

**Evaluación de la presencia entre generaciones  
de los genes SIX (secretado en xilema) en  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

**Álvaro Josué Bautista Flores  
Andrea Karina Suazo Tejada**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras  
Noviembre, 2020**

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Álvaro Josué Bautista Flores**  
**Andrea Karina Suazo Tejada**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2020

# Evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Presentado por:

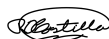
Álvaro Josué Bautista Flores  
Andrea Karina Suazo Tejada

Aprobado:



---

Carolina Avellaneda, Ph.D.  
Asesora Principal



---

Rogel Castillo, M.Sc.  
Director  
Departamento de Ciencia y Producción  
Agropecuaria



---

Raphael Colbert, Ph.D.  
Asesor



---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Vicepresidente y Decano  
Académico

## **Evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

**Álvaro Josué Bautista Flores  
Andrea Karina Suazo Tejada**

**Resumen.** El tomate es una de las hortalizas más importantes en el mundo, siendo afectada severamente por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El estudio del proteoma de la savia del xilema es de vital importancia, ya que determina la presencia de los genes de avirulencia, llamados genes SIX (secretados en xilema). El objetivo de este estudio fue, evaluar la presencia de los genes SIX1 y SIX3 a través de la generación madre, primera generación y segunda generación de siete aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. El total de aislamientos en todas las generaciones fue de 168. Se extrajo ADN y se evaluó la presencia de los genes a través de PCR con el uso de primers específicos para cada gen. Se realizaron mapas de calor para obtener un análisis visual de datos de la expresión génica del hongo en los aislamientos. Se demostró que existe un fenómeno de presencia y ausencia de genes SIX entre generaciones, así como diferencias en morfología. Se determinó que el fenómeno está sucediendo con mayor proporción en el gen SIX1 y en menor proporción en el gen SIX3. La causa de este fenómeno de presencia y ausencia de genes SIX entre generaciones, está ligada a su ubicación en el cromosoma 14 del genoma de *Fusarium oxysporum*, el cual es transferido horizontalmente. Sin embargo, es recomendado secuenciar el producto de la PCR, para obtener un factor preciso que determine la causa de este fenómeno.

**Palabras clave:** ADN, genoma, patogenicidad, primers, virulencia.

**Abstract.** Tomato is one of the most important vegetables in the world, being severely affected by the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The study of the xylem sap proteome is of vital importance, since it determines the presence of avirulence genes, called SIX genes (secreted in xylem). The objective of this study was to evaluate the presence of the SIX1 and SIX3 genes through the mother generation, first generation and second generation of seven isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and an isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. The total of isolates in all generations was 168 isolates. DNA was extracted and the presence of the genes was evaluated through PCR with the use of specific primers for each gene. Heat maps were made to obtain a visual analysis of data on the gene expression of the fungus in the isolates. It was demonstrated that there is a phenomenon of presence and absence of SIX genes between generations, as well as differences in morphology. It was determined that the phenomenon is occurring with a higher proportion in the SIX1 gene and to a lesser extent in the SIX3 gene. The cause of this phenomenon of presence and absence of SIX genes between generations is linked to their location on chromosome 14 of the *Fusarium oxysporum* genome, which is transferred horizontally. However, it is recommended to sequence the PCR product, to obtain a precise factor that determines the cause of this phenomenon.

**Key words:** DNA, genome, pathogenicity, primers, virulence.

## ÍNDICE GENERAL

Portadilla.....	i
Página de Firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Índice General .....	iv
Índice de Cuadros y Figuras y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>4. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>21</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>23</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , del banco de aislamientos del Laboratorio de Fitopatología en el Centro de Investigación y Educación de la Costa del Golfo de la Universidad de Florida (GCREC) usados para evaluar la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema).....	4
2. Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> de la generación madre.....	4
3. Reactivos utilizados en el protocolo de extracción de ADN.....	6
4. Contenido para la preparación de muestras procesadas por PCR.....	6
5. Contenido y función del GoTaq o máster mix.....	6
6. Temperaturas utilizadas en el termociclador para los primers ITS4/ITS5, en el estudio evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	7
7. Temperaturas utilizadas en el termociclador para los primers SIX1 FR/ SIX 3 FR, en el estudio evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	7
8. Primers utilizados en el estudio evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	14

Figuras	Página
1. Crecimiento de aislamiento 1369 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , generación 2 en PDA con Tetraciclina.....	9
2. Crecimiento de aislamiento 3408 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , generación 2 en PDA con Tetraciclina.....	10
3. Producto de PCR, cargada en gel. Resultados gen ITS, presencia de ADN en las 168 muestras de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	11
4. Producto de PCR, cargada en gel. Resultados gen SIX1, presencia de ADN en las 168 muestras de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	12
5. Producto de PCR, cargada en gel. Resultados gen SIX3, presencia de ADN en las 168 muestras de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	13
6. Representación gráfica por medio de un mapa de calor del cambio generacional de presencia de genes en aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> de la generación madre. El eje X corresponde a los genes estudiados, mientras que el eje Y corresponde al código del aislamiento de dicha generación. El color azul turquesa indica la presencia de los genes en los aislamientos, mientras que el color marrón indica la ausencia.....	15

7. Representación gráfica por medio de un mapa de calor del cambio generacional de presencia de genes en aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de la primera generación. El eje X corresponde a los genes estudiados, mientras que el eje Y corresponde al código del aislamiento de dicha generación. El color azul turquesa indica la presencia de los genes en los aislamientos, mientras que el color marrón indica la ausencia..... 16
8. Representación gráfica por medio de un mapa de calor del cambio generacional de presencia de genes en aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de la segunda generación madre. El eje X corresponde a los genes estudiados, mientras que el eje Y corresponde al código del aislamiento de dicha generación. El color azul turquesa indica la presencia de los genes en los aislamientos, mientras que el color marrón indica la ausencia..... 17

Anexos

Página

1. Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* de la primera generación..... 23
2. Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* de la segunda generación..... 24

# 1. INTRODUCCIÓN

El tomate es considerado una de las hortalizas más importantes en el mercado con mayor valor económico, botánicamente el tomate es un fruto y es consumido como una hortaliza vegetal. Anualmente, se cultivan alrededor de tres millones de hectáreas de tomate en el mundo logrando una producción de 86 toneladas al año (FHIA 2018). Honduras ha logrado rendimientos de producción de 31 t ha<sup>-1</sup> de tomate (FHIA 2018). El cultivo muestra enormes oportunidades de crecimiento, ya que las nuevas tendencias de consumo de productos frescos permiten que su expansión por el mercado sea de manera acelerada. Además, es considerada una hortaliza con altos contenidos de antioxidante licopeno y vitamina A (Luna-Guevara y Delgado-Alvarado 2014). Una de las limitantes que presentan los productores es el ataque de plagas y enfermedades, como ser el ataque por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Los hongos fitopatógenos son causantes de una variedad de daños a los cultivos, causando grandes pérdidas económicas para los agricultores. Las pérdidas económicas a causa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* son del 21% hasta el 47% (Cardona-Piedrahita y Castaño-Zapata 2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es un hongo ascomiceto que vive en el suelo en forma de clamidosporas, contribuye al marchitamiento vascular del tomate (Vásquez y Castaño-Zapata 2017). El hongo tiene tres razas conocidas, estas se diferencian entre sí por su patogenicidad, que le confieren genes de resistencia específicos de cada raza (Srinivas *et al.* 2019). El hongo penetra las raíces de las plantas y coloniza todo el tejido vascular. Por lo tanto, al dañar el tejido vascular existe una coloración color marrón que se extiende hasta el ápice de la planta. Los síntomas de la enfermedad en la planta aparecen en las hojas inferiores. El hongo produce atrofia de los tejidos causando marchitamiento severo y senescencia, siendo estos los principales síntomas (Srinivas *et al.* 2019). Al ser un hongo que vive en el suelo su manejo y control se vuelve más difícil. Actualmente, una de las principales alternativas de control de este hongo es el uso de variedades resistentes, uso de químicos y rotación de cultivos (Seebold 2014).

