

Uso de marcadores PCR-RFLP de la región IGS del ADNr para estudios de diversidad genética de especies de *Fusarium* asociados a cultivos de babaco y naranjilla en Ecuador

Use of PCR-RFLP markers of the IGS region of rDNA for genetic diversity studies of *Fusarium* species associated with babaco and naranjilla crops in Ecuador

Eduardo E. Argotti V.⁽¹⁾
Segundo M. Benavides L.⁽¹⁾
Mónica P. Cazar C.⁽²⁾
Emmerik Motte D.⁽³⁾

⁽¹⁾ Universidad de la Fuerzas Armadas-ESPE
eeargotti@espe.edu.ec
smbenavides3@espe.edu.ec

⁽²⁾ Universidad Central del Ecuador
monicacazar72@gmail.com

⁽³⁾ University of Montpellier
motte_emmerik@gmail.com

Recibido: Marzo 2022
Aceptado: Abril 2022

Doi: <https://doi.org/10.24133/ciencia.v24i2.2761>

"THIS IS AN OPEN ACCESS ARTICLE UNDER THE TERMS OF THE CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION LICENSE, WHICH PERMITS USE, DISTRIBUTION AND REPRODUCTION IN ANY MEDIUM, PROVIDED THE ORIGINAL WORK IS PROPERLY CITED."

RESUMEN

Entre los factores bióticos, que determinan mayores pérdidas económicas en los cultivos agrícolas, se encuentran los hongos fitopatógenos. *Fusarium oxysporum*, constituye un complejo de especies con una considerable variación morfológica y fisiológica; lo que dificulta su identificación, esto ha conducido al desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de formas especiales de este patógeno. En particular, *F. oxysporum* f. sp. *vasconcellea* (Fov) y *F. oxysporum* f. sp. *Quitoense* (Foq) infectan cultivos de babaco y naranjilla provocando la marchitez vascular del babaco (MVB) y la marchitez vascular de la naranjilla (MVN). En esta investigación se aplicó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCR-RFLP) del espaciador intergénico (IGS) del ADN ribosomal (ADNr) para determinar la diversidad genética de formas especiales (f. sp.) de *F. oxysporum*, agente causal de la MVB y MVN. Las secuencias IGS fue amplificado por PCR y secuenciadas en ambas direcciones. Las secuencias IGS fueron utilizadas para la construcción de árboles filogenéticos e identificación de sitios de restricción específicos para las enzimas EcoRI y Apal e identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). El tamaño de los productos de PCR de la región IGS fue de 1935 y 2603 nucleótidos, los mismos que fueron determinados en base al alineamiento de secuencias y al marcador de peso molecular. El análisis filogenético y la técnica PCR-RFLPs ubica a las secuencias de babaco y naranjilla en grupos diferentes. En el primer grupo se ubican las secuencias NA4 y NA6; en el segundo grupo BA3, BA4, BA5, BA6 y NA2; en el tercer grupo BA1, BA2, NA1, NA3 y NA5. Estos resultados demuestran que cada grupo evolucionó a partir del mismo ancestro común, por lo tanto, cada grupo tendría un origen polifilético.

Palabras claves: endonucleasas, restricción, polimorfismos, haplotipos, biotrofos *quitoense*, *vasconcellea*.

ABSTRACT

Among the biotic factors, which determine greater economic losses in agricultural crops, are the phytopathogenic fungi. *Fusarium oxysporum*, constitutes a complex of species with considerable morphological and physiological variation; which makes its identification difficult, this has led to the development of molecular tools for the study of special forms of this pathogen. In particular, *F. oxysporum* f. sp. *vasconcellea* (Fov) and *F. oxysporum* f. sp. *quitoense* (Fon) infect babaco and naranjilla crops causing babaco vascular wilt (BVW) and naranjilla vascular wilt (NVW). In this research, the polymerase chain reaction technique and polymorphic length restriction fragments (PCR-RFLP) of the intergenic spacer (IGS) of ribosomal DNA (rDNA) were applied to determine the genetic diversity of special forms (f. sp.) of *F. oxysporum*, the causal agent of MVB and MVN. The IGS sequences were amplified by PCR and sequenced in both directions. The IGS sequences were used for phylogenetic tree construction and identification of specific restriction sites for EcoRI and Apal enzymes and identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs). The size of the PCR products of the IGS region was 1935 and 2603 nucleotides, which were determined based on sequence alignment and molecular weight marker. The phylogenetic analysis and the PCR-RFLPs technique placed the babaco and naranjilla sequences in different groups. In the first group are located the sequences NA4 and NA6; in the second group BA3, BA4, BA5, BA6 and NA2; in the third group BA1, BA2, NA1, NA3 and NA5. These results show that each group evolved from the same common ancestor, therefore, each group would have a polyphyletic origin.

Key words: endonucleases, restriction, polymorphisms, haplotypes, biotrophs, *quitoense*, *vasconcellea*.

1. INTRODUCCIÓN

El babaco (*Vasconcellea x heilbornii*, H.) (Badillo, 1993), es un híbrido estéril, originario de los valles interandinos y la naranjilla común (*Solanum quitoense*, L.) (Heiser *et al.*, 1999) es un arbusto originario de los bosques húmedos de la región sub-tropical oriental y occidental de la cordillera de los Andes de Ecuador y Colombia (INIAP, 2010). Los cultivos de babaco producen alrededor de 200 Ton/Ha y la naranjilla 30 Ton/Ha (Meneses & Correa, 1992; Soria *et al.*, 1999; Revelo, *et al.*, 2010), tanto el babaco como la naranjilla constituyen los principales rubros de subsistencia, para miles de familias ecuatorianas. Sin embargo, la rentabilidad de los cultivos de babaco y naranjilla son atacados por varios factores bióticos; entre los que se encuentran *F. oxysporum* f. sp. *vasconcellea* (Fov) y *F. oxysporum* f. sp. *quitoense* (Fon) (Ochoa *et al.*, 2004), agentes causales de la MVB y MVN, tanto en campo como a nivel de invernadero, llegando a distribuirse en todo el País, ocasionando pérdidas del 70 al 80 % en naranjilla y el 90 al 100 % en cultivos de babaco (Ochoa *et al.*, 2004).

