



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: OMAR PAÚL ARIAS GAGUANCELA

**TEMA: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Fusarium sp.* A
PARTIR DE AISLADOS DE ISRAEL Y ESTADOS UNIDOS.**

DIRECTORA: ALMA ROSEL KOCH KAISER, MSc.

CODIRECTOR: ING. TATIANA PÁEZ BARRERA, MSc.

SANGOLQUÍ, OCTUBRE 2014.

CERTIFICACIÓN

Alma Koch Kaiser, MSc.

Ing. Tatiana Páez Barrera, MSc.

Certifican:

Que el trabajo de tesis titulado como “**Caracterización genética de poblaciones de *Fusarium sp.*, a partir de aislados de Israel y Estados Unidos**”, realizado por el Sr. Omar Paúl Arias Gaguancela, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”.

Debido a que este estudio es parte del convenio entre el laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas y el Departamento de Entomología y Patología de Plantas de la Universidad del Estado de Oklahoma (OSU), se deja en libertad de la autor y de OSU, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto con los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Omar Paúl Arias Gaguancela que lo entregue a M.V.Z. María Augusta Chávez Larrea, MSc., en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, Octubre del 2014.

Alma Koch Kaiser MSc.

DIRECTORA

Ing. Tatiana Páez Barrera MSc.

CODIRECTORA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Omar Paúl Arias Gaguancela

Declaro que:

El perfil de tesis de graduación “**Caracterización genética de poblaciones de *Fusarium sp.*, a partir de aislados de Israel y Estados Unidos**” ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas colocadas al final de cada párrafo, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría. En virtud de esta declaración me responsabilizo de su contenido, veracidad y alcance científico.

Omar Paúl Arias Gaguancela

AUTORIZACIÓN

Yo, Omar Paúl Arias Gaguancela

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“Caracterización genética de poblaciones de *Fusarium sp.*, a partir de aislados de Israel y Estados Unidos”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Octubre del 2014.

Omar Paúl Arias Gaguancela

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría expresar mis agradecimientos a mi madre Mercy por haberme apoyado incondicionalmente durante las distintas etapas de mi vida, es debido a su amor, dedicación y esfuerzo que he podido cumplir todas las metas trazadas hasta el momento. Siempre estaré agradecido por tener una madre tan maravillosa y trabajadora, su ejemplo de superación diaria me ha servido de inspiración para derribar todo obstáculo y convertirme en una mejor persona cada día.

Deseo expresar mi total gratitud a la Universidad del Estado de Oklahoma - Departamento de Entomología y Patología de Plantas (OSU), específicamente a Carla Garzón PhD., quien me dio la oportunidad de desarrollarme como científico, desde la primera ocasión que tuve de realizar pasantías, ha sabido ser una persona y guía excepcional tanto en el ámbito profesional como personal. Es gracias a su colaboración, generosidad y ayuda que este tipo de investigaciones pueden llevarse a cabo.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”, Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, específicamente a mi Directora de tesis Alma Koch MSc., quien ha confiado en mí y me permitió dar los primeros pasos en el ámbito académico, gracias a su oportunidad, apoyo y preocupación. He podido realizar grandes avances profesionales. Además a la Codirectora Ing. Tatiana Páez MSc., y a Lenin Ron PhD., por haber colaborado con su asesoría durante la realización del presente estudio.

A Stephen Marek PhD., (OSU), por haber coordinado y asesorado en las distintas etapas de desarrollo del presente estudio, también a Jacque Fletcher PhD., (OSU), directora del NIMFFAB (Instituto Nacional para Microbiología Forense y Bioseguridad de Agricultura y Alimentos) por haber colaborado en el financiamiento de varios de los ensayos realizados. A Ian Moncrief PhD., (OSU), por haber colaborado con algunas de las técnicas, reactivos y controles positivos empleados.

A Abraham Gamliel PhD., Director del Laboratorio para Investigación y Control de Pestes del Instituto de Investigación Agrícola (ARO) – Organismo del Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural del Estado de Israel, por haber provisto los aislados empleados para esta investigación.

A la Ing. Gabriela Orquera MSc., y a la Ing. Patricia Garrido MSc., por haberme brindado su amistad además de su conocimiento y experiencia en el ámbito científico. A Lis Peña por haber ayudado con el aislamiento y mantenimiento de algunos de los cultivos de *Fusarium* provenientes de USA.

A mi amiga y compañera incondicional Sofía Játiva, por haberme apoyado en las distintas etapas de mi vida universitaria, gracias por haberme otorgado su amistad y apoyo, además de ser una gran confidente y servir de soporte en momentos difíciles.

DEDICATORIA

A Dios.

Al amor incondicional de mi madre.

A mi padre que me está observando desde algún lugar del más allá.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Formulación del problema | 1 |
| 1.2. Justificación del problema | 3 |
| 1.3. Objetivos..... | 5 |
| 1.3.1. Objetivo general | 5 |
| 1.3.2. Objetivos específicos..... | 5 |
| 1.4. Marco teórico..... | 7 |
| 1.4.1. Hospedero | 7 |
| 1.4.2. Patógeno | 7 |
| 1.4.3. Patogenicidad..... | 8 |
| 1.4.4. Metabolismo secundario..... | 9 |
| 1.4.5. Marcadores moleculares | 11 |
| 1.4.6. Genética de poblaciones | 14 |
| 1.5. Sistema de Hipótesis | 20 |
| | |
| CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 2.1. Participantes..... | 21 |
| 2.1.1. Instituciones:..... | 21 |
| 2.1.2. Colaboradores científicos: | 21 |
| 2.2. Zona de Estudio | 21 |
| 2.3. Periodo de Investigación | 21 |
| 2.4. Material de trabajo..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5. Protocolo de aislamiento de espora única de especies del género <i>Fusarium</i> | 24 |
| 2.5.1. Condiciones previas de cultivo | 24 |
| 2.5.2. Condiciones de cultivo e inoculación | 25 |
| 2.6. Análisis molecular | 27 |
| 2.6.1. Extracción de DNA | 27 |
| 2.6.2. Normalización de DNA | 27 |
| 2.6.3. Detección del género <i>Fusarium</i> | 28 |
| 2.6.4. Detección específica de <i>Fusarium proliferatum</i> | 30 |
| 2.6.5. Secuenciación | 32 |
| 2.6.6. Análisis de secuencias | 33 |
| 2.6.7. Detección de genes productores de micotoxina fumonisina | 35 |
| 2.6.8 Amplificación de microsatélites fluorescentes SSRs | 37 |
| 2.6.9 Estandarización del protocolo de preparación de muestras SSRs para análisis de fragmentos o secuenciación en electroforesis capilar | 40 |
| 2.6.10. Análisis estadístico de datos de SSRs | 41 |
| 2.6.13. Protocolo de inducción <i>in vitro</i> para producción de fumonisinas a partir de cultivos de <i>Fusarium</i> del grupo A de aislados | 43 |
| 2.6.14. Análisis toxicológico de fumonisinas | 45 |
| CAPÍTULO 3: RESULTADOS | 47 |
| “GRUPO A” | 47 |
| 3.1. Análisis Morfológico | 47 |
| 3.2. Análisis Molecular | 48 |
| 3.2.1. Extracción y evaluación de DNA | 48 |
| 3.2.2. Detección del género <i>Fusarium</i> | 48 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3. Detección específica de <i>Fusarium proliferatum</i> | 49 |
| 3.2.3.1. Identificación mediante amplificación de genes TEF1 α y CAM | 49 |
| 3.2.3.2. Identificación en bases de datos | 50 |
| 3.2.3.3. Identificación de grupos o genotipos en árbol filogenético | 53 |
| 3.2.4. Detección de genes productores de micotoxina fumonisina | 56 |
| 3.2.5. Inducción <i>in vitro</i> para producción de fumonisinas a partir de cultivos de <i>Fusarium</i> | 60 |
| 3.2.6. Análisis toxicológico de fumonisinas | 64 |
| “GRUPO B” | 66 |
| 3.3. Análisis Molecular..... | 66 |
| 3.3.1. Extracción y evaluación de DNA | 66 |
| 3.3.2. Detección específica de <i>Fusarium proliferatum</i> | 66 |
| 3.3.3. Perfil genético de <i>Fusarium proliferatum</i> mediante uso de SSRs - secuencias de repetición simple..... | 68 |
| 3.3.3.1. Análisis intrapoblacional | 69 |
| 3.3.3.1.1. Frecuencias Alélicas..... | 69 |
| 3.3.3.1.2. Estimación de variabilidad genética..... | 71 |
| 3.3.3.2. Análisis interpoblacional | 73 |
| 3.3.3.2.1. Identidad genética | 73 |
| 3.3.3.2.2. Análisis de varianza molecular (AMOVA), coeficiente de varianza genética (PhiPT) y flujo génico (Nm) | 74 |
| 3.3.3.2.3. Método sin ponderar de agrupamiento en pares con uso de media aritmética (UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y árbol de unión (NJ- Neighbor joining tree) | 78 |
| 3.3.3.2.3. Análisis de coordenadas principales (PCoA)..... | 82 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.3.2.4. Asignación genética mediante análisis Bayesiano | 83 |
| 3.3.4. Detección de gen Fum8 asociado con la generación de fumonisinas | 87 |
| CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN | 89 |
| “GRUPO A” | 89 |
| 4.1. Perfil Genético | 89 |
| 4.2. Detección de genes productores de micotoxina fumonisina y producción <i>in vitro</i> | 91 |
| “GRUPO B” | 93 |
| 4.3. Perfil Genético | 93 |
| 4.3.1. Análisis intrapoblacional | 95 |
| 4.3.2. Análisis interpoblacional | 96 |
| 4.4. Detección de gen Fum8 asociado con la generación de fumonisinas. | 98 |
| CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES | 99 |
| CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES | 103 |
| CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA | 104 |
| ANEXOS | 119 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 2.1: aislados de cebolla de acuerdo al número de capas y daño encontrado en bulbo (S: sintomático, A: asintomático). | 23 |
| Tabla 2.2: primers de detección para el género <i>Fusarium</i> , se detalla su secuencia, temperatura de alineamiento y fuente bibliográfica. | 29 |
| Tabla 2.3: listado de reactivos y proporciones empleadas en el ensayo PCR del gen TEF1 α mediante los primers EF1- EF2. | 29 |
| Tabla 2.4: listado de condiciones para el ensayo de PCR del gen TEF1 α utilizando los primers EF1- EF2. | 30 |
| Tabla 2.5: primers de detección específica para <i>Fusarium proliferatum</i> | 31 |
| Tabla 2.6: listado de parámetros para los ensayos PCR de los primers; a) Proli1F/TEF1R y b) PRO1/PRO2. | 31 |
| Tabla 2.7: condiciones de limpieza molecular en termociclador usando el reactivo ExoSAP-IT. | 32 |
| Tabla 2.8: primers para detección de genes productores de fumonisinas; temperatura de alineamiento (Tm). | 36 |
| Tabla 2.9: lista de condiciones aplicadas a todos los ensayos de PCR para detección de genes del clúster FUM; temperatura de alineamiento (Tm) de acuerdo al primer correspondiente detallado en la tabla 2.8. | 36 |

| | |
|---|-----------|
| Tabla 2.10: listado de microsatélites SSRs empleados en el presente estudio (Moncrief, 2013). a) Nombre, secuencia, tipo de marcaje fluorescente, b) Motif, tamaño de banda esperado, temperatura de alineamiento (T _m), c) características de absorción y emisión de fluorocromos..... | 37 |
| Tabla 2.11: listado de reactivos y proporciones empleadas en el ensayo PCR..... | 39 |
| Tabla 2.12: condiciones de PCR para amplificación de microsatélites; T _m : de acuerdo al primer SSR correspondiente detallado en la tabla 2.10 (b)..... | 39 |
| Tabla 3.1: identificación de especie basada en la secuenciación del gen TEF1 α (base de datos NCBI)..... | 51 |
| Tabla 3.2: identificación de especie basada en la secuenciación del gen TEF1 α (base de datos MLST)..... | 52 |
| Tabla 3.3: cuadro comparativo de identificación de especies de <i>Fusarium</i> | 55 |
| Tabla 3.4: registro de contaminación de <i>Fusarium</i> en variedades de grano; (+): crecimiento; (-): ausencia de crecimiento. | 61 |
| Tabla 3.5: cuantificación de fumonisinas (ppm) sintetizadas in vitro por aislados de <i>Fusarium</i> y presencia de genes FUM; n/d: niveles no detectados (0 ppm); *Muestras con niveles de fumonisinas que excedieron los límites de cuantificación de OADDL; (+): detección del gen; (-) gen no detectado..... | 65 |
| Tabla 3.6: identidades de dos aislados de Israel, búsqueda en la base de datos del NCBI y MLST; ID: nombre del aislado..... | 68 |

| | |
|---|-----------|
| Tabla 3.7: frecuencias alélicas totales de cada locus en el total de la población (valores de frecuencias en el rango de 0 a 1)..... | 70 |
| Tabla 3.8: proporción de alelos únicos y exclusivos en todas las poblaciones. Na: número de alelos diferentes o riqueza alélica, Ne: número de alelos efectivos, % E total: proporción de alelos exclusivos en función del total. | 71 |
| Tabla 3.9: valores estimados de variación genética mediante el uso de marcadores microsatélites SSRs. I: Índice de información de Shannon; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada imparcial; P (%): porcentaje de loci polimórfico..... | 72 |
| Tabla 3.10: matriz de distancias genéticas totales en pares de Nei (1973). Los colores amarillos y verdes representan el comportamiento de las capas superiores (orden descendente desde “a1” hasta “e1”) e inferiores (desde “a2” hasta “e2”) respectivamente. | 74 |
| Tabla 3.11: análisis de varianza molecular (AMOVA) para 143 aislados de <i>Fusarium proliferatum</i> provenientes de cebolla blanca (<i>Allium cepa</i>). | 75 |
| Tabla 3.12: estimación de la varianza y flujo genético del total poblacional de 143 aislados de <i>Fusarium proliferatum</i> en base al valores estadísticos PhiPT y Nm respectivamente (significancia $p < 0.003$; 999 permutaciones)..... | 76 |
| Tabla 3.13: combinación entre poblaciones y valores de PhiPT y Nm..... | 77 |
| Tabla 3.14: matriz de datos para construcción de método gráfico de análisis. Resaltado en verde se denota el nivel más alto de delta K..... | 84 |

Tabla 3.15: soporte estadístico F_{st} para cada uno de los K generados en el estudio con una significancia de $p < 0.001$ (STRUCTURE versión 2.3.4)..... **84**

Tabla 3.16: listado de aislados de *Fusarium proliferatum* que no amplificaron para el gen Fum8 (ID: nombre del aislado); (-): gen Fum8 no detectado..... **88**

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.1:** representación esquemática de las formas básicas de esporas asexuales en *Fusarium*: marcoconida (ma), microconida (mi) y clamidiosporas (cs) (Toshiaki *et al.*, 2004)..... **8**
- Figura 1.2:** representación esquemática de la estructura química de la fumonisina variedad FB1 (De la Torre *et al.*, 2014)..... **11**
- Figura 1.3:** representación esquemática del proceso de electroforesis capilar (Life Technologies, 2012)..... **13**
- Figura 2.1:** a) cebolla con sintomatología de pudrición empleada en estudio (manchas salmón y blanquecinas - salmon blotch), b) cortes realizados para generar aislamiento en cebolla asintomática. **22**
- Figura 2.2:** esquema de los cortes transversales realizados a las cebollas para aislamiento de las muestras de Israel (Grupo B). **24**
- Figura 2.3:** aislamiento de *Fusarium* en medio YPS, encerrado en círculo negro se puede apreciar el halo hifal, correspondiente a crecimiento del cultivo, alrededor de la muestra de cebolla..... **25**
- Figura 2.4:** esquema de un aislamiento de colonia única (en círculo amarillo) a partir de inóculo hifal. **26**
- Figura 2.5:** crecimiento de hifa a partir de inóculo de colonia o espora únicas..... **26**

| | |
|--|-----------|
| Figura 2.6: crecimiento de muestra de espora única de <i>Fusarium</i> (líneas purpuras) para preservación en papel filtro, desecada y almacenada en equipo de desecación a temperatura de 4°C. | 27 |
| Figura 2.7: comparación de secuencias - espectrogramas de los primers (EF1) forward y (EF2) reverse en Chromas Pro para obtención de secuencia consenso..... | 33 |
| Figura 2.8: ventana para modificación de parámetros de construcción de árbol filogenético (Software MEGA versión 5.2)..... | 35 |
| Figura 2.9: picos de tamaño de banda para la combinación A de microsatélites; SSR 38 (pico negro- fluorescencia amarilla), SSR 45 (pico rojo- fluorescencia roja), SSR 92 (pico azul- fluorescencia azul), la línea roja transversal corresponde al reactivo LIZ600. | 41 |
| Figura 2.10: cajas magenta con avena y sorgo (50/50), preparadas para el proceso de contaminación con aislados de <i>Fusarium</i> | 44 |
| Figura 2.11: cajas magenta con maíz preparadas para el proceso de contaminación con aislados de <i>Fusarium</i> | 44 |
| Figura 2.12: cultivos activados de <i>Fusarium</i> a los cuales se les extrajo segmentos circulares de agar para generar la inoculación en grano. | 45 |
| Figura 2.13: muestras empaquetadas para análisis de fumonisinas (pesada y procesada de acuerdo a parámetros de OADDL). | 45 |