Los síntomas son muy variables ya que son causados por una serie de actividades fisiológicas de la planta al ser inoculada por el hongo, dentro de estos se destacan, la acumulación de micelios en y alrededor del xilema, la producción de micotoxinas y tilides (Srinivas *et al.* 2019). El hongo se puede propagar por el uso de semillas contaminadas, residuos de plantas infectadas, maquinaria, agua y viento (Seebold 2014). Adicionalmente, existen condiciones ambientales que favorecen la reproducción del hongo como los climas cálidos, suelos con baja capacidad de drenaje y suelos ácidos con pH de 5 a 5.6 (Seebold 2014).

Se han realizado muchos estudios para conocer el comportamiento del hongo por medio del proteoma de la savia del xilema, ya que la patogenicidad del hongo está definida por enzimas y proteínas del xilema. También se conoce que la variabilidad del hongo se debe a regiones específicas que son ricas en elementos transponibles, genes relacionados a patogenicidad como ser los efectores y factores de virulencia (Ma *et al.* 2010). Algunas enzimas como la tomatinasa, metaloproteasa y serina proteasa contribuyen a la patogenicidad (de Sain y Rep 2015). El hongo, así como produce enzimas, también produce productos proteicos que son liberados durante la infección de las células huésped, son proteínas producidas en el xilema, estas proteínas son codificadas por los genes SIX por sus siglas en inglés “Secreted in xylem” (Schmidt *et al.* 2016).

Actualmente, hay 14 genes SIX que han sido identificados (Houterman *et al.* 2009). Es importante mencionar, que se encuentran presentes en varias razas de *Fusarium oxysporum* (Taylor *et al.* 2016). Los genes SIX1 y SIX3, son parte de los genes en los cuales los loci están presentes en zonas específicas que son ricas en elementos transponibles y codifican para factores de virulencia (Houterman *et al.* 2009).

Para la patogenicidad del *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* se requiere de los genes codificadores SIX, que confieren la capacidad al hongo de producir enfermedad en la planta y las proteínas que también han sido identificadas por el gen de resistencia(R) al hongo estén presentes en el tomate (Srinivas *et al.* 2019). Se ha demostrado que los genes SIX1, SIX3, SIX5 y SIX6 son necesarios para conferir una virulencia completa del hongo (Gawehns *et al.* 2015). En este caso se estudiaron los genes SIX1(Avr 3), SIX 3 (Avr2), las proteínas SIX también son conocidas como proteínas de avirulencia (Avr) (Takken y Rep 2010). Se han empleado métodos moleculares para el estudio del hongo, pero no han resultado muy confiables, por lo tanto, se ha demostrado que el estudio de la presencia de los genes SIX forma la base para la identificación de las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El SIX1, codifica para una proteína rica en cisteína es de gran importancia su estudio ya que ha demostrado ser esencial que esté presente para que el *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cause virulencia (Selim y El-Gammal 2015). El SIX3, así como el SIX1 codifica proteínas que se secretan en la savia del xilema y la presencia o ausencia de estos genes puede contribuir a la virulencia del hongo, y así al marchitamiento de la planta por la colonización fúngica (Srinivas *et al.* 2019). Por tal razón, varios centros de investigación consideran de vital importancia el reconocimiento de estos genes.

En conjunto con investigadores del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación y Educación de la Costa del Golfo de la Universidad de Florida, se observó un fenómeno en ocho aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El fenómeno consistió en que a través de las generaciones del hongo estos aislamientos mostraban una variabilidad en la presencia y ausencia de los genes SIX 1 y SIX3. Este estudio permite establecer el comportamiento de estos genes para así comprender mejor la biología del hongo. Además, conociendo el comportamiento y la biología del hongo fitopatógeno se logrará obtener mejores resultados en el mejoramiento de plantas resistentes a las razas del hongo. Siendo esta la primera evaluación del comportamiento de la presencia de los genes SIX a través de generaciones en los mismos aislamientos.

El objetivo de este proyecto fue determinar la presencia de genes SIX1 y SIX3 (secretado en xilema) entre generaciones madre, primera y segunda de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a través de PCR.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología en el Centro de Investigación y Educación de la Costa del Golfo de la Universidad de Florida, ubicada en la ciudad de Balm que se encuentra en el sur del condado de Hillsborough, Florida, Estados Unidos.

### Experimento 1. Aislamientos entre generaciones y extracción de ADN

Se realizó el estudio de siete aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y uno de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* previamente recolectados en varias zonas de Estados Unidos (Cuadro 1). Cada aislamiento se realizó en medio de cultivo Agar Agua con Estreptomicina y PDA con Tetraciclina, para poder identificar el medio en el cual la recolección de esporas resultase más efectiva. Se utilizó el crecimiento del plato de Agar Agua con Estreptomicina para lograr una buena práctica de recolección de esporas por línea con el palillo de madera. Una vez se recolectaron las esporas de cada aislamiento, haciendo un movimiento de línea se sumergió el palillo de madera en un tubo Eppendorf con 25  $\mu$ L de agua destilada estéril. Posteriormente, para cada suspensión de esporas provenientes de los ocho aislamientos, se colocó en un plato Petri con medio PDA con Tetraciclina 25  $\mu$ L de la suspensión de esporas y se empleó un esparcidor desechable para cada aislamiento, se dejó crecer por dos días.

**Desarrollo de la generación madre.** Los cultivos de la suspensión de esporas, luego de dos días mostraron un crecimiento, por cada plato se tomó una única espora de cada aislamiento y se aisló cada espora en platos Petri en medio PDA con Tetraciclina. Se obtuvo el crecimiento de ocho nuevos platos Petri, siendo estos la generación madre. A cada aislamiento de única espora se le asignó una identificación de inventario para el respaldo guardado en agua y glicerol 30%, y un nombre específico para cada plato Petri (Cuadro 2). Se esperó cinco días hasta que el micelio del hongo cubriera todo el plato Petri y se extrajo ADN, se colocó el micelio en microtubos con microesferas de vidrio y 500  $\mu$ L de Buffer de extracción. Luego de la extracción de ADN se realizó un aislamiento del hongo en Agar Agua, una vez creció cada aislamiento se realizó la toma de esporas con el palillo de madera, se sumergió el palillo en un tubo Eppendorf con un volumen de 25  $\mu$ L de agua destilada estéril. Posteriormente, para cada suspensión de esporas de los ocho aislamientos, se colocó en un plato Petri con medio PDA con Tetraciclina, 25  $\mu$ L de la suspensión de esporas y se utilizó un esparcidor desechable para cada aislamiento, se dejó crecer por dos días.

Cuadro 1. Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, del banco de aislamientos del Laboratorio de Fitopatología en el Centro de Investigación y Educación de la Costa del Golfo de la Universidad de Florida (GCREC) usados para evaluar la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema).

Aislamiento	Especie	Raza	Lugar de recolección
1309	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	FCR	Florida
2947	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	3	UC Davis, CA
2976	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	3	Florida
1369	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	3	Florida
2959	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	3	Louisiana
2975	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	2	Arkansas
2999	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	3	Florida
3408	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	3	Florida

Cuadro 2. Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* de la generación madre.

Identificación de inventario	Nombre plato en crecimiento	Aislamiento
AS01	1309	1309
AS02	1369	1369
AS03	2947	2947
AS04	2959	2959
AS05	2975	2975
AS06	2976	2976
AS07	2999	2999
AS08	3408	3408

**Desarrollo de la primera generación.** Los platos en crecimiento de la suspensión de esporas, luego de dos días mostraron un crecimiento acelerado de esporas, por cada plato se tomó cuatro únicas esporas que estuvieran aisladas de otras esporas, esto a través de la observación del plato en crecimiento a través del estereoscopio, escogiendo una espора en crecimiento que estuviera totalmente aislada. Posteriormente, se aisló cada espора en platos Petri con medio PDA con Tetraciclina. Se obtuvo cuatro platos nuevos por cada aislamiento, es decir, la primera generación consistió en treinta y dos nuevos aislamientos, identificados desde AS09-AS40.

**Desarrollo de la madre y primera generación.** Luego de obtener los platos en crecimiento de cada nueva generación, se realizó un aislamiento del hongo en Agar Agua, una vez creció cada aislamiento se realizó la toma de esporas con el palillo de madera, se sumergió el palillo en un tubo Eppendorf con un volumen de 25  $\mu$ L de agua grado molecular. Posteriormente, para cada

suspensión de esporas de los aislamientos, se colocó 25  $\mu\text{L}$  de la suspensión de esporas en un plato Petri con medio PDA con Tetraciclina, y se utilizó un esparcidor desechable para cada aislamiento, se dejó crecer por dos días.

