

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Micología

Protocolo de Diagnóstico:

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* razas 1, 2 y 3 y
f. sp. *radicis - lycopersici*
(Marchitez del tomate y pudrición de la corona y raíz)

Tecámac, Estado de México, agosto 2019



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

Senasica, agricultura sana para el bienestar



Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 1, 2 y 3 y f. sp. *radicis - lycopersici*. La metodología descrita tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.



I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Información sobre la plaga	1
2.2 Información taxonómica	2
2.3 Flujo de trabajo	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	4
3.1 Identificación morfológica	4
3.1.1 Observación directa	4
3.1.1.1 Interpretación de resultados	4
3.1.2 Incubación en papel secante (cámara húmeda)	4
3.1.2.1 Interpretación de resultados	5
3.1.3 Incubación en medios de cultivo.....	6
3.1.3.1 Interpretación de resultados	6
3.2 Descripción morfológica	6
3.2.1 Morfología colonial	6
3.2.2 Morfología de las estructuras de <i>Fusarium oxysporum</i>	7
3.3 Identificación molecular	8
3.3.1 Extracción de DNA a partir de cultivos puros	8
3.3.2 Verificación de la calidad del DNA	9
3.3.3 PCR punto final.....	9
3.3.3.1 Ensayo control endógeno	9
3.3.3.2 Ensayo con primers específicos	10
3.3.3.3 Controles para las pruebas moleculares	12
3.3.3.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final.	12
4. REGISTROS	14
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	14
6. RECONOCIMIENTO	14
7. REFERENCIAS	15
8. ANEXOS.....	17
8.1 Síntomas de la enfermedad	17
8.2 Ciclo de la enfermedad	18
8.3 Elaboración de montajes.....	18
8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos.....	18
8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva	19
8.3.3 Preparaciones permanentes	19
8.4 Medios de montaje.....	20
8.5 Medios de cultivo	21



II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de <i>Fusarium oxysporum</i>	7
Figura 2. Perfil electroforético de la amplificación del gen endógeno EF-1 α . 1.....	12
Figura 3. Perfil electroforético de la amplificación con primers específicos.	13
Figura 4. Síntomas en tomate de <i>FOL</i>	17
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	18

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno ribosomal.....	9
Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno.....	10
Cuadro 3. Programa de termociclaje para la detección del control endógeno	10
Cuadro 4. Primers específicos para la detección de <i>FOL</i> razas 1, 2 y 3 y <i>FORL</i>	11
Cuadro 5. Programa de termociclaje para la primers específicos	11
Cuadro 6. Matriz para la determinación de resultados.....	13
Cuadro 7. Medios de montaje recomendados	20
Cuadro 8. Medios de cultivo recomendados para aislamiento e identificación de <i>Fusarium oxysporum</i>	21



1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Definir la metodología aplicada en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para la detección e identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FOL*) razas 1, 2 y 3 y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*FORL*) a partir de semillas, raíces, corona y tallo de muestras de tomate (*Solanum lycopersicum*), por medio de caracterización morfológica y técnicas moleculares a partir de cultivos puros.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

La marchitez del tomate causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FOL*) razas 1, 2 y 3, es una enfermedad altamente destructiva en variedades susceptibles y específica para el cultivo de *S. lycopersicum*. Mientras que la pudrición de la corona y raíz, causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*FORL*), es capaz de afectar cultivos de chile, berenjena, y otras especies no solanáceas como espinaca, betabel, repollo y algunas leguminosas, así como cultivares de tomate, incluyendo los resistentes a *FOL* razas 1, 2 y 3 (Menzies, Koch & Seywerd, 1990).

Actualmente, tanto *FORL* como *FOL* con sus 3 razas virulentas, presentan una extensa distribución en las áreas tomateras del mundo, por lo que en México no son consideradas de importancia cuarentenaria; sin embargo, ambos patógenos son de alta importancia económica, ya que llegan a causar pérdidas mayores al 50% con repercusiones significativas para el país, debido a que el tomate es la primera hortaliza de mayor valor de producción nacional (más de 30 mil millones de pesos en 2018) (SIAP, 2019).

La marchitez del tomate (*FOL*) comienza a nivel de la raíz de la planta y avanza hacia el tallo, dentro del cual, en un corte transversal, es posible observar un anillo necrótico de color café que se extiende hacia arriba conforme la enfermedad avanza. Debido al taponamiento de raíces y haces vasculares, los síntomas empiezan a hacerse visibles con un amarillamiento en un solo lado de las hojas y ramas más viejas de la planta, permaneciendo las hojas muertas adheridas a las ramas. Una vez que raíces y tallos son invadidos, una pudrición negra se manifiesta en las raíces jóvenes laterales, lo que favorece el marchitamiento entero de la planta y, finalmente, su muerte (Ramírez & Sáinz, 2010). Consultar el Anexo 8.1.

Las tres razas de *FOL* son idénticas morfológicamente, pero difieren en su capacidad para parasitar cultivares de tomate (Ulloa & Hanlin, 2006). El hongo produce tres tipos de esporas: clamidosporas, microconidios y macroconidios (Leslie, Summerell & Bullock, 2006). Las clamidosporas pueden sobrevivir largos periodos en el suelo, pero al germinar penetran en las raíces o en la zona de elongación. El micelio avanza hasta llegar al xilema, donde se ramifica y produce conidios, los cuales son llevados por la savia hacia la parte apical de la planta, donde germinan y se reproducen. Los taponamientos y las enzimas producidas por la planta inducen



la marchitez; una vez que la planta muere, sobre los tejidos en descomposición se producen esporodocios que forman macroconidios (Ramírez & Sáinz, 2010). Consultar el Anexo 8.2. En contraste, en la pudrición de la corona y raíz (*FORL*) se pueden observar los bordes amarillos de las hojas más viejas y posteriormente en las hojas superiores, síntoma que puede confundirse con una deficiencia nutricional. Las plantas se van marchitando poco a poco hasta el final de la temporada, lo cual afecta directamente la cantidad y calidad de la producción. Es posible observar manchas púrpuras a marrón a lo largo de la raíz y en la corona, y puede presentarse una necrosis vascular que comprime el cuello hasta 25 cm sobre la línea del suelo (Ramírez & Sáinz, 2010; Lagopodi et al., 2002).

