GU33	<i>Fusarium oxysporum</i>	KT223907.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	MF327621.1	98
GU34	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH752510.1	100	<i>Fusarium oxysporum</i>	KY657530.1	98

3.3.3. Análisis filogenético de la Región ITS

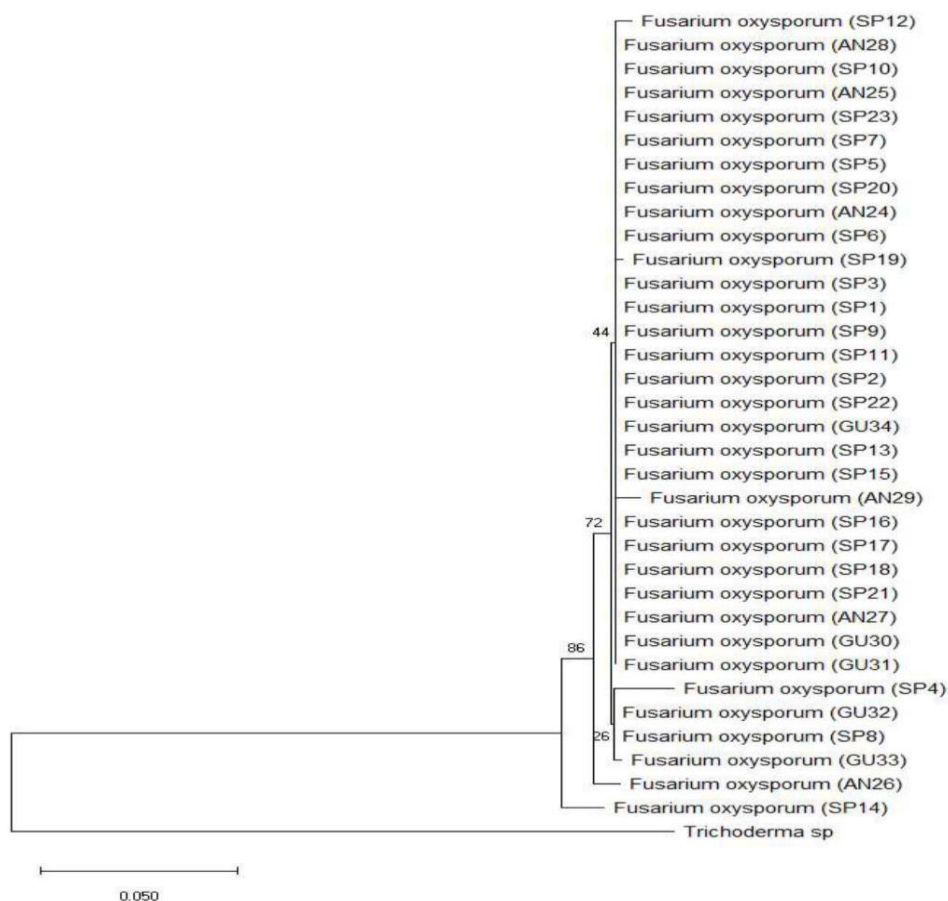


Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias de *Fusarium* con el primer ITS 1-ITS 4 (Espacio interno transcrito) usando el coeficiente de similitud de Neighbor joining NJ. El árbol se elaboró con un bootstrap de 1000 réplicas. (SP: San Pablo; AN: Ancuya; GU: Guaitarilla).

A partir del árbol generado se puede ver un grupo claramente diferenciado que corresponden a las especie *Fusarium oxysporum*. Además dentro de la especie existen cuatro subgrupos. En el subgrupo uno se encuentran los aislamientos (SP10, SP12, AN28, SP23, SP7, SP2, SP1, SP5, SP20, SP6, SP19, SP3, SP9, AN24, AN25, SP22, AN29, GU34, SP13, SP15, SP16, SP17, SP11, SP18, SP21, AN27, GU30 y GU31); en el subgrupo dos se encuentran los aislamientos (GU32, GU33, SP4 y SP8); en el subgrupo tres se encuentra el aislamiento (AN26) y en el

cuarto subgrupo aparece el aislamiento (SP14). También, se puede apreciar que en la primera parte del árbol se encuentran las mínimas distancias entre los aislamientos evaluados, mostrando una amplia similitud dentro del grupo, lo que indicó que la mayoría de estos provenían de un ancestro común debido a la homología de sus secuencias (Geisser *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Varón *et al.* (2009), donde llevaron a cabo una caracterización patogénica y molecular de aislamientos de *Fusarium* sp procedentes de plantas de granadilla con síntomas de secadera en el departamento del Huila, determinaron que la especie asociada a esta enfermedad correspondió a *Fusarium oxysporum*, siendo igual al resultado obtenido en esta investigación utilizando la región ITS.