F. oxysporum es un complejo de especies, que agrupa una multitud de cepas que causan enfermedades de marchitez vascular en cultivos de importancia económica. *Fusarium* avanza a través de una serie de transiciones, comenzando por la germinación de esporas, avanza a través de heridas o las discontinuidades entre las raíces laterales y se desplaza a través del tejido vascular para habitar y obstruir los vasos del xilema (Argotti, 2016; Gordon *et al.*, 2017), lo que conlleva al estrés hídrico severo en la planta, cuya sintomatología se manifiesta en el amarillamiento de las hojas, iniciando por la parte del tercio inferior de un solo lado en los folíolos, acompañado de una decoloración vascular, marchitez y finalmente la muerte de la planta (Ochoa *et al.*, 2004). Fov y Fon infectan los cultivos de babaco y naranjilla en todas las edades, la propagación del patógeno depende de la humedad, la temperatura y la textura del suelo (Ochoa *et al.*, 2004). Debido a las características de la enfermedad ocasionados por Fov y Fon, los métodos de control químico como biológico han resultado inconsistentes en el campo y muy costosos para el agricultor; además, lo que tiene consecuencias negativas para el medio ambiente. A esto se suma el hecho de que las prácticas agrícolas actuales se basan en la siembra de semillas de un mismo genotipo en grandes extensiones de terreno, lo que reduce la diversidad genética en los cultivos y facilita la selección de aislados fúngicos capaces de adquirir rápidamente resistencia a los distintos agroquímicos utilizados (Casado del Castillo, 2017)

De todos los métodos de control, los mejores resultados se han obtenido con el desarrollo de cultivares resistentes a *Fusarium*. La resistencia que ha presentado *Fusarium* hacia algunos fungicidas son elementos suficientes para suponer que la diversidad genética de este hongo es muy amplia (Argotti *et al.*, 2011). En Ecuador la identificación de las especies de *Fusarium* se basa en características morfológicas y de patogenicidad (Ochoa & Ellis, 2010), lo que implica gran cantidad de tiempo y material, por lo tanto, una alternativa es encontrar nuevos métodos para un diagnóstico rápido, consistente y confiable. A nivel mundial existen técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética para el diagnóstico de *Fusarium* y otros patógenos; en nuestro país aún no han sido implementadas herramientas de diagnóstico molecular para la identificación de formas especiales de *F. oxysporum* y sus razas. La diversidad biológica de *Fusarium* y otros hongos fitopatógenos han sido estudiados con gran éxito con métodos basados en herramientas moleculares que incluyen la secuenciación de regiones intergénicas del ADN ribosómico nuclear (ADNr), espaciadores intergénicos transcritos ITS1 (entre 18S y 5,8S) e ITS2 (entre 5,8S y 28S); y regiones espaciadoras intergénicas (IGS) entre ADNr 28S y 18S, cuya variabilidad entre especies del mismo género es mayor que la de las regiones ITS, pudiéndose utilizar en ocasiones en una clasificación intraespecífica (Alves-Santos *et al.*, 2002a; Appel y Gordon, 1995; Mirete *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2002; Voigt *et al.*, 1995). En la elaboración de la filogenia también se han utilizado otras secuencias de genes de copia única ricas en intrones como son los genes codificantes de la calmodulina, la β -tubulina, la histona H3, poligalacturonasas (pg1) o los dos genes idiomorfos MAT-1 y MAT-2 (Kawabe *et al.*, 2005; Seifert y Levesque, 2004; Casado del Castillo, 2017).

Varios estudios han demostrado que el análisis de las regiones IGS del ADNr son útiles para estudios de diversidad genética entre formas especiales de *F. oxysporum*, debido a que la región IGS del ADNr es altamente conservada entre grupos genéticamente relacionados; la amplificación por PCR de la región IGS y la identificación de sitios de restricción específicos con programas bioinformáticos y la digestión tanto *in vivo* como *in silico* con enzimas de restricción, permiten obtener fragmentos de restricción de diferente tamaño, dando lugar a patrones polimórficos específicos para cada secuencia. (Henao-Henao *et al.*, 2018).

Por lo expuesto, el propósito de esta investigación, fue evaluar la diversidad genética de formas especiales *vasconcellea* y *quitoense* de *F. oxysporum* agentes causales de la MVB y MVN, mediante análisis PCR-RFLPs de la región IGS del ADNr.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FUSARIUM SPP.

Durante los meses de junio a diciembre del 2019, se recolectaron 12 muestras de plantas de babaco y naranjilla con síntomas de infección por *F. oxysporum*. También se incluyó 4 muestras de plantas de gladiolo (*Gladiolus illyricus*), papaya (*Carica papaya*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y alcachofa (*Cynara cardunculus*) asociados a cultivos de babaco y naranjilla en las provincias de Tungurahua, Pastaza, Chimborazo, Pichincha y Loja. Cada muestra fue desinfectada con etanol al 75 % por un minuto y una solución de hipoclorito de sodio al 5 % por un minuto y lavado tres veces con agua destilada estéril. Las muestras fueron colocadas en una termonevera y transportadas al laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería agropecuaria de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE para su procesamiento; las muestras de raíces, tallos y hojas fueron transferidas a platos Petri de 90 mm por 15 mm con 20 mL con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y selladas con cinta parafilm e incubados a 25°C por 7 días.

La identidad del género *Fusarium* fueron evaluados con los iniciadores universales ITS-fu-f 5'-AACTCCCAAACCCCTGTGA-3' y ITS-fu-r 5'- GCGACGATTACCAGTAACGA-3' (Argotti *et al.*, 2011). Una vez evaluado la identidad de *Fusarium* se obtuvieron cultivos monoconídicos, para lo cual se realizaron diluciones seriadas de esporas previamente obtenidas por filtración en embudos con lana de vidrio; 10 μ l de la dilución fueron extendidos en placas con medio Agar-Agua, las cuales se incubaron 12 horas a 25°C. Transcurrido este

tiempo se observaron las esporas germinadas en lupa binocular (Leica, Germany) y con un bisturí estéril se tomó un microconidio que fue transferido a una placa con medio PDA que fueron conservados mediante resiembras periódicas en platos Petri con medio de cultivo PDA. Estos cultivos fueron utilizados posteriormente en las pruebas de patogenicidad y reacciones de PCR y PCR-RFLP.