**Desarrollo de la segunda generación.** Los platos en crecimiento de la suspensión de esporas, luego de dos días mostraron un crecimiento acelerado de esporas, por cada plato se tomó cuatro únicas esporas que estuvieran aisladas de otras esporas y se aisló cada espora en platos Petri pequeños con medio PDA con Tetraciclina. Se obtuvo el crecimiento de dieciséis platos Petri por cada aislamiento, es decir, la segunda generación consistió en ciento veintiocho nuevos aislamientos, identificados desde AS41-AS168.

**Mantenimiento a largo plazo de esporas.** A cada aislamiento de única espora se le asignó una identificación de inventario para el respaldo guardado en agua y glicerol 30%, y un nombre específico para cada plato Petri. Se esperó hasta que el crecimiento del hongo cubriera todo el plato Petri, aproximadamente cinco días. Se realizó la toma de micelio del plato para la extracción de ADN, se colocó el micelio en microtubos con micro cuentas de vidrio y 500  $\mu\text{L}$  de Buffer de extracción.

## **Experimento 2. Extracción de ADN y desarrollo de PCR para identificación de genes SIX (Secretados en xilema)**

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo de método de extracción de ADN de hongos, un procedimiento original de Akif's modificado por Cenis en 1992 y actualizado por el Laboratorio de Fitopatología en el Centro de Investigación y Educación de la Costa del Golfo de la Universidad de Florida.

Cada micelio ya previamente recolectado en el Experimento 1, se colocó en el Vórtex Genie en la máxima velocidad a 10 unidades, por cinco minutos. La función del Vórtex Genie es lograr un movimiento rápido para así permitir que las micro cuentas de vidrio deshagan la muestra de micelio en el microtubo y formar una sola solución, se logró observar al finalizar que el buffer de extracción formó mucha espuma. Posteriormente, se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de RNase, cuya función, al igual que la de todos los reactivos utilizados en el protocolo de extracción de ADN, está especificada en el Cuadro 3. Se llevaron los microtubos a la incubadora a 65 °C durante 10 minutos. Se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de 3M Acetato de Sodio previamente preparado con un pH de 5.2 y se colocó en el congelador a -20 °C durante 10 minutos. Se sacaron los microtubos del congelador y se colocaron en la centrifugadora a 14000 rpm durante 10 minutos. Una vez se terminó el ciclo en la centrifugadora, se transfirió el sobrenadante (300  $\mu\text{L}$ ) de cada tubo a un nuevo tubo Eppendorf, se agregó 300  $\mu\text{L}$  de Isopropanol para precipitar el ADN de la solución y se dejó reposar en temperaturas de refrigeración a 5 °C por 10 minutos. Se sacaron los tubos del refrigerador y se colocó de nuevo en la centrifugadora a 14000 rpm durante 10 minutos para lograr peletizar el precipitado de ADN. Una vez terminó el ciclo, se descartó todo el material líquido en el tubo y se lavó con etanol al 70%, posteriormente, se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 10 minutos. Luego, al terminar el ciclo, se descartó todo el material líquido del tubo y se dejó secar en la cabina de flujo laminar por 1 hora, al finalizar se colocó 50  $\mu\text{L}$  de TE Buffer.

Cuadro 3. Reactivos utilizados en el protocolo de extracción de ADN.

Reactivo	Función
Buffer de extracción	Elimina partículas grandes, permite la presencia solo de organismos celulares como ADN, proteínas y rompe la pared celular.
RNase	Enzima para la degradación de ARN.
Acetato de Sodio	Aumenta el número de iones en la solución.
Isopropanol	Precipitar ADN de la solución.
Etanol 70%	Eliminar capa de solvatación que rodea ADN y precipitar ADN.
TE Buffer	Solubilizar el ADN o ARN y protege de la degradación.

Fuente: CENIS 1992 “Extracción rápida de ADN fúngico para la amplificación de PCR”, modificado por Laboratorio de Fitopatología, Vallad Laboratorio.

**Preparación de PCR.** Para la reacción en Cadena de Polimerasa se utilizó un máster mix comercial o listo para usar (Cuadro 4), el “GoTaq Colorless Master Mix”, de Promega Productions, este consiste en una mezcla de componentes previamente preparada para agregar los iniciadores a utilizar (Cuadro 5).

Cuadro 4. Contenido para la preparación de muestras procesadas por PCR.

Reactivos	25 $\mu$ L rxn ( $\mu$ L)
GoTaq	12.5 $\mu$ L
DH20	9.3 $\mu$ L
F iniciador o cebador	0.6 $\mu$ L
R iniciador o cebador	0.6 $\mu$ L
ADN	2.0 $\mu$ L

Cuadro 5. Contenido y función del GoTaq o máster mix.

Contenido	Función
Buffer 10X	Regulador de pH.
MgCl <sub>2</sub>	Iones positivos para la realización de polimerasa.
dNTP's	Nucleótidos para la generación de cadenas de ADN.
Taq Polimerasa	Crea polímeros de nucleótidos para crear cadenas de ADN.

Fuente: Promega Corporation

Adicionalmente, se utilizó tres parejas de primers ITS4/ITS5 (Cuadro 6), SIX1F/R, SIX3 F/R (Cuadro 7) para la identificación de los genes de interés. Para el proceso de PCR se utilizó un

termociclador “Bio-Rad”, donde para cada iniciador o cebador se programó programas específicos con temperaturas específicas para cada etapa, siguiendo las recomendaciones generales de la guía de amplificación por PCR utilizando GoTaq. Para la etapa de desnaturalización se utilizó una temperatura de 95 °C por 2 minutos, la etapa de hibridación típicamente se debe de optimizar comenzando aproximadamente 5 °C por debajo de la temperatura de fusión de los cebadores. Al programar la extensión, esta se lleva a cabo a temperaturas óptimas para la Taq polimerasa de 72-74 °C.

Cuadro 6. Temperaturas utilizadas en el termociclador para los primers ITS4/ITS5, en el estudio evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

<b>Programa: ITSGOTAQ</b>		<b>Primers:</b>
<b>Tapa: 105°C</b>		<b>ITS4/ITS5</b>
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
1	95 °C	2 minutos
2	95 °C	30 segundos
3	55 °C	45 segundos
4	72 °C	1:30 minutos
5	GO TO step 2	36X
6	72 °C	5:00 minutos
7	4 °C	infinito

Cuadro 7. Temperaturas utilizadas en el termociclador para los primers SIX1 FR/ SIX 3 FR, en el estudio evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

<b>Programa: SIX13G</b>		<b>Primers:</b>
<b>Tapa: 105°C</b>		<b>SIX1 FR/ SIX 3 FR</b>
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
1	95 °C	2 minutos
2	95 °C	30 segundos
3	58 °C	30 segundos
4	72 °C	1:00 minuto
5	GO TO step 2	34X
6	72 °C	10:00 minutos
7	12 °C	infinito

Se utilizó el ADN de las tres generaciones (168 muestras), se utilizó parejas de iniciadores o cebadores específicos para la identificación de los genes SIX en cada generación. Cada cebador o

iniciador utilizado originalmente se encontró a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , se modificó cada uno a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Para realizar la concentración deseada se agregó 50  $\mu\text{L}$  del iniciador sin alterar y 450  $\mu\text{L}$  de agua de grado molecular, así obtener iniciadores o cebadores a 10X. Se utilizó “Green GoTaq Reaction Buffer” y se agregó cada iniciador o cebador a la mezcla, se agregó 23.5  $\mu\text{L}$  de la máster mix ya preparada y 2  $\mu\text{L}$  de ADN de cada aislamiento. Posteriormente, se aseguró la mezcla y se insertó cada grupo de tubos de PCR en el termociclador. Para cada PCR con la pareja de iniciadores o cebadores (F/R) se utilizó un programa en el termociclador donde se determinó las temperaturas y tiempo en cada etapa de la PCR (desnaturalización, extensión, mantenimiento).