3.3.4. Análisis filogenético de la Región de TEF 1 α

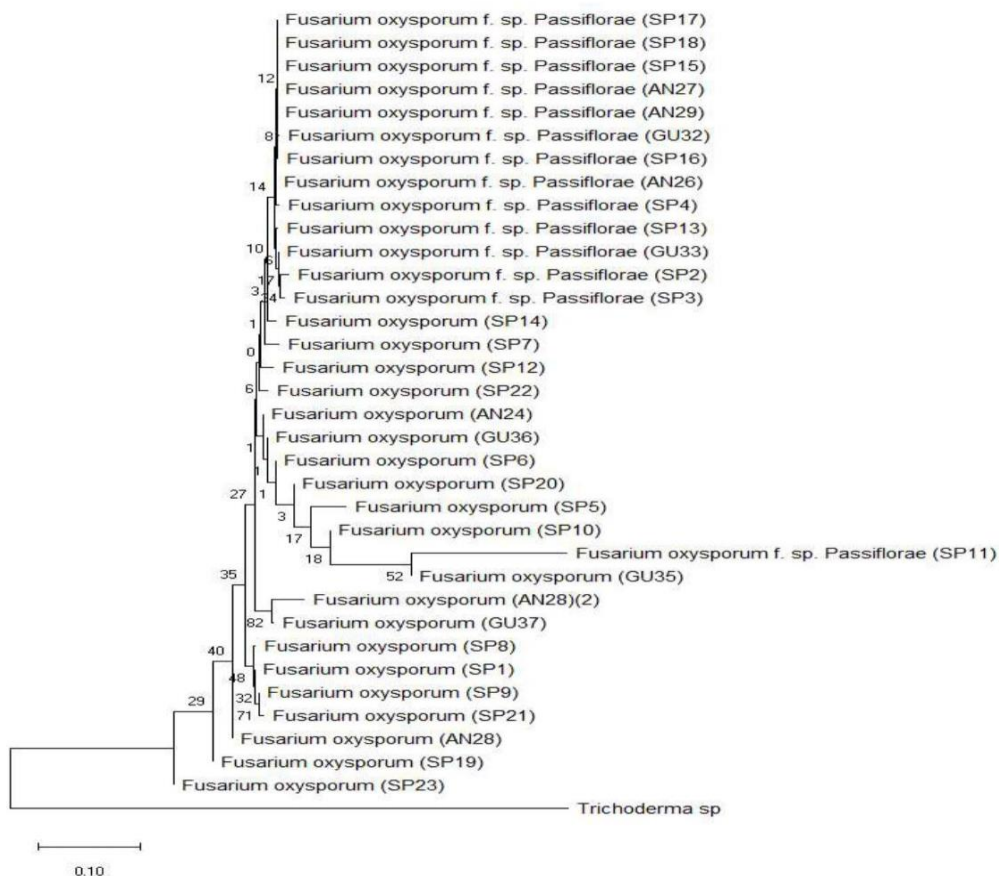


Figura 6. Árbol filogenético de las secuencias de *Fusarium* con el primer TEF-1 α (Factor de elongación de la traducción) usando el coeficiente de similitud de Neighbor joining NJ. El árbol se elaboró con un bootstrap de 1000 réplicas. (SP: San Pablo; AN: Ancuya; GU: Guaitarilla).

Se determinó que para el cebador TEF1 α , 14 aislamientos evaluados se clasificaron como *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (SP11, GU31, SP2, SP3, SP13, SP4, AN25, SP16, GU30, AN29, SP18, SP15, SP17, AN26), provenientes de los Municipios de Ancuya, San

Pablo y Guaitarilla y 20 como *Fusarium oxysporum* (SP9, SP21, SP8, SP1, SP23, SP19, AN27, GU33, AN24, SP6, AN28, GU34, SP22, SP5, SP10, GU32, SP20, SP7, SP12, SP14), provenientes de los Municipios de Ancuya, San Pablo y Guaitarilla.