2.3 OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

La extracción del ADN genómico se realizó con el método Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) propuesto por Kim *et al.*, (1992) con ligeras modificaciones por el autor. El micelio de cada una de las cepas de *F. oxysporum* conservado a -80°C , fue triturado en un mortero con nitrógeno líquido. El micelio pulverizado fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 300 μl de buffer CTAB (200 ml/l de Tris-base 1 M, 100 ml/l de EDTA pH 8,0; 0,5 M, 20 g/l de CTAB); 300 μl de buffer STE (127,56 g/l de Sorbitol; 24,2 g/l de Tris-base; 3,36g/l de EDTA) y 150 μl de N-Lauroylsarcosine al 5 %. Las muestras fueron homogenizadas con una pipeta e incubadas a 65°C por 1 hora con agitación constante. Posteriormente se añadieron 750 μl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y homogenizado en un vortex durante 15 segundos, seguido de centrifugación a 12.000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 600 μl de isopropanol y 150 μl de acetato de amonio 7,5 M. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 20 minutos y sometida a centrifugación a 12.000 rpm por 20 minutos. El pellet de ADN resultante fue lavado con 500 μl de etanol 70 % y centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. Finalmente, una vez eliminado el etanol, el pellet fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 50 a 100 μl de TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl), y sometido a un tratamiento con RNasa para eliminar residuos de ARN.

2.3 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN IGS

La amplificación de la región IGS del ADNr se realizó con los iniciadores universales CNL12 5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3' y CNS1 5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3' (Appel y Gordon, 1995) (Figura 1), en un volumen de 50 μL con 50 ng de ADN genómico, 2,5 U de GoTaq polimerasa (10 μL de Buffer 5X, 3 mM de MgCl_2), 20 pmol de cada primer, 200 mM de cada dNTPs. En todos los ensayos se incluyó un control negativo con todos los reactantes excepto ADN. Las reacciones de amplificación de la región IGS se realizaron en un Termociclador Biometra (Germany) con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos; desnaturalización a 94°C por 1 minuto; hibridación 54°C por 1 minuto y extensión final; 72°C por 2 minutos, seguida de una extensión final 72°C por 7 minutos. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de Agarosa al 1% en TAE 1X, teñidos con Bromuro de Etidio (EtBr) al 1% y visualizados en un transluminador TFX-20M bajo luz ultravioleta.

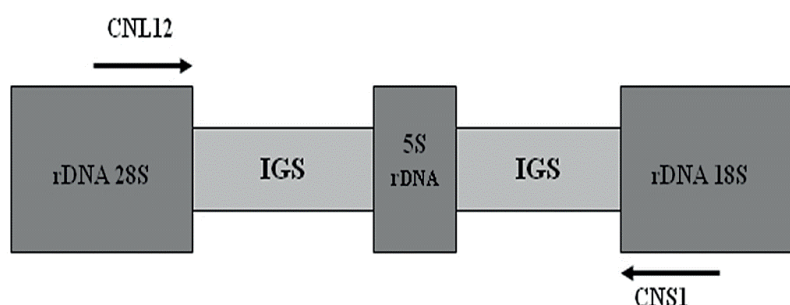


Figura 1. Sitios de anillamiento de los primers CNL12-CNS1 de la región IGS del ADN ribosómico de especies de *Fusarium* spp.

2.4 EL ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los productos amplificados por PCR de la región IGS de cada una de las cepas, fueron enviados a la empresa MacroGen USA (Rockville, Maryland) para limpieza y secuenciación. La comparación de secuencias se realizó con la base de datos en línea BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi>).

nlm.nih.gov/). Para la aplicación de la técnica PCR-RFLP *in silico*, los patrones de restricción específicos para las enzimas EcoRI (Promega) y Apal (New England, Biolabs), con el programa RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org>) y Webcutter 2.0 (Heiman, M. 1997).

El alineamiento de secuencias se realizó en el programa ClustalW 2.0 del EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (European Biology molecular) (Tompson *et al.*, 1997). El árbol filogenético de cada una de las secuencias se realizó con programa FastTree (Price *et al.*, 2009) con el algoritmo de Máxima verosimilitud con 100 réplicas bootstrap (Felsenstein, 1981). La identificación de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se realizó con el software sequence viewer de la NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer/>). En el alineamiento de secuencias se incluyó un grupo externo (outgroup), con el fin de identificar la raíz del árbol filogenético. Las secuencias de referencia fueron obtenidas del banco de genes GenBank de la NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. RESULTADOS

3.1 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN IGS DEL ADN

La amplificación de la región IGS de cada una de las cepas de *Fusarium* generaron productos de amplificación de 1935 a 2603 pb; el tamaño de los fragmentos se determinó en base al marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Promega) y la secuenciación de las cadenas en ambas direcciones (Figura 2). La región IGS consta de una región parcial del gen de ADN ribosómico 18S y asociada a este encontramos dos regiones no codificadoras IGS1/IGS2 y el gen 5S, seguido por una región parcial del gen 28S. Los parámetros de reacción de PCR con los iniciadores CNL12 y CNS1 fueron óptimos y mostraron buena especificidad para la amplificación de la región IGS. En las secuencias IGS aislados de muestras de plantas de babaco y naranjilla se identificaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); en BA3, BA4, BA5, BA6 y NA2 se identificaron 65 haplotipos; en BA1 y BA2 se identificaron 3 haplotipos; en NA1, NA3 y NA5 se identificaron 34, 36 y 37 haplotipos, respectivamente; en los aislamientos NA4 y NA6 se identificaron 28 haplotipos (Datos no mostrados).