**Preparación de Gel para electroforesis.** Se realizó la lectura del producto de PCR para los tres pares de iniciadores para las 168 muestras. Se preparó previamente el gel al 1.5% utilizando 4.5 gramos de “Ultra Clear Quick dissolve agarose”, 300 1XTAE y 9  $\mu\text{L}$  gel red. Se colocó cada gel en la cámara de electroforesis, se utilizó una escalera de ADN de 1 kb, adicionalmente, se cargó 5  $\mu\text{L}$  del material de PCR, una vez cargado se corrió la cámara de electroforesis a 80 voltios por 40 minutos. Los datos obtenidos a través de PCR, fueron datos cualitativos. Son considerados cualitativos, porque solamente se evaluó la presencia del gen en cada aislamiento de cada generación. El número 1 representó la presencia y el 0 representó la ausencia. Una vez se obtuvo todos los datos, estos fueron interpretados mediante la elaboración de un “Heatmap” en el programa “R” (versión 1.2.5042).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Aislamientos entre generaciones y extracción de ADN

Se logró observar que el crecimiento del hongo era más fácil de observar en Agar Agua con Estreptomicina para lograr una buena práctica de recolección de esporas por línea con el palillo de madera, para cada nueva generación se utilizó esta técnica de crecimiento del hongo de Agar agua. Además, los aislamientos pertenecientes a una misma generación mostraron diferencias morfológicas como ser diferentes tonalidades de color púrpura y blanquecinas y crecimiento de micelio, algunas mostraron poco crecimiento y otros platos mostraron un crecimiento abundante (Figuras 1 y 2). Esto coincidió con características de *Fusarium oxysporum*, ya que presenta distintas variaciones en la morfología del hongo, características culturales de la colonia del hongo e incluso el tamaño de esporas puede cambiar (Arbeláez Torres 2000). Algunos estudios, han confirmado que estas variaciones muchas veces son a causa del medio de cultivo PDA (Duarte Leal *et al.* 2016).

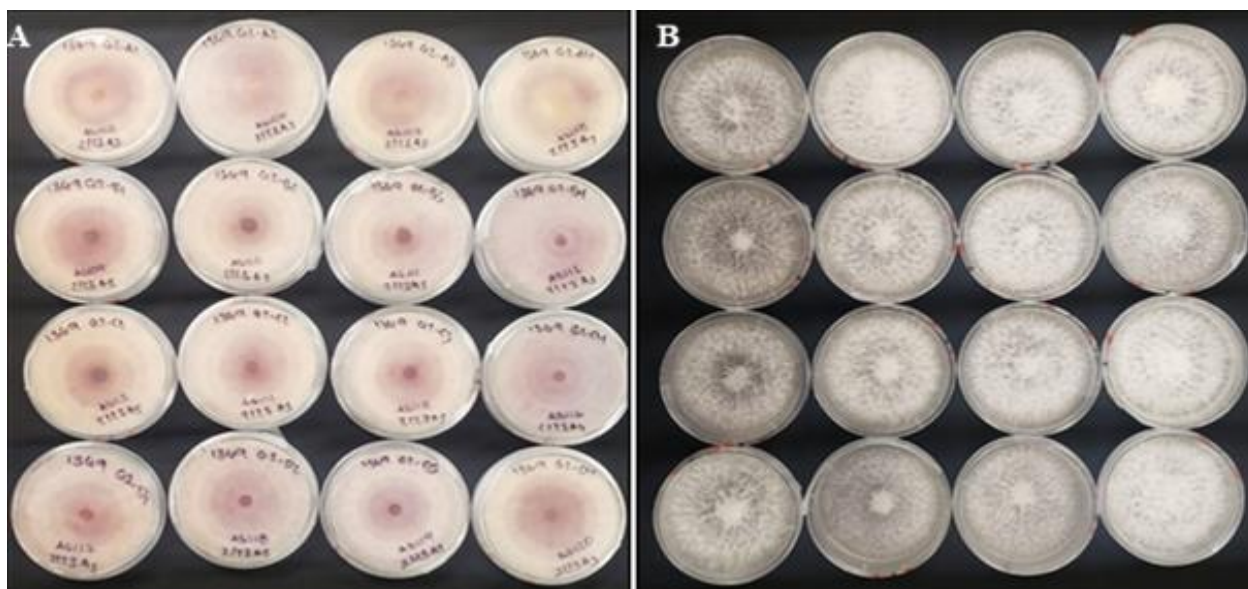


Figura 1. Crecimiento de aislamiento 1369 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, generación 2 en PDA con Tetraciclina.

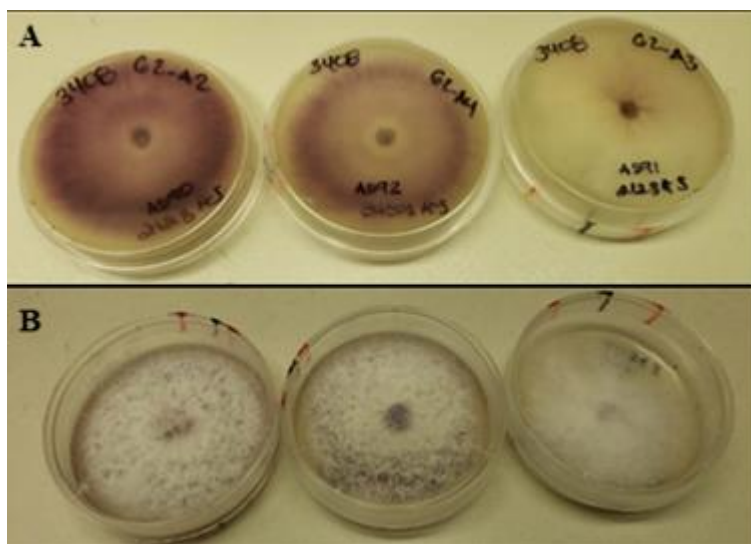


Figura 2. Crecimiento de aislamientos 3408 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, generación 2 en PDA con Tetraciclina.

#### **Extracción de ADN y desarrollo de PCR para identificación de genes SIX (Secretados en xilema)**

La extracción de ADN permitió realizar el desarrollo de PCR para cada pareja de iniciador. La lectura de la PCR a través de la electroforesis permitió identificar la presencia o ausencia de los genes SIX1 y SIX3. Además, de confirmar que el ADN es fúngico a través de la presencia del ITS. Se utilizó el “Bio Rad Plastic Gel Doc Imaging system” para la lectura de los geles preparados con el producto de la PCR previamente cargado, a través de una imagen se obtuvo los resultados y se identificó cada aislamiento. En el resultado de la electroforesis en gel del gen ITS, se obtuvo un tamaño de bases de 550pb (Figura 3). El gen SIX1, obtuvo un tamaño de bases de 992 pb (Figura 4) y el gen SIX3, obtuvo un tamaño de bases de 608pb (Figura 5). Todos los tamaños de bases obtenidos, dentro del rango esperado (Cuadro 8).



Figura 3. Producto de PCR, cargada en gel. Resultados gen ITS, presencia de ADN en las 168 muestras de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



Figura 4. Producto de PCR, cargada en gel. Resultados gen SIX1, presencia de ADN en las 168 muestras de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