Entre las secuencias de aislamientos de *F. oxysporum* evaluados se observó que existe poca diversidad dentro de este grupo, mostrándose una relación entre las especies que presentan la forma especial *Passiflorae*. Sin embargo, en este caso no se aprecia un agrupamiento con relación al origen geográfico donde fueron tomadas las muestras. La variabilidad entre la misma especie que se muestra en el árbol filogenético pudo deberse a que los diferentes aislamientos pertenecían a un origen filogenético o linaje diferente (Nelson *et al.*, 1994; Leslie *et al.*, 2006; O'Donnell *et al.*, 2008; Balajee *et al.*, 2009)

Los resultados de esta investigación concuerdan con lo reportado por Patiño *et al.*, 2015 quienes realizaron el diagnóstico del agente causal de la secadera en granadilla en Colombia, por medio de la secuenciación del espaciador intergénico (IGS) rDNA, obteniendo que las especies causantes de esta enfermedad fueron *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, siendo este último el de mayor ocurrencia en las muestras evaluadas.

Además, Londoño (2012), realizó la caracterización molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a la secadera de Maracuyá en el Valle del Cauca, obteniendo que *Fusarium oxysporum* estaba entre los causantes de esta enfermedad; mostrando además que dentro del grupo de *F. oxysporum*, se formaron otros subgrupos, lo cual demostró que existió una variabilidad intraespecífica. Se considera que la fuente de variabilidad para esta especie que no presenta reproducción sexual, estaría asociada con mutaciones. Este fenómeno le facilita al hongo la transferencia genética vía anastomosis de hifas y a su vez la presencia de elementos transposones; lo cual permite que con la reproducción asexual se establezcan linajes clonales dentro de la población (Jacobson y Gordon, 1991; Salazar, 2016). Los elementos transposones actúan como generadores de la diversidad debido a que su actividad produce mutaciones espontáneas y por consiguiente variabilidad en el genoma (McDonald *et al.*, 1992; Daboussi y Langin, 1994).

Fusarium oxysporum es un complejo de especies económicamente importante, porque causa daños a una amplia variedad de cultivos agrícolas (Baayen *et al.*, 2000). Se han descrito más de 150 formas especiales que se caracterizan por presentar propiedades fisiológicas que le otorgan la especialización patogénica a determinadas especies, géneros o grupos de plantas

(Arbeláez, 2000; Baayen *et al.*, 2000); por lo que se ha asumido que están altamente relacionadas y presentan morfología similar aún cuando pertenecen a diferentes grupos biológicos (Kistler, 1997; Alanís *et al.*, 2015).

Es así como el estudio de la biología de *F. oxysporum* es difícil al no poder distinguir formas especiales del hongo con criterios exclusivamente morfológicos y, por tanto, no poder definir qué es una población como tal dentro del complejo de especies *F. oxysporum* (Casado del Castillo, 2017). La combinación del concepto forma *specialis* con la definición tan amplia de *F. oxysporum* a nivel morfológico, ha hecho que durante mucho tiempo se haya considerado a cada forma especial como un grupo monofilético (Leslie y Summerell, 2006) con un único origen; sin embargo, trabajos recientes realizados con marcadores moleculares demuestran que especies con la misma forma especial presentan orígenes independientes (Alves-Santos *et al.*, 1999; Baayen *et al.*, 2000; Kistler y Benny, 1988; O'Donnell *et al.*, 1998). Las formas especiales, a su vez, se subdividen en razas en función de la capacidad patogénica sobre una serie de variedades de la planta huésped (variedades diferenciales). Asimismo, dentro de cada raza se clasifican las estirpes según el grado de virulencia mostrado frente al hospedador (Alves-Santos *et al.*, 2002; De Vega-Bartol *et al.*, 2011).

4. CONCLUSIONES

La especie *Fusarium oxysporum* fue el hongo aislado en los tres municipios productores de granadilla del departamento de Nariño y puede estar relacionado como el agente causal de la Secadera en granadilla, en su forma especial *Fusarium oxysporum* f. sp *Passiflorae*. Además las características morfológicas de los aislamientos se correlacionaron con las reportadas para esta especie.

El análisis filogenético permitió determinar que existió poca diversidad entre los aislamientos evaluados, no encontrándose ninguna variación en relación con el origen geográfico de las muestras. Esto pudo suceder debido al uso de un solo ecotipo entre los productores, denominada granadilla criolla.