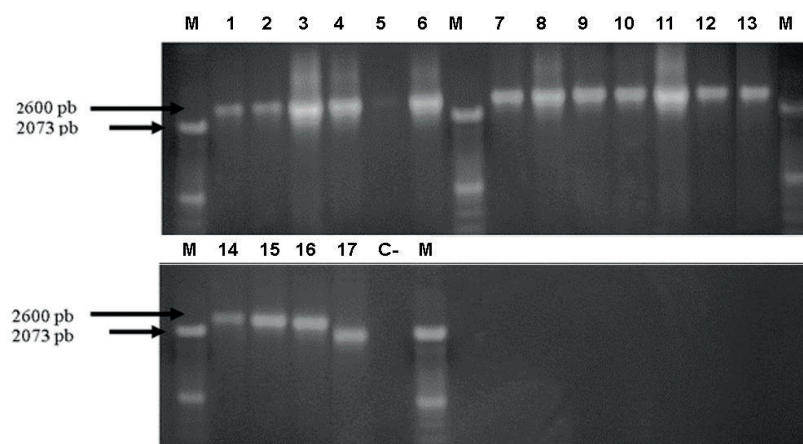


Figura 2. Se muestran las reacciones de PCR. A. Amplificación de la región IGS (M) Marcador de peso molecular; M. Marcador de peso molecular 1. Organismo de referencia (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*) (accesión GenBank EF661647.1). 2. Babaco (2 a 7), 3. Naranjilla (8 a 13), 14. Gladiolo (GL1), 15. Papaya (LC1), 16. Tomate de árbol (TR1), 17. Alcachofa (AL1).

Las secuencias BA1 y BA2 de cultivos de babaco de las provincias de Pichincha y Tungurahua, respectivamente, mostraron el 100% de identidad, al igual que las secuencias BA3 con BA4 de cultivos de babaco de las provincias de Chimborazo y Pichincha. BA5, BA6 y NA1 de cultivos de babaco y naranjilla de las provincias de Loja, Chimborazo y Napo mostraron el 100% de identidad; NA4, NA5 y NA6 de cultivos de naranjilla de las provincias de Tungurahua y

Pichincha mostraron el 100% de identidad; los aislamientos NA2 y NA3 de cultivos de naranjilla de las provincias de Morona Santiago y Tungurahua mostraron diferencias polimórficas. Las secuencias GL1, LC1, TR1 y AL1 mostraron diferencias polimórficas al ser comparadas con las secuencias de referencia de la base de datos de la NCBI.

2.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN IGS DEL ADNr

El árbol filogenético con el programa FastTree, ubica a los aislamientos de babaco y naranjilla y otros cultivos en dos clúster; el primer clúster se subdivide en 4 subgrupos, en el primer subgrupo se ubican los aislamientos NA4 y NA6; en el segundo subgrupo los aislamientos LC1 y TR1; en el tercer subgrupo los aislamientos BA3, BA4, BA5, BA6, NA2 y GL1; en el cuarto subgrupo los aislamientos BA1, BA2, NA1, NA3 y NA5. El aislamiento AL1 se ubica en el segundo clúster (Grafico 3). Las secuencias de *Trichoderma fasciculatum* (AY746393.1), *Hypocrea crassa* (EU927406.1) e *Hypocrea virens* (AY392020.1) utilizadas como outgroup se ubican en un clúster separados de los 6 aislamientos objeto de investigación (Grafico 3).

2.3 PCR-RFLP DE LAS SECUENCIAS IGS

Los productos de la amplificación por PCR de la región IGS, fueron secuenciados y digeridos *in silico* con las enzimas de restricción EcoRI y Apal. El análisis PCR-RFLP *in silico* mostraron perfiles de restricción de tamaños diferentes; en las secuencias BA1, BA2, NA1, NA3 y NA5 se identificó dos sitios de restricción, con tres productos de restricción de 376, 381, 1846 y 239, 988 y 1376 pb para EcoRI y Apal, respectivamente; con las secuencias BA3, BA4, BA5, BA6, NA2 y GL1 se identificó un sitio de restricción para EcoRI y tres sitios de restricción para Apal, con dos y cuatro fragmentos de restricción de 237, 2165 y 195, 397, 439 y 1371; excepto la secuencia NA2 y GL1 con dos sitios de restricción para Apal, con productos de restricción de 239, 918, 1376 y 220, 859, 1370, respectivamente; en las secuencias NA4, NA6 con dos sitios de restricción tanto para EcoRI como para Apal, con productos de restricción de 237, 368, 1797 y 198, 836, 1368, respectivamente. En las secuencias LC1 y TR1 se identificaron 2 sitios de restricción, para EcoRI y Apal; en la secuencia AL1 se identificó un solo sitio de restricción para EcoRI i Apal. (Tabla 1).