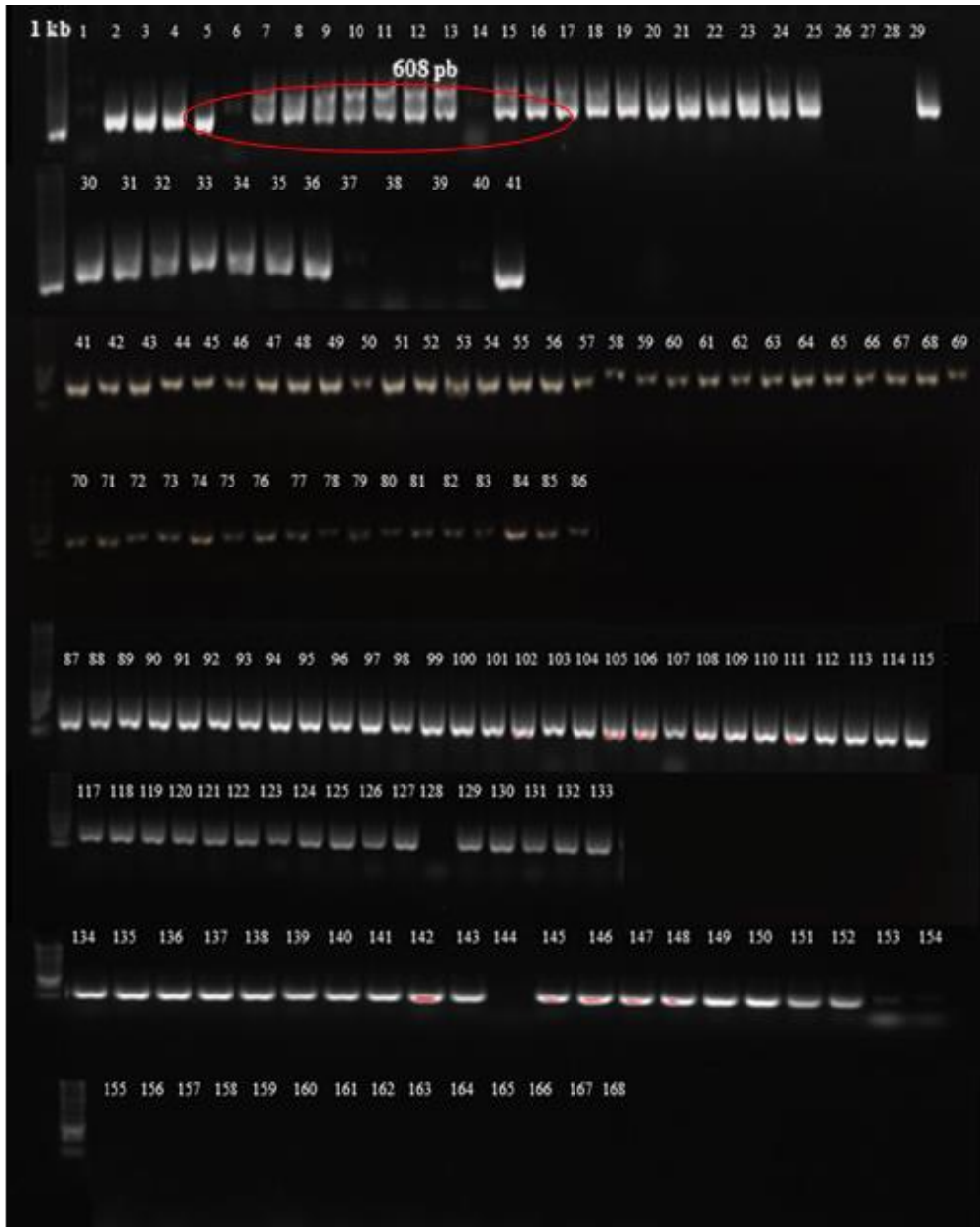


Figura 5. Producto de PCR, cargada en gel. Resultados gen SIX3, presencia de ADN en las 168 muestras de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Cuadro 8. Primers utilizados en el estudio evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Tamaño de fragmento en pares de bases</b>	<b>Función</b>
ITS5/F ITS4/R	5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3' 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	~550-600 pb	Presencia de ADN
SIX1F SIX1R	5'GTATCCCTCCGGATTTTGAGC-3' 5'AATAGAGCCTGCAAAGCATG-3'	~992 pb	Gen de patogenicidad
SIX3F SIX3R	5'CCAGCCAGAAGGCCAGTTT-3' 5'GGCAATTAACCACTCTGCC-3'	~608 pb	Gen de patogenicidad

C: Citosina, A: Adenina, T: Timina, G: Guanina,  
ITS: "Internal transcribed spacer", SIX: "Secreted in xylem", pb: pares de bases.  
Fuente: "Integrated DNA technologies" Company, (Raja *et al.* 2017), (Bellemain *et al.* 2010), (Lievens *et al.* 2009).

El producto de la PCR cargado en electroforesis para cada pareja de genes, permitió definir si el fenómeno de la presencia y ausencia de genes entre generaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* está sucediendo. La interpretación a través de este tipo de mapa o también llamado mapa de calor permitió hacer un análisis visual de datos de la expresión génica del estudio. Además, de una interpretación visual del fenómeno de la presencia y ausencia entre generaciones para cada gen. El color azul representó la presencia y el color marrón claro representó la ausencia. En la generación madre el 87.5% de los aislamientos presentan el gen SIX1 y el 100% presentan el gen SIX3 (Figura 6). Por otro lado, en la primera generación el 87.5% de los aislamientos presentan el gen SIX1 y el 75% presentan el gen SIX3 (Figura 7). Además, en la segunda generación, el 61.71% de los aislamientos presentan el gen SIX1 y el 85.93% presentan el gen SIX3 (Figura 8).

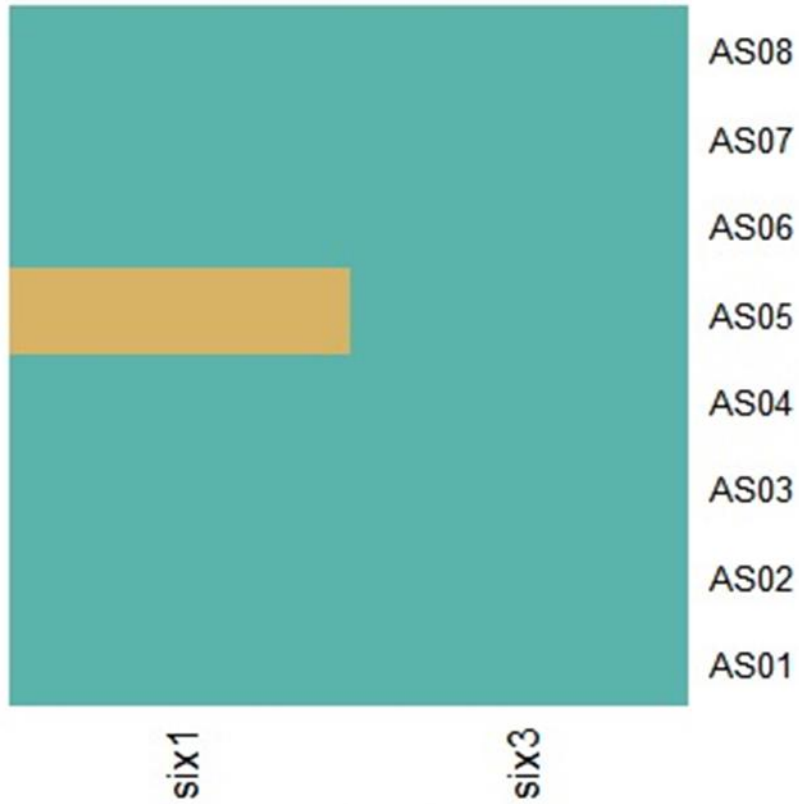


Figura 6. Representación gráfica por medio de un mapa de calor del cambio generacional de presencia de genes en aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de la generación madre. El eje X corresponde a los genes estudiados, mientras que el eje Y corresponde al código del aislamiento de dicha generación. El color azul turquesa indica la presencia de los genes en los aislamientos, mientras que el color marrón indica la ausencia.