Es necesario realizar pruebas de patogenicidad en todos los aislamientos obtenidos para determinar el grado de afectación que cada uno pueda tener en plantas de granadilla y verificar la virulencia.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, Y. (2013). Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium*. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.
- Alanís, I., Medina, C., Marbán, M. & Valadez, E. (2015). Técnicas moleculares clásicas para la diferenciación de formas especiales de *fusarium oxysporum*. *Rev. Méx. Mic.* 42:1-7.
- Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Monzón, A. & Mellado, E. (2008). Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:805–809.
- Alves-Santos, F., Benito, E., Eslava, A. & Díaz-Mínguez, J. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. environ. Microbiol.* 65: 3335–3340
- Alves-Santos, F., Ramos, B., García-Sánchez, M., Eslava, A. & Díaz- Mínguez, J. (2002). A DNA-based procedure for in plant a detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*. 92: 237–244.
- Analdex. (2016). Informe de exportaciones e importaciones de fruta 2016 dirección de asuntos económicos. Recuperada de: <http://www.analdex.org/wp-content/uploads/2016/02/2017-02-informe-exportaciones-e-importaciones-de-fruta-2016.pdf>.
- Arbeláez, T. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *fusarium* y de la especie *fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*. 17: 11-22.
- Baayen, R., O'Donnell, P., Bonants, E., Cigelnik, L., Kroon, E. & Roebroeck, C. (2000). Gene genealogies and AFLP analyses in *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and monophyletic formal specialis causing wilt and rot disease. *Phytopathology*. 90: 891-900.
- Casado del Castillo, V. (2017). Las funciones de FTF2 en *fusarium oxysporum*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología Departamento de Microbiología y Genética área: Genética Instituto hispano-luso de Investigaciones Agrarias.
- Baayen, R., O'Donnell, K., Bonants, P., Cigelnik, E., Kroon, L., Roebroeck, E. & Waalwijk, C. (2000). Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and no monophyletic formal specialis causing wilt and rot disease. *Phytopathology*. 90: 891–900
- Balajee, S., Borman, A., Brandt, M., Cano, J., Cuenca-Estrella, M. & Dannaoui, E. (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. Clin. Microbiol.* 47(4):877-84. doi: 10.1128/JCM.01685-08

Blast, (2019). Basic local alignment search tool of Ncbi). Recuperada de (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

Daboussi, M., Langin, T. (1994). Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Genética*. 93(1-3): 49-59.

De vega-Bartol, J., Martín-Domínguez, R., Ramos, B., García-Sánchez, M. & Díaz-Mínguez, J. (2011). New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: The expression of the gene coding for the transcription factor FTF1 correlates with virulence. *Phytopathology*. (4):470-9. doi: 10.1094/PHYTO-09-10-0252

Dubey, J., Rajendran, C., Ferreira, L., Kwok, O., Sinnett, D. & Majumdar, D. (2010). A new atypical highly mouse virulent *Toxoplasma gondii* genotype isolated from a wild black bear in Alaska. *J. Parasitol.* 96: 13–716.

Garcés de Granada, E., Orozco, M., Bautista, G. & Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta biol. Colomb.* 6(1): 7-25.

García, J., Chamorro, L., Floriano, J., Vera, L. & Segura, J. (2007). *Enfermedades y plagas del cultivo de la granadilla (Passiflora ligularis) en el departamento del Huila*. Tolima: Corpoica. 24 p.

Gómez, E. (2008). Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología.

Hebert, P., Cywinska, S. & Dewaard, J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / the royal society*. 270: 313–21.

Jacobson, D. & Gordon, T. (1991). *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. A case study of diversity within a forma specialis. *Phytopathology*. 81: 1064-1067.

Henao, E., Hernández, C., Salazar, C., Velasco, M. & Gómez, E. (2017). Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá, en el Valle del Cauca, Colombia. *Agron. Mesoam.* 29(1):53-61.

Kistler, H. & Benny, U. (1988). Genetic transformation of the fungal plant wilt pathogen, *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* 13: 145–149.

Landlinger, C., Bašková, L., Preuner, S., Willinger, B., Buchta, V. & Lion, T. (2009). Identification of fungal species by fragment length analysis of the internally transcribed spacer 2 region. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.* 28: 613-622.

Leslie, F. & Summerell, B. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Published, blackwell. Manhattan, United States of America. 387 p.

Lin, C., Koval, A., Tishchenko, S., Gabdulkhakov, A., Tin, U., Solis, G.P., Katanaev, V.L. (2014). Double Suppression of the α Protein Activity by RGS Proteins. *Mol. Cell* 53: 663-671.

Londoño, J. (2012). Evaluación de la resistencia genética de especies de *Passiflora* spp a *Fusarium* spp, agente causal de la “secadera”. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Trabajo de grado para optar al título de: magíster en ciencias agrarias énfasis protección de cultivos. Palmira, Valle del Cauca.