- Figura 3.1:** agrupamiento de macro (segmentos alargados y oblicuos) y microconidia (segmentos cortos semicirculares) en 1 μ L de muestra de aislados de USA observadas en microscopio óptico (40X)..... **47**
- Figura 3.2:** amplificación del gen TEF1 α usando muestras del Grupo A; M: marcador de peso molecular de 100 bp, 1: *Fusarium* 1, 2: *Fusarium* 2, 3: *Fusarium* 3, 4: *Fusarium* 4, 5: *Fusarium* 5, 6: *Fusarium* 6, 7: *Fusarium* 7, 8: *Fusarium* 8, 9: *Fusarium* 9, 10: *Fusarium* 10, 11: *Fusarium* 11, 12: *Fusarium* 12, (-): control negativo. **48**
- Figura 3.3:** amplificación del gen calmodulin usando muestras del grupo A; M: marcador de peso molecular de 100 bp, 1: *Fusarium* 1, 2: *Fusarium* 2, 3: *Fusarium* 3, 4: *Fusarium* 4, 5: *Fusarium* 5, 6: *Fusarium* 6, 7: *Fusarium* 7, 8: *Fusarium* 8, 9: *Fusarium* 9, 10: *Fusarium* 10, 11: *Fusarium* 11, 12: *Fusarium* 12. **49**
- Figura 3.4:** amplificación un sector del gen TEF1 α ; M: marcador de peso molecular de 100 bp, 1: *Fusarium* 1, 2: *Fusarium* 2, 3: *Fusarium* 3, 4: *Fusarium* 4, 5: *Fusarium* 5, 6: *Fusarium* 6, 7: *Fusarium* 7, 8: *Fusarium* 8, 9: *Fusarium* 9, 10: *Fusarium* 10, 11: *Fusarium* 11, 12: *Fusarium* 12..... **50**
- Figura 3.5:** alineamiento múltiple de secuencias consenso de *Fusarium* (MEGA versión 5.2), los recuadros en negro representan algunas de las diferencias o variabilidades de bases entre secuencias. **53**
- Figura 3.6:** árbol filogenético consenso en base a secuencias del gen TEF1 α , valores Bootstrap presentados en las tres ramificaciones principales (MEGA versión 5.2); los recuadros verde, tomate y celeste representan las capas de cebolla de donde fueron aisladas las muestras; (control externo: *Fusarium chlamydosporum*)..... **54**

- Figura 3.7:** amplificación de los genes productores de fumonisina: Fum1 (primers Fum1F1-Fum1R2), Fum7 (Fum7eF-Fum8eR) y Fum8 (Antfum8F-Antfum8R). M: marcador de peso molecular de 100 bp; 1: *Fusarium* 1; 2: *Fusarium* 3, 3: *Fusarium* 4, 4: *Fusarium* 7, (+): control positivo..... **57**
- Figura 3.8:** amplificación de los genes productores de fumonisina: Fum1 (primers Fum1F1-Fum1R2), Fum7 (Fum7eF-Fum8eR) y Fum8 (Antfum8F-Antfum8R). M: peso molecular de 100 bp, 1: *Fusarium* 2, 2: *Fusarium* 5, 3: *Fusarium* 6, 4: *Fusarium* 8, 5: *Fusarium* 9, 6: *Fusarium* 10, 7: *Fusarium* 11, 8: *Fusarium* 12, (+): control positivo..... **58**
- Figura 3.9:** gráfico de pastel que esquematiza la detección de los genes productores de fumonisinas en todas los aislados del grupo A ; a) Fum1 (primers Fum1F1-Fum1R2), b) Fum7 (Fum7eF-Fum8eR) y c) Fum8 (Antfum8F-Antfum8R) ; (Positivo: detectó, Negativo: no detectó)..... **59**
- Figura 3.10:** evaluación de maíz contaminado con *Fusarium* al día 14 de crecimiento; a) Control negativo, b) *Fusarium* 1 (S1) , c) *Fusarium* 3 (S3) , d) *Fusarium* 4 (A1) , e) *Fusarium* 7 (A7). **62**
- Figura 3.11:** evaluación de sorgo-avena contaminado con *Fusarium* al día 14 de crecimiento; a) Control negativo, b) *Fusarium* 1 (S1) , c) *Fusarium* 3 (S3) , d) *Fusarium* 4 (A1) , e) *Fusarium* 7 (A7)..... **63**
- Figura 3.12:** amplificación del gen CAM mediante los primers PRO1-2 para muestras de *Fusarium proliferatum*, cuatro fotografías en orden secuencial de muestras (a, b, c d, e); M: marcador de 100 pares de bases, (-): control negativo, en rectángulos amarillos se resaltan las bandas de los productos de PCR..... **67**

- Figura 3.13:** visualización gráfica del comportamiento de patrones alélicos y variabilidad de las poblaciones de *Fusarium proliferatum*..... **73**
- Figura 3.14:** gráfico de pastel que esquematiza la distribución de varianza genética en el total poblacional. **75**
- Figura 3.15:** dendograma UPGMA, basado en las distancias de Nei, entre poblaciones de *Fusarium proliferatum* (los corchetes encierran a los haplotipos o ramas principales del árbol)..... **80**
- Figura 3.16:** Neighbor-Joining entre poblaciones de *Fusarium proliferatum*; encerrados en círculos de colores amarillo, morado, rojo, verde y negro se delimitan los haplotipos. **81**
- Figura 3.17:** agrupamiento PCoA de 143 aislados de *Fusarium proliferatum*, en base a los ejes (2 vs 3). En círculos negros se resaltan los cinco grandes clúster, por otro lado encerrado en un círculo verde se encuentra el aislado (YM117) de la población “b1”. **82**
- Figura 3.18:** determinación del valor de K mediante método de Evanno, en el eje de las x se puede apreciar los valores de K (1 a 9) y en el eje de las y los valores de delta K. **83**
- Figura 3.19:** agrupamiento K=9 para 143 aislados de *Fusarium proliferatum* empleando método bayesiano en el Software Structure versión 2.3.4. Cada una de las barras de colores rojo, verde, azul, rosado, celeste, dorado, morado y naranja corresponden a los ancestros en común que cada aislado contiene. Las líneas verticales negras representan la separación de cada aislado. **86**

Figura 3.20: los gráficos de pastel (a y b) representando los niveles de detección del gen *Fum8* mediante amplificación en PCR empleando el par de primers Antfum8; positivo: detectó el gen; negativo: gen no detectado. **87**

LISTADO DE ANEXOS

| | |
|---|------------|
| ANEXO A: método de extracción de DNA aplicado a las muestras del grupo A..... | 119 |
| ANEXO B: secuencias de aislados pertenecientes al Grupo A de muestras de <i>Fusarium</i> aisladas a partir de cebolla blanca (<i>Allium cepa</i>). | 120 |
| ANEXO C: validación de microsatélites SSR 18, 38, 45, 68, 92, 109 en 143 aislados de <i>Fusarium proliferatum</i> mediante amplificación PCR y lectura en gel de agarosa 2% a una potencia de 100 voltios por dos horas y media, (-): control negativo, (M): marcador molecular de 100 pares de bases; (a, b, c, d, e): orden secuencial de muestras. | 123 |
| ANEXO D: frecuencias alélicas para seis locus generados a partir de un análisis de microsatélites SSR empleando 143 aislados de <i>Fusarium proliferatum</i> | 129 |
| ANEXO E: frecuencias alélicas generadas en el análisis de microsatélites realizado en 143 aislados de <i>Fusarium proliferatum</i> . En el lado derecho de las imágenes se puede apreciar las correspondencias de colores para cada población. | 130 |

ANEXO F: visualización en gel de agarosa TAE 2% de productos de PCR amplificados con los primers Antfum8 para detección del gen Fum8 en aislados de *Fusarium proliferatum* (tamaño de banda observado alrededor de 600 pares de bases), orden secuencial de aislados a, b, c, d..... **132**

RESUMEN

Se han reportado grandes pérdidas de cultivos de importancia agrícola como cebolla, maíz y otros, ocasionados por patógenos fúngicos pertenecientes al género *Fusarium*, de ahí que la caracterización molecular de este tipo de hongos representa un paso previo fundamental en el desarrollo de estrategias de control menos invasivas. Se evaluaron 155 muestras de *Fusarium sp.*, aislados a partir de cebolla blanca (*Allium cepa*) y distribuidos en dos grupos: A (12) y B (143), provenientes de Estados Unidos de Norteamérica e Israel, respectivamente. Mediante el empleo de los primers de detección (PRO1-PRO2 y Prolif/TEF1R) para *F. proliferatum*, así como evaluación en árbol filogenético en base a la secuencias del gen TEF1 α (soporte Bootstrap de 1000 repeticiones), se determinó la presencia de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudonygami* en los aislados del grupo A. En el caso del grupo B, las muestras fueron identificadas como *F. proliferatum* a través de detección del gen CAM. Posteriormente, se evaluó la variabilidad genética de esta especie mediante seis pares de microsatélites fluorescentes SSR, hallándose una varianza genética (PhiPT=0.044, $p < 0.003$), dentro de las poblaciones (capas de cebolla) de 96% y entre ellas de un 4%. Además, empleando estrategias de agrupamiento como UPGMA, NJ y PCoA se pudo dilucidar la presencia de cinco genotipos. Finalmente, se evaluó la potencialidad de generación de fumonisinas mediante detección de los genes Fum1, Fum7 y Fum8, encontrándose que *F. proliferatum* y *F. pseudonygami* podrían tener esta habilidad metabólica, lo cual contrasta con *F. oxysporum* (Group A). Además en el grupo B, se dedujo que condiciones ambientales podrían afectar la síntesis metabólica de micotoxina.

Palabras clave:

CAM (calmodulin), TEF α (translation elongation factor), Bootstrap, SSR (secuencias de repetición simple), fumonisinas.

ABSTRACT

It has been reported the loss of crops of agricultural importance such as onion, corn and others, by fungal pathogenic species of genus *Fusarium*. Due to molecular characterization of those fungus represent a remarkable step in developing less invasive control strategies, there were evaluated 155 samples of *Fusarium sp.*, isolated from white onion (*Allium cepa*); A (12) and B (143) from United States of America and Israel, respectively. Through the use of detection primers (PRO1-PRO2 y ProlIF/TEF1R) for *F. proliferatum*, and evaluation in phylogenetic tree with TEF1 α sequences (Bootstrap support of 1000 repetitions), in group A, it was determined the presence of *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. pseudonygami*. On the other hand, group B was identified as *F. proliferatum* through detection of gen CAM (PRO1-2). Afterwards, the genetic variability within this specie was studied by using six fluorescent microsatellites SSRs. It was found a variance (PhiPT=0.044, $p < 0.003$) of 96% within populations (layers of onion) and 4% among them. Moreover, grouping strategies like UPGMA, NJ and PCoA, were able to elucidate five genotypes. Finally, it was analyzed the potential generation of fumonisins by detection of genes Fum1, Fum7 and Fum8. *F. proliferatum* and *F. pseudonygami* had the ability of producing them, in contrast with *F. oxysporum* (Group A). Besides, in Group B, it was inferred that environmental conditions could affect the metabolic synthesis of the mycotoxin.

Key words:

CAM (calmodulin), TEF α (translation elongation factor), Bootstrap, SSR (simple sequence repeats), fumonisins.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Allium cepa (cebolla blanca) representa uno de los cultivos de mayor producción e importancia en el mundo, se estima una producción mundial de 74 millones de toneladas por año (UN Food & Agriculture Organization - FAO, 2012). Su alto consumo se debe en gran parte a su alto contenido nutricional, se conoce que por cada porción de 100 gramos de cebolla, se consumen alrededor de 1.5 gramos de proteína, 11 gramos de carbohidrato, 0.5 gramos de fibra y una gran variedad de vitaminas y minerales (FDA, 2009).

En los últimos años, se ha reportado la presencia de infecciones o afectaciones en plantas ocasionadas por especies del género *Fusarium* tales como *F. pseudograminearum*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. oxysporum*. Específicamente las dos últimas especies son consideradas como los más grandes parásitos a nivel mundial que ocasionan enfermedades que limitan la producción de cebolla, como el tizón de hoja (leaf blight), marchitamiento (damping-off), manchas púrpuras (purple blotch), podredumbre basal (basal rot), lesiones vasculares de hoja (downy mildew), pudrición de corona, desecación y finalmente apoptosis (Rabiei-Motlagh *et al.*, 2010; Schwartz, 2011).

Un gran nivel de incidencia de *Fusarium* ha sido registrado en países como USA, Israel, Italia, Nepal, Eslovaquia, además de varios países sudamericanos como Argentina y Ecuador (Pacin *et al.*, 2003; Salvalaggio, 2013).

Se ha reportado además que especies como *F. proliferatum* presentan uno de los mayores rangos de hospederos, atacando no solamente a cultivos vegetales como cebolla, maíz, banana, esparrago, arroz, piña, tomate, cebada, sorgo, ajo y ciertas plantas ornamentales (Jeney *et al.*, 2007; Tsavkelova *et al.*, 2008), sino también a variedades de hongos como *Plasmora vitícola*, insectos como *Schizaphis graminum* e inclusive animales y humanos (Ganassi *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2007).

Se han realizado diversas investigaciones para determinar el mecanismo de acción de estos hongos, encontrándose que muchos son capaces de generar micotoxinas de alta peligrosidad para la salud animal y humana, pudiendo llegar a ser hasta mortales en el caso de pacientes inmunodeprimidos (Kapetanov *et al.*, 2013).

Durante varios años, las estrategias de control de este y otro tipo de patógenos se fundamentan en la aplicación de fuertes fungicidas; sin embargo su funcionalidad y efectividad ha ido decreciendo. Por otro lado, la aplicación de químicos tiene incidencia en la productividad de los cultivos, puesto que al alterar el equilibrio del suelo se generan fenómenos de polución y desbalances microbianos que disminuyen la capacidad de generación de un cultivo (Gaikwad *et al.*, 2014).

Hay que tomar en cuenta que previo a la aplicación de estos métodos invasivos de control, no se generaban estudios que permitiesen una evaluación preliminar del patógeno incidente, más bien, se tomaba como único parámetro de referencia aspectos sintomatológicos apreciables a simple vista, dejando a un lado una identificación y evaluación detallada de la etiología de la enfermedad (Toshiaki *et al.*, 2004).

Durante décadas, uno de los métodos de identificación de mayor predilección ha sido la caracterización morfológica, si bien este análisis en la antigüedad permitió generar una perspectiva general taxonómica del conocimiento de las especies fúngicas, ha demostrado estar sufriendo un cambio radical. Dos especies pueden tener un fenotipo similar pero su genotipo puede expresar variantes observadas en aspectos como cambio en el mecanismo de infección de un hospedero, métodos de obtención de alimento e inclusive cambios sutiles en la misma morfología (Takayuki *et al.*, 2014).

Específicamente en *Fusarium*, se ha demostrado que es casi imposible detectar una diferencia morfológica entre *F. verticillioides* y *F. fujikuroi*, las cuales a su vez son indistinguibles de *F. proliferatum* (Leslie & Summerell, 2006).

En base a estos hechos se han desarrollado mecanismos moleculares basados en atributos genéticos tales como detección de genes específicos y análisis mediante marcadores microsatélites, entre otros (Park *et al.*, 2011).

1.2. Justificación del problema

Debido al creciente nivel de pérdidas económicas, que se han registrado a nivel mundial, por infecciones de especies de *Fusarium* en cebolla y otros cultivos (Lager, 2011), el desarrollo de un método de detección rápido y efectivo es fundamental, con la característica de que puedan ser aplicados en diversas regiones del mundo y no solo en una región o país en particular (Amatulli *et al.* 2012).

La problemática, por tanto, podría ser solucionada mediante el empleo de estrategias de erradicación diseñadas en base a perfiles genéticos, como es el caso de la manipulación genética para generación de resistencia de enfermedades.

Por otro lado, cabe destacar que al evaluar genéticamente un patógeno, se posibilita la determinación de la fuente u origen de la infección así como la detección temprana de producción de agentes químicos contaminantes como micotoxinas, fortaleciéndose aún más las estrategias de control.

Un paso fundamental para el desarrollo de las citadas estrategias es la identificación molecular. El empleo de técnicas de detección más acertadas basadas en evaluación de genes y marcadores moleculares como microsatélites, han mostrado ser altamente específicos lo que contribuye a una reducción de los costes de detección o generación diagnóstica más rápida y fortalece a los sectores agrícola, alimentario y de salud pública.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Identificar la diferencia y similitud genotípica de especies del género *Fusarium* existentes en 155 aislados de cebolla (*A. cepa*) distribuidos en dos grupos: grupo A (12 aislados) y grupo B (143 aislados), provenientes de Estados Unidos de Norteamérica (Stillwater, Oklahoma) e Israel, respectivamente.

1.3.2. Objetivos específicos

- **GRUPO A:**

1. Identificar especies del género *Fusarium* mediante primers específicos como Prolif/TEF1R, Ef1/Ef2, PRO1/2 dirigidos a amplificar parcial o totalmente los genes TEF1 α (translación elongation factor) y CAM (calmodulin).
 - 1.2. Registrar la eficiencia de detección de los primers CAM-PRO1/2, Prolif/TEF1R, Ef1/Ef2.
 - 1.3. Evaluar las relaciones filogenéticas de árbol en base a secuencias del gen TEF1 α .
2. Detectar la presencia de los genes Fum1, Fum7 y Fum8 (productores de micotoxina fumonisina).
3. Evaluar la producción *in vitro* de fumonisinas en maíz triturado y una combinación de avena-sorgo (50/50).

- **GRUPO B:**

4. Identificar especies del género *Fusarium* mediante el par de primers específicos PRO1/2 dirigidos a amplificar el gen CAM (calmodulin).

5. Analizar las diferencias génicas y generar agrupamientos clúster basados en los microsatélites SSRs (secuencias de repetición simple).
 - 5.1. Registrar las frecuencias alélicas de distribución.
 - 5.2. Realizar un análisis molecular de varianza (AMOVA)
 - 5.3. Generar y analizar los dendogramas UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic means) y NJ (Neighbor joining).
 - 5.4. Visualizar la distribución de individuos en la representación de coordenadas principales PCoA.
 - 5.5. Realizar un análisis de asignación genética

6. Detectar la presencia del gen Fum8 (productor de micotoxina fumonosina)

1.4. Marco teórico

1.4.1 Hospedero

La cebolla (*A. cepa*) es una planta de la familia *Liliaceae*, cuyo origen podría ser la parte central de Asia. Se desarrolla en tres fases de crecimiento: en la primera fase se forman y desarrollan las hojas, en la segunda se construye el bulbo para lo cual el tallo sufre modificaciones morfológicas y las hojas internas comienzan un proceso de hinchazón; y en la tercera etapa, el bulbo madura y se forma una cáscara dura alrededor del mismo. Eventualmente durante la última, el vegetal se encuentra listo para la cosecha (Lager, 2011).