2.2 Información taxonómica

Nombre científico: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* W. C. Synder & H.N. Hansen, 1940

Sinonimias: *Fusarium oxysporum* subsp. *lycopersici* Sacc., 1886
Fusarium lycopersici (Sacc.) Wollenw, 1913

Nombres comunes: Marchitez del tomate (español)
Marchitez vascular del tomate (español)
Fusarium wilt on tomato (inglés)

Nombre científico: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker, 1979

Nombres comunes: Pudrición de la corona y raíz (español)
Tomato crown and root rot (inglés)

Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

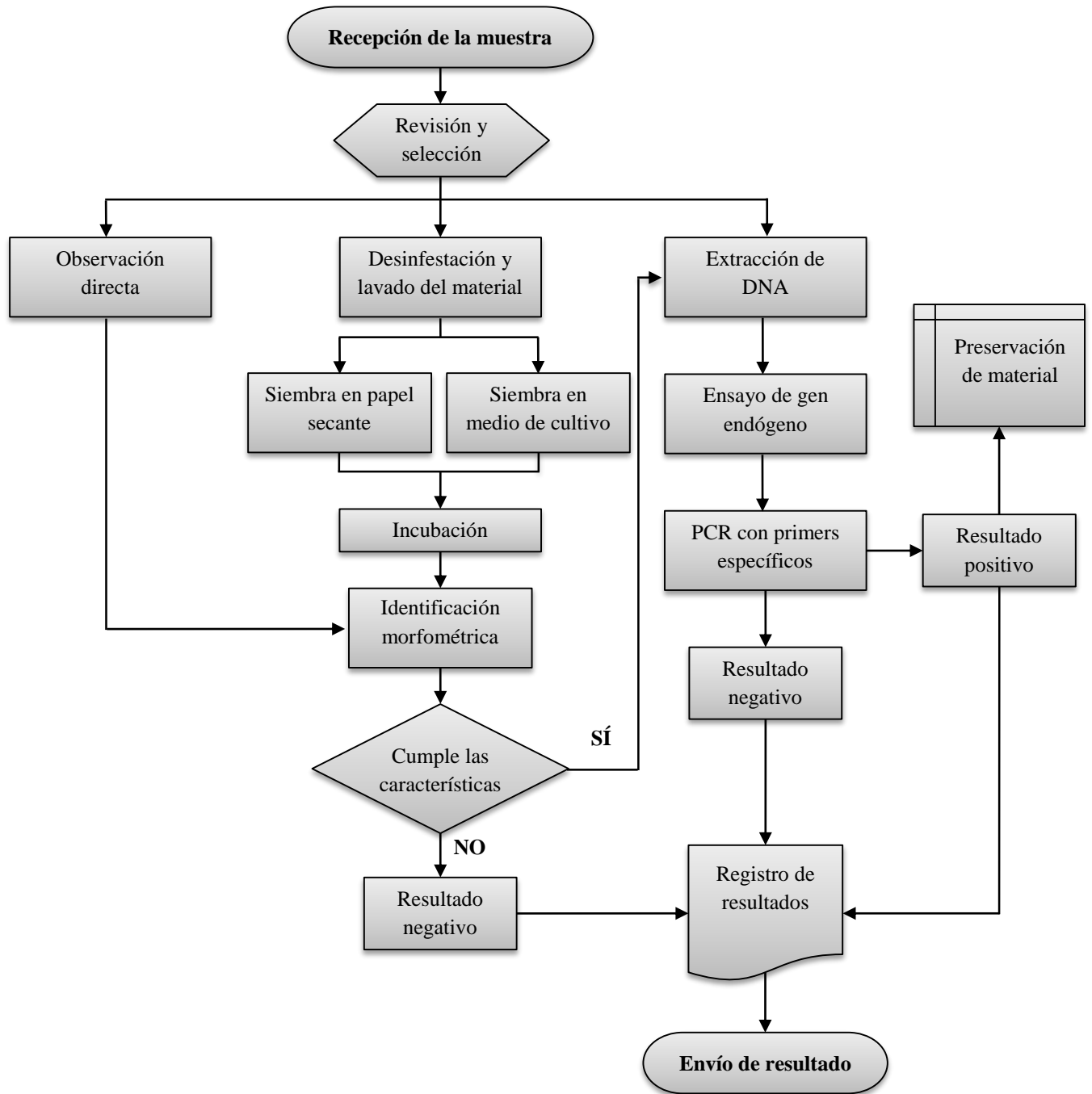
Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum*

(Crous, Gams, Stalpers, Robert & Stegehuis, 2004)

2.3 Flujo de trabajo





3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Al recibir la muestra, verificar que cumpla con las características aceptables para su procesamiento, es decir, que el tejido vegetal, que puede estar compuesto por semilla, raíz, corona o tallo de tomate (*Solanum lycopersicum*) esté en buen estado, sin presentar putrefacciones ni exceso de humedad y envuelto en papel absorbente. En caso de que la muestra esté compuesta de semillas y su tamaño lo permita, tomar 400 semillas para realizar las pruebas; de lo contrario, utilizar el 80% de la muestra.

3.1 Identificación morfológica

Es necesaria la aplicación total de las tres técnicas siguientes: 1) observación directa, 2) incubación en papel secante y 3) incubación en medio de cultivo.

3.1.1 Observación directa

- 1) A partir de tejidos vegetales como tallo, corona y raíz, por observación directa al microscopio estereoscópico o con ayuda de una lupa, buscar micelio blanco y esporulación en tejidos marchitos.
- 2) Realizar montajes temporales o permanentes (Anexo 8.3) para su observación al microscopio compuesto en busca de las estructuras del hongo (fiálides, microconidios, macroconidios y clamidosporas) [Sección 3.2].
- 3) Medir las estructuras del hongo para obtener rango y promedio de largo y ancho y comparar con literatura de referencia con el fin de determinar el género y especie de acuerdo con la descripción morfológica (Sección 3.2).
- 4) En caso de que los signos correspondan con la descripción de *F. oxysporum* realizar aislamientos e incubar para hacer la detección por ensayo de PCR (Sección 3.3).