López, D. & López, M. (2004). Influencia del pH y de los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del género *Fusarium* en Cuba. Instituto de investigaciones de sanidad vegetal, ciudad de la Habana, cp. 11600.

Marmolejo, D. (2008). Una metodología no invasiva para la extracción de ADN de *Coryphaena hippurus*. Universidade estadual norte fluminense darcy ribeiro (uenf), av. Alberto Lamego, (2000). Parque Califórnia, campos dos Goytacazes, rio de janeiro, Brasil.

Caetano, B., Selvaraj, J, Marmolejo, D, Muñoz, J. & Guzmán, A. (2015). Una Metodología No Invasiva Para La Extracción De Adn De *Coryphaena Hippurus*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 44(2): 395-399.

McDonald, F., Porras, V., Sánchez, J., Mignucci, J., Torres, L., Hepperly, P. R. & Clarke, A. (1992). Diseases of economic importance in citrus (grapefruit) and avocado. Recuperado de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=iicacr.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=018605>

Melgarejo, L. & rodríguez-castillo, N. (2015). Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss): caracterización ecofisiológica del cultivo. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá). Facultad de Ciencias. Colciencias: corporación centro de desarrollo tecnológico de las pasifloras de Colombia, cepass. 304 p.

MinAgricultura - Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural de Colombia. (2018). Análisis, estadísticas, granadilla. Recuperado de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>

Nelson. P., Toussoun, T. & Marasas, W. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State: University Press, University park. 30.

Nelson, P., Dignani, M. & Anaissie, E. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Rev. Clin. Microbial.* 7 (4): 479-504.

NCBI-National center for biotechnology information. (2019). Nucleotide. Recuperado de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>

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. *Rev. Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2044-2049

O'Donnell, K., Kistler, H., Tacke, B. & Casper, H. (2008). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 97 (14): 7905-7910. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.130193297>

Ortega, M., Morales, V. & García, S. (2008). Cultivos monospóricos de hongos micorrízicos arbusculares. En: Álvarez-Sánchez. J. (Comps.), *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y su implicación de la restauración*, pp. 69-83. México: Facultad de Ciencias, Unam.

Ortiz, H. (2012). Etiología de enfermedades asociadas a fusariosis en el cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz. Trabajo de investigación para optar el título de magister en ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 108p.

Osorio-Gutiérrez, L. A. & Castaño-Zapata, J. (2011). Caracterización del agente causante de la Pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* Linneo), enfermedad endémica en el municipio de Manizales-Caldas (Colombia). *Agronomía*, 19(2): 33-43.

Patiño, M., Pérez, O. & Arbeláez, G. (2015). Diagnóstico del agente causal de la “Secadera” en granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) en Colombia. Recuperado de <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/volumen332015/resumenesposters.pdf>.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution.* 16:111-120.

Kistler, H. (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology.* 87: 474-479.

Retana, K., Ramírez-Coché, J., Castro, O. & Blanco-Meneses, M. (2017). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en costa rica. 42(1): 115-126.

Rivera, B., Miranda, D., Avila, A. & Nieto, A. (2002). *Manejo integral del cultivo de la granadilla (Passiflora ligularis Juss.)*. Manizales, Colombia, Manizales, Colombia: editorial litoas, 130 p.

Rodríguez, H. (2013). Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. Obtenidos de zonas productoras de uchuva (*Physalis peruviana*) en Cundinamarca y Boyacá. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, escuela de posgrado. Bogotá, Colombia.

Sampietro, D., Marín, P., Iglesias, J., Presello, D., Vattuone, M. & Catalan, C. (2010). A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. Fungal. Biol. 114:74-81. en: Acevedo, Y. (2013). Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas. Tesis de maestría. Facultad de ciencias. Universidad nacional de Colombia, sede Medellín.

Salazar, C. (2016). Caracterización molecular y morfológica de aislamientos de *Fusarium* spp. productores de micotoxinas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Salazar, C., Serna, L. & Gomez, E. (2016). Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Revista Agronomía Mesoamericana*. 27(2):277-285.