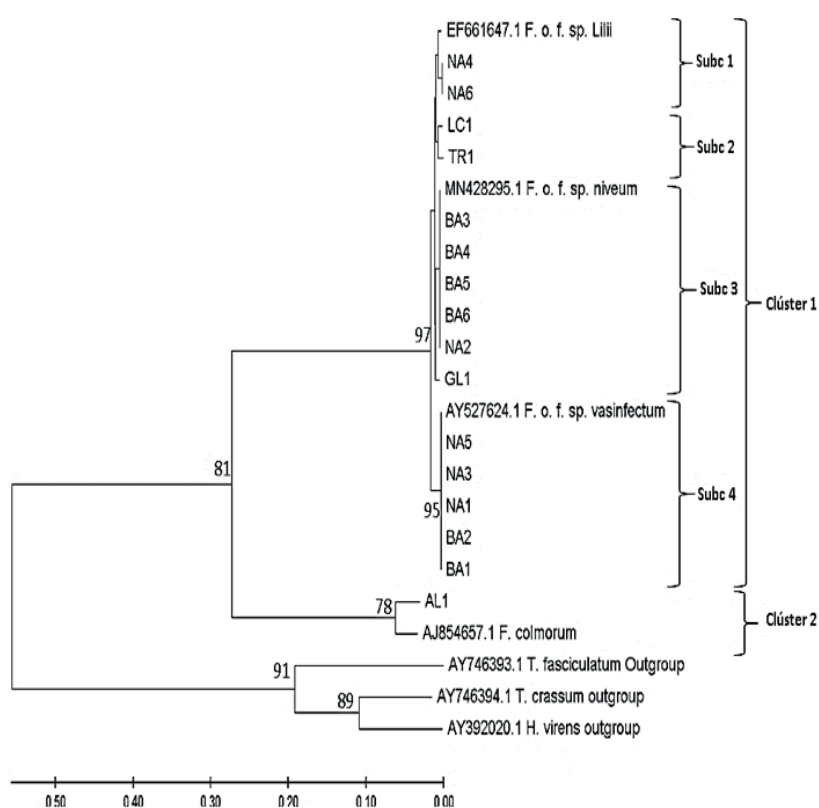


Figura 3. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de secuencias ADNr de la región IGS de especies de *Fusarium*. Los números en los nodos representan los valores de soporte estadístico (bootstrap). Valores menores del 50% se omiten. Secuencias BA1, BA2, BA3, BA4, BA5, BA6 (cultivos de babaco), NA1, NA2, NA3, NA4, NA5, NA6 (cultivos de naranjilla), GL1, LC1, TR1, AL1 (otros cultivos). Los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lillii* (Accesión EF661647) *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (AY527624.1), *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (MN428295.1) y *F. colmorum* (Accesión AJ854657.1) fueron utilizados como secuencias de referencia. Las Secuencias *Trichoderma fasciculatum* (Accesión AY746393.1) y *Hypocrea crassa* (Accesión AY746394.1) *Hypocrea virens* (Accesión AY392020.1) fueron usados como outgroup.

2.4 PCR-RFLP DE LAS SECUENCIAS IGS

Los productos de la amplificación por PCR de la región IGS, fueron secuenciados y digeridos *in silico* con las enzimas de restricción EcoRI y Apal. El análisis PCR-RFLP *in silico* mostraron perfiles de restricción de tamaños diferentes; en las secuencias BA1, BA2, NA1, NA3 y NA5 se identificó dos sitios de restricción, con tres productos de restricción de 376, 381, 1846 y 239, 988 y 1376 pb para EcoRI y Apal, respectivamente; con las secuencias BA3, BA4, BA5, BA6, NA2 y GL1 se identificó un sitio de restricción para EcoRI y tres sitios de restricción para Apal, con dos y cuatro fragmentos de restricción de 237, 2165 y 195, 397, 439 y 1371; excepto la secuencia NA2 y GL1 con dos sitios de restricción para Apal, con productos de restricción de 239, 918, 1376 y 220, 859, 1370, respectivamente; en las secuencias NA4, NA6 con dos sitios de restricción tanto para EcoRI como para Apal, con productos de restricción de 237, 368, 1797 y 198, 836, 1368, respectivamente. En las secuencias LC1 y TR1 se identificaron 2 sitios de restricción, para EcoRI y Apal; en la secuencia AL1 se identificó un solo sitio de restricción para EcoRI i Apal. (Tabla 1).

Tabla 1.

Fragmentos de restricción de las regiones IGS del ADN ribosomal de especies de *Fusarium*, generados *in silico* con las enzimas de restricción EcoRI y Apal en secuencias de babaco, naranjilla, gladiolo, papaya, tomate de árbol y alcachofa.

Cepa	Accesión GenBank	Organismo referencia GenBank	Región IGS	PCR-RFLP EcoRI	PCR-RFLP Apal	% Identidad
BA1	AY527624.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	2603	376, 381, 1846	239, 988, 1376	100%
BA2	EU313440.1	<i>F. oxysporum</i> cepa FoChz 10c	2603	376, 381, 1846	239, 988, 1376	98%
BA3	MN428295.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	2402	237, 2165	195, 397, 439, 1371	100%
BA4	EU313440.1	<i>F. oxysporum</i> cepa FoChz 10c	2402	237, 2165	195, 397, 439, 1371	98%
BA5	EU313440.1	<i>F. oxysporum</i> cepa FoChz 10c	2402	237, 2165	195, 397, 439, 1371	98%
BA6	EU313440.1	<i>F. oxysporum</i> cepa FoChz 10c	2402	237, 2165	195, 397, 439, 1371	98%
NA1	AY118139.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>licopersici</i>	2533	306; 381, 1846	239, 918,1376	98%
NA2	EU313443.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tulipae</i> foGa2	2402	237, 2165	239, 918,1376	98%
NA3	EU857619.1	<i>Fusarium</i> sp. F24 28S	2603	376; 381, 1846	239, 988, 1376	98%
NA4	EF661647.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lilii</i>	2402	237, 368, 1797	198, 836,1368	100%
NA5	EU847620.1	<i>Fusarium</i> sp F29 28S	2603	376, 381, 1846	239, 988, 1376	98%
NA6	AY527712.1	<i>F. oxysporum</i> NRRL26400	2402	237, 368, 1797	198, 836, 1368	99%
GL1	EU313446.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>medicaginis</i>	2490	322, 378, 1790	188, 931, 1371	98%
LC1	EU313454.1	<i>F. oxysporum</i> cepa FoStL 1a	2449	262, 366, 1821	220, 859, 1370	100%
TR1	DQ837883.1	<i>F. oxysporum</i> cepa BMP 1388	2519	352, 378, 1789	188, 961, 1370	99%
AL1	AJ854659.1	<i>F. colmorum</i> cepa CECT 2148	1935	624, 1311	196, 1739	98%

4. DISCUSION

El objetivo de esta investigación fue determinar la diversidad genética de *F. oxysporum* f. sp. *vasconcellea* (Fov) y *F. oxysporum* f. sp. *quitoense* (Fon), asociados a la marchitez vascular de babaco y naranjilla. Los aislamientos fueron obtenidos de plantas de babaco y naranjilla con síntomas de infección por *Fusarium*, que fueron confirmados mediante la amplificación por PCR de secuencias específicas, utilizando los primers universales ITS-fu-f y ITS-fu-r (Argotti *et al.*, 2011). Los análisis PCR, RFLP y filogenéticos de las secuencias IGS del ADNr, mostraron el 98 al 100% de identidad con las secuencias de referencia obtenidas de GenBank de la NCBI. Los resultados mostrados describen claramente la inconsistencia entre la identificación taxonómica y morfológica, y la genética, basada

en el análisis de ADN. Este tipo de discrepancias han sido reportados en otros géneros de hongos fitopatógenos, especialmente en especies del género *Fusarium* tanto patógenas y no patógenas (MacLean *et al.*, 1993; McDonald, 1997). Gran parte de este fenómeno se ha atribuido a la variabilidad fenotípica y genética que presentan las formas especiales de *F. oxysporum* (Nelson, 1991; Kistler, 1997; Gordon y Martyn, 1997; Vakalounakis *et al.*, 1998). Nakime *et al.*, (1994) reportaron diversidad genética de *F. oxysporum*, además la identificación de razas y haplotipos.