En cuanto al área agrícola, se sabe que para generar una producción de gran cantidad y calidad, es necesario conservar altos niveles de humedad y de oxígeno, ya que no posee raíces profundas carece (Schwartz, 2011).

1.4.2. Patógeno

Los hongos del género *Fusarium*, Phylum Ascomycota, clase Ascomycetes, orden Hypocreales presentan alrededor de 300 especies filogenéticas distribuidas en alrededor de 20 complejos monofiléticos (Geiser *et al.*, 2013).

Algunas especies de *Fusarium* pueden generar esporas meióticas (reproducción sexual; menos del 20% del total de especies) y otras producen tres tipos de esporas mitóticas (reproducción asexual o conidiogénesis), cabe denotar que la presencia de los tipos de conidios variará dependiendo de la especie, así se tiene: macroconidia, microconidia y clamidosporas (estructuras de resistencia) según la figura 1.1 (Agrios, 2005; Lager, 2011).

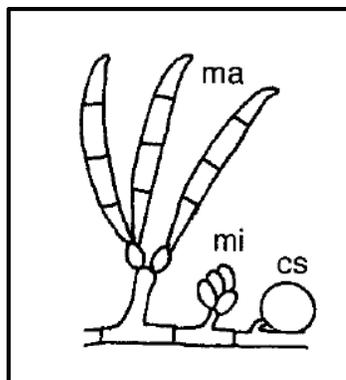


Figura 1.1: representación esquemática de las formas básicas de esporas asexuales en *Fusarium*: marcoconida (ma), microconida (mi) y clamidiosporas (cs) (Toshiaki *et al.*, 2004).

En lo que respecta a su acervo genético, se conoce que el genoma se encuentra compartimentalizado en regiones responsables de diversas funciones como: metabolismo primario (genoma nuclear), virulencia patogénica, especialización de hospedero y otras funciones no determinadas todavía; genoma adaptativo (Ma *et al.*, 2013).

Se dispone hasta el momento de nueve genomas completos de especies de *Fusarium*, así se tiene: *F. verticillioides*, *F. circinatum*, *F. fujikuroi* (clase FSP34), *F. fujikuroi* (clase IMI58289), *F. pseudograminearum*, *F. oxysporum* 5176 *F. graminearum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani* f. sp. *lisi* (Ma *et al.*, 2013).

1.4.3. Patogenicidad

Se conoce de una gran variedad de mecanismos de infección, en base a la cual *Fusarium* ha sido clasificado en dos etapas. La primera es la fase biótrofa en la que conviven con el huésped, seguida de un fase necrotrófica, en la que se provoca la eventual muerte del hospedero (Ma *et al.*, 2013).

Las enfermedades desencadenadas por las especies de este género generalmente inician en las raíces a partir de un inóculo proveniente del suelo o en los órganos superiores de la planta (tallos, hojas, flores, fruto) vía aérea o transportado por agua. Pueden contaminar una gran variedad de hospederos de gran importancia agrícola entre las que destacan: cebolla, ajo, maíz, trigo, tomate, arroz, banana y mango (O'Donnell *et al.*, 2010).

En el caso de productos como la cebolla, la forma más común de ingreso en el hospedero es a través del suelo, las esporas germinan y desarrollan un micelio, con lo cual se posibilita la entrada en los tejidos de la raíz, avanzando posteriormente a la base del tallo. Cabe resaltar que la penetración del hongo se puede realizar también de manera directa, es decir, a través de las hojas carnosas del bulbo (Lager, 2011).

Una vez que el hongo ha entrado por los espacios intercelulares de los tejidos del bulbo y ha invadido el sistema vascular (xilema), se produce una disminución en el transporte de agua, por tanto, se genera una desecación del vegetal y su muerte o necrosis. La sintomatología en ciertos casos no puede ser apreciada a simple vista, y si se presenta, se encuentran signos iniciales como retardo, deformación de las hojas y decoloración del bulbo (Carter, 2008).

1.4.4. Metabolismo secundario

Los hongos del género *Fusarium* pueden seguir una variedad de rutas metabólicas que les permiten producir metabolitos activos como ácido giberélico (GAs), ácido fusárico, terpenoides, bikaverinas, poliquétidos y micotoxinas como fumonisinas, tricotocenos, entre otros (Ramana *et al.*, 2011).

Las micotoxinas son los metabolitos que más han llamado la atención de científicos en la actualidad debido a su incidencia en la salud humana y en el descenso de la producción agrícola. Se han reportado altos niveles de pérdida de cultivos de maíz, contaminados con fumonisinas y tricotecenos, cuya ingesta se relaciona con cáncer de esófago, defectos en estructuras neuronales, irritación dérmica y vómito (Lori *et al.*, 2008; Kotowicz *et al.*, 2014).

Actualmente se conocen de 24 especies del género *Fusarium* productoras de tricotecenos tales como *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* y *F. oxysporum*. Por otro lado, la generación de fumonisinas han sido registradas predominantemente por *F. proliferarum* y *F. verticillioides* (Mankevicien *et al.*, 2011).

Fumonisinias: representa un metabolito de estructura química lineal de 20 carbonos con un grupo amino en el carbono 2 y residuos de ácido tricarbóxico esterificado en los carbonos 14 y 15, tal como se aprecia en la figura 1.2 (De la Torre *et al.*, 2014).

En base a diferencias de estructura, las fumonisinas han sido clasificadas en cuatro categorías (A, B, C, D), siendo las más comunes las variedades del grupo B (B1, B2, B3), en el que B1 (FB1) representa el 75% del total de fumonisinas. El nivel de producción de la misma varía entre especies de *Fusarium* encontrándose a las mayores productoras en el complejo *F. fujikuroi* principalmente a *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. carcinatum* y *F. circinatum* (Stepien *et al.*, 2011).

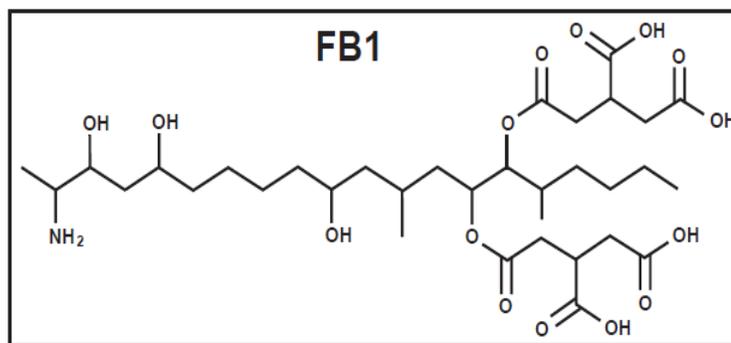


Figura 1.2: representación esquemática de la estructura química de la fumonisina variedad FB1 (De la Torre *et al.*, 2014).

La síntesis de estas micotoxinas son de responsabilidad de una región de genes de 46kpb conocida como FUM, la que es capaz de codificar las enzimas necesarias, así como factores proteicos que regulan la excreción y represión de la fumonisina. Los principales genes que la componen son: Fum1, Fum8, Fum6, Fum13, Fum2, Fum10, Fum14 y Fum3 (López *et al.*, 2009).

La ruta metabólica comienza con unidades de acetato seguida de una transformación hasta un policétido lineal dimetilado, condensado posteriormente en L- alanina, seguida de cinco reacciones de oxigenación y dos esterificaciones (De la Torre *et al.*, 2014).

1.4.5. Marcadores moleculares

Son regiones concretas o específicas de DNA, cuya secuencia presenta y tolera variación sin que se altere sustancialmente su fenotipo. Se emplean como herramientas para estudios filogenéticos, detección de variabilidad, pruebas de paternidad, entre otros (Somasundaram & Kalaiselvam, 2007).

Pueden ser divididos como dominantes (AFLPs, ISSRs, RAPDs) y codominantes (RFLPs, SSRs), al analizar un alelo (dominante) o dos alelos (dominante y recesivo) de individuos heterocigotos respectivamente (Jiménez & Collada, 2000). Otros autores, además, sugieren la categorización de marcadores monomórficos (invariable) y polimórficos; presenta variación o diferencia en las poblaciones estudiadas (Frakham *et al.*, 2002).

Un tipo de marcadores empleados en la actualidad son los **microsatélites o SSRs (secuencias de repetición simple)**, los cuales se caracterizan por presentar regiones hipervariables constituidas por secuencias de dos a siete nucleótidos distribuidos por repeticiones en tándem (González, 2008). Presentan un nivel de mutación de loci de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por locus y por generación, se heredan siguiendo las leyes de Mendel y son característicos de una población en particular (Wan, *et al.*, 2004; Eckert and Hile, 2009).

Para el estudio y visualización preliminar de estos y otros microsatélites es necesario el empleo de técnicas como la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, en la que se amplifica un sector o región de DNA mediante el empleo de cebadores o primers complementarios con la secuencia blanco (Dieffenbach & Dveksler, 2003).

El proceso empieza con la desnaturalización (95°C) del DNA de doble cadena, seguida de un alineamiento (T_m : 55°C) de los primers a la secuencia objetivo. Posteriormente una enzima polimerasa (Taq) genera la extensión o amplificación (72°C) de la región de interés, proceso realizado por un número específico de ciclos (dependiendo del estudio a realizarse). En cada uno, el material genético se incrementa exponencialmente (Lodish *et al.*, 2004).

La técnica descrita únicamente ofrece una validación de la amplificación del microsatélite mas no genera datos que permitan un análisis estadístico posterior, para lo que se emplea otra técnica conocida como **análisis de fragmentos o electroforesis capilar**. En este procedimiento, las muestras o productos de amplificación PCR son forzadas a ingresar a un capilar (inyección electroquinética) con un electrodo cargado positivamente en su interior, que separa la muestra en fragmentos de diferente medida. A su paso por el capilar hasta el electrodo, son leídos por un haz de láser que excita a los fluorocromos ligados, emitiéndose una fluorescencia de un color determinado (figura 1.3).

Finalmente, una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada) transforma la señal fluorescente en datos digitales, los cuales son analizados en softwares específicos como GenMapper, Peak Scanner, entre otros (Life Technologies, 2012).

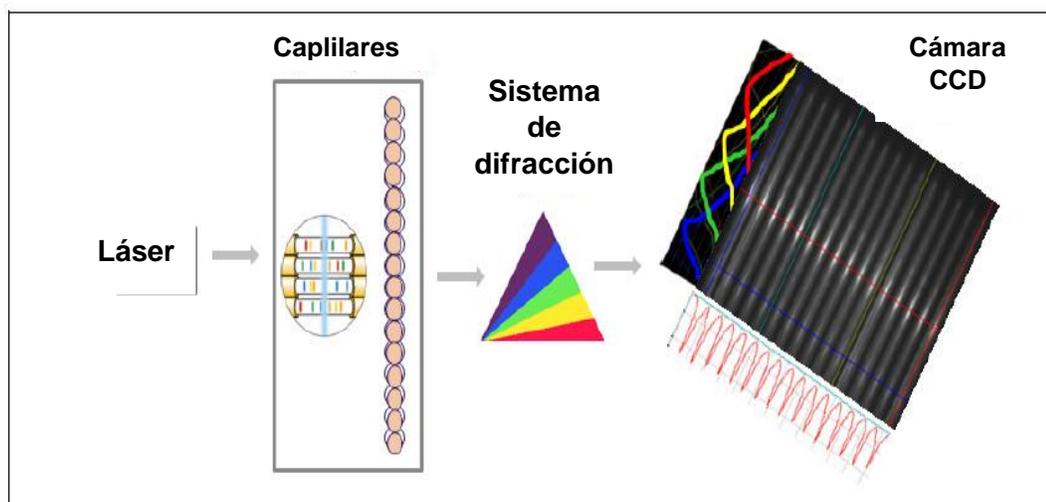


Figura 1.3: representación esquemática del proceso de electroforesis capilar (Life Technologies, 2012).

1.4.6. Genética de poblaciones

Campo de estudio que permite el estudio de los cambios evolutivos de individuos componentes de una población a través del espacio-tiempo. Tales sucesos quedan determinados por alteraciones en la estructura genética y la subsecuente alteración en la expresión proteica (Griffiths *et al.*, 2005).

Al hablar de cambios en la estructura genética de una población, fundamentalmente se expresa una modificación en las frecuencias alélicas, pudiendo llegar a ser altas, poblaciones altamente diferentes y bajas, poblaciones casi idénticas (González, 2008).

Existen diversos métodos que permiten estimar la diferenciación y estructura genética poblacional. Inicialmente se evalúa la diversidad genética global en un grupo de individuos para lo cual se emplean análisis fundamentados en la estimación y comparación de las diferencias en las frecuencias alélicas; análisis intrapoblacional. Por otro lado, están aquellos que estudian más detalladamente la proporción interna de variación genética entre individuos de una población y entre poblaciones mediante el empleo de estadísticos diversos como análisis interpoblacional (Eguiarte *et al.*, 2010).

Estudio intrapoblacional

A continuación, se presentan algunos parámetros de estimación que son empleados para este tipo de análisis.

Riqueza alélica (Na): es el número medio de alelos por locus y genera un estimado de la cantidad de alelos distintos detectados en cada uno de los loci de una población. Matemáticamente están representados por la siguiente ecuación:

$$\bar{A} = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L a_l \quad 1 \leq \bar{A} \leq \max a_l$$

Donde; L representa el número total de loci analizados y a_l es el número de alelos detectados en un locus determinado (Caujapé & Baccarani, 2006).

Polimorfismo (%P): representa la probabilidad de que existan dos o más alelos en un mismo locus de una población analizada. Para su evaluación se divide el número de loci polimórfico individual para el número total de loci estudiados (Sosa *et al.*, 2002).

Heterocigosidad observada (Ho): mide la probabilidad de que dos alelos aleatorios de una población sean diferentes, algunos autores también lo definen como la cantidad de individuos heterocigotos de una población. Puede ser calculada mediante la siguiente expresión (Frankham *et al.*, 2009):

$$H_o = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \frac{(N_{heterocigotos})_i}{N_i} \quad (0 \leq H_o \leq 1)$$

Donde, L representa el número de loci, $N_{heterocigotos}$ es el número de heterocigotos para el locus i y N_i es el número total de individuos (González, 2011).

Heterocigosidad esperada (He): también conocido como diversidad genética media, expresa la heterocigosidad esperada en el locus medio (González, 2011).

$$He = H_{av} = \frac{\sum_{j=1}^n H_j}{n} = \frac{\sum_{j=1}^n \left(1 - \sum_{i=1}^m p_{ij}^2 \right)}{n}$$

Donde H_j es la heterocigosidad esperada en un locus j , p_{ij} es la frecuencia del alelo i del locus j , m es número de alelos en el locus j y n es el número de loci considerados (Hedrick, 2000).

Índice informativo de Shannon (I) ó ($^S H_A$): valor que cuantifica un estimado de la diversidad biológica presente en una población, ampliamente usado en estudios de ecología poblacional (Rossetto *et al.*, 2008).

$$^S H_A = - \sum p_i \log_2 p_i$$

Donde p_i es la frecuencia alélica del alelo i en el locus especificado para una población estudiada (Sherwin *et al.*, 2006).

Estudio inter poblacional

Los siguientes parámetros conceptualizan un análisis genético más detallado de la realidad de una población determinada.

Distancia genética: este parámetro representa la probabilidad de que dos alelos de diferentes poblaciones pero en el mismo campo de estudio sean idénticos.

$$Nei = \frac{J_{xy}}{\sqrt{(J_x J_y)}}$$

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^k p_{ix} p_{iy}, J_x = \sum_{i=1}^k p_{ix}^2, J_y = \sum_{i=1}^k p_{iy}^2.$$

Donde p_{ix} y p_{iy} constituyen las frecuencias alélicas del alelo i en las poblaciones x e y ; J_{xy} , J_x y J_y simbolizan la sumatoria de loci múltiple. Cabe destacar que los valores de distancia genética varían desde cero a uno (Hedrick, 2000).

Análisis de varianza molecular (AMOVA) y coeficiente de varianza genética (PhiPT): este análisis consiste en un estudio estadístico que permite obtener una división jerárquica con respecto a la varianza genética entre los individuos componentes de una población, así como entre poblaciones, para lo cual genera valores estadísticos como el F_{ST} , R_{ST} y Φ_{PT} , cuyas expresiones se muestran a continuación:

$$\Phi_{PT} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})}, F_{ST} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})}, R_{ST} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})}$$

Donde V_{AP} es la varianza entre poblaciones y V_{WP} es la varianza dentro las poblaciones. Es importante resaltar que un análisis de este tipo plantea dos tipos de hipótesis, así se tiene (Peakall & Smouse, 2006):

H_0 ; se considera que no existe variación genética entre las poblaciones cuando los estadísticos presentan valores iguales a cero ($F_{st}=0$; $R_{st}=0$; $\Phi_{iPT}=0$).

H_1 ; se presume que existe variación genética entre poblaciones cuando los estadísticos son mayores a cero ($F_{st}>0$; $R_{st}>0$; $\Phi_{iPT}>0$).

Además, cuando los valores de estadísticos como Φ_{iPT} se encuentran en el rango de 0 a 1, se hallan diversos niveles de variación así se tiene: entre 0 a 0.1: variación genética baja; entre 0.1 y 0.2: media, de 0.2 a 0.5 alta y mayor a 0.5 se estima una variación sumamente elevada. Es importante tomar en cuenta que para que los resultados de una investigación determinada tengan soporte estadístico, se sugiere establecer valores de permutación entre 100 a 1000, con lo cual se genera una significancia al nivel del 95% o error máximo de 5% (Meirmans, 2006).