3.1.1.1 Interpretación de resultados

Si los signos y estructuras del hongo encontrados en el tejido vegetal corresponden a la descripción morfológica de *F. oxysporum*, utilizar el aislamiento para la detección por ensayo de PCR. En caso contrario, si no es detectada la presencia de estructuras de interés, reportar el diagnóstico como negativo a *F. oxysporum* mediante la técnica de observación directa y verificar el resultado por las demás técnicas descritas (Secciones 3.1.2 y 3.1.3).

3.1.2 Incubación en papel secante (cámara húmeda)

- 1) Bajo condiciones de asepsia, obtener fragmentos de tejido vegetal sano y enfermo (raíces, corona y tallo). En caso de tratarse de semillas, tomar una submuestra de 200 semillas, o bien, el 50% de las semillas seleccionadas. Desinfectar el material de corte entre muestra y muestra.



- 2) Desinfectar los fragmentos vegetales con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, si se trata de semillas, desinfectar con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 2 min. Posteriormente, realizar tres lavados de 2 min cada uno con agua destilada estéril. Colocar los fragmentos en papel absorbente previamente esterilizado por aproximadamente 2 a 3 horas para permitir el correcto secado de los tejidos.
- 3) Armar cámaras húmedas. Colocar en cajas Petri de cristal un círculo de papel filtro Whatman® del número 4 (se puede utilizar otro tipo de papel filtro o papel absorbente) y esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 psi (libras por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés) durante 20 min, o a 160 °C durante 2 horas con calor seco. Una vez estériles y frías, humedecer el papel filtro con agua destilada estéril (evitar tener exceso de agua) y marcar con plumón permanente (bajo condiciones asépticas) las cajas con los datos de identificación de la muestra.
- 4) Colocar de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco o aproximadamente 30 semillas, de ser el caso, con una distribución uniforme dentro de la cámara húmeda. Incubar a 25 ±3 °C, bajo condiciones de 80% de humedad, durante 5 días.
- 5) Buscar estructuras del hongo mediante la observación con un microscopio estereoscópico, realizar montajes para visualizar las características (Anexo 8.3) y obtener aislamientos puros en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar, por sus siglas en inglés), CLA (Hoja de Clavel Agar, por sus siglas en inglés) y SNA (Agar Especial Pobre en Nutrientes, por sus siglas en inglés). Para la preparación de medios consultar el Anexo 8.5.
- 6) Incubar los aislamientos puros a 25 °C durante 8 días. Al término de este tiempo, observar el tipo de crecimiento, coloración del micelio y del medio de cultivo, además de la formación de estructuras características del hongo.
- 7) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Medir las estructuras del hongo y obtener el intervalo de medidas del ancho y largo. Comparar las dimensiones con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo de acuerdo con las características morfométricas que presenten (Sección 3.2).

3.1.2.1 Interpretación de resultados

En caso de obtener crecimiento y estructuras típicas que correspondan con la descripción morfológica de *F. oxysporum* sobre el tejido incubado en papel secante, es necesario corroborar los resultados obtenidos mediante la técnica de aislamiento en medio de cultivo e identificación molecular.

De lo contrario, si no se encuentran las estructuras esperadas, reportar el diagnóstico como negativo a *F. oxysporum* mediante la técnica de incubación en papel secante y verificar el resultado por las técnicas restantes (Secciones 3.1.3 y 3.3).



3.1.3 Incubación en medios de cultivo

- 1) Bajo condiciones de asepsia, obtener fragmentos de tejido vegetal sano y enfermo (raíces, corona y tallo). En caso de tratarse de semillas, tomar una submuestra de 200 semillas, o bien, el 50% de las semillas seleccionadas. Desinfectar el material de corte entre muestra y muestra.
- 2) Desinfectar los fragmentos vegetales con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, si se trata de semillas, desinfectar con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 2 min. Posteriormente, realizar 3 lavados de 2 min cada uno con agua destilada estéril. Colocar los fragmentos en papel absorbente previamente esterilizado por aproximadamente 2 a 3 horas para permitir el correcto secado de los tejidos.
- 3) Colocar de 6 a 8 fragmentos de material vegetal seco o aproximadamente 30 semillas, de ser el caso, con una distribución uniforme, insertados dentro de cajas Petri con medio de cultivo PDA. Incubar a 25 ± 3 °C durante 5 días.
- 4) Buscar estructuras del hongo mediante la observación con un microscopio estereoscópico, realizar montajes para visualizar las características (Anexo 8.3) y obtener aislamientos puros en medio de cultivo PDA, CLA y SNA. Para la preparación de medios consultar el Anexo 8.5.
- 5) Incubar los aislamientos puros a 25 °C durante 8 días. Al término de este tiempo, observar el tipo de crecimiento, coloración del micelio y del medio de cultivo, además de la formación de estructuras del hongo.
- 6) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Medir las estructuras del hongo y obtener el intervalo de medidas del ancho y largo. Comparar las dimensiones con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo de acuerdo con las características morfométricas que presenten (Sección 3.2).

3.1.3.1 Interpretación de resultados

En caso de obtener crecimiento y estructuras típicas que correspondan con la descripción morfológica de *F. oxysporum* sobre el tejido en medio de cultivo, es necesario corroborar los resultados obtenidos mediante la identificación molecular.

De lo contrario, si no se encuentran las estructuras esperadas, reportar el diagnóstico como negativo a *F. oxysporum* mediante la técnica de incubación en medio de cultivo.

3.2 Descripción morfométrica

3.2.1 Morfología colonial

Se recomienda el aislamiento de *F. oxysporum* en PDA, CLA y SNA. El desarrollo colonial en PDA se caracteriza por crecimiento rápido, micelio blanco y delicado que puede tornarse violeta o púrpura, incluso azul cuando se presentan abundantes esclerocios. En medio CLA se

estimula la formación de macroconidios y clamidosporas, mientras que en SNA es posible observar con claridad la disposición de los microconidios sobre el conidióforo (Leslie et al., 2006).