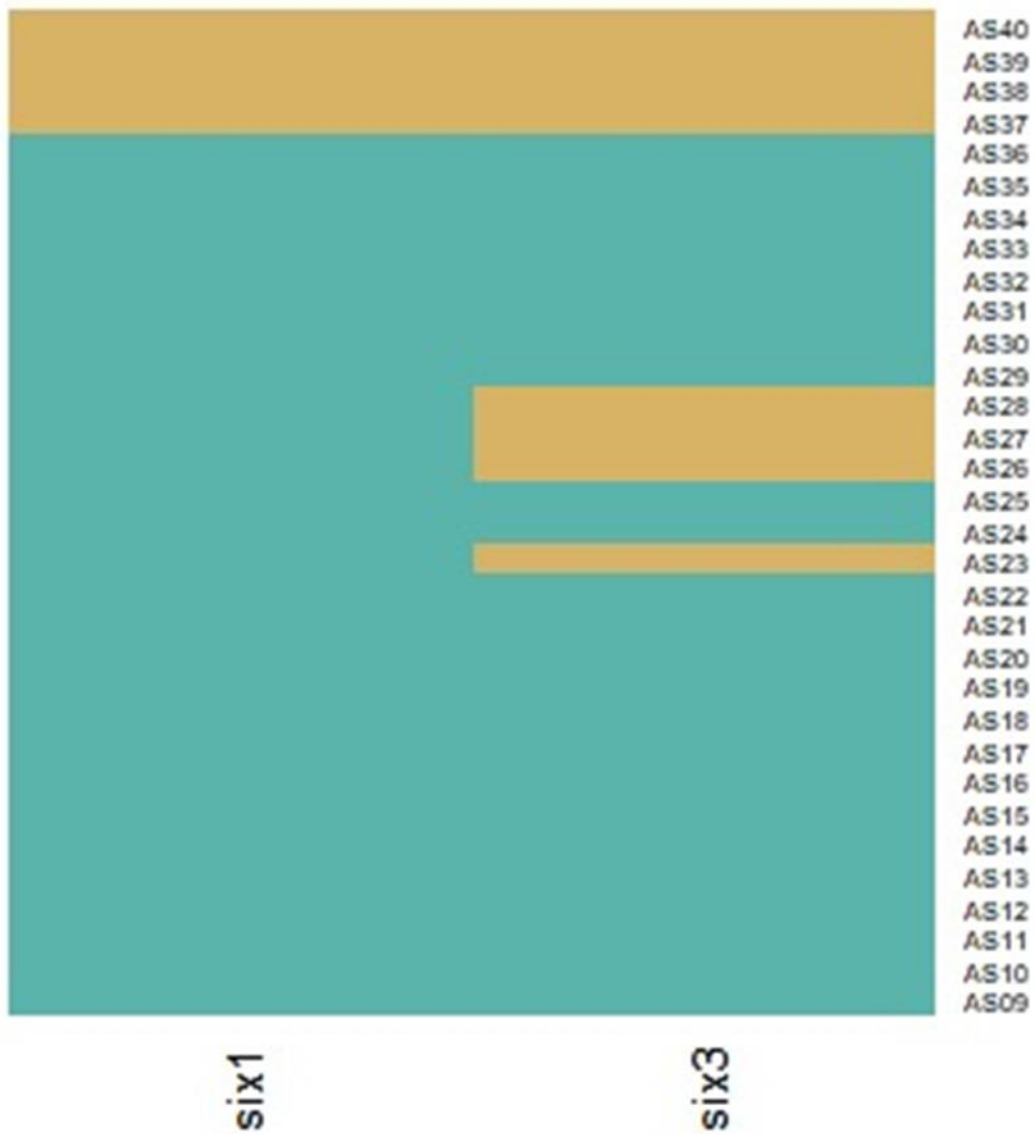


Figura 7. Representación gráfica por medio de un mapa de calor del cambio generacional de presencia de genes en aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de la primera generación. El eje X corresponde a los genes estudiados, mientras que el eje Y corresponde al código del aislamiento de dicha generación. El color azul turquesa indica la presencia de los genes en los aislamientos, mientras que el color marrón indica la ausencia.

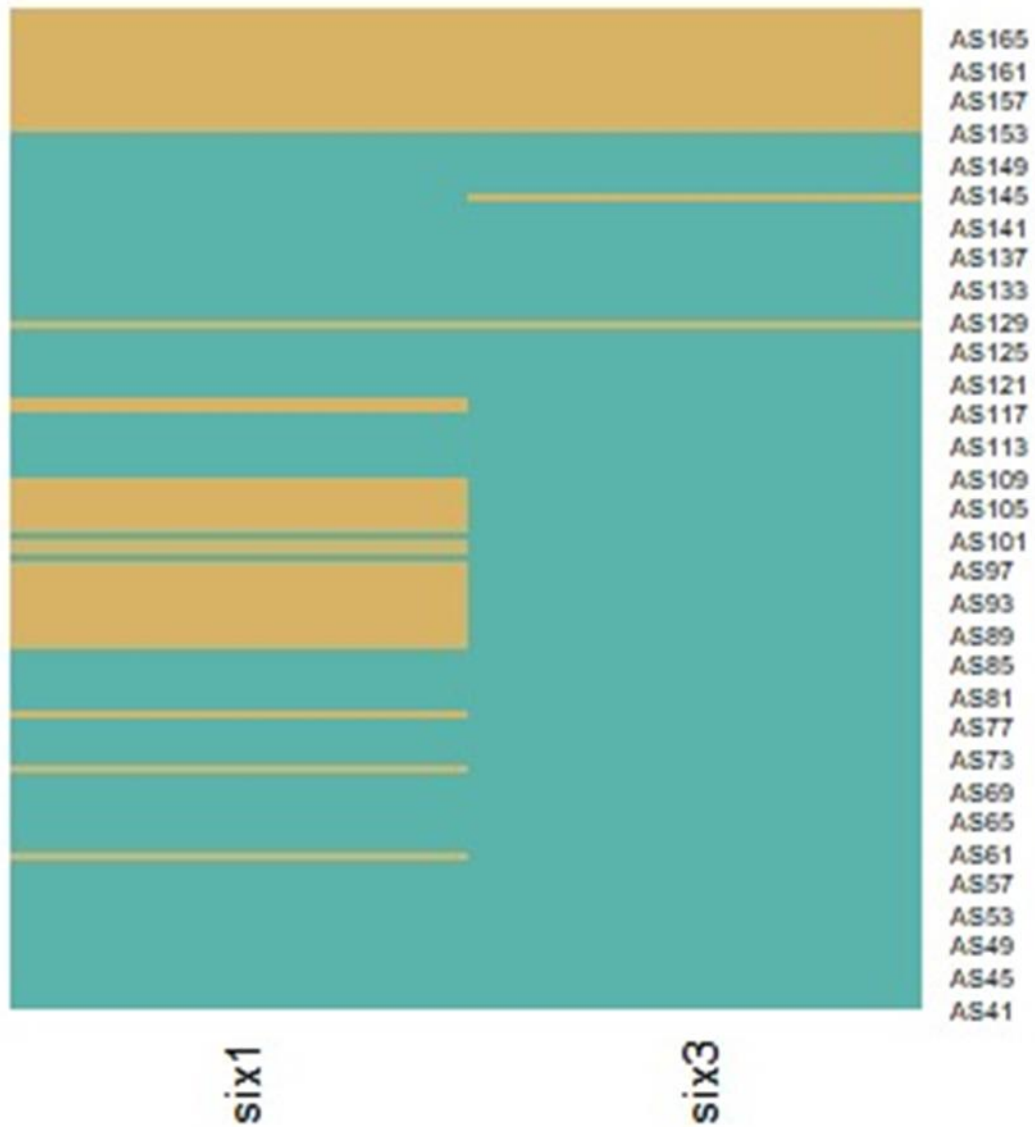


Figura 8. Representación gráfica por medio de un mapa de calor del cambio generacional de presencia de genes en aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* de la segunda generación madre. El eje X corresponde a los genes estudiados, mientras que el eje Y corresponde al código del aislamiento de dicha generación. El color azul turquesa indica la presencia de los genes en los aislamientos, mientras que el color marrón indica la ausencia.

No se encontró otro estudio en el cual se evalué el comportamiento de los genes SIX en aislamientos a través de generaciones, por lo tanto, no se puede comparar con otros. Es posible comparar con otros estudios de variabilidad en el genoma del *Fusarium oxysporum*. En este estudio siete aislamientos (1309, 1369, 2959, 2975, 2976, 2999, 3408) mostraron el fenómeno de presencia y ausencia entre generaciones del gen SIX1. Por otro lado, cinco aislamientos (1309, 1369, 2975, 2976, 3408) mostraron el fenómeno de presencia y ausencia entre generaciones del gen SIX3. Se logró determinar que el fenómeno está sucediendo con mayor proporción en el gen SIX1 en los aislamientos estudiados. Existen muchos factores por los cuales este fenómeno se puede presentar, estos factores ya han sido evaluados al estudiar el genoma de *Fusarium oxysporum*.

Al haber un cambio de presencia de genes SIX entre generaciones de aislamientos, esto se puede deber a que existen regiones específicas denominadas “Regiones genómicas específicas de linaje” que son regiones distribuidas en cromosomas en el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* se encuentra en los cromosomas accesorios y en otras regiones de otros cromosomas (Ma *et al.* 2010). Las regiones específicas son ricas en elementos transponibles, genes relacionados a patogenicidad como ser los efectores y factores de virulencia (Ma *et al.* 2013). Además, estos genes de avirulencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, AVR2 (SIX3) y AVR3 (SIX1), parte de los genes en la cual los loci están ubicados en las zonas específicas codifican para estos factores de virulencia (Houterman *et al.* 2009). Por lo tanto, al estar ubicados en esas zonas es posible que su genoma sea variable, esto afectando su patogenicidad y su posible cambio en presencia de genes entre generaciones.