Flujo genético (N_m): representa el ingreso de genes provenientes de diferentes poblaciones de una misma especie a un conjunto o poza génica. Este parámetro permite determinar si las poblaciones evolucionan de manera conjunta ($N_m > 4$), independiente (divergencia) ($1 < N_m < 4$) o si actúan como linajes evolutivos individuales por aislamiento ($N_m \leq 1$). Para su cálculo generalmente se utilizan valores estadísticos como el F_{st} , G_{st} , entre otros (Eguiarte *et al.*, 2010).

Dendogramas UPGMA y NJ: constituyen métodos de análisis genealógico o filogenético basado en matrices de distancia génica los cuales agrupan en genotipos o clúster a un número de individuos determinado. En el caso del UPGMA (método de agrupamiento en pares no ponderados utilizando la media aritmética), se considera las distancias genéticas medias entre los miembros de cada grupo. Por otro lado, el NJ (Neighbor-Joining) se fundamenta en la generación de un árbol sin raíz, en el cual se minimiza la longitud de las ramas de distancia entre individuos (Salemi & Vandamme, 2003; Allendorf & Luikart, 2007).

Análisis de coordenadas principales (PCoA): consiste en una representación visual de relaciones en patrones genéticos a partir de una matriz basada en los valores del estadístico PhiPT, que permite encontrar, trazar y sectorizar patrones dentro de un conjunto de datos multivariados (gran número de loci y muestras). Los datos de variación de la gráfica están representados en los tres ejes espaciales principales (Peakall & Mousse, 2006).

Análisis Bayesiano: asigna probabilísticamente individuos a un número determinado de poblaciones o grupos (K) dependiendo del nivel de similitud de sus genotipos multilocus. Para su desarrollo emplea algoritmos de agrupamiento basándose en los métodos de cadena de Montecarlo MCMC (Monte Carlo Markov Chain) e integrar los parámetros de frecuencia alélica. Este modelo es empleado en estudios en donde las estructuras genéticas no se encuentran bien definidas (Pritchard *et al.*, 2000; Pearse & Crandall, 2004).

Algunos autores interpretan este análisis como la determinación del número de ancestros comunes en un número de individuos analizados. Por otro lado, para la selección del verdadero valor de K se emplea el modelo de Evanno

basado en la generación sucesiva de valores K con respecto al cambio en la probabilidad de log, empleando la estadística hoc (Evanno *et al.*, 2005).

1.5. Sistema de Hipótesis

- La variabilidad genética de los aislados del grupo A permite la formación de grupos discretos bien diferenciados.
- La variabilidad genética de los aislados del grupo B es mayor dentro de las poblaciones que entre las mismas.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones:

El proyecto fue realizado en los laboratorios del Departamento de Entomología y Patología de Plantas (EPP) de la Universidad del Estado de Oklahoma (OSU); Estados Unidos de Norteamérica, en convenio con la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE - Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

2.1.2. Colaboradores científicos:

Alma Koch, MSc., ESPE (Directora de la tesis).

Tatiana Páez, MSc., ESPE (Codirectora de la tesis).

Lenin Ron, PhD., ESPE (Biometrista).

Carla Garzón, PhD., OSU (Tutora científica, asesora y directora del proyecto).

2.2. Zona de Estudio

Las muestras de cebolla provinieron de Stillwater, Oklahoma - Estados Unidos de Norteamérica y del estado de Israel.

2.3. Periodo de Investigación

La investigación fue desarrollada en un periodo de siete meses, desde febrero hasta agosto del 2014.

2.4. Material de trabajo

El presente estudio empleó 155 aislados identificados de acuerdo a morfología como especies del género *Fusarium*, los cuales fueron encontrados en cultivos de cebolla blanca (*Allium cepa*). Los aislados fueron analizados en dos secciones: grupo A (12 aislados) y grupo B (143 aislados).

- **GRUPO A:**

A partir de tres cebollas recolectadas de centros comerciales de Stillwater, Oklahoma (Estados Unidos de Norteamérica), se aislaron 12 cultivos de *Fusarium* con presencia y ausencia de sintomatología de infección: pudrición de coloración salmón- blanquecina a nivel de bulbo (figura 2.1).

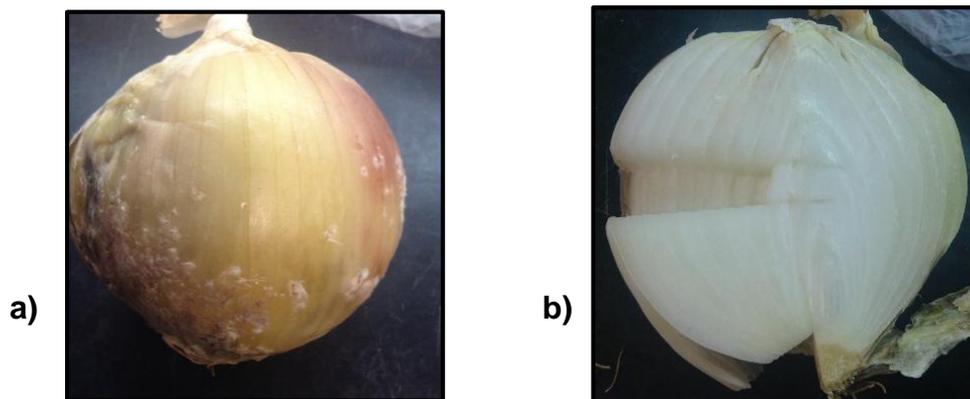


Figura 2.1: a) cebolla con sintomatología de pudrición empleada en estudio (manchas salmón y blanquecinas - salmon blotch), b) cortes realizados para generar aislamiento en cebolla asintomática.

Los aislados fueron tomados realizando diversos cortes transversales en el eje central de la cebolla, con el objetivo de generar un aislamiento por cada capa cortada, además se tomó muestra de la corona.

Una vez realizados los cortes, se procedió a etiquetar los aislados de las capas con el propósito de identificarlos de manera ordenada. A continuación se presenta un listado de los nombres otorgados a los aislados.

Tabla 2.1: aislados de cebolla de acuerdo al número de capas y daño encontrado en bulbo (S: sintomático, A: asintomático).

| Aislado | ID Cebolla | Capa de Cebolla | Afectación en hospedero (S/A) |
|--------------------|-------------------|------------------------|--------------------------------------|
| <i>Fusarium 1</i> | S | S1 | S |
| <i>Fusarium 2</i> | | S2 | S |
| <i>Fusarium 3</i> | | S3 | S |
| <i>Fusarium 4</i> | A | A1 | A |
| <i>Fusarium 5</i> | | A2 | A |
| <i>Fusarium 6</i> | | A3 | A |
| <i>Fusarium 7</i> | | A4 | A |
| <i>Fusarium 8</i> | | A5 | A |
| <i>Fusarium 9</i> | D | D1 | D |
| <i>Fusarium 10</i> | | D2 | D |
| <i>Fusarium 11</i> | | D3 | D |
| <i>Fusarium 12</i> | | Dcr | D |

- **GRUPO B:**

Los análisis fueron realizados en 143 muestras de DNA provistas por parte del Profesor Abraham Gamliel, PhD., Director del Laboratorio para Investigación y Control de Pestes del Instituto de Investigación Agrícola (ARO) – Organismo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural del Estado de Israel.

Las muestras provienen de diez cebollas con sintomatología apreciable (infección de coloración salmón también conocida como salmon blotch). Posteriormente los aislados fueron seccionados de la parte superior e inferior de

las cebollas definiéndose dos grupos de poblaciones; poblaciones de la capa superior (a1, b1, c1, d1, e1) y de la capa inferior (a2, b2, c2, d2, e2), tal como se presenta en el siguiente esquema (figura 2.2).

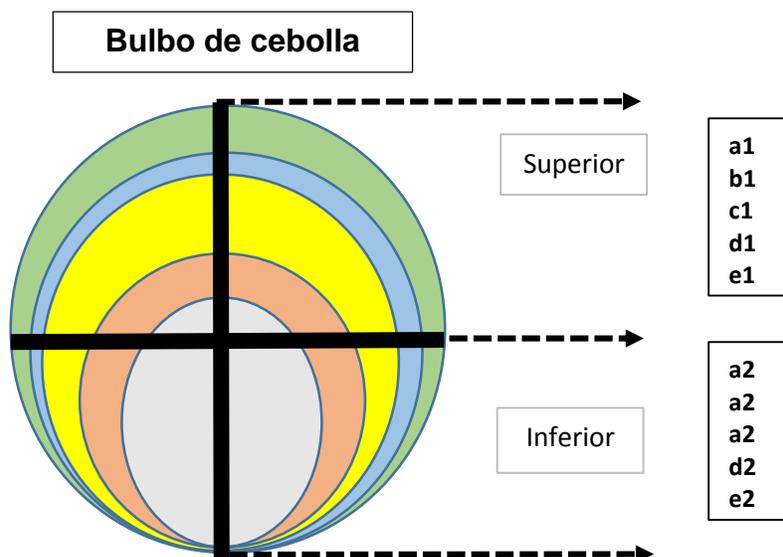


Figura 2.2: esquema de los cortes transversales realizados a las cebollas para asilamiento de las muestras de Israel (Grupo B).

2.5. Protocolo de aislamiento de espora única de especies del género *Fusarium*

Los siguientes procedimientos relacionados a trabajo en cultivos de crecimiento fueron realizados únicamente en el **grupo A** para obtención de muestras.

2.5.1. Condiciones previas de cultivo

- **Desinfección**

Los cortes transversales de los bulbos de cebolla fueron seccionados en forma de cuadrado (1 cm²) y sometidos a desinfección en etanol al 95% por 30

segundos, luego se los secó con papel toalla, para posteriormente sumergirlos en hipoclorito de sodio al 20% por un minuto y secarlos nuevamente.

2.5.2. Condiciones de cultivo e inoculación

Las muestras desinfectadas fueron colocadas en cajas Petri con medio YPS en combinación con antibióticos específicos para eliminación bacteriana y de otros hongos que no pertenezcan al Phylum Ascomycota. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente (20 a 25°C) por dos días, periodo en el cual se generó crecimiento hifal (figura 2.3).

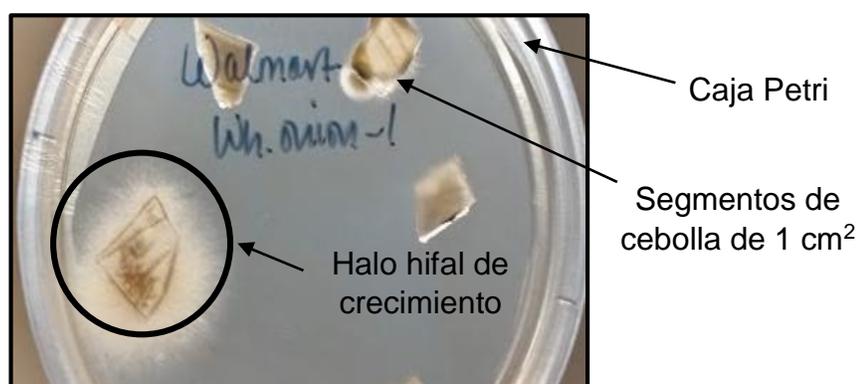


Figura 2.3: aislamiento de *Fusarium* en medio YPS, encerrado en círculo negro se puede apreciar el halo hifal, correspondiente a crecimiento del cultivo, alrededor de la muestra de cebolla.

Posteriormente, con un asa esterilizada, se extrajo una muestra de la hifa en crecimiento y se hizo un estriado para aislamiento de colonia, luego se incubó el cultivo a 28°C por dos días (figura 2.4).

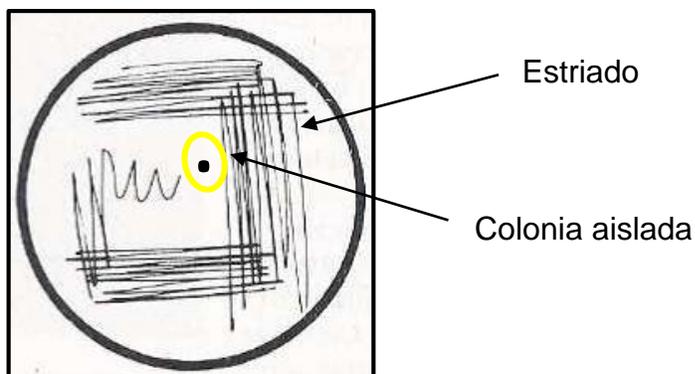


Figura 2.4: esquema de un asilamiento de colonia única (círculo amarillo) a partir de inóculo hifal en medio de cultivo YPS.

Una vez que la colonia fue aislada, se procedió a retirarla del medio usando un sacabocado. Posteriormente, la colonia fue colocada en la parte central de la caja Petri con medio YPS selectivo, para el crecimiento hifal de espora única (figura 2.5).

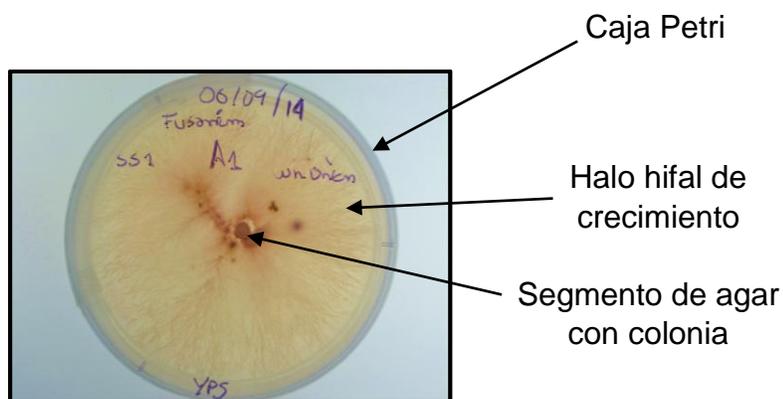


Figura 2.5: crecimiento de hifa a partir de inóculo de colonia o espora única en medio YPS.

Cuando el crecimiento hifal colonizó la mayor parte del medio después de cinco días, se tomó una porción usando un asa esterilizada y se la inoculó en papel filtro sobre medio YPS en modo de estrías, el cultivo fue incubado a 28°C hasta observar crecimiento en papel (coloración púrpura característica).

Después, el papel filtro fue depositado en cajas Petri vacías y preservadas en un desecador a temperatura de 4°C (figura 2.6).

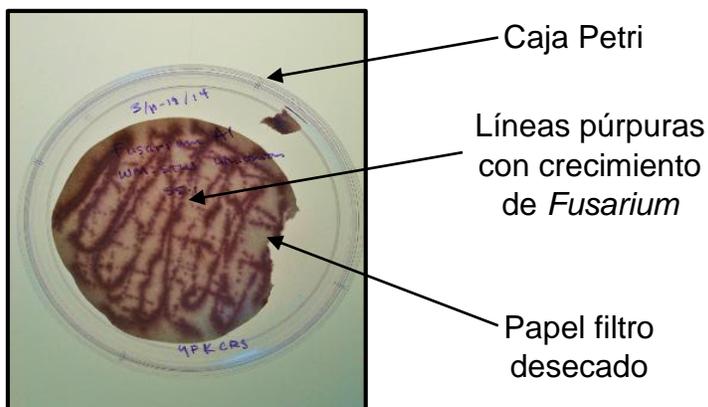


Figura 2.6: muestra de espora única de *Fusarium* (líneas púrpuras) preservada en papel filtro, desecada y almacenada en equipo de desecación a temperatura de 4°C.

2.6. Análisis molecular

2.6.1. Extracción de DNA

En el caso del **grupo A**, una vez generados los aislados de espora única de *Fusarium*, se procedió con la extracción de DNA a partir del papel filtro para lo cual se empleó el método desarrollado por Weising *et al.*, 2005 (anexo A). Las muestras del **grupo B** fueron proporcionadas en un volumen de 50 µL.

2.6.2. Normalización de DNA

La cuantificación y medición de calidad de los **grupos A y B** fue realizada en el equipo NanoDrop - modelo 1000c. Inicialmente el lente-lector del equipo

fue limpiado con papel absorbente o de seda (específico para limpieza de lentes). Se colocó como blanco 1 μL de buffer de elución AE. Las muestras fueran medidas una a una, evaluándose dos parámetros principales: concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y calidad - absorbancia (relación de longitudes de onda 260 nm y 280 nm).

En cuanto a la absorbancia, se revisó que los valores se encontraran entre el rango de 1.5 a 2.5 (indicativo de que el DNA es de buena calidad y potencialmente libre de contaminación e impurezas). Posteriormente, en base al parámetro de concentración, se realizaron cálculos tomando como referencia la ecuación básica de diluciones ($C_1V_1=C_2V_2$).

Donde:

- C_1 : concentración leída en NanoDrop.
- C_2 : concentración a la que se deseó llegar ($25 \text{ ng}/\mu\text{L}$).
- V_1 : volumen de agua en el cual se diluyó la muestra ($50 \mu\text{L}$).
- V_2 : incógnita que representa el volumen de DNA que se debe diluir en el V_1 .

2.6.3. Detección del género *Fusarium*

El proceso fue realizado mediante amplificación PCR del gen translation elongation factor (TEF1 α) utilizando el par de primers específicos EF1 (forward) y EF2 (reverse) según la tabla 2.2.

El volumen de reacción final para cada muestra fue de $20 \mu\text{L}$, distribuido como se presenta en la tabla 2.3.