3.2.2 Morfología de las estructuras de *Fusarium oxysporum*

Los **macroconidios** son producidos en esporodoquios o en conidióforos aéreos, son abundantes, rectos a ligeramente curvos, de pared delgada, contienen de tres a cinco septos (mayormente tres), con mediciones promedio de 27-46 x 3-5 μm (3 septos), 35-60 x 3-5 μm (5 septos). La célula apical es corta, atenuada y, en algunos casos, ligeramente enganchada; la célula basal en forma de pie (Nelson, Toussoun & Marasas, 1983; Booth, 1971).

Los **microconidios** son generalmente aseptados con medidas promedio de 5-12 x 2.2-3.5 μm , pueden ser de forma ovalada a elipsoidal, cilíndricos. Se producen abundantemente en **falsas cabezuelas** siempre en **monofiálides cortas** (en comparación con *Fusarium solani*) (Nelson, et al., 1983; Booth, 1971).

Las **clamidosporas** (de dos a cuatro semanas) pueden presentar paredes tanto lisas como rugosas, generalmente se encuentran solitarias y terminales o intercaladas (Leslie et al., 2006).

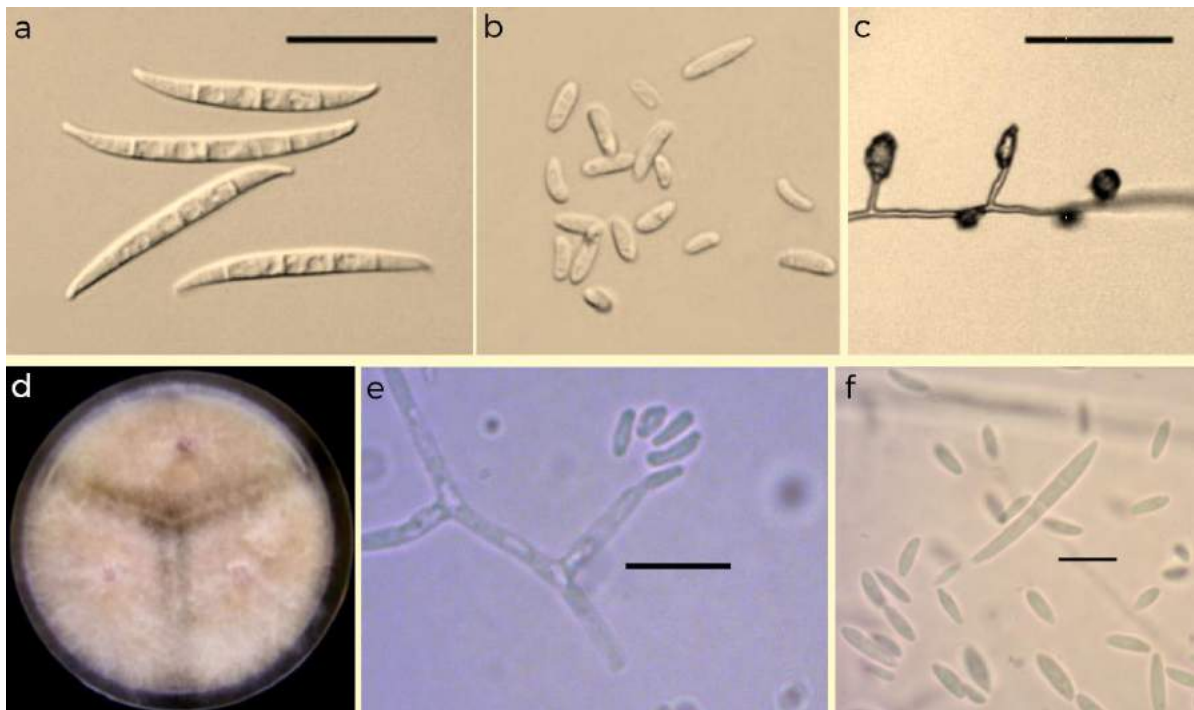


Figura 1. Estructuras de *Fusarium oxysporum*. a. Macroconidios con 3 a 5 septos; b. Microconidios; c y e. Monofiálides cortas con microconidios en falsas cabezuelas; d. Crecimiento colonial en medio PDA; f. Macroconidio con tres septos. Escala: a y b. 25 μm , c. 50 μm , e y f. 10 μm . (a, b y c: Leslie et al., 2006; d: Dita Rodríguez, Echegoyén Ramos & Pérez Vicente, 2013).



3.3 Identificación molecular

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) permite la detección y amplificación de regiones específicas de ácidos nucleicos. Los primers a utilizar permiten la diferenciación molecular primeramente de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*FOL*) y *F. oxysporum* f. sp. *radicis - lycopersici* (*FORL*) de otras formas especiales de la especie, así como la identificación de las razas 1, 2 y 3 de *FOL*.

Nota: para la estandarización de este protocolo se utilizaron diversos reactivos y equipos, éstos se pueden remplazar por otras marcas siempre y cuando sean homólogos y cumplan con la misma función.

3.3.1 Extracción de DNA

La extracción se debe realizar a partir de cultivos puros en medio PDA previamente caracterizados morfológicamente.

Nota: cualquier kit comercial de extracción de DNA puede resultar óptimo para tal fin, para ello es importante obtener una buena calidad, cantidad e integridad del DNA.

Se sugiere la metodología propuesta por Cenis (1992) modificada, se describe a continuación:

- 1) En un tubo con perlas de cerámica (MagNA Lyser Green Beads de Roche) transferir 0.01 g aproximadamente de micelio de una caja Petri de la muestra de interés.

Nota: para facilitar la obtención de sobrenadante, previamente sustraer del tubo un poco menos de la mitad de las perlas de cerámica.

- 2) Agregar 500 μ L de buffer TE 1X, incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, centrifugar 5 min a 17 940 g, extraer la mayor cantidad posible de sobrenadante con una micropipeta.