Tamayo, P. (1999). Estudio para el control de la secadera (*Nectria haematococca* Berk. & Br.) de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.): Evaluación de patrones existentes y prácticas de manejo integrado: informe técnico. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordid=co20030009164>

Tamayo, P. (2001). “*Meloidogine incógnita* en granadilla”. Disponible en: Manejo fitosanitario del cultivo de la granadilla (*Passiflora ligularis*) medidas para la temporada invernal. Bogotá D.C. Recuperado de <http://www.ica.gov.co/getattachment/ee408b8b-fd44-4cca-bf0b-44b6c34972e9/-nbspm;manejo-fitsanitario-del-cultivo-de-granadil.aspx>.

The online aduction color chart. (2004). The new language of color for buyers and sellers. (Palo alto, calif: Online aduction color chart co., ©2004).

Varón, E., Santos, O., Vera, A. & Salamanca, J. (2009). Problemas fitosanitarios de secadera y mosca de los botones florales en el cultivo de la granadilla. Nataima Espinal, Tolima: Corpoica y Colciencias.

White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc.

Wulff, E., Sorensen, J., Lübeck, M., Nielsen, K., Thrane, U. & Torp, J. (2010). *Fusarium* spp. associated with rice bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environ. Microbiol.* 12:649-657.

6. ANEXOS

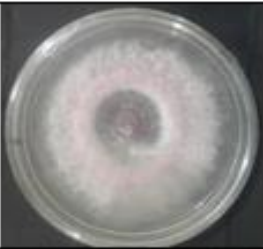
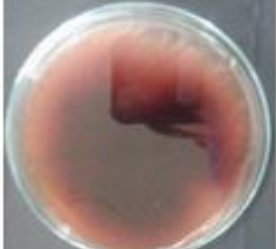
Anexo 1. Aislamientos obtenidos de plantas de Granadilla con síntomas de la enfermedad conocida como secadera.

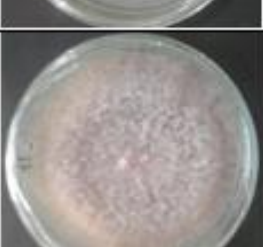
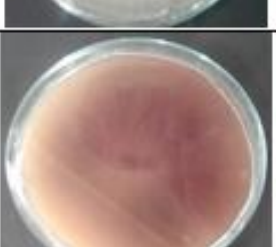
Número aislamiento	código Aislamiento	Municipio	Vereda	Georreferenciación	Altura (msnm)
2	SP1	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'56.76'' -W 77°1'24.74''	2052
3	SP2	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'55.84'' -W 77°1'23.17''	2052
4	SP3	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'56.25'' -W 77°1'25.14''	2052
6	SP4	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'57.84'' -W 77°1'22.13''	2052
7	SP5	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'56.22'' -W 77°1'28.36''	2052
8	SP6	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'57.45'' -W 77°1'32.27''	2052
9	SP7	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'51,52'' - W 77°1'42.23''	2052
10	SP8	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'51,13'' - W 77°1'42.72''	2052
11	SP9	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'50,02'' - W 77°1'43.58''	2052
12	SP10	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'51,86'' - W 77°1'43.21''	2052
13	SP11	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'50,31'' - W 77°1'42.23''	2052
14	SP12	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'51,14'' - W 77°1'42.13''	2052
15	SP13	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'50,73'' - W 77°1'43.44''	1910
16	SP14	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'51,62'' - W 77°1'43,36''	1910
17	SP15	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'51,75'' - W 77°1'42.05''	1910
18	SP16	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'50,84'' - W 77°1'42.19''	1910
19	SP17	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°40'51,32'' - W 77°1'42.28''	1910
20	SP18	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°41'09,54'' - W 77°00'48.81''	1910
22	SP19	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°41'10,01'' - W 77°00'49.67''	1910
23	SP20	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°41'09,14'' - W 77°00'48.96''	1910
24	SP21	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°41'10,52'' - W 77°00'49.74''	1910