Tabla 2.2: primers de detección para el género *Fusarium*, se detalla su secuencia, temperatura de alineamiento y fuente bibliográfica.

| Primers | Secuencia | T (°C) | Referencia |
|----------------|-----------------------|---------------|-----------------------------|
| EF1 | ATGGGTAAGGARGACAAGAC | 60 | Amatulli <i>et al.</i> 2012 |
| EF2 | GGARGTACCAGTSATCATGTT | 60 | Amatulli <i>et al.</i> 2012 |

Tabla 2.3: listado de reactivos y proporciones empleadas en el ensayo PCR del gen TEF1 α mediante los primers EF1- EF2.

| Reactivo | Concentración | Volumen por reacción (μL) |
|--|----------------------|----------------------------------|
| Gotaq Green (Kit GoTaq flexi 5X - Promega) | 2X | 10 |
| Primer Forward (IDT - Integrated DNA technologies) | 5 μM | 1 |
| Primer Reverse (IDT - Integrated DNA technologies) | 5 μM | 1 |
| Agua (destilada - autoclavada) | - | 6 |
| DNA | 25 ng/μL | 2 |
| Volumen total | | 20 |

El proceso fue llevada a cabo en un termociclador Nyx Techinc, Inc., (Modelo A6 - hecho en USA), bajo las siguientes condiciones de tiempo y temperatura (Amatulli *et al.*, 2012):

Tabla 2.4: listado de condiciones para el ensayo de PCR del gen TEF1 α utilizando los primers EF1- EF2.

| Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Número de ciclos |
|------------------|--------------|------------------|
| 95 | 3.0 | 1 |
| 95 | 1.0 | 35 |
| 60 | 1.0 | 35 |
| 72 | 3.0 | 35 |
| 72 | 5.0 | 1 |
| 4 | 60.0 | 1 |

Finalmente, se tomó 5 μ L del volumen final de reacción para visualización de productos en gel de agarosa 2%, TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio, a una potencia de 100 Voltios y por el lapso de una hora.

2.6.4. Detección específica de *Fusarium proliferatum*

El proceso fue realizado en base a la amplificación del gen calmodulin y un sector específico del gen elongation factor, empleándose el par de primers PRO1/PRO2 y Prol1F/TEF1R respectivamente (tabla 2.5). Cabe destacar el **grupo A** fue procesado con ambos primers, mientras que el **grupo B** se lo proceso únicamente con los primer PRO1/2.

Tabla 2.5: primers de detección específica para *Fusarium proliferatum*.

| Primers | Secuencia | T (°C) | Referencia |
|---------|------------------------|--------|---|
| Proli1F | GTCACGTGTCAAGCAGCGA | 63 | Amatulli <i>et al.</i> 2012 |
| TEF1R | GCGACAACATACCAATGACG | 63 | Amatulli <i>et al.</i> 2012 |
| PRO1 | CTTTCCGCCAAGTTTCTTC | 56 | Mule <i>et al.</i> , 2004; Rahjoo <i>et al.</i> , 2008 |
| PRO2 | TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG | 56 | Mule <i>et al.</i> , 2004; Rahjoo <i>et al.</i> , 2008 |

Para los ensayos de PCR de los primers citados previamente se emplearon los mismos volúmenes, reactivos y equipos empleados en la tabla 2.3, con modificación de los ciclos de temperatura (tabla 2.6).

Tabla 2.6: listado de parámetros para los ensayos PCR de los primers;

a) Proli1F/TEF1R y b) PRO1/PRO2.

a)

| Temperatura °C | Tiempo (min) | Número de ciclos |
|----------------|--------------|------------------|
| 95 | 5.0 | 1 |
| 94 | 0.6 | 35 |
| 63 | 0.6 | 35 |
| 72 | 0.6 | 35 |
| 72 | 5.0 | 1 |
| 4 | 60.0 | 1 |

b)

| Temperatura °C | Tiempo (min) | Número de ciclos |
|----------------|--------------|------------------|
| 95 | 5.0 | 1 |
| 94 | 0.8 | 35 |
| 56 | 0.8 | 35 |
| 72 | 1.0 | 35 |
| 72 | 7.0 | 1 |
| 4 | 60.0 | 1 |

Al finalizar ambos ensayos específicos de PCR, se procedió a la visualización en gel de agarosa 2%, TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio, a una potencia de 98 Voltios y por el lapso de una hora y media.

2.6.5. Secuenciación

Este proceso fue realizado para todas las muestras del **grupo A** y para dos muestras del **grupo B**. Se hizo una limpieza de impurezas (nucleótidos y primers no reaccionados), se tomó 5 μ L de los productos de PCR amplificados con los primers EF1-2 y se los mezcló con 2 μ L del reactivo ExoSAP-IT (Affymetrix, Inc., 2010), después las muestras fueron sometidas a ciclos de temperatura en termociclador bajo las condiciones de la tabla 2.7.

Tabla 2.7: condiciones de limpieza molecular en termociclador usando el reactivo ExoSAP-IT.

| Proceso | Temperatura °C | Tiempo (min) | Número de ciclos |
|---|-------------------|-----------------|---------------------|
| Degradación de primers y nucleótidos no específicos | 37 | 15.0 | 1 |
| Inactivación de ExoSAP-IT | 80 | 0.8 | 35 |

Una vez que el proceso anterior finalizó, se realizó una normalización a 5 ng/ μ L en 22 μ L de agua destilada (estándares de análisis), para posteriormente enviar las muestras al Centro de Análisis Core Facility del Departamento de Entomología y Patología de Plantas de OSU. Las muestras fueron sometidas a doble secuenciación.

2.6.6. Análisis de secuencias

Las secuencias de los primers EF1 y EF2 fueron analizadas en el programa ChromasPro Versión 1.7.5., se realizó básicamente limpieza de las mismas mediante eliminación de ruido (turbulencia en la longitud de onda del espectrograma).

Posteriormente, se alinearon las secuencias Forward y Reverse para obtención de una secuencia consenso (figura 2.7) con la cual se procedió a la identificación de especie en dos bases de datos.

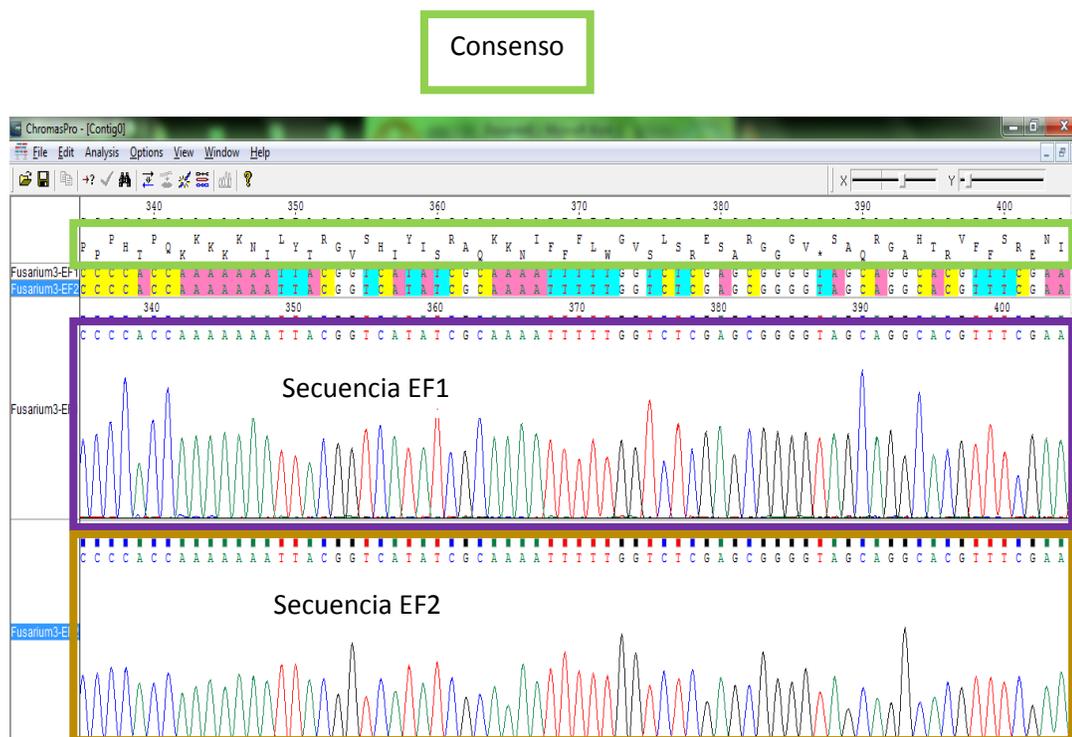


Figura 2.7: comparación de secuencias - espectrogramas de los primers (EF1) forward y (EF2) reverse en Chromas Pro para obtención de secuencia consenso. Encerrados en rectángulos de color morado, dorado y verde se resaltan a las secuencias forward, reverse y consenso, respectivamente.

Bases de datos:

NCBI - National Center of Biotechnology Information (página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): la secuencia a analizar fue introducida en Blast (herramienta de alineamiento local de NCBI), luego del alineamiento se procedió con la identificación de especie en base a tres parámetros de importancia: nombre de la especie identificada, porcentajes de identidad y cobertura.

***Fusarium* MLST - Colaboración Micológica Internacional** (página web: <http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>): representa una base de datos específica para identificación de especies del género *Fusarium*, creada en colaboración con las Universidades de Pensilvania, San Antonio Texas, Idaho, Seoul así como con varios Centros de Investigación de Japón, Eslovenia y Estados Unidos.

En esta base de datos básicamente se compara las secuencias consenso de DNA amplificadas con el gen TEF α con otras secuencias de *Fusarium* reaccionadas con el mismo gen, para lo cual busca coincidencias en otras dos bases de datos: FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) y el CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center.

Por otro lado, se procedió con el alineamiento de las secuencias consensos obtenidas de todas las muestras, añadiendo al análisis individuos de control externo y de referencia, en el software MEGA versión 5.2. Se permitió entonces la construcción del árbol filogenético, establecido bajo las siguientes condiciones y modificaciones (figura 2.8): prueba de filogenia - método

Bootstrap (consenso condensado con 1000 repeticiones); modelo de sustitución en caso de transversiones y transiciones - Kimura2.

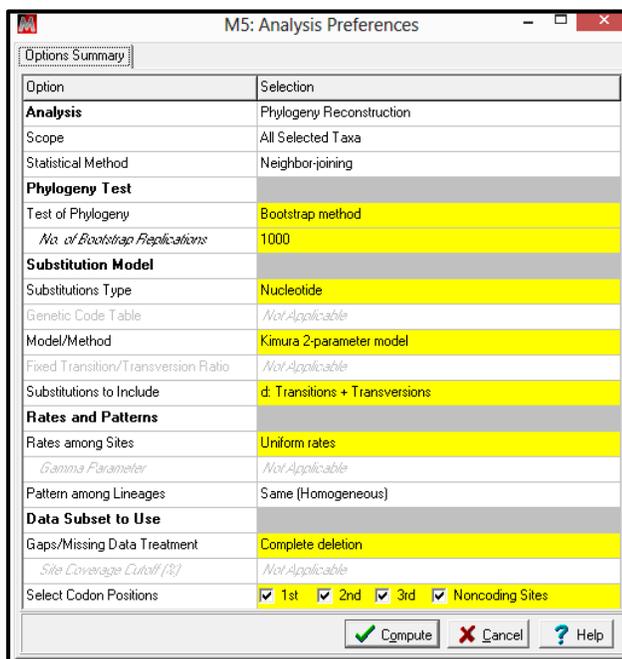


Figura 2.8: ventana para modificación de parámetros de construcción de árbol filogenético (Software MEGA versión 5.2).

2.6.7. Detección de genes productores de micotoxina fumonisina

Todos los genes productores de micotoxinas evaluados en la presente sección de estudio fueron detectados mediante primers diseñados de acuerdo a bibliografía (Stepien *et al.*, 2011). En cuanto a condiciones de PCR, se modificó la temperatura de alineamiento (T_m) de todas las amplificaciones (tablas 2.8 y 2.9) y se mantuvo los volúmenes usados previamente en la tabla 2.3.

El **grupo A** fue procesado con los primers Fum1F1 - Fum1R2 y Fum7eF - Fum8eR, mientras que el **grupo B**, únicamente con los primers Antfum8F- Antfum8R.

Tabla 2.8: primers para detección de genes productores de fumonisinas; temperatura de alineamiento (Tm).

| Primers | Secuencia | Gen objetivo | Tm (°C) | Referencia |
|----------|----------------------|--------------|---------|------------------------------|
| Fum1F1 | CACATCTGTGGGCGATCC | Fum1 | 56.0 | Stepien <i>et al.</i> , 2011 |
| Fum1R2 | ATATGGCCCCAGCTGCATA | Fum1 | 56.0 | Stepien <i>et al.</i> , 2011 |
| Fum7eF | ATCCGGTTGAGTTGGACAAG | Fum7 | 54.7 | Stepien <i>et al.</i> , 2011 |
| Fum8eR | GGAACAGATGCCCATACCAT | Fum7 | 54.7 | Stepien <i>et al.</i> , 2011 |
| Antfum8F | ACGGCTCTCCCGTTGTCTGC | Fum8 | 62.4 | Stepien <i>et al.</i> , 2011 |
| AntFum8R | GGCCAGCCGTCTCTCAAGCG | Fum8 | 62.4 | Stepien <i>et al.</i> , 2011 |

Tabla 2.9: lista de condiciones aplicadas a todos los ensayos de PCR para detección de genes del clúster FUM; temperatura de alineamiento (Tm) de acuerdo al primer correspondiente detallado en la tabla 2.8.

| Temperatura °C | Tiempo (min) | Número de ciclos |
|----------------|--------------|------------------|
| 95 | 15.0 | 1 |
| 94 | 0.8 | 35 |
| Tm | 0.8 | 35 |
| 72 | 1.5 | 35 |
| 72 | 7.0 | 1 |
| 4 | 60.0 | 1 |

2.6.8 Amplificación de microsatélites fluorescentes SSRs - secuencias de repetición simple

Todos los aislados de *Fusarium* del **grupo B** fueron sometidos a ensayos de amplificación PCR de SSRs, para lo cual se empleó seis pares de primers con marcaje fluorescente (se marcó únicamente los primers forward o región 5') cuyas características principales se muestran en la tabla 2.10. En total para las 143 muestras de DNA se realizaron 858 reacciones.

Tabla 2.10: listado de microsatélites SSRs empleados en el presente estudio (Moncrief, 2013). a) Nombre, secuencia, tipo de marcaje fluorescente, b) Motif, tamaño de banda esperado, temperatura de alineamiento (T_m), c) características de absorción y emisión de fluorocromos.

a)

| Nombre | Primer Forward (5') | | Primer Reverse (3') |
|--------|------------------------|---------|----------------------------|
| | Secuencia | Marcaje | Secuencia |
| SSR18 | GAGCTGAAGCAAAACCAACTTC | 6FAM | GTCAGTGTATGGGA AAAGAGCC |
| SSR38 | TCTTCCTGCTGCTCTACCTCTT | NED | AACGCGAACACAGA TACTGAGA |
| SSR45 | CTTTAGCTGTTTGGTCGTTGTG | PET | CGGGGAGATCCAAG TTATTCTT |
| SSR68 | ATGTTGGATACTTCAGGCAGGT | PET | CGTTTTCTGCTCTCC TTCTCTC |
| SSR92 | GGCATCGTTTCTAGGGACTGTA | 6FAM | AGCTGTCTTCTTTGG GACTCT |
| SSR109 | TGTGGTTGAGAGGTGGTTATGA | 6FAM | GGGGATGAGACCAT GTAGAAAA |

b)

| Nombre | Motif | Tamaño de banda esperado (pares de bases - bp) | Tm (°C) |
|--------|-----------|--|---------|
| SSR18 | (GT)5 | 372 | 60.0 |
| SSR38 | (TCT)7 | 377 | 59.8 |
| SSR45 | (TG)5 | 139 | 59.8 |
| SSR68 | (TGTGT)12 | 145 | 59.8 |
| SSR92 | (GAT)5 | 354 | 60.5 |
| SSR109 | (TTG)5 | 395 | 60.2 |

c)

| Fluorocromos | Absorbancia (nm) | Emisión (nm) |
|--------------|------------------|--------------|
| 6-FAM | 494 | 530 |
| NED | 546 | 575 |
| PET | 558 | 595 |

Para la reacción se aplicaron los reactivos y volúmenes detallados en la tabla 2.11. En cuanto a los parámetros de amplificación, se usó como base los ciclos PCR de Lee *et al.*, 2007, modificándose la temperatura de alineamiento (tabla 2.12).

Tabla 2.11: listado de reactivos y proporciones empleadas en el ensayo PCR.

| Reactivo | Concentración | Volumen por reacción (µL) |
|--|----------------------|----------------------------------|
| GoTaq® Colorless (Promega) | 2X | 10 |
| Primer Forward (IDT - Integrated DNA technologies) | 5 µM | 1 |
| Primer Reverse (IDT - Integrated DNA technologies) | 5 µM | 1 |
| Agua (destilada - autoclavada) | - | 6 |
| DNA | 1 a 25 ng/µL | 2 |
| Volumen total | | 20 |

Tabla 2.12: condiciones de PCR para amplificación de microsatélites; T_m: de acuerdo al primer SSR correspondiente detallado en la tabla 2.10 (b).

| Temperatura °C | Tiempo (min) | Número de ciclos |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| 95 | 5.0 | 1 |
| 94 | 0.6 | 34 |
| T _m | 0.6 | 34 |
| 72 | 0.5 | 34 |
| 72 | 10.0 | 1 |
| 4 | 60.0 | 1 |

Se prosiguió con la visualización de productos, se mezcló 4 μL del producto PCR con el Buffer de carga – BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen; 1X), posteriormente la mezcla fue cargada en un gel de agarosa 2%, TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio y sometidos a una potencia de 100 Voltios y por el lapso de dos horas y media.

Cabe destacar que en este y en todos los ensayos previamente citados, se empleó como referencia de tamaño de banda un ladder de DNA de 100 bp (VWR), el cual amplifica 12 fragmentos discretos en el rango de 100 a 3000 bp. Finalmente para la documentación fotográfica de resultados se empleó un transiluminador UV (Benchtop UVP).