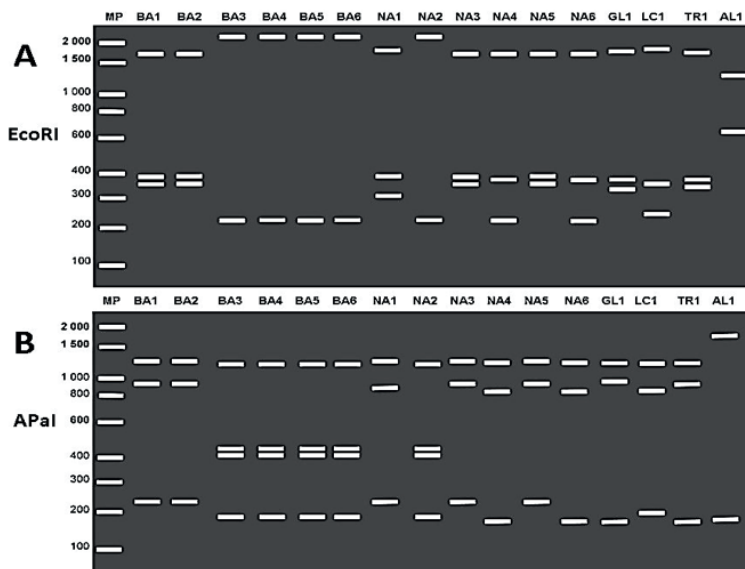


Figura 4. Fragmentos de restricción del espaciador intergénico (IGS) en gel de agarosa al 1,5% *in silico* A: Digestión *in silico* con la enzima EcoRI. B: Digestión *in silico* con la enzima ApaI. MP: Marcador de peso molecular, Carril 1 al 6: secuencias de cultivos de babaco; Carril 7 al 12: secuencias de cultivos de naranjilla; Carril 13: secuencia de gladiolo; Carril 14: secuencia de papaya; Carril 15: secuencia de tomate de árbol; Carril 16: secuencia de alcachofa.

Woo *et al.*, (1996) identificó variabilidad genética entre aislamientos patógenos y no patógenos de *F. oxysporum*, causantes de la marchitez vascular en cultivos de soya usando la técnica de PCR-RFLPs, al parecer las formas especializadas de *F. oxysporum* forman parte de un grupo polifilético (Baayen *et al.*, 2000). El mismo O'Donnell *et al.* (1998) afirma que algunas formas especializadas del complejo *F. oxysporum* son polifiléticos, esto implica que cepas con una base genética muy diferente han adquirido genes patógenos, y la acumulación de mutaciones de tipo transversión, transición, delección, la presencia de transposones y transferencia horizontal de genes también contribuyen a la diversidad observada en cepas patógenas (Gordon & Martyn, 1997); además, *F. oxysporum* presenta un genoma compartimentado estructural y funcionalmente en dos componentes, un genoma central que codifica genes de mantenimiento vitales para la supervivencia y el crecimiento del patógeno y un genoma accesorio que codifica genes de patogenicidad o asociados a la virulencia (Gordon & Martyn, 1997; Ma *et al.*, 2010). Esta observación tiene gran significado para el concepto de formas especiales de *Fusarium* (Kistler *et al.*, 2001). Al respecto (Hibbet, 1992) manifiesta que las regiones IGS del ADNr son altamente estables y exhibe un mosaico de regiones diversas y conservadas dentro del genoma.

Los productos de PCR y la secuenciación de la región IGS mostraron longitudes de 1935 y 2603 pb; que corroboran los reportes realizados por Cai *et al.*, (2003), con fragmentos 2,6 kb en 60 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizando los primers CNL12 y CNS1. Igualmente Yli- Mattila *et al.*, (2002) reportaron fragmentos del tamaño de 2,6 kb en aislamientos *F. avenaceum*, *F. arthrosporioides* y *F. tricinctum*. Appel & Gordon, (1995) reportaron resultados similares en 56 aislamientos patogénicos y no patogénicos de *F. oxysporum*. Sin embargo

Apratim Chakrabarti *et al.*, (2000) reportaron secuencias de la región IGS para *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de 2,4 a 2,6 kb con los primers CLN12 y CNS1. Appel & Gordón (1995) demostraron variación intraespecífica de 56 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, colectados de Maryland y California.

El análisis filogenético construido con el programa Fasttree, basado en el método de máxima verosimilitud de las secuencias IGS, apoya el origen polifilético de las formas especiales propuesto por Bentley *et al.*, (1998), O'Donnell *et al.*, (1998), Groenewald *et al.*, (2006) y Fourie *et al.*, (2009); el análisis filogenético de las formas especiales *vasconcellea* y *quitoense*, separa a los aislamientos en dos clúster; en el primer clúster se ubican los 15 aislamientos dividido en cuatro subgrupos con una divergencia de 70 y 201 nucleótidos; en el segundo clúster se ubica el aislamiento AL1 totalmente divergente con 467 y 668 nucleótidos. En el primer subgrupo se ubican las secuencias NA4 y NA6, pertenecientes a las provincias de Tungurahua y Pichincha; en el segundo subgrupo se ubican las secuencias LC1 y TR1 de cultivos de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas; en el tercer subgrupo encontramos las secuencia BA3, BA4, BA5, BA6, NA2 y GL1 de cultivos de las provincias de Pichincha, Tungurahua, Loja, Chimborazo, Morona Santiago e Imbabura y en el cuarto subgrupo encontramos a las secuencias BA1, BA2, NA1, NA3 y NA5 aislados de cultivos de las provincias de Tungurahua, Napo y Pichincha. En el segundo clúster encontramos a la secuencia AL1 recuperado de cultivos de alcachofa en la provincia de Imbabura. La presencia de SNPs muestra la diversidad genética intraespecífica de las f. sp. *vasconcellea* y la f. sp. *quitoense*. En las secuencias BA1 y BA2 se identificaron tres haplotipos, en las secuencias BA3, BA4, BA5, BA6, se identificaron 65 haplotipos; en las secuencias de la f. sp. *quitoense* NA1, NA2, NA3, NA4, NA5 y NA6, se identificaron 34, 65, 36, 28, 37, 28 haplotipos. Los resultados obtenidos demuestran que la f. sp. *quitoense* es más diversa la f. sp. *vasconcellea*. Al respecto Soria *et al.*, (1992) manifiestan que los cultivos de babaco son exclusivamente asexual, por brotes, estacas e injerto y los cultivos de naranjilla común el cultivo se realiza por plántulas, previamente germinadas en invernadero (Ochoa, *et al.*, 2010).