Además, se logró identificar la variabilidad en morfología y en la presencia de los genes SIX entre generaciones de los aislamientos. Otros estudios de *Fusarium oxysporum* demuestran que el hongo fitopatógeno es muy variable tanto en morfología como en patogenicidad (Ma *et al.* 2010). Los resultados obtenidos en este estudio afirman que existe el fenómeno de cambio de presencia de genes SIX1 y SIX3, lo que se confirma con otros estudios donde se ha identificado que el genoma de *Fusarium oxysporum* representa una inestabilidad y mediante su estudio se encontró la actividad de elementos transponibles (Davière *et al.* 2001). Adicionalmente, los genes SIX están asociados con elementos transponibles, particularmente con regiones de impala en miniaturas o MIMP (Schmidt *et al.* 2013; van Dam *et al.* 2016). El estudio al ser una evaluación de la presencia de genes entre generaciones está asociado con los transposones del ADN o MIMP. Estos, pueden moverse durante el ciclo de vida del hongo, después de un evento como la anastomosis o incluso entre generaciones. Por lo tanto, está asociado con el cambio de presencia y ausencia de los genes (Maldonado *et al.* 2018).

En otros estudios a través de la secuenciación del genoma de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se ha identificado que los genes SIX están presentes en el cromosoma 14 del genoma del hongo. El cromosoma 14 se transfiere horizontalmente (Ma 2014). Por lo tanto, este fenómeno de presencia y ausencia de genes puede ser ocasionado debido a la transferencia horizontal de cromosomas de patogenicidad en tomate. (Ma *et al.* 2010). Al ser varios los factores es importante realizar estudios más profundos del genoma del hongo además de secuenciar los productos obtenidos de PCR para poder establecer un resultado de la causa específica del cambio generacional de los genes SIX1 y SIX3.

## 4. CONCLUSIÓN

Se determinó mediante resultados de PCR que existe un fenómeno de presencia y ausencia de genes SIX (Secretado en xilema) SIX1 y SIX3 entre generaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

## 5. RECOMENDACIONES

- Efectuar una segunda repetición del estudio para comparar los resultados y secuenciar el producto de la PCR, para establecer la razón del cambio de presencia y ausencia entre generaciones de los aislamientos.
- Realizar inoculaciones a plantas de tomate con los aislamientos ya estudiados, para así poder confirmar si existe un cambio de virulencia del aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, dependiendo de la presencia o ausencia de los genes SIX.
- Repetir el estudio en condiciones controladas sin presencia de luz, para evaluar el cambio de morfología del micelio entre generaciones.
- Evaluar distintos aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* para verificar si el fenómeno de la presencia de genes SIX sucede en todos los aislamientos del hongo.
- Realizar estudio del cambio entre generaciones de los genes SIX en distintos hospederos de *Fusarium oxysporum*, para así identificar el comportamiento de dichos genes en diferentes hospederos.

## 6. LITERATURA CITADA

- Arbeláez Torres G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *oxysporum*. *Agronomía Colombiana*; [consultado 1 junio 2020]. 17:11–22. <http://bdigital.unal.edu.co/24385/1/21538-73639-1-PB.pdf>.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kausserud H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol.* 10:189. eng. doi:10.1186/1471-2180-10-189.
- Cardona-Piedrahita LF, Castaño-Zapata J. 2019. Comparison of inoculation methods of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, The causal agent of the vascular wilt of tomato. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.*, 43(167): 227-233.
- Cenis JL. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20(9):2380 doi:10.1093/nar/20.9.2380.
- Davière JM, Langin T, Daboussi MJ. 2001. Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. *Fungal Genet Biol.* 34(3):177–192. doi:10.1006/fgbi.2001.1296.
- de Sain M, Rep M. 2015. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. *Int J Mol Sci.* 16(10):23970–23993. doi:10.3390/ijms161023970.
- Duarte Leal Y, Echevarría Hernández A, Martínez Coca B. 2016. Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Rev Protección Veg.* 31(3):173–183.
- [FHIA] Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. 2018. Centro de Comunicación Agrícola y Servicios Agrícolas: Informe Técnico 2017. La Lima, Cortés: FHIA. 71 p.
- Gawehns F, Ma L, Bruning O, Houterman PM, Boeren S, Cornelissen BJC, Rep M, Takken FLW. 2015. The effector repertoire of *Fusarium oxysporum* determines the tomato xylem proteome composition following infection. *Front Plant Sci.* 6:967. doi:10.3389/fpls.2015.00967.
- Houterman PM, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen MJ, Cornelissen BJC, Takken FLW, Rep M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J.* 58(6):970–978. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x.
- Lievens B, Houterman PM, Rep M. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiol Lett.* 300(2):201–215. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x.
- Luna-Guevara ML, Delgado-Alvarado A. 2014. Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Av en Investig Agropecu.* [consultado 2020 julio 18]. 18(1):51–66. <http://ww.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2014/enero/5.pdf>.
- Maldonado BLD, Villarruel OJL, Calderón OMA, Sánchez EAC. Secreted in Xylem (Six) Genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and Their Potential Acquisition by Horizontal Transfer. *Adv Biotech & Micro.* 2018; 10(1): 555779. DOI: 10.19080/AIBM.2018.10.555779

- Ma LJ, Van Der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, et al. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*. 464(7287):367–373. doi:10.1038/nature08850.
- Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, Gardiner DM, Manners JM, Kazan K. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annu Rev Microbiol*. 67(1):399–416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650.
- Ma LJ. 2014. Horizontal chromosome transfer and rational strategies to manage *Fusarium* vascular wilt diseases. *Mol Plant Pathol*. 15(8):763–766. doi:10.1111/mpp.12171.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770. [consultado 2020 abril 01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5368684/>.
- Schmidt SM, Lukasiewicz J, Farrer R, van Dam P, Bertoldo C, Rep M. 2016. Comparative genomics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* reveals the secreted protein recognized by the Fom-2 resistance gene in melon. *New Phytol*. 209(1):307–318. doi:10.1111/nph.13584.
- Seebold KW. 2014. Tomato Wilt Problems. *Plant Pathol Fact Sheet*. 15. [consultado 2020 enero 28]. <https://plantpathology.ca.uky.edu/files/ppfs-vg-15.pdf>.
- Selim EM, El-Gammal NA. 2015. Role of Fusaric Acid Mycotoxin in Pathogenesis Process of Tomato Wilt Disease Caused by *Fusarium oxysporum*. *J Bioprocess Biotech*. 5(10):5–9. doi:10.4172/2155-9821.1000255.
- Srinivas C, Nirmala Devi D, Narasimha Murthy K, Mohan CD, Lakshmeesha TR, Singh BP, Kalagatur NK, Niranjana SR, Hashem A, Alqarawi AA, et al. 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi J Biol Sci*. 26(7):1315–1324. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.06.002.
- Takken F, Rep M. 2010. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol*. 11(2):309–314. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00605.x.
- Taylor A, Vágány V, Jackson AC, Harrison RJ, Rainoni A, Clarkson JP. 2016. Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Mol Plant Pathol*. 17(7):1032–1047. doi:10.1111/mpp.12346.
- van Dam P, Fokkens L, Schmidt SM, Linmans JHJ, Kistler HC, Ma LJ, Rep M. 2016. Effector profiles distinguish formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Environ. Microbiol*. 18(11), 4087– 4102. doi:10.1111/1462-2920.13445
- Vásquez LM, Castaño-Zapata J, 2017. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate. *UDCA* 20(2), 363-374.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* de la primera generación.