2.6.9 Estandarización del protocolo de preparación de muestras SSRs para análisis de fragmentos o secuenciación en electroforesis capilar

Los microsatélites amplificados previamente fueron agrupados en una dilución (1:60)*3 para análisis multiloci en electroforesis capilar, para lo cual los SSRs fueron agrupados en dos grupos en base al tamaño de las pares de bases amplificadas, con el fin de evitar solapamiento de lectura.

Combinación A: 171 μL de agua destilada, 3 μL SSR 38, 3 μL SSR 45, 3 μL SSR 92.

Combinación B: 171 μL de agua destilada, 3 μL SSR 18, 3 μL SSR 68, 3 μL SSR 109.

Posteriormente los productos diluidos fueron combinados con los reactivos necesarios para su análisis y detección, así se tiene: 0.4 μL LIZ600 (fluorescencia de tamaño estándar de 600 bp, 9 μL de formamida, 3 μL del combinado de SSRs.

Finalmente, las muestras fueron enviadas al Centro de Análisis Core Facility del Departamento de Entomología y Patología de Plantas de OSU, para la secuenciación en el secuenciador de DNA modelo 3730, usándose los reactivos y protocolos detallados en el manual del proveedor Life Technologies, 2012.

2.6.10. Análisis estadístico de datos de SSRs

Posterior al procesamiento de muestras en electroforesis capilar, los datos fueron trasladados al software **Peak Scanner versión 1.0** - Applied Biosystem, en el cual se seleccionaron tres picos de cada muestra de las combinaciones A y B. Cada pico representa el tamaño de cada alelo en uno de los locus (SSRs) analizados. El tamaño de banda de cada alelo es calculado o extrapolado a partir del tamaño estándar proporcionado por el reactivo LIZ600 (figura 2.9).

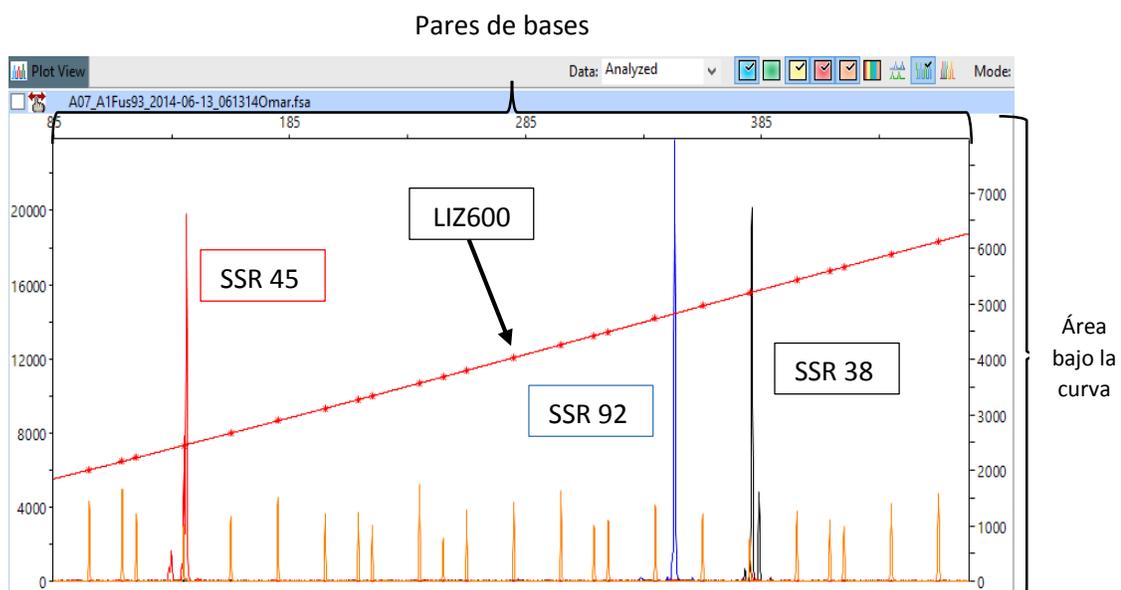


Figura 2.9: picos de tamaño de banda para la combinación A de microsatélites; SSR 38 (pico negro- fluorescencia amarilla), SSR 45 (pico rojo- fluorescencia roja), SSR 92 (pico azul- fluorescencia azul), la línea roja transversal corresponde al reactivo LIZ600.

Luego de seleccionar y verificar cada pico de cada muestra, se procedió a exportar los datos y armar una matriz de distancias o datos alélicos en Excel la cual fue ingresada en el software **GenAlEx versión 6.5.**, para obtener un **análisis intrapoblacional** en el que se evaluaron las frecuencias alélicas y diversidades genéticas para lo cual se utilizó los estimadores de Shannon, porcentaje de polimorfismo, heterocigosidad observada y esperada.

En el **análisis interpoblacional** se generaron los parámetros de identidad genética de Nei, análisis de varianza molecular (AMOVA) con soporte del estadístico PhiPT, flujo génico (Nm) y análisis de componentes principales (PCoA) en dos ejes de varianza.

Para el agrupamiento de haplotipos o variedades genéticas se emplearon los programas **PowerMarker versión 3.25** y **MEGA versión 5.2** con el fin de esquematizar dos dendogramas, el primero a través del método sin ponderar de agrupamiento en pares con uso de media aritmética (UPGMA) y el segundo usando el agrupamiento vecinal (NJ) en el que no se toma en cuenta un ancestro en común o raíz de árbol.

Finalmente, se determinó el número de ancestros comunes (K) o asignación genética usando el sitio **Structure Harvester** (página web: taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester) y, para su visualización, se utilizó el algoritmo de **STRUCTURE versión 2.3.3.**

2.6.13. Protocolo de inducción *in vitro* para producción de fumonisinas a partir de cultivos de *Fusarium* del grupo A de aislados

- **Preparación de los cultivos inactivos de *Fusarium***

En primera instancia se realizó una reactivación de cultivos de *Fusarium* para lo cual cada uno de los cultivos preservados (dormancia) en papel filtro (*Fusarium* 1, 3, 4 y 7 – Grupo A) fueron cortados en tres pedazos (forma de triángulo – tamaño no específico) y se los colocó sobre medio selectivo YPS. El cultivo fue incubado por tres días a 28°C, hasta observar crecimiento de micelio alrededor de los pedazos (zonas colonizadas).

- **Preparación de los granos a contaminarse con *Fusarium***

Por otro lado, se seleccionó dos grupos de granos, el primero conteniendo maíz y el otro, una combinación de avena y sorgo (proporción 50/50). De cada grupo se tomó 100 gramos de grano y se lo colocó en una caja magenta (Magenta® GA-7 Plant Culture Box), a la cual previamente se añadió agua destilada (1000 mL).

Este proceso fue realizado para cada muestra generándose duplicados de cada una y dos controles positivos (total 18 cajas) (figuras 2.10 y 11). Las cajas magenta fueron autoclavadas durante 20 minutos, y se dejó enfriar toda la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, cada una de las cajas fue agitada para evitar acumulación.



Figura 2.10: cajas magenta con avena y sorgo (50/50), preparadas para el proceso de contaminación con aislados de *Fusarium*.



Figura 2.11: cajas magenta con maíz preparadas para el proceso de contaminación con aislados de *Fusarium*.

- **Inoculación y evaluación de cultivos**

A cada uno de los cultivos activos de *Fusarium* se les extrajo ocho segmentos circulares de agar (figura 2.12) y se los colocó en el interior de las cajas con grano (dos por caja). Se sellaron y se las preservó a temperatura

ambiente. Finalmente, se llevó a cabo un registro de crecimiento del hongo en grano durante 14 días, homogenizándose cada dos mediante agitación.

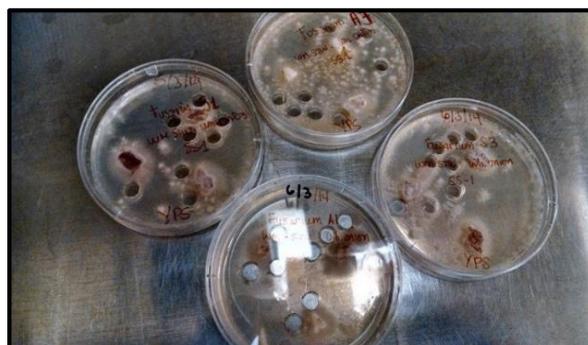


Figura 2.12: cultivos activados de *Fusarium* a los que se les extrajo segmentos circulares de agar para generar la inoculación en grano.

2.6.14. Análisis toxicológico de fumonisinas

Una vez que el periodo de infección (14 días) terminó, se procedió con la preparación de muestras para análisis toxicológico. Se pesó diez gramos de cada muestra y se los colocó en fundas plásticas - NascoWhirl-Pak -2oz (figura 2.13).



Figura 2.13: muestras empaquetadas para análisis de fumonisinas (pesada y procesada de acuerdo a parámetros de OADDL).

Posteriormente las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Animales de Oklahoma (OADDL–Oklahoma Animal Disease Diagnostic Lab) para la cuantificación de micotoxina.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

“GRUPO A”

3.1. Análisis Morfológico

Los cultivos en papel filtro presentaron coloración rojiza-púrpura propia de especies del género *Fusarium*. Se prosigió con la visualización en microscopio óptico (40X) para lo cual se tomaron muestras de los aislados cultivados en YPS y se observó agrupamiento de macro y microconidia de diverso tamaño (figura 3.1). No se realizó una distinción de especies de *Fusarium*, únicamente se verificó pertenencia de género.

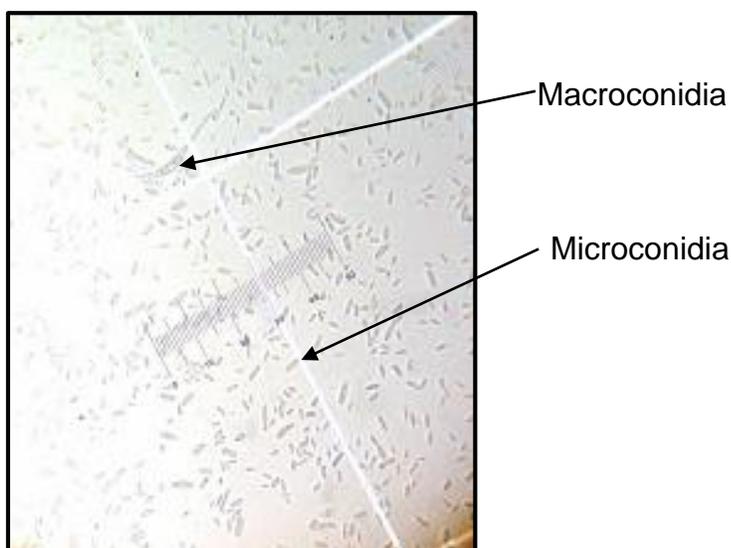


Figura 3.1: agrupamiento de macro (segmentos alargados y oblicuos) y microconidia (segmentos cortos semicirculares) en 1 μ L de muestra de aislados de USA observadas en microscopio óptico (40X).

3.2. Análisis Molecular

3.2.1. Extracción y evaluación de DNA

Los niveles de DNA extraído de todas las muestras (12 aislados de USA) generaron concentraciones entre 226.3 a 2018.2 ng/ μ L y una pureza de absorbancia entre 2.05 a 2.58, por lo que la normalización a 25 ng/ μ L fue alcanzada.

3.2.2. Detección del género *Fusarium*

Todos los aislados analizados fueron identificados como especies pertenecientes al género *Fusarium* mediante amplificación del gen TEF1 α con los primers EF1 y EF2. Se encontró que los productos amplificados de todas las muestras se encontraron en el rango de 700 a 800 pares de bases (figura 3.2).

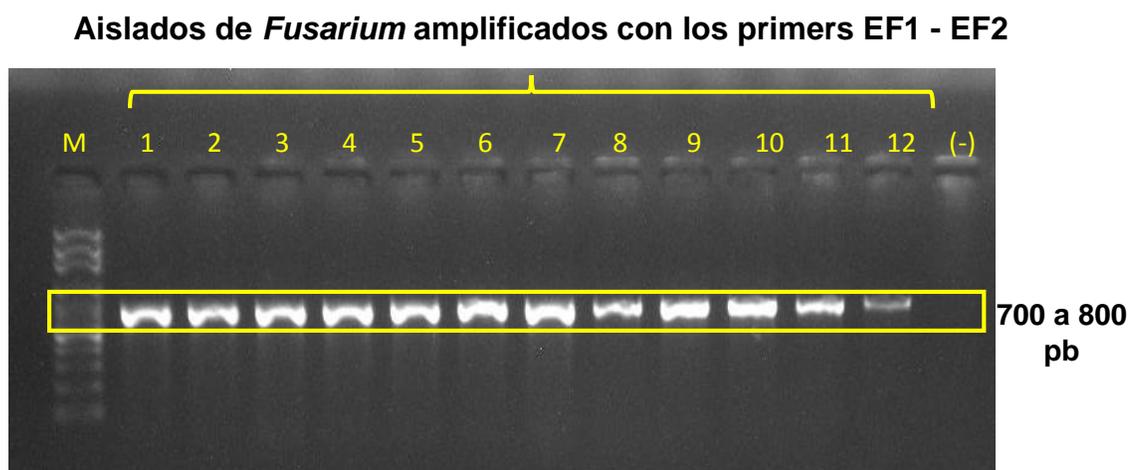


Figura 3.2: amplificación del gen TEF1 α usando muestras del grupo A; M: marcador de peso molecular de 100 bp, 1: *Fusarium* 1, 2: *Fusarium* 2, 3: *Fusarium* 3, 4: *Fusarium* 4, 5: *Fusarium* 5, 6: *Fusarium* 6, 7: *Fusarium* 7, 8: *Fusarium* 8, 9: *Fusarium* 9, 10: *Fusarium* 10, 11: *Fusarium* 11, 12: *Fusarium* 12, (-): control negativo.

3.2.3. Detección específica de *Fusarium proliferatum*

3.2.3.1. Identificación mediante amplificación de genes TEF1 α y CAM

De las 12 aislados analizados, cuatro fueron identificados como *Fusarium proliferatum*, mediante amplificación del gen calmodulin usando los primers PRO1-PRO2 (los productos amplificados de todas las muestras se encontraron en el rango de 500 a 600 pares de bases (bp) según la figura 3.3).

Aislados de *Fusarium* amplificados con los primers PRO1 - PRO2



Figura 3.3: amplificación del gen calmodulin usando muestras del grupo A; M: marcador de peso molecular de 100 bp, 1: *Fusarium* 1, 2: *Fusarium* 2, 3: *Fusarium* 3, 4: *Fusarium* 4, 5: *Fusarium* 5, 6: *Fusarium* 6, 7: *Fusarium* 7, 8: *Fusarium* 8, 9: *Fusarium* 9, 10: *Fusarium* 10, 11: *Fusarium* 11, 12: *Fusarium* 12.

En el caso de la detección de un sector del gen TEF1 α mediante los primers Prolif-TEF1R, se encontró que de los 12 aislados analizados, cinco fueron identificados como *F. proliferatum* y los aislados restantes (figura 3.4) presentaron amplificación débil no específica (los productos amplificados de todas las muestras presentaron un tamaño de aproximadamente 200 bp).

Aislados de *Fusarium* amplificados con los primers Prolif - TEF1R

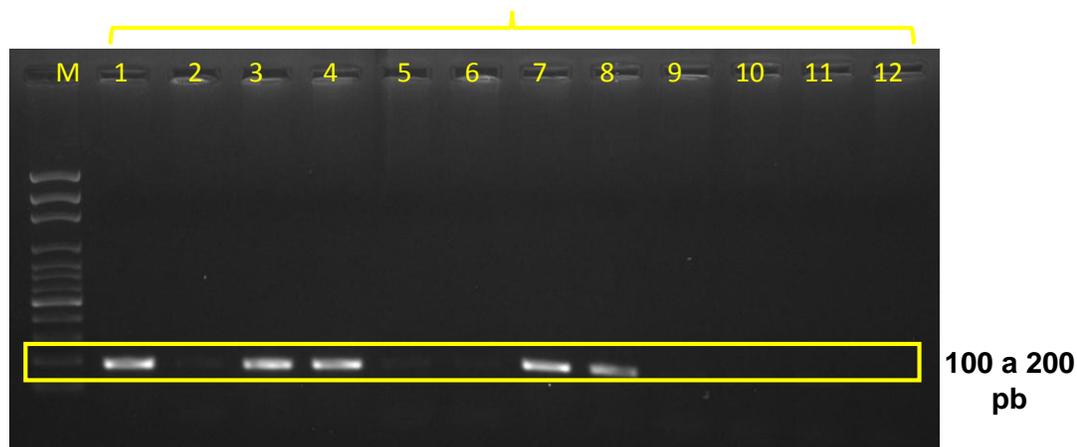


Figura 3.4: amplificación un sector del gen TEF1 α ; M: marcador de peso molecular de 100 bp, 1: *Fusarium* 1, 2: *Fusarium* 2, 3: *Fusarium* 3, 4: *Fusarium* 4, 5: *Fusarium* 5, 6: *Fusarium* 6, 7: *Fusarium* 7, 8: *Fusarium* 8, 9: *Fusarium* 9, 10: *Fusarium* 10, 11: *Fusarium* 11, 12: *Fusarium* 12.

3.2.3.2. Identificación en bases de datos

Las 12 muestras amplificadas con el gen TEF1 α fueron secuenciadas (anexo B). Los datos fueron insertados en las bases de datos NCBI y MLST para obtener un estimado de su identidad. Se observaron valores desde 99 hasta 100%.

El nivel de cobertura es decir, la cantidad de secuencia analizada presentó porcentajes desde 91% hasta 100% y de 98 hasta 100% para NCBI y MLST respectivamente. Las fuentes base que sirvieron de referencia para homologar las secuencias de *Fusarium* pueden ser apreciadas en las tablas 3.1 y 3.2.