Nota: no decantar el buffer TE mediante inversión del tubo, ya que las perlas de cerámica y micelio se perderían.

- 3) Adicionar 300 μ L de buffer de extracción y macerar el micelio hasta que quede pulverizado usando un disruptor de tejidos durante 10 min (Minibeadbeater-96 Cat. No. 1001 de Biospect Products) o equipos con características similares.

Nota: el buffer de extracción consiste en 200 mM Tris-HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) y 0.5% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio). Se recomienda agitar antes de usar.

- 4) Adicionar 150 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2, invertir suavemente dos a tres veces el tubo y posteriormente incubar a una temperatura de -20 °C durante 10 min.
- 5) Centrifugar los tubos durante 10 min a 15 290 g. Transferir 250 μ L del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril (evitar la resuspensión del sedimento).



- 6) Agregar 250 μ L de isopropanol frío (almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), invertir suavemente dos a tres veces el tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, centrifugar 10 min a 15 290 g.

Nota: al final del proceso puede ser o no visible la pastilla de DNA.

- 7) Decantar el isopropanol por inversión cuidando no perder la pastilla. Agregar 500 μ L de etanol al 70% y centrifugar durante 2 min a 15 290 g. Repetir el lavado con etanol al 70% una vez más. Secar la pastilla por inversión en papel secante estéril durante 3 horas o hasta que no se observen gotas en la pared del tubo.
- 8) Resuspender el DNA en 50 μ L de agua grado biología molecular o buffer TE 1X, y almacenar la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La cantidad de DNA obtenida por este método debe ser la suficiente para cubrir el intervalo de trabajo del ensayo de PCR.

3.3.2 Verificación de la calidad del DNA

Al finalizar el proceso es importante verificar la calidad y cantidad del DNA obtenido. Para ello, se puede utilizar un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma función. La calidad óptima del DNA está dada por la absorbancia $A_{260/280} = 1.8-2.0$ y $A_{260/230} = 2.0-2.2$. Para corroborar que el DNA obtenido es apto para ser amplificado, debe realizarse un ensayo de control endógeno, evitando así falsos negativos. En la práctica, absorbancias fuera de los intervalos óptimos son permitidos solamente cuando se amplifique exitosamente el control endógeno.

3.3.3 PCR punto final

3.3.3.1 Ensayo control endógeno

Para verificar la calidad e integridad del DNA extraído, así como evitar falsos negativos, se debe realizar un ensayo de PCR de un control endógeno. Se utilizan los primers EF-1 y EF-2 propuestos por O'Donnell, Kistler, Cigelnik y Ploetz (1998), que reconocen una región del gen del factor de elongación 1 alfa (EF-1 α). Las secuencias de los primers se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno ribosomal

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	EF-1	5'- ATGGGTAAGGARGACAAGAC -3'	Aprox. 750
Antisentido	EF-2	5'- GGARGTACCAGTSATCATGTT -3'	

R=G o A; S= G o C

- 1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 2.



Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer Sentido	10 µM	0.5 µM	1.25
Primer Antisentido	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	2.5 U	0.125
DNA	25 – 500 ng/µL	2 – 40 ng/µL	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.625
		Volumen final	25.0

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Programa de termociclaje para la detección del control endógeno

Etapa	Temperatura	Tiempo	Cielos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	45 s	35
Alineamiento	58 °C	45 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1

3) Realizar el corrimiento electroforético de los productos de PCR durante 1 hora a 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6 X de GelRed™ Biotum, u otro método adaptable que permita interpretar los resultados.

3.3.3.2 Ensayo con primers específicos

Una vez concluido el ensayo de control endógeno para la comprobación de la integridad y amplificación del DNA de interés, realizar los ensayos de PCR punto final con primers específicos para la detección y diferenciación de *FOL* razas 1, 2 y 3 y *FORL* propuestos por Hirano & Arie (2006), quienes diseñaron cuatro pares de primers basados en los genes *pgl* (endo-poligalacturonasa) y *pgx4* (exo-poligalacturonasa) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Primers específicos para la detección de *FOL* razas 1, 2 y 3 y *FORL*

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Patógeno
Sentido	Unif	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'	670 -672 pb	<i>FOL</i> y <i>FORL</i>
Antisentido	Unir	5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'		
Sentido	Sp13f	5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3'	445 pb	<i>FOL</i> razas 1 y 3
Antisentido	Sp13r	5'-TCCTTGACACCATCACAGAG-3'		
Sentido	Sp23f	5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3'	518 pb	<i>FOL</i> razas 2 y 3
Antisentido	Sp23r	5'-GCAACAGGTCGTGGGGAAAA-3'		
Sentido	Sprlf	5'-GATGGTGGAAACGGTATGACC-3'	947 pb	<i>FORL</i>
Antisentido	Sprlr	5'-CCATCACACAAGAACACAGGA-3'		

Los pares de primers Unif/Unir y Sprlf/Sprlr, permiten distinguir *FORL* y *FOL* de las demás formas especiales de *F. oxysporum* en tomate: la amplificación de 670 pb del primer par indica la presencia de *FOL* y *FORL* y la amplificación de Sprlf/Sprlr de 947 pb indica únicamente la presencia de *FORL*. En caso de obtener ambas amplificaciones, el resultado será positivo a *FORL*. Si solo se obtiene la primera amplificación, se deben hacer las siguientes dos reacciones de PCR: Sp13f/Sp13r y Sp23f/Sp23r que amplifican 445 pb para razas 1 y 3, y 518 pb para razas 2 y 3, respectivamente.

- 1) Preparar una mezcla de reacción por separado para cada uno de los pares de primers Unif/Unir y Sprlf/Sprlr de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 2.
- 2) Programar el termociclador de acuerdo a las condiciones de reacción del Cuadro 5.
- 3) Realizar el corrimiento electroforético de los productos de PCR durante 1 hora a 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum, u otro método adaptable que permita interpretar los resultados.