<b>Identificación de inventario</b>	<b>Nombre plato en crecimiento</b>	<b>Aislamiento</b>
AS09	2947 g1-a	2947
AS10	2947 g1-b	2947
AS11	2947 g1-c	2947
AS12	2947 g1-d	2947
AS13	2959 g1-a	2959
AS14	2959 g1-b	2959
AS15	2959 g1-c	2959
AS16	2959 g1-d	2959
AS17	2999 g1-a	2999
AS18	2999 g1-b	2999
AS19	2999 g1-c	2999
AS20	2999 g1-d	2999
AS21	3408 g1-a	3408
AS22	3408 g1-b	3408
AS23	3408 g1-c	3408
AS24	3408 g1-d	3408
AS25	1369 g1-a	1369
AS26	1369 g1-b	1369
AS27	1369 g1-c	1369
AS28	1369 g1-d	1369
AS29	2976 g1-a	2976
AS30	2976 g1-b	2976
AS31	2976 g1-c	2976
AS32	2976 g1-d	2976
AS33	2975 g1-a	2975
AS34	2975 g1- b	2975
AS35	2975 g1-c	2975
AS36	2975 g1-d	2975
AS37	1309 g1-a	1309
AS38	1309 g1-b	1309
AS39	1309 g1-c	1309
AS40	1309 g1-d	1309

**Anexo 2.** Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* de la segunda generación.

<b>Identificación de inventario</b>	<b>Nombre plato en crecimiento</b>	<b>Aislamiento</b>
AS41	2947 g2-a1	2947
AS42	2947 g2-a2	2947
AS43	2947 g2-a3	2947
AS44	2947 g2-a4	2947
AS45	2947 g2-b1	2947
AS46	2947 g2-b2	2947
AS47	2947 g2-b3	2947
AS48	2947 g2-b4	2947
AS49	2947 g2-c1	2947
AS50	2947 g2-c2	2947
AS51	2947 g2-c3	2947
AS52	2947 g2-c4	2947
AS53	2947 g2-d1	2947
AS54	2947 g2-d2	2947
AS55	2947 g2-d3	2947
AS56	2947 g2-d4	2947
AS57	2959 g2-a1	2959
AS58	2959 g2-a2	2959
AS59	2959 g2-a3	2959
AS60	2959 g2-a4	2959
AS61	2959 g2-b1	2959
AS62	2959 g2-b2	2959
AS63	2959 g2-b3	2959
AS64	2959 g2-b4	2959
AS65	2959 g2-c1	2959
AS66	2959 g2-c2	2959
AS67	2959 g2-c3	2959
AS68	2959 g2-c4	2959
AS70	2959 g2-d2	2959
AS71	2959 g2-d3	2959
AS72	2959 g2-d4	2959
AS73	2999 g2-a1	2999
AS74	2999 g2-a2	2999
AS75	2999 g2-a3	2999
AS76	2999 g2-a4	2999
AS77	2999 g2-b1	2999
AS78	2999 g2-b2	2999
AS79	2999 g2-b3	2999
AS80	2999 g2-b4	2999
AS81	2999 g2-c1	2999
AS82	2999 g2-c2	2999
AS83	2999 g2-c3	2999
AS84	2999 g2-c4	2999

Continuación Anexo 2

<b>Identificación de inventario</b>	<b>Nombre plato en crecimiento</b>	<b>Aislamiento</b>
AS85	2999 g2-d1	2999
AS86	2999 g2-d2	2999
AS87	2999 g2-d3	2999
AS88	2999 g2-d4	2999
AS89	3408 g2-a1	3408
AS90	3408 g2-a2	3408
AS91	3408 g2-a3	3408
AS92	3408 g2-a4	3408
AS93	3408 g2-b1	3408
AS94	3408 g2-b2	3408
AS95	3408 g2-b3	3408
AS96	3408 g2-b4	3408
AS97	3408 g2-c1	3408
AS98	3408 g2-c2	3408
AS99	3408 g2-c3	3408
AS100	3408 g2-c4	3408
AS101	3408 g2-d1	3408
AS102	3408 g2-d2	3408
AS103	3408 g2-d3	3408
AS104	3408 g2-d4	3408
AS105	1369 g2-a1	1369
AS106	1369 g2-a2	1369
AS107	1369 g2-a3	1369
AS109	1369 g2-b1	1369
AS110	1369 g2-b2	1369
AS111	1369 g2-b3	1369
AS112	1369 g2-b4	1369
AS113	1369 g2-c1	1369
AS114	1369 g2-c2	1369
AS115	1369 g2-c3	1369
AS116	1369 g2-c4	1369
AS117	1369 g2-d1	1369
AS118	1369 g2-d2	1369
AS119	1369 g2-d3	1369
AS120	1369 g2-d4	1369
AS121	2976 g2-a1	2976
AS122	2976 g2-a2	2976
AS123	2976 g2-a3	2976
AS124	2976 g2-a4	2976
AS125	2976 g2-b1	2976
AS126	2976 g2-b2	2976
AS127	2976 g2-b3	2976
AS128	2976 g2-b4	2976
AS129	2976 g2-c1	2976

Continuación Anexo 2

<b>Identificación de inventario</b>	<b>Nombre plato en crecimiento</b>	<b>Aislamiento</b>
AS130	2976 g2-c2	2976
AS131	2976 g2-c3	2976
AS132	2976 g2-c4	2976
AS133	2976 g2-d1	2976
AS134	2976 g2-d2	2976
AS135	2976 g2-d3	2976
AS136	2976 g2-d4	2976
AS137	2975 g2-a1	2975
AS138	2975 g2-a2	2975
AS139	2975 g2-a3	2975
AS140	2975 g2-a4	2975
AS141	2975 g2- b1	2975
AS142	2975 g2- b2	2975
AS143	2975 g2- b3	2975
AS144	2975 g2- b4	2975
AS145	2975 g2-c1	2975
AS146	2975 g2-c2	2975
AS147	2975 g2-c3	2975
AS148	2975 g2-c4	2975
AS150	2975 g2-d2	2975
AS151	2975 g2-d3	2975
AS152	2975 g2-d4	2975
AS153	1309 g2-a1	1309
AS154	1309 g2-a2	1309
AS155	1309 g2-a3	1309
AS156	1309 g2-a4	1309
AS157	1309 g2-b1	1309
AS158	1309 g2-b2	1309
AS159	1309 g2-b3	1309
AS160	1309 g2-b4	1309
AS161	1309 g2-c1	1309
AS162	1309 g2-c2	1309
AS163	1309 g2-c3	1309
AS164	1309 g2-c4	1309
AS165	1309 g2-d1	1309
AS166	1309 g2-d2	1309
AS167	1309 g2-d3	1309
AS168	1309 g2-d4	1309









# 20036\_20149-Evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici

Final Audit Report

2020-11-05

Created:	2020-11-05
By:	Maria Bravo (mbravo@zamorano.edu)
Status:	Signed
Transaction ID:	CBJCHBCAABAA-KzXplCrC4Yn3GGosnlLwi9gX_cnKQ88

## "20036\_20149-Evaluación de la presencia entre generaciones de los genes SIX (secretado en xilema) en Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici" History


-  Document created by Maria Bravo (mbravo@zamorano.edu)  
2020-11-05 - 6:45:54 PM GMT- IP address: 190.242.24.88
-  Document emailed to Carolina Avellaneda (cavellaneda@zamorano.edu) for signature  
2020-11-05 - 6:47:18 PM GMT
-  Email viewed by Carolina Avellaneda (cavellaneda@zamorano.edu)  
2020-11-05 - 7:06:34 PM GMT- IP address: 200.10.153.23
-  Document e-signed by Carolina Avellaneda (cavellaneda@zamorano.edu)  
Signature Date: 2020-11-05 - 7:07:02 PM GMT - Time Source: server- IP address: 200.10.153.23
-  Document emailed to Raphael Colbert (rcolbert@zamorano.edu) for signature  
2020-11-05 - 7:07:05 PM GMT
-  Email viewed by Raphael Colbert (rcolbert@zamorano.edu)  
2020-11-05 - 9:00:11 PM GMT- IP address: 190.181.212.29
-  Document e-signed by Raphael Colbert (rcolbert@zamorano.edu)  
Signature Date: 2020-11-05 - 9:03:16 PM GMT - Time Source: server- IP address: 190.181.212.29
-  Document emailed to Rogel Castillo (rcastillo@zamorano.edu) for signature  
2020-11-05 - 9:03:18 PM GMT

 Email viewed by Rogel Castillo (rcastillo@zamorano.edu)


2020-11-05 - 9:03:42 PM GMT- IP address: 200.10.153.23

 Document e-signed by Rogel Castillo (rcastillo@zamorano.edu)


Signature Date: 2020-11-05 - 9:04:17 PM GMT - Time Source: server- IP address: 200.10.153.23

 Document emailed to Luis Fernando Osorio (ctrejo@zamorano.edu) for signature

2020-11-05 - 9:04:18 PM GMT

 Email viewed by Luis Fernando Osorio (ctrejo@zamorano.edu)

2020-11-05 - 10:58:00 PM GMT- IP address: 181.115.63.137

 Document e-signed by Luis Fernando Osorio (ctrejo@zamorano.edu)

Signature Date: 2020-11-05 - 10:58:42 PM GMT - Time Source: server- IP address: 181.115.63.137

 Agreement completed.

2020-11-05 - 10:58:42 PM GMT