Tabla 3.1: identificación de especie basada en la secuenciación del gen TEF1 α
(base de datos NCBI).

| Aislado | Especie | Identidad (%) | Cobertura (%) | Número de acceso (NCBI) |
|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|
| <i>Fusarium</i> 1 | <i>F. proliferatum</i> | 100 | 100 | KC121066.1 |
| <i>Fusarium</i> 2 | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 100 | JN995200.1 |
| <i>Fusarium</i> 3 | <i>F. proliferatum</i> | 100 | 100 | KF939498.1 |
| <i>Fusarium</i> 4 | <i>F. proliferatum</i> | 100 | 100 | KC121066.1 |
| <i>Fusarium</i> 5 | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 98 | JN995200.1 |
| <i>Fusarium</i> 6 | <i>F. oxysporum</i> | 99 | 91 | KC622308.1 |
| <i>Fusarium</i> 7 | <i>F. proliferatum</i> | 100 | 100 | KF939498.1 |
| <i>Fusarium</i> 8 | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 100 | JN995200.1 |
| <i>Fusarium</i> 9 | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 100 | JN995200.1 |
| <i>Fusarium</i> 10 | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 100 | JN995200.1 |
| <i>Fusarium</i> 11 | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 100 | JN995200.1 |
| <i>Fusarium</i> 12 | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 100 | JN995200.1 |

Tabla 3.2: identificación de especie basada en la secuenciación del gen TEF1 α
(base de datos MLST).

| Aislado | Especie | Identidad (%) | Cobertura (%) | Número de acceso (MLST) |
|--------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--|
| <i>Fusarium 1</i> | <i>F. proliferatum</i> | 99 | 99 | <u>CBS 217.76</u> <u>AF160280</u> |
| <i>Fusarium 2</i> | <i>F. oxysporum</i> | 99 | 98 | <u>CBS 259.50</u> |
| <i>Fusarium 3</i> | <i>F. pseudonygami</i> | 99 | 100 | <u>NRRL 13592</u> |
| <i>Fusarium 4</i> | <i>F. proliferatum</i> | 99 | 100 | <u>AF160280 - NRRL</u> <u>22944</u> |
| <i>Fusarium 5</i> | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 98 | <u>CBS 259.50</u> |
| <i>Fusarium 6</i> | <i>F. oxysporum</i> | 99 | 98 | <u>CBS 213.49</u> <u>FJ985347</u> |
| <i>Fusarium 7</i> | <i>F. pseudonygami</i> | 99 | 100 | <u>NRRL 13592</u> |
| <i>Fusarium 8</i> | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 98 | <u>CBS 259.50</u> |
| <i>Fusarium 9</i> | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 98 | <u>CBS 259.51</u> |
| <i>Fusarium 10</i> | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 99 | <u>CBS 259.52</u> |
| <i>Fusarium 11</i> | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 98 | <u>CBS 259.53</u> |
| <i>Fusarium 12</i> | <i>F. oxysporum</i> | 100 | 98 | <u>CBS 259.54</u> |

3.2.3.3. Identificación de grupos o genotipos en árbol filogenético

A partir de las doce secuencias consenso obtenidas de los aislados, más tres secuencias de referencia y una de control externo (obtenidas a través de MLST), se procedió con la construcción del árbol filogenético en base al modelo de Kimura2, para lo cual se empleó un alineamiento múltiple, observándose preliminarmente cierta variación en bases nitrogenadas entre las secuencias de los aislados consenso y los de referencia (figura 3.5).

Posteriormente, mediante método Bootstrap se generó un árbol filogenético consenso después de 1000 repeticiones (figura 3.6). Al analizar el árbol filogenético se pudo denotar que el grupo A concentró a los aislados de las capas S3, Dcr, D5, D3, A5, S2, D7, A9 relacionadas completamente (100%) con la secuencia control correspondiente a *F. oxysporum* (NRRL26203, secuencia AF008501).

| DNA Sequences | Translated Protein Sequences |
|----------------------|---|
| Species/Abbrv | |
| 1. Fusarium1 | A C C C T G G A C G T T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G C E G G T A C T C T T T G A A |
| 2. Fusarium2 | C T C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T C T T T C T C - G A A |
| 3. Fusarium3 | A C C C T G G A C G A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G C E G G T A C T C T T T G A A |
| 4. Fusarium4 | A C C C T G G A C G T T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G C E G G T A C T C T T T C T C - G A A |
| 5. Fusarium5 | C T C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T T C T T C - G A A |
| 6. Fusarium6 | C T C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T T C T T C - G A A |
| 7. Fusarium7 | A C C C T G G A C G A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G C E G G T A C T C T T T G A A |
| 8. Fusarium8 | C T C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T T C T T C - G A A |
| 9. Fusarium9 | C T C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T T C T T C - G A A |
| 10. Fusarium10 | C T C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T T C T T C - G A A |
| 11. Fusarium11 | C T C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T T C T T C - G A A |
| 12. Fusarium12 | C T C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T T C T T C - G A A |
| 13. F.oxysporum | A C C C T G G A C G A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G C E G G T A C T C T T T G A A |
| 14. F.proliferatum | A C C C T G G A C G T T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G C E G G T A C T C T T T C T C - G A A |
| 15. F.pseudonygami | A C C C T G G A C G A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G C E G G T A C T C T T T G A A |
| 16. F.chlamydsoporum | A C C C T C G A C A A T G A G C T T A T C T T C C A T C G T - G A T C C C T G A C C A A G A T C T T G G T E G G T A C T T T T C T T C - G A A |

Figura 3.5: alineamiento múltiple de secuencias consenso de *Fusarium* (MEGA versión 5.2), los recuadros en negro representan algunas de las diferencias o variabilidades de bases entre secuencias.

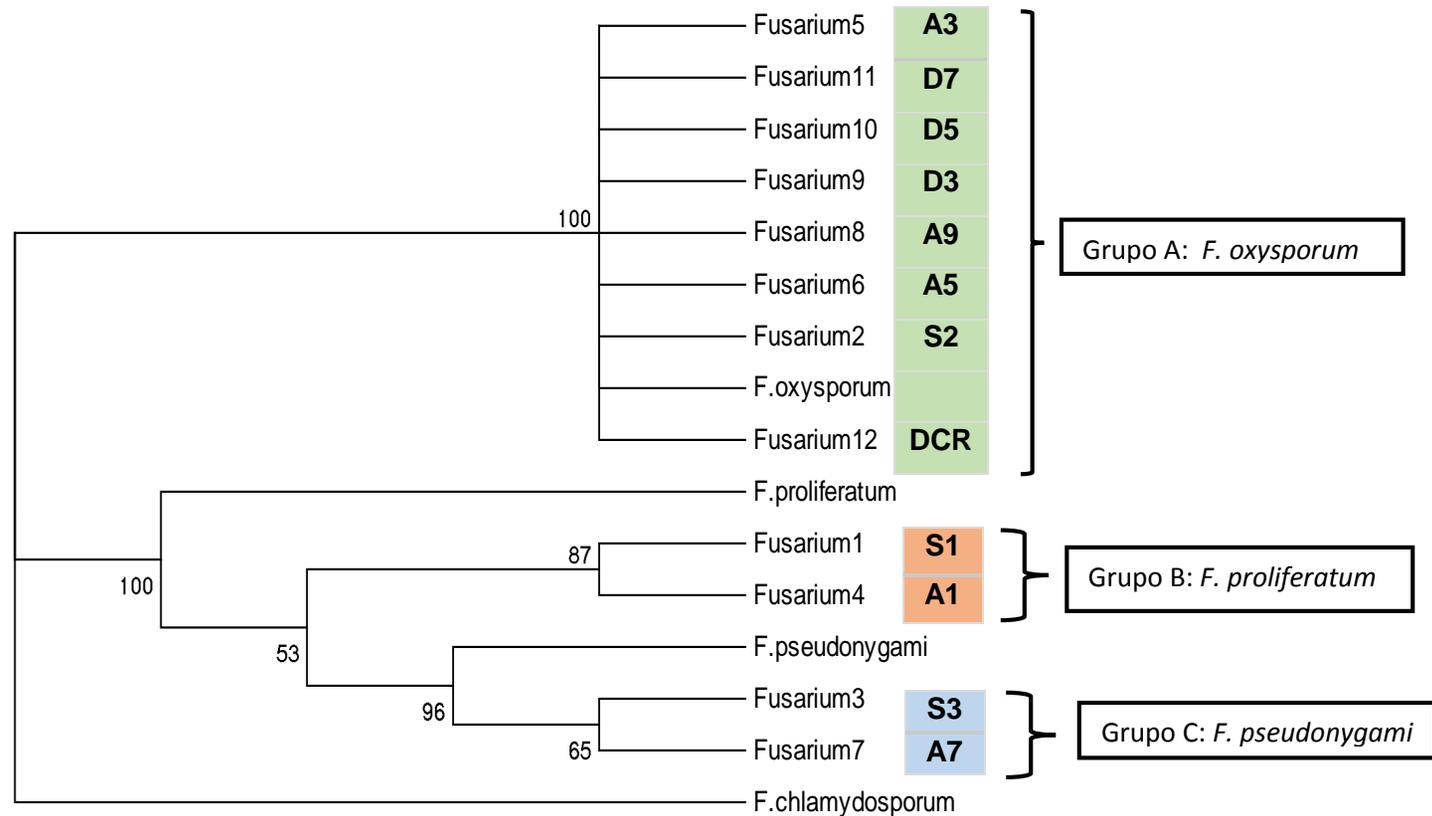


Figura 3.6: árbol filogenético consenso en base a secuencias del gen TEF1 α , valores Bootstrap presentados en las tres ramificaciones principales (MEGA versión 5.2); los recuadros verde, tomate y celeste representan las capas de cebolla de donde fueron aisladas las muestras; (control externo: *Fusarium chlamydosporum*).

Tabla 3.3: cuadro comparativo de identificación de especies de *Fusarium*.

| Asilado | Capa | PRO1-PRO2 (gel) | Prolif-TEF1R (gel) | EF1-EF2 (secuencia) | | Grupo genotípico en árbol |
|--------------------|------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|
| | | | | NCBI | MLST | |
| <i>Fusarium</i> 1 | S1 | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | B |
| <i>Fusarium</i> 2 | S2 | - | - | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. oxysporum</i> | A |
| <i>Fusarium</i> 3 | S3 | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. pseudonygami</i> | C |
| <i>Fusarium</i> 4 | A1 | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | B |
| <i>Fusarium</i> 5 | A3 | - | - | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. oxysporum</i> | A |
| <i>Fusarium</i> 6 | A5 | - | - | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. oxysporum</i> | A |
| <i>Fusarium</i> 7 | A7 | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. pseudonygami</i> | C |
| <i>Fusarium</i> 8 | A9 | - | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. oxysporum</i> | A |
| <i>Fusarium</i> 9 | D3 | - | - | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. oxysporum</i> | A |
| <i>Fusarium</i> 10 | D5 | - | - | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. oxysporum</i> | A |
| <i>Fusarium</i> 11 | D7 | - | - | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. oxysporum</i> | A |
| <i>Fusarium</i> 12 | DCR | - | - | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. oxysporum</i> | A |

El grupo B contuvo a los aislados de las capas S1 y A1, los cuales se relacionaron (53%) con la secuencia control correspondiente a *F. proliferatum* (NRRL22944, secuencia AF160280). Por otro lado, el grupo C concentró a los aislados S3 y A7, estos a su vez se relacionaron (96%) con la secuencia correspondiente a *F. pseudonygami* (NRRL13592, secuencia 2699). Además los aislados S3 y A7 también presentaron cierta relación con *F. proliferatum*. El control externo del árbol fue proporcionado por la especie *F. chlamydosporum* (NRRL34018, secuencia GQ505413).

Finalmente, con los resultados generados a partir de amplificación de gen, identificación en bases de datos y agrupamientos en árboles, se procedió a realizar una comparación de identidad y procedencia de muestras (tabla 3.3). Se encontró que en los aislados de las distintas capas de cebollas se identificaron tres especies de *Fusarium*, distribuidas de la siguiente manera: en la cebolla con **sintomatología (S)** se encontró: *F. proliferatum* en la capa S1, *F. oxysporum* en S2 y *F. pseudonygami* en S3. En la cebolla con **sintomatología (D)** se encontró *F. oxysporum* en D3, D5, D7 y Dcr.

En la cebolla **asintomática (A)** se identificó a *F. oxysporum* en los aislados de las capas A3, A5 y A9. Además se encontraron a *F. proliferatum* y *F. pseudonygami* en las capas A1 y A9 respectivamente. La interpretación de identidad de las muestras fue realizada tomando en consideración la base de datos de MLST.

3.2.4. Detección de genes productores de micotoxina fumonisina

En cuanto al perfil genético asociado con la producción de micotoxinas, se encontró que de los 12 aislados, cuatro amplificaron para el gen Fum1 (33%

del total de población), que codifica a la enzima poliquétido sintetasa catalizadora de la primera etapa de síntesis de fumonisina. Los aislados que amplificaron el gen fueron las muestras identificadas como *F. proliferatum*, se registró un tamaño de banda de alrededor de 1000 a 1300 pares de bases. En el caso de las ocho muestras restantes (67% del total de población), *F. oxysporum* mostró incapacidad de codificación de la enzima citada.

No hubo amplificación para el gen Fum7 codificante de una enzima tipo deshidrogenasa en ninguno de los 12 aislados. Finalmente, el gen Fum8 codificante de la enzima oxoamina sintetasa fue amplificado por diez aislados (83% del total de población) con un tamaño de banda de alrededor de 600 a 700 pb e identificados como *F. proliferatum*, *F. pseudonygami* y *F. oxysporum*. En todos los casos anteriores se empleó un control positivo (figuras 3.7, 3.8 y 3.9).

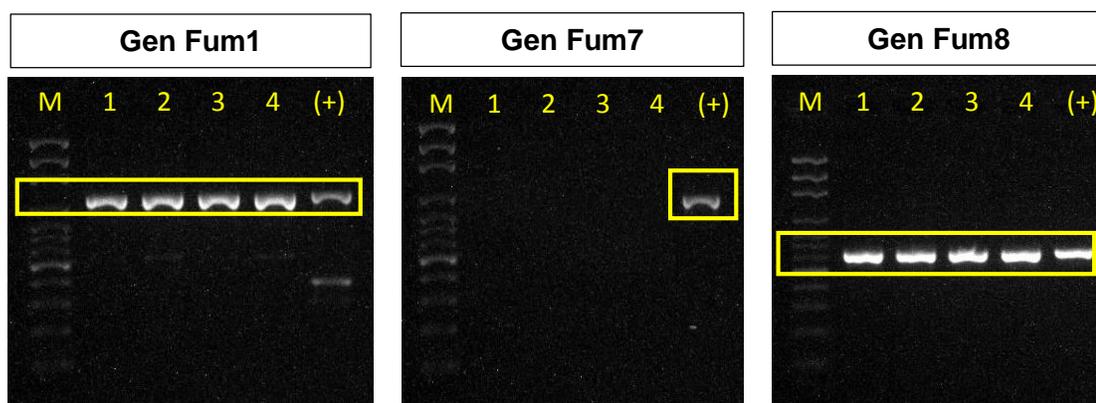


Figura 3.7: amplificación de los genes productores de fumonisina: **Fum1** (primers Fum1F1-Fum1R2), **Fum7** (Fum7eF-Fum8eR) y **Fum8** (Antfum8F-Antfum8R). M: marcador de peso molecular de 100 bp; 1: *Fusarium* 1; 2: *Fusarium* 3, 3: *Fusarium* 4, 4: *Fusarium* 7, (+): control positivo; en rectángulos amarillos se resaltan las bandas de los productos de PCR.

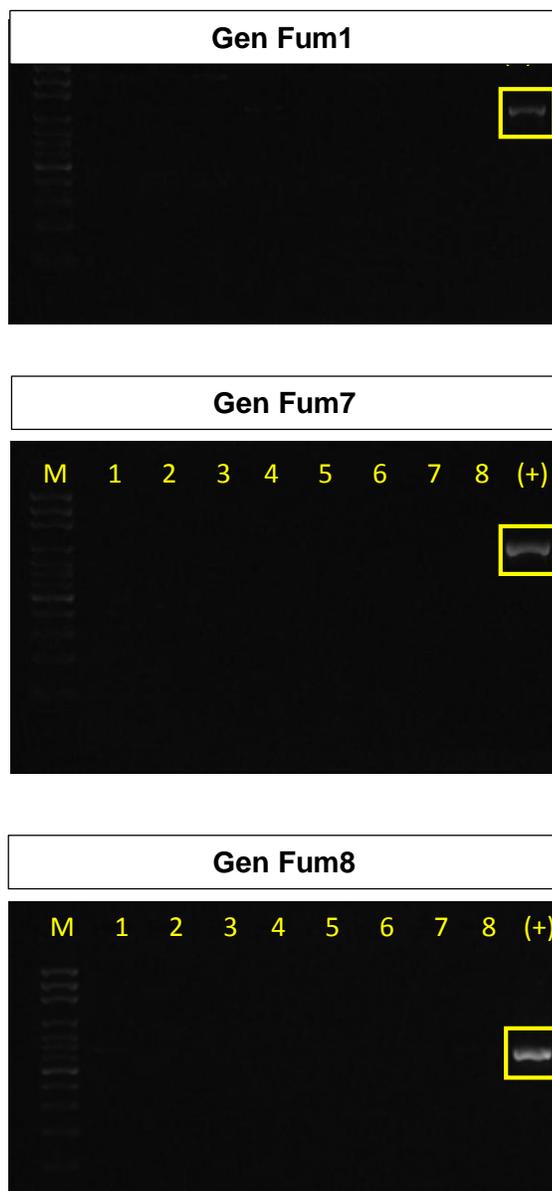


Figura 3.8: amplificación de los genes productores de fumonisina: **Fum1** (primers Fum1F1-Fum1R2), **Fum7** (Fum7eF-Fum8eR) y **Fum8** (Antfum8F-Antfum8R). M: peso molecular de 100 bp, 1: *Fusarium 2*, 2: *Fusarium 5*, 3: *Fusarium 6*, 4: *Fusarium 8*, 5: *Fusarium 9*, 6: *Fusarium 10*, 7: *Fusarium 11*, 8: *Fusarium 12*, (+): control positivo; en rectángulos amarillos se resaltan las bandas de los productos de PCR.