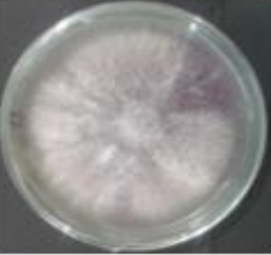
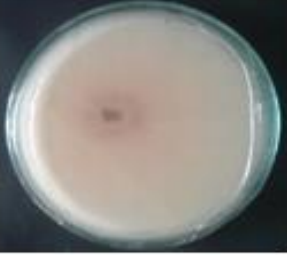
25	SP22	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°41'10,63'' - W 77°00'48.81''	1910
26	SP23	San Pablo	Alto de la Playa	N 1°41'09,54'' - W 77°00'49.56''	1910
28	AN24	Ancuya	Indo	N 1°12'43.55'' -W 77°32'47.20''	2024
29	AN25	Ancuya	Indo	N 1°12'43.55'' -W 77°32'47.20''	2024
30	AN26	Ancuya	Indo	N 1°12'43.55'' -W 77°32'47.20''	2024
32	AN27	Ancuya	El collal	N 1°13' 02.65'' -W 77°32'28.42''	2278
33	AN28	Ancuya	El collal	N 1°13' 02.65'' -W 77°32'28.42''	2278
34	AN29	Ancuya	El collal	N 1°13' 02.65'' -W 77°32'28.42''	2278
36	GU30	Guaitarilla	El Paramillo	N 1°9'30.75'' -W 77°29'1.54''	2221
38	GU31	Guaitarilla	El Paramillo	N 1°9'30.75'' -W 77°29'1.54''	2221
41	GU32	Guaitarilla	San Alejandro	N 1°9'36.23'' -W 77°30'10.18''	2219
42	GU32	Guaitarilla	San Alejandro	N 1°9'36.23'' -W 77°30'10.18''	2219
43	GU34	Guaitarilla	San Alejandro	N 1°9'36.23'' -W 77°30'10.18''	2219

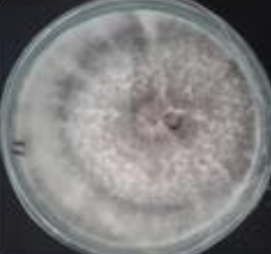
Anexo 2. Caracterización morfológica de los aislamientos evaluados, de acuerdo a su pigmentación del micelio, comparado con el catálogo de colores The online Aduction Color Chart® 2004.

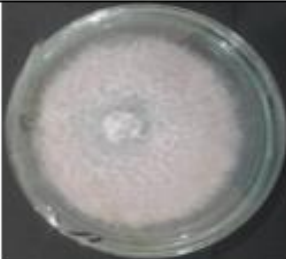
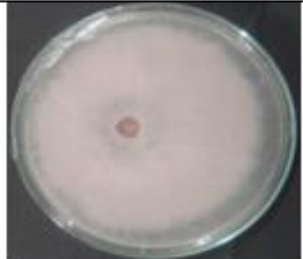
Numero aislamiento	Código	Anverso	Reverso	Imagen Anverso	Imagen Reverso
2	SP1	oac436 oac909	ac839 oac853		
3	SP2	oac404	oac412		
4	SP3	oac450 oac909	oac432		

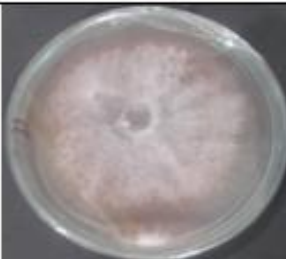
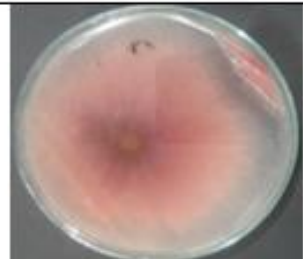
6	SP4	oac909 oac443	oac909 oac445		
7	SP5	oac435	oac436		
8	SP6	oac909 oac607	oac523		

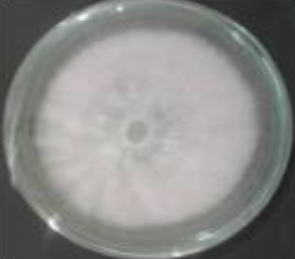
9	SP7	oac909	oac484		
10	SP8	oac909 oac443	oac909 oac498		
11	SP9	oac909 oac456	oac909 oac457		

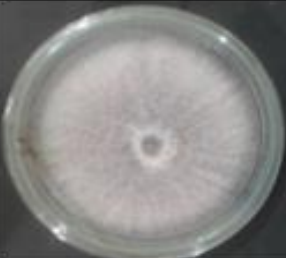
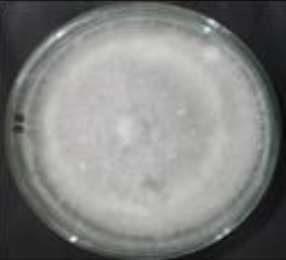
12	SP10	oac909	oac909 oac434		
13	SP11	oac909 oac449	oac440		
14	SP12	oac909	oac441 oac522		