De acuerdo a los resultados mostrados en esta investigación se puede apreciar que secuencias obtenidos de cultivos de babaco y naranjilla de diferente origen geográfico, se ubican en el mismo clúster; lo que demuestra que evolucionaron a partir del mismo ancestro común y tienen un origen polifilético; estos resultados corroboran los reportes realizados por O'Donnell *et al.* (1998), quienes demostraron que algunas formas especiales de *F. oxysporum* no tienen origen monofilético y cepas de una forma especial están estrechamente relacionados con cepas pertenecientes a otras formas especiales de *F. oxysporum*. Según Koenig *et al.*, (1997), O'Donnell *et al.*, (1998) y Fourie *et al.*, (2009) confirman que formas especializadas del complejo *F. oxysporum* son de origen polifilético; Igualmente Baayen *et al.*, (2000) manifiestan que las formas especializadas de *F. oxysporum* forman parte de un grupo polifilético; esto implica que cepas con una base genética muy diferente han adquirido genes patógenos. Según Kim *et al.*, (1993) la mayoría de estudios de diversidad genética enfoca una sola forma especial y muy pocos datos están disponibles sobre la relación entre diferentes formas especiales. En este estudio se encontraron diferencias significativas en la secuencia de nucleótidos entre formas especiales, estos resultados reafirman los hallazgos realizados por Kistler *et al.*, (2001), quienes manifiestan que existe variabilidad genética de la región IGS dentro y entre formas especiales; estudios similares han sido aplicados con éxito para la identificación de *Aspergillus* y otros hongos tanto patógenos y no patógenos (Moody y Tyler, 1990).

5. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en esta investigación, utilizando marcadores PCR-RFLP de la región IGS del ADNr nos permite aseverar que más de una técnica molecular puede ser utilizada para estudios de diversidad genética intraespecífica en formas especiales de *F. oxysporum* f. sp. *vasconcellea* y *F. oxysporum* f. sp. *quitoense*, agentes causales de la marchitez vascular de babaco (MVB) y naranjilla (MVN). La región IGS del ADNr utilizados en este estudio, ha sido usada con gran éxito en varias investigaciones para estudios de diversidad genética de hongos

patógenos y no patógenos. La amplificación por PCR y la secuenciación de la región IGS del ADNr, así, como, el análisis filogenético y la identificación de SNPs, dividen a los 16 aislamientos en dos clúster; en el primer clúster se ubican los 15 aislamientos dividido en cuatro subgrupos, con el 98 al 100% de identidad respecto a las secuencias de referencia; el aislamiento AL1 se ubica en el segundo clúster, con el 98% de identidad respecto a *F. colmorum* utilizado como organismo de referencia.

De igual forma, el análisis filogenético mostró, que aislamientos de diferente origen geográfico se ubican en diferentes subgrupos, pero dentro del mismo clúster, estos resultados evidencian que *F. oxysporum* f. sp. *vasconcellea* y *F. oxysporum* f. sp. *quitoense* evolucionaron a partir del mismo ancestro común y tendrían un origen polifilético. La amplificación por PCR y la secuenciación de la región IGS del ADNr de las formas especiales de *F. oxysporum*, así, como, el alineamiento de secuencias, el análisis filogenético de máxima verosimilitud y la digestión con las endonucleasas de restricción EcoRI y Apal fueron utilizados para la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); estos resultado apoyan las evidencias mostradas por varios autores de la gran diversidad genética de la región IGS del ADNr de las formas especiales de *F. oxysporum*. En conclusión, los marcadores PCR-RFLPs de la región IGS del ADNr han demostrado ser una forma rápida y adecuada de agrupar aislados de formas especiales de *F. oxysporum* estrechamente relacionados.

6. AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincero agradecimiento a las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta investigación. Al señor Ing. José Ochoa, técnico del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental "Santa Catalina" del INIAP por apoyo profesional, para el análisis de las muestras de hongos fitopatógenos, al Sr. Dr. Luis Oswaldo Villa por la revisión del artículo y elaboración del abstract.

7. REFERENCIAS

- Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P., and Díaz-Mínguez, J. M. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3335-3340.
- Alves-Santos, F. M., Ramos, B., García-Sánchez, M. A., Eslava, A. P., and Díaz-Mínguez, J. M. (2002). A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 92:237-244.
- Appel, D. J. and Gordon, T. R. (1995). Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental Mycol.* 19:120-128.
- Appel, D. J. y Gordon, T. R. (1996). Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mol Plant Microbe Interact* 9, 125-138.
- Apratim, C., Mukherjee, K. P., Sherkhane, P D., Bhagwat A. S., and B. K. Murth. (2000). A simple and rapid molecular method for distinguishing between races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* from India. Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400 085.
- Argotti Valencia, E. E. (2016). Funciones fisiológicas de la detoxificación del óxido nítrico en *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: El papel de las flavohemoglobinas. Tesis doctoral, Universidad de Salamanca.
- Argotti, E., Cazar, M., Motte, E., & Cedeño, V. (2011). Análisis molecular de la región ITS de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez vascular de *Vasconcellea heilbornii* y *Solanum quiotense* en Ecuador. *ESPE Ciencia y Tecnología*, 3(1), 25-36.