Cuadro 5. Programa de termociclaje para la primers específicos

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	35
Alineamiento	62 °C	1 min	
Extensión	72 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	2 min	1

Nota: en caso de que el par de primers Unif/Unir amplifique y de que Sprlf/Sprlr no amplifique, se deben hacer las siguientes dos reacciones de PCR con Sp13f/Sp13r y Sp23f/Sp23r para identificar la raza.

- 4) Para diferenciar las razas 1, 2 y 3 de FOL, preparar una mezcla de reacción por separado para cada uno de los pares de primers Sp13f/Sp13r y Sp23f/Sp23r de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 2.
- 5) Programar el termociclador de acuerdo a las condiciones de reacción del Cuadro 5.
- 6) Realizar el corrimiento electroforético de los productos de PCR durante 1 hora a 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum, u otro método adaptable que permita interpretar los resultados.

3.3.3.3 Controles para las pruebas moleculares

Los siguientes controles deben ser incluidos para todas las PCR descritas anteriormente:

Control positivo: provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Puede ser DNA genómico o el fragmento clonado del hongo, el cual debe estar confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

3.3.3.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

Antes de notificar el resultado, verificar las siguientes condiciones:

- Todas las muestras de interés, así como el control positivo, deben amplificar una banda de 750 pb aproximadamente en el ensayo del gen endógeno (primers EF-1/EF-2) (Figura 2).
- En los ensayos con primers específicos, el control positivo debe siempre mostrar una banda de 670 pb para los primers Unif/U nir, 445 pb en el caso de Sp13f/Sp13r, 518 pb para Sp23f/Sp23r y finalmente, 947 pb para los primers Sprlf/Sprlr.
- El control negativo no debe mostrar banda alguna en ninguno de los ensayos de PCR.

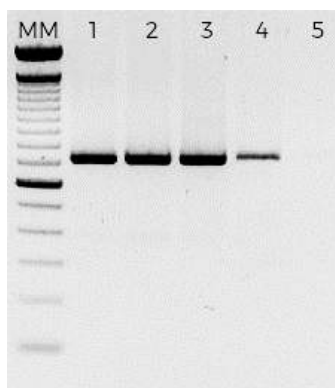


Figura 2. Perfil electroforético de la amplificación del gen endógeno EF-1 α . 1-2: control positivo; 3-4: muestras; 5: control negativo. MM: marcador molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder de Invitrogen.

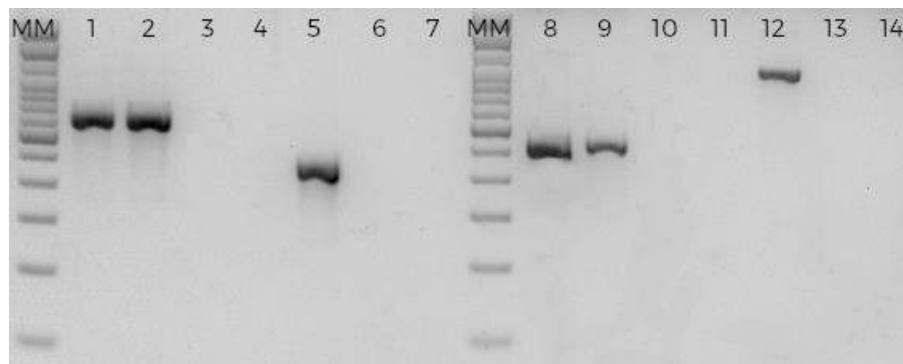


Figura 3. Perfil electroforético de la amplificación con primers específicos. 1-4: Unif/Unir; 5-7: Sp13f/Sp13r; 8-11: Sp23f-Sp23r y 12-14: Sprlf-Sprlr. 1, 2, 5, 8, 9 y 12: control positivo; 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13 y 14 control negativo. MM: marcador molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder de Invitrogen.

Una vez corroboradas las situaciones anteriores, emitir el resultado positivo de acuerdo al Cuadro 6 y a la información que a continuación se describe:

- 1) Resultado **positivo** a *F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* si amplifican solo los pares de primers: Unif/Unir y Sprlf/Sprlr.
- 2) Resultado **positivo** a *F. oxysporum f. sp. lycopersici raza 1* si amplifican solo los pares de primers: Unir/Unir y Sp13f/Sp13r.
- 3) Resultado **positivo** a *F. oxysporum f. sp. lycopersici raza 2* si amplifican solo los pares de primers: Unir/Unir y Sp23f/Sp23r.
- 4) Resultado **positivo** a *F. oxysporum f. sp. lycopersici raza 3* si amplifican solo los pares de primers: Unir/Unir, Sp13f/Sp13r y Sp23f/Sp23r.

Cuadro 6. Matriz para la determinación de resultados

Resultado Positivo a:	Primers			
	Unif-Unir (670-672 pb)	Sp13f-Sp13r (445 pb)	Sp23f-Sp23r (518 pb)	Sprlf-Sprlr (947 pb)
<i>FORL</i>	✓	✗	✗	✓
<i>FOL raza 1</i>	✓	✓	✗	✗
<i>FOL raza 2</i>	✓	✗	✓	✗
<i>FOL raza 3</i>	✓	✓	✓	✗

En caso de que no se presenten ninguna de las combinaciones del Cuadro 6, el resultado se debe emitir como: **Negativo a FOL razas 1, 2 y 3 y negativo a FORL.**



4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *FOL* razas 1, 2 y 3 y *FORL*.

- Mantener el material vegetal que no fue utilizado en el diagnóstico en su empaque original a 4 °C durante, al menos, un mes posterior al diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal.

En caso de obtener un resultado positivo:

- Conservar montajes permanentes, donde se encuentren estructuras distintivas del hongo como evidencia de la identificación morfométrica.
- Conservar el aislamiento puro mediante técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo, no realizar transferencias continuas del aislamiento.
- Resguardar los resultados de las pruebas moleculares (fotografía del gel y secuencias).
- Mantener el DNA obtenido en congelación a -20 °C (de ser posible a -70 °C).