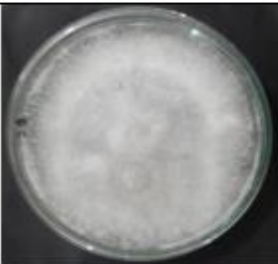
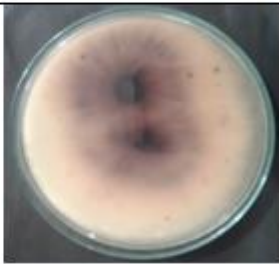
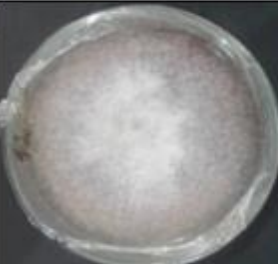
15	SP13	oac909	oac442 oac635		
16	SP14	oac812 oac618	oac600		
17	SP15	oac909 oac443	oac441		

18	SP16	oac909 oac443	oac909 oac449		
19	SP17	oac443	oac444		
20	SP18	oac443	oac909 oac435		

22	SP19	oac513	oac503		
23	SP20	oac909	oac909 oac441		
24	SP21	oac909 oac477	oac464		

25	SP22	oac909	oac909 oac435		
26	SP23	oac445	oac442		
28	AN24	oac909	oac406 oac909		
29	AN25	oac443	oac442		
30	AN26	oac445	oac522		
32	AN27	oac909 oac566	oac567		

33	AN28	oac909	oac432		
34	AN29	oac909	oac909 oac449		
36	GU30	oac909 oac445	oac442 oac909		

38	GU31	oac909	oac397 oac634		
41	GU32	oac909	oac441 oac856		
42	GU33	oac909	oac525		
43	GU34	oac909	oac442		

Anexo 3. Tasa de crecimiento radial de las muestras evaluadas.

Código aislamiento	Crecimiento radial (mm)/ día 3	Crecimiento radial (mm)/ día 4	Crecimiento radial (mm)/ día 5	Crecimiento radial (mm)/ día 6	Crecimiento radial (mm)/ día 7	Crecimiento radial (mm)/ día 8	Diámetro Crecimiento día 4-3	Diámetro crecimiento día 6-5
SP1	40	55,3	63	77,4	85	87	15,3	14,4
SP2	42	57,7	65,7	79,5	82,5	90	15,7	13,8
SP3	39,8	56	60,7	74	86	89	16,2	13,3
SP4	38	52,6	64	76,8	86,5	87,5	14,6	12,8
SP5	40	56	60	73	84	89,5	16	13
SP6	39	58,7	62,3	75	85,7	87	19,7	12,7
SP7	42	56	60,3	73,2	87	92	14	12,9
SP8	43	56,7	65,8	79,3	86,7	90	13,7	13,5
SP9	43	55,6	63	78,6	88,7	91	12,6	15,6
SP10	45	58,9	68	81,5	82,5	86,5	13,9	13,5
SP11	43	57	64	77,6	89	90	14	13,6
SP12	42	55,7	64,5	79	78	85	13,7	14,5
SP13	39	53,4	60,8	74	86,5	90	14,4	13,2
SP14	45	65,2	74	88	86	90,5	20,2	14
SP15	43,0	58	65	79,6	90	92	15	14,6
SP16	43	58,2	66	79	88,6	91	15,2	13
SP17	43	55,6	65,4	77,8	89	91	12,6	12,4
SP18	44	58,6	60,6	74	86	89	15	13,4
SP19	43	54	63,6	73,8	77	88,6	11	10,2
SP20	40	53,1	64	72,5	80	87,5	13,1	8,5
SP21	39,4	50,6	63,2	74,2	85,2	89	11,2	11
SP22	45	56	64,3	75,1	86	90,4	11	10,8
SP23	41	58,8	67	79,8	86	91,5	17,8	12,8
AN24	43	54,2	62	73,7	85,6	87,6	11,2	11,7
AN25	38	52	64,9	78	89	90,2	14	13,1
AN26	43	54,6	67,8	78,4	88,7	89	11,6	10,6
AN27	44,6	59	78	90	92	92	14,4	12
AN28	42	56	75,6	88,6	92	92	14	13
AN29	42	55,8	66	78,6	89,6	90	13,8	12,6
GU30	40	54,8	66	80,5	87,6	92	14,8	14,5
GU31	42	57	70	84	88,6	91,5	15	14
GU32	45	57,4	68	80,6	90	92	12,4	12,6
GU33	42,7	57,2	69,6	86,9	92	92	14,5	17,3

GU34	42	57	69	84,5	90	92	15	15,5
-------------	----	----	----	------	----	----	----	------