- Baayen, R., P. (2000). Diagnosis and detection of host-specific forms of *Fusarium oxysporum*. Bulletin OEPP/EPPO 30:489-491.
- Baayen, R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.J.M., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroeck, E.J.A. and Waalwijk, C. (2000a). Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *formae speciales* causing wilt and rot diseases. *Phytopathology* 90: 891-900.
- Badillo, VM. (1993). *Caricaceae. Segundo Esquema*. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central. Alcance 43. Maracay, Venezuela. 111 pp.
- Booth, C. (1971). The species of *Fusarium*. En *The genus Fusarium*, pp. 130- 155. Edited by Institute, C. M.
- Botstein, D., K. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*32:3 14-33 I.
- Bruns, T. D., T. J. White & W. Taylor. (1991). Fungal Molecular Systematic. En: *Rev. Ecology Systematic*. 22:525-564.
- Cai, G., Rosewich Gale, L., Schneider, R. W., Kistler, H. C., Davis, R. M., Elias, K. S. and Miyao, E. M. (2003). Origin of Race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology* 93:1014-1022.
- Casado del Castillo, V. (2017). Resumen de tesis. Las funciones de FTF2 en *Fusarium oxysporum*.
- Felsenstein J. (1978). Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Sys. Zool.* 27: 401-410.
- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Ploetz, R. C., Gordon, T. R., & Viljoen, A. (2011). Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* *formae specialis cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 533-542.
- Gordon, T. R. y Martyn, R. D. (1997). The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu Rev Phytopathol* 35, 111-128.
- Hajek, A. E., Humber, R. A., Elkinton, J. S., May, B., Walsh, S. R., & Silver, J. C. (1990). Allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses confirm *Entomophaga maimaiga* responsible for 1989 epizootics in North American gypsy moth populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(18), 6979-6982.
- Heiman, M. (1997). Webcutter 2.0. [http://www. Firstmarket/cutter/cut2. Html](http://www.Firstmarket/cutter/cut2.Html).
- Heiser, C., and Anderson, G. 1999. "New" Solanums. Pages 379-383 in: *Perspectives on New Crops and New Uses: Proceedings of the Fourth National Symposium New Crops and New Uses*. J. Janick, ed. ASHS Press. Alexandria, VA.
- Henao-Henao, E. D., Hernández-Medina, C. A., Salazar-González, C., Velasco-Belalcazar, M. L., & Gómez-López, E. D. (2018). Molecular identification of *Fusarium* isolates associated with passion fruit in five locations from Valle del Cauca, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 29(1), 56-65.
- Hibbett, D. S. (1992). Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans Mycol Soc Jpn*, 33, 533-556.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73.
- Jiménez-Gasco, M. M., and Jiménez-Díaz, R. M. (2003). Development of a specific polymerase chain reaction-

- based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* 93:200-209.
- Kim, D. H., Martyn, R. D., and Magill, C. W. (1993). Mitochondrial DNA (mtDNA)-relatedness among formae speciales of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae. *Phytopathology* 83:91-97.
- Kim, W.K., Mauthe, W., Hausner, G. & Klassen, G.R. (1990). Isolation of high molecular weight DNA and double-stranded RNAs from fungi. *Can J Bot*, (68), 1898-1902.
- Kistler, H. C. (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87, 474-479.
- Kistler, H. C. (2001). Evolution of the Host specificity in *Fusarium oxysporum*. En *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*, pp. 70-96. Edited by Summerell, A., Leslie, J. F., Badihouse, D., Bryden, W. L. and Burgess, L. W.
- Koenig, R. L., Ploetz, R. C., & Kistler, H. C. (1997). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. *Phytopathology*, 87(9), 915-923.
- Ma L. J., Van Der Does H. C., Borkovich K. A., Coleman J. J., Daboussi M. J., Di Pietro A., et al. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464 367–373. 10.1038/nature08850
- Ma, L. J. (2014). Horizontal chromosome transfer and rational strategies to manage *Fusarium* vascular wilt diseases. *Molecular Plant Pathology*, 15(8), 763.
- McDonald, B.A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87: 448-453.
- McLean, D.J., K.S. Braithwaite, J. M. Manners, and J.A.G. Irwin. (1993). How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis? p. 207-244. *In: Advances in Plant Pathology*, Vol 10. Academic Press, New York, USA.
- Meneses M., H. y Correa C. J. (1992). El Cultivo del lulo o naranjilla. Secretaria de Agricultura. No. 18. 40 p.
- Moody, S. F., & Tyler, B. M. (1990). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2441-2452.
- Namiki, F., Shiomi, T., Kayamura, T., and Tsuge, T. (1994). Characterization of the formae speciales of *Fusarium oxysporum* causing wilts of cucurbits by DNA fingerprinting with nuclear repetitive DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2684-2691.
- Nelson, P.E. (1991). History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology* 81: 1045-1048.
- Nirenberg, H. I., & O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 434-458.
- Ochoa, J. B., Ellis, M. A., & Alwang, J. (2010). El Manejo de la Fusariosis como base para un cultivo ecológico de la naranjilla en el Ecuador. INIAP Archivo Histórico.
- Ochoa, J.B., Yangari, B.F., Ellis, M.A. and Williams, R.N. (2004). Two new formae speciales of *Fusarium oxysporum*, causing vascular wilt (*Vasconcellea heilbornii* and vascular wilt on naranjilla (*Solanum quitoense*) in Ecuador 39(1):10-17.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. and Ploetz, R.C. (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.
- Parry DW, Jenkinson P & McLeod L (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathol* 44: 207–238.
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular biology and evolution*, 26(7), 1641-1650.
- Revelo, J., Viteri, P., Vásquez, W., Valverde, F., León, J., y Gallegos, P. (2010). Manual del cultivo ecológico de la naranjilla. INIAP Quito.
- Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Schilling A.G. (1996). Characterization and differentiation of the cereal pathogens *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* by PCR-based molecular markers. Ph.D Thesis. University of Hohenheim, Germany.
- Soria, N; Viteri, P. (1999). Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador. Quito: INIAP. 48 p.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- Vakalounakis, D. J., and Fragkiadakis, G. A. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* 89:161-168.
- Valadez, E. y Günter, K. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). México: Universidad Autónoma de Chapingo/Mundi Prensa.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van der Lee, T., Hornes, M., Frijtens, A., Pot, J., Peleman, J., Kiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407- 4414.
- White TJ, T.D. Bruns, S. Lee y J. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols, a guide to methods and applications.* Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. Academic Press. San Diego, California.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wong JY & Jeffries P (2006) Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK. *Plant Pathol* 55: 331–342.
- Woo, S.L., A. Zoina, G. Del Sorbo, M. Lorito, B. Nanni, F. Scala, and C. Noviello. (1996). Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs. RFLPs and RAPD. *Phytopathology* 86: 966-973.
- Yli-Mattila, T. (2010). Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 7-18.