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.micologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 011 (52) 55 5905 1000, Ext. 51424, 51409 y 51373

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Micología (Adrián González Saucedo, Jire Ajeleth Muñoz Jaimes, Lervin Hernández Ramos, Magnolia Moreno Velázquez y Nayeli Carrillo Ortiz); revisado por el Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández) y el Grupo DiaFi (Berenice Calderón Pérez); y editado por el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárate).

Agradecimiento a quienes participaron en elaboración y revisión de las versiones anteriores del Protocolo: Alma Rosa Solano Báez, Antonio Cárcamo Rodríguez, Edith Luna Martínez, Edith Maldonado Cruz, Oscar Morales Galván.



7. REFERENCIAS

- Agrios G. N. (2005). *Plant Pathology* (5a ed.). San Diego, CA, EUA: Elsevier- Academic Press.
- Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. (2019). En *Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)* de la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). Recuperado el 20 de septiembre de 2019 de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Suffolk, Inglaterra: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Cenis, L. J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20 (9), 2380.
- Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V., & Stegehuis, G. (2004). MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*, 50 (1), 19-22.
- Dita Rodríguez, M. A., Echegoyén Ramos, P. E. & Pérez Vicente, L. F. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en un país de la región del OIRSA. San Salvador, El Salvador: Organismo Internacional Regional de Sanidad. Agropecuaria (OIRSA).
- Greenlife Crop Protection Africa. (2018). *Fusarium wilt* [Figura]. Recuperado en junio de 2019 de <https://www.greenlife.co.ke/fusarium-wilt/>
- Hirano, Y. & Arie, T. (2006). PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*, 72 (5), 273-283.
- IPPC. International Plant Protection Convention. (s.f.). *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hansen [Figura]. Recuperado en junio de 2019 de <http://ippc.acfs.go.th/pest/G001/T008/FUNGI058>
- Lagopodi, A. L., Ram, A. F., Lamers, G. E., Punt, P. J., Van den Hondel, C. A., ... & Bloemberg, G. V. (2002). Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15 (2), 172-179.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. & Bullock, S. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (1a ed.). Iowa, EUA: Blackwell Publishing.
- Menzies, J. G., Koch, C. & Seywerd, F. (1990). Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant disease*, 74 (8), 569-572.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsylvania, EUA: The Pennsylvania State University.
- O'Donnell, K., Kistler, C., Cigelnik & E., Ploetz, C. R. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 2044-2049.



- Ramírez, J. & Saíenz, R. A. (2010). *Manejo integrado de las enfermedades del tomate* (2ª ed.). Sinaloa, México: Dirección de Asesorías y Divulgación de Agrobiología, S.A. de C.V.
- Ulloa, M., & Hanlin, R. T. C. (2006). *Nuevo diccionario ilustrado de micología*. Minnessota, EUA: APS Press.
- Universidad de Clemson – USDA. United States Department of Agriculture. (s.f.). *Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) in Southern Plant Diagnostic Network* [Figura]. Recuperado en junio de 2019 de <https://images.bugwood.org/gallery.cfm?coll=84002>

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2019). Protocolo de Diagnóstico: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 1, 2 y 3 y f. sp. *radicis - lycopersici*. (Marchitez del tomate y pudrición de la corona y raíz) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Síntomas de la enfermedad



Figura 4. Síntomas en tomate de FOL. a. Planta completa con marchitez; b. inicio de marchitez en un solo lado de la hoja; c. anillo necrótico en el xilema del tallo. (a: Greenlife Crop Protection Africa, 2018; b: IPPC, s.f.; c: Universidad de Clemson – USDA, s.f.)

8.2 Ciclo de la enfermedad

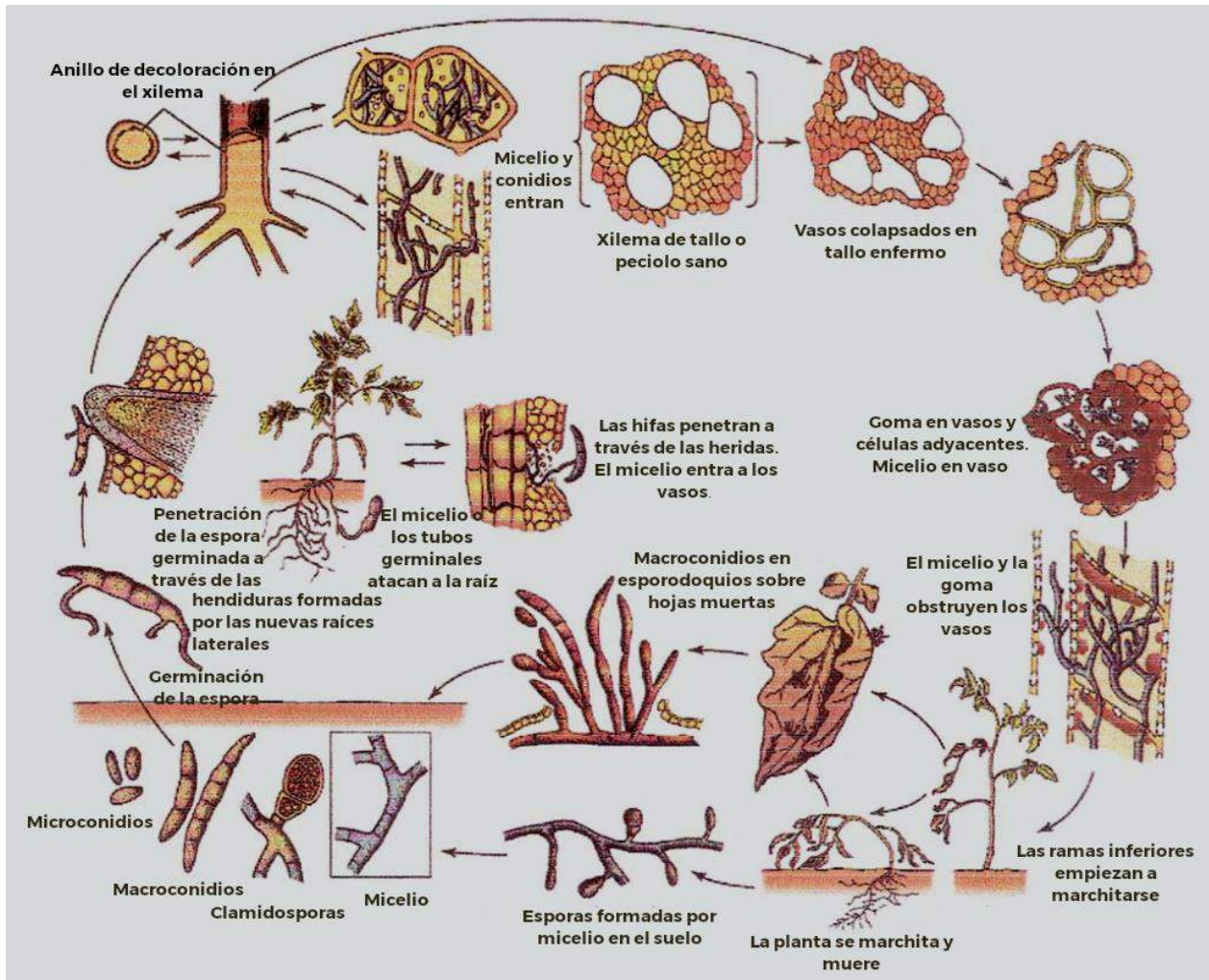


Figura 5. Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Modificado y traducido de Agrios, 2005).

8.3 Elaboración de montajes

8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Partir de tejido vegetal con signos del hongo o de cultivos puros. Colocar el tejido vegetal o estructuras en un portaobjeto o caja Petri de cristal sobre la platina del microscopio estereoscópico para observar a detalle el área a seccionar o montar en laminillas.
- 2) Realizar cortes de material vegetal con estructuras del hongo con navaja de bisturí o con navaja de afeitar, de un grosor menor a 0.5 mm o lo suficientemente delgado para dejar pasar la luz a través del tejido; también se puede tomar directamente un fragmento de micelio o las estructuras del hongo a partir del tejido vegetal o cultivo puro.



- 3) Colocar los cortes o estructuras del hongo sobre un portaobjetos con la ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Adicionar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4) e hidratar completamente el tejido evitando la formación de burbujas de aire.
- 4) Cubrir la gota con un cubreobjetos y presionar ligeramente para que se distribuya la gota y, en su caso, sustraer el líquido excedente. Secar con papel absorbente cuidando que no se pierda el espécimen. Calentar por algunos segundos para eliminar burbujas de aire. Observar el espécimen en un microscopio compuesto. En caso de que no se aprecien las estructuras, se debe realizar otra preparación, cuidando de que los cortes sean más finos.

8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje (Anexo 8.4).
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente, tocar con delicadeza y en forma superficial el área del tejido vegetal o del medio de cultivo con crecimiento del hongo para obtener las estructuras del mismo.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las estructuras queden dentro de la gota.
- 4) Observar con un microscopio compuesto.

8.3.3 Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4) sobre un portaobjetos.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo dentro de la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar las burbujas que se formen con una aguja o calentado el portaobjetos.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota. Para esto, calentar el extremo del sacabocados en un mechero e introducirlo en parafina sólida e inmediatamente colocarlo alrededor de la gota.

Nota: el diámetro del sacabocados debe ser mayor al de la gota.

- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que el anillo se derrita, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota ni en la parafina.
- 5) Dejar enfriar y observar con un microscopio compuesto.

8.4 Medios de montaje

Cuadro 7. Medios de montaje recomendados

Medio de montaje	Reactivos	Procedimiento
Lactofenol	Fenol (cristales) 20 g	1) Agregar los cristales de fenol y el agua a un recipiente.
	Ácido láctico 20 mL	2) Calentar ligeramente para disolver los cristales, adicionar la glicerina y el ácido láctico.
	Glicerina 40 mL	3) Colocar una cantidad mínima de colorante y agitar hasta que se diluya
	Agua destilada 20 mL	4) Agregar colorante hasta obtener la coloración deseada.
	Azul de Nilo 0.1- 0.5 g	
Agua-glicerina	Glicerina 50 mL	1) Mezclar 50 partes de agua destilada y 50 partes de glicerina
	Agua destilada 50 mL	2) Se puede adicionar algún colorante como azul de Nilo.

Nota: el lactofenol actúa como solución fijadora y restaura la turgencia del material seco. Es excelente medio para montajes temporales y permanentes. El agua-glicerina se utiliza en montajes temporales y permanentes.

8.5 Medios de cultivo

En el Cuadro 8 se señalan los medios de cultivo recomendamos para el aislamiento, crecimiento e identificación de *F. oxysporum*.

Cuadro 8. Medios de cultivo recomendados para aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum*

Medio de Cultivo	Ingredientes	Procedimiento
PDA (Papa-Dextrosa-Agar)	200 g papa 20 g dextrosa 20 g agar 1 L agua destilada	1) Colocar en trozos la papa en un matraz Erlenmeyer con el agua y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min. 2) Filtrar el agua de cocción y aforar a 1 L. Agregar el agar y la dextrosa. Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 min. 3) Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.
CLA (Hojas de Clavel Agar, Canation Leaf Agar)	Hojas de clavel 20 g agar 1 L agua destilada	1) Lavar las hojas con agua corriente para eliminar rastros de suelo. 2) Exponer el haz las hojas a luz UV durante 30 min y posteriormente el envés. Cortar en fragmentos de 1 cm. 3) Esterilizar en autoclave dos ciclos a 121 °C. 4) En 1 L de agua destilada adicionar 20 g de agar y esterilizar a autoclave a 121 °C durante 20 min a 15 lb. 5) Enfriar, vaciar a cajas Petri y antes de solidificar adicionar un fragmento de hoja de clavel por caja.
SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar, Agar especial pobre en nutrientes)	1 g KH ₂ PO ₄ 1 g KNO ₃ 0.5 g MgSO ₄ -7H ₂ O 0.5 g KCL 0.2 g glucosa 0.2 g sucrosa 20 g agar 1 L agua destilada	1) Colocar en el matraz todos los ingredientes y meter a autoclave a 121 °C durante 20 min. 2) Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.