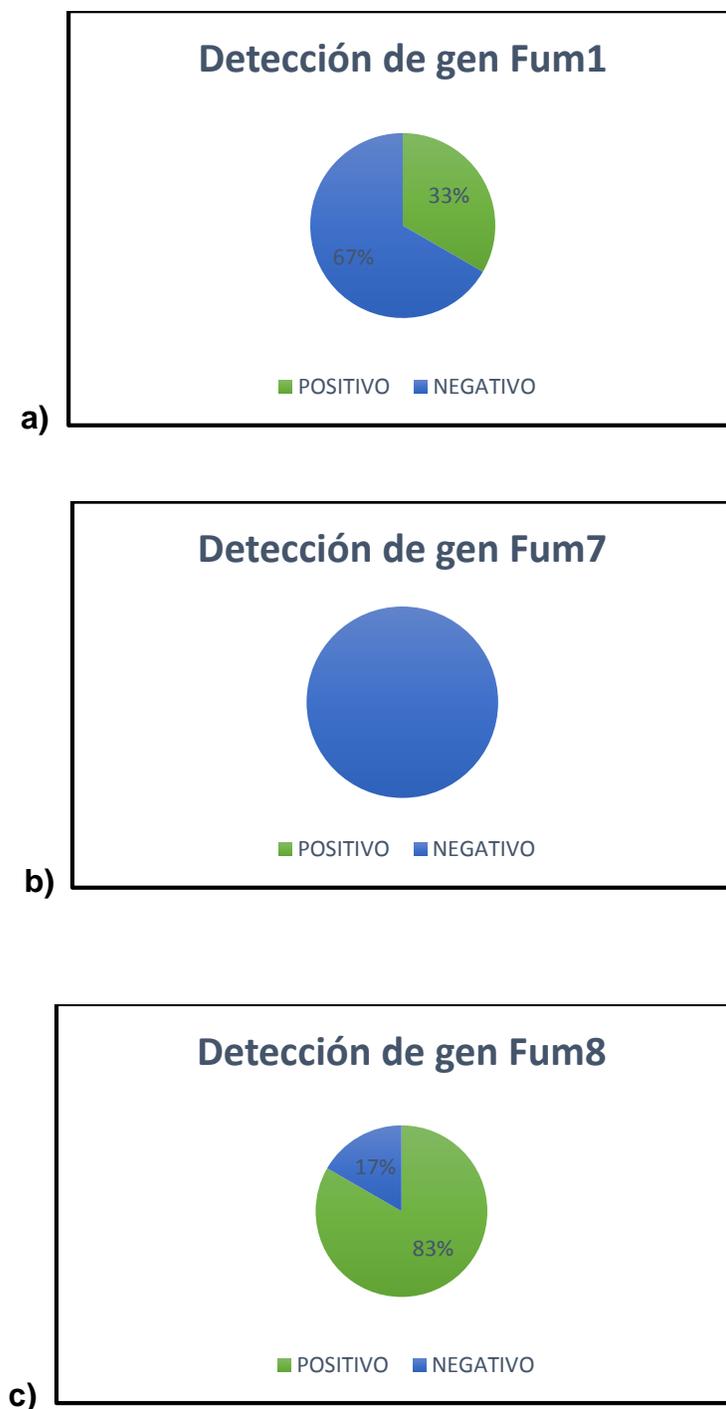


Figura 3.9: gráfico de pastel que esquematiza la detección de los genes productores de fumonisinas en todas los aislados del grupo A ; **a) Fum1** (primers Fum1F1-Fum1R2), **b) Fum7** (Fum7eF-Fum8eR) y **c) Fum8** (Antfum8F-Antfum8R) ; (positivo: detectó, negativo: no detectó).

3.2.5. Inducción *in vitro* para producción de fumonisinas a partir de cultivos de *Fusarium*

Con los aislados identificados como *F. proliferatum* y *F. pseudonygami* (*Fusarium* 1, 4 y 3, 7 respectivamente) se realizó una estimulación para generación de micotoxinas fumonisinas en dos grupos de granos: el primero contuvo maíz triturado y el otro, una combinación de avena y sorgo (proporción 50/50).

Se encontró que el maíz cambió de una coloración amarilla, color propio del maíz sin contaminación o control negativo, a una blanquecina-rosácea, día 14 de crecimiento de *Fusarium* en maíz (figura 3.10). En el caso de la combinación de avena y sorgo, se apreció una preferencia de desarrollo en el sorgo (tonalidad blanquecina) en comparación con la avena que no presentó cambio de coloración (figura 3.11).

El cambio de coloración fue uniforme en todo el grano y se registraron controles de crecimiento cada dos días tal como se puede visualizar en la tabla 3.4. Se notó que el aislado *Fusarium* 4 en avena-sorgo sufrió un cambio de tonalidad más rápido en comparación con los otros. En contraste, el aislado *Fusarium* 7 creció más lentamente en maíz y en avena-sorgo.

Los experimentos fueron desarrollados con duplicados y un control negativo para ambas combinaciones de granos.



Figura 3.10: evaluación de maíz contaminado con *Fusarium* al día 14 de crecimiento; **a)** Control negativo, **b)** *Fusarium 1* (S1) , **c)** *Fusarium 3* (S3) , **d)** *Fusarium 4* (A1) , **e)** *Fusarium 7* (A7).



Figura 3.11: evaluación de sorgo-avena contaminado con *Fusarium* al día 14 de crecimiento; **a)** Control negativo, **b)** *Fusarium* 1 (S1) , **c)** *Fusarium* 3 (S3) , **d)** *Fusarium* 4 (A1) , **e)** *Fusarium* 7 (A7).

3.2.6. Análisis toxicológico de fumonisinas

La cuantificación de fumonisinas realizada en el Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Animales de Oklahoma (OADDL) encontró que las **muestras de maíz** con crecimiento de *Fusarium* produjeron niveles de fumonisina desde 0 hasta >700 ppm, este último valor fue generado por el aislado *Fusarium 7* (identificado como *F. pseudonygami*) el cual excedió los niveles máximos de cuantificación de acuerdo con los parámetros de OADDL. Además, la muestra tuvo su origen en la capa A7 de una cebolla asintomática, es decir con ausencia de pudrición o coloración apreciable.

Otro aislado de la misma cebolla, *Fusarium 4* (A1), que fue identificado como *F. proliferatum*) presentó una concentración de 0.2 ppm. Los aislados *Fusarium 1* y 3 de la cebolla con sintomatología proveniente de las capas S1 y S3 respectivamente, no generaron niveles detectables de fumonisinas.

En el caso de las **muestras de avena y sorgo** se encontraron niveles desde 0 hasta >350 ppm, este último valor fue producido por el mismo aislado *Fusarium 7*, que generó mayor concentración de micotoxina en el maíz, es decir, hay concordancia o patrón similar. El restante de muestras infectadas con los aislados *Fusarium 1* (S1), *Fusarium 3* (S3), *Fusarium 4* (A1), no mostraron niveles detectables.

En la tabla 3.5 se puede apreciar un cuadro comparativo de los niveles cuantificables de micotoxina y su ubicación mediante amplificación de genes FUM. Si bien en todos los aislados se encontró al menos dos genes FUM, lo que se traduce en una potencial producción de micotoxinas, no se vio reflejado en

los niveles cuantificables ya que únicamente dos mostraron una concentración detectable.

Tabla 3.5: cuantificación de fumonisinas (ppm) sintetizadas *in vitro* por aislados de *Fusarium* y presencia de genes FUM; n/d: niveles no detectados (0 ppm); *Muestras con niveles de fumonisinas que excedieron los límites de cuantificación de OADDL; (+): detección del gen; (-) gen no detectado.

| Huésped | ID | Capa | Identificación | Cantidad (ppm) | Fum1 | Fum7 | Fum8 |
|----------------|-------------------|------|------------------------|----------------|------|------|------|
| Maíz | <i>Fusarium</i> 1 | S1 | <i>F. proliferatum</i> | n/d | + | - | + |
| | <i>Fusarium</i> 3 | S3 | <i>F. pseudonygami</i> | n/d | + | - | + |
| | <i>Fusarium</i> 4 | A1 | <i>F. proliferatum</i> | 0.2 | + | - | + |
| | <i>Fusarium</i> 7 | A7 | <i>F. pseudonygami</i> | >700* | + | - | + |
| | Control negativo | | | n/d | | | |
| Avena Sorgo | <i>Fusarium</i> 1 | S1 | <i>F. proliferatum</i> | n/d | + | - | + |
| | <i>Fusarium</i> 3 | S3 | <i>F. pseudonygami</i> | n/d | + | - | + |
| | <i>Fusarium</i> 4 | A1 | <i>F. proliferatum</i> | n/d | + | - | + |
| | <i>Fusarium</i> 7 | A7 | <i>F. pseudonygami</i> | >350* | + | - | + |
| | Control negativo | | | n/d | | | |

“GRUPO B”

3.3. Análisis Molecular

A continuación se presentan los resultados de 143 muestras de DNA provenientes de Israel.

3.3.1. Extracción y evaluación de DNA

Del total de la población, 33 aislados presentaron niveles de DNA aceptables (superior a 30 ng/μL, con un máximo de 127.60 ng/μL), a partir de los cuales fue posible realizar un proceso de normalización a 25 ng/μL con agua destilada. El resto de muestras mostraron menores niveles de DNA (mínimo de 0.7 ng/μL), por lo cual se trabajó con un rango de concentraciones desde 0.7 hasta 25 ng/μL. En cuanto a la pureza, los niveles variaron entre absorbancias de 0.5 hasta 2.59.

3.3.2. Detección específica de *Fusarium proliferatum*

De las 143 muestras de Israel analizadas, 141 fueron identificadas como *F. proliferatum* mediante amplificación del gen calmodulin (CAM) usando los primers PRO1-PRO2. Los productos amplificados de todas las muestras se encontraron en el rango de 500 a 600 pares de bases al ser comparados con el marcador molecular.

Tal como se pudo apreciar en la figura 3.12, únicamente dos muestras de las 143 no amplificaron para el gen CAM, por lo cual, se les preparó para secuenciación doble (previa amplificación con gen TEF1α), obteniéndose las identidades según la tabla 3.6.

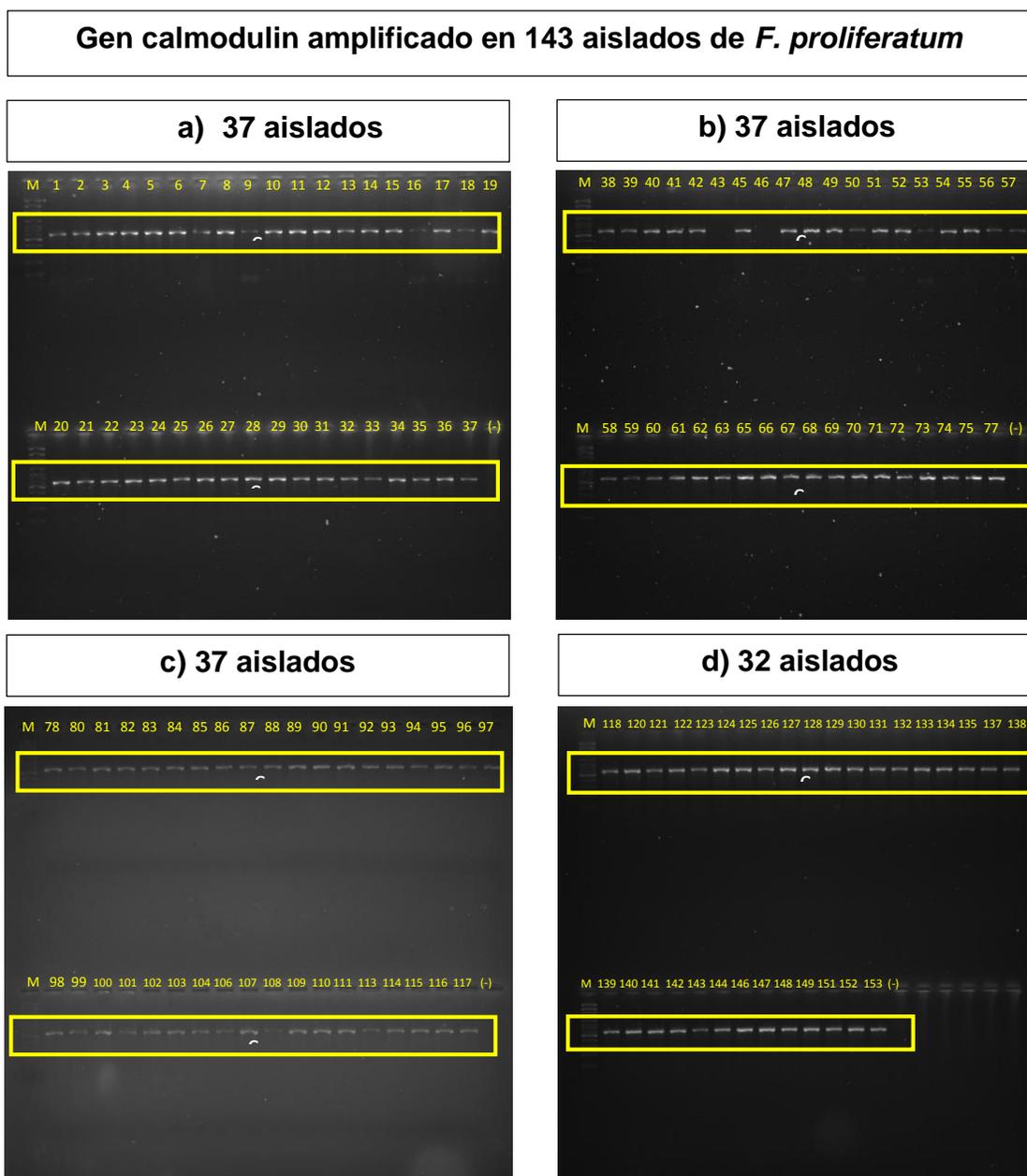


Figura 3.12: amplificación del gen CAM mediante los primers PRO1-2 para muestras de *Fusarium proliferatum*, cuatro fotografías en orden secuencial de muestras (**a, b, c, d, e**); M: marcador de 100 pares de bases, (-): control negativo; en rectángulos amarillos se resaltan las bandas de los productos de PCR.

Tabla 3.6: identidades de dos aislados de Israel, búsqueda en la base de datos del NCBI y MLST; ID: nombre del aislado.

| ID | Especie | Identidad (%) | Cobertura (%) | Número de acceso (NCBI) | Número de acceso (MLST) |
|------|------------------------|---------------|---------------|----------------------------|--|
| YM43 | <i>F. proliferatum</i> | 100 | 100 | KF939498.1 | CBS 217.76 AF160280 |
| YM46 | <i>F. proliferatum</i> | 100 | 100 | KF939498.1 | CBS 217.76 AF160280 |

3.3.3. Perfil genético de *Fusarium proliferatum* mediante uso de SSRs - secuencias de repetición simple

Los 143 aislados fueron amplificados mediante PCR con los microsatélites SSR, empleando los procedimientos y condiciones detalladas en materiales y métodos. La validación del producto de PCR fue apreciada en gel de agarosa 2% para cada una de las muestras, tal como se puede apreciar en el anexo C. Todas las amplificaciones de los seis microsatélites mostraron un tamaño de banda aproximado al esperado (listado de SSRs en materiales y métodos).

Con el fin de conocer el tamaño exacto de banda de cada una de las muestras para cada SSR, las muestras fueron analizadas en electroforesis capilar encontrándose diversos alelos (variación en el tamaño de banda correspondiente a una variedad de gen) tal como se puede apreciar en el anexo D. La matriz de tamaños fue analizada en diversos softwares obteniéndose datos que permitieron la caracterización molecular o genética de las poblaciones.

3.3.3.1. Análisis intrapoblacional

3.3.3.1.1. Frecuencias Alélicas

Se analizaron 143 aislados contenidos en dos grupos poblacionales de cinco, siendo “a1, b1, c1, d1, e1” poblaciones de las capas superiores de la cebolla y “a2, b2, c2, d2, e2” de las capas inferiores.

Se encontraron un total de 27 alelos correspondientes a seis locus, distribuidos de la siguiente manera: dos para el locus SSR18, dos para el locus SSR38, cuatro para el locus SSR45, tres para el locus SSR68, 13 para el locus 92 y tres alelos para el locus 109 (anexo D). Con estos datos fue posible determinar parámetros de frecuencia alélica mínima, máxima y promedio cuyos valores son 0.007 (alelo 379), 0.993 (alelo 372) y 0.222 respectivamente (tabla 3.7). Los resultados anteriores pueden ser visualizados de manera gráfica para cada locus en el anexo D.

En base a lo anterior, cabe destacar que el alelo 372 encontrado en el locus SSR18 es el de mayor prevalencia en toda la población mientras que el alelo 379 encontrado en el mismo locus es el de menor ocurrencia. Posteriormente se analizó el nivel de alelos únicos, es decir aquellos que se encuentran de manera exclusiva o singular en la población generándose valores desde 1,66 (población “e2”) hasta 3 (poblaciones “b1 y e1”). Para los alelos efectivos o fijados, es decir aquellos que pueden ser transmitidos a la siguiente generación, se encontró que la población “d1” es la de mayor potencialidad de transmisión con un valor de 2.480 (tabla 3.8).

Tabla 3.7: frecuencias alélicas totales de cada locus en el total de la población (valores de frecuencias en el rango de 0 a 1).

| Locus | Alelos | Total |
|---------------|-----------------|--------------|
| SSR18 | 372 | 0.993 |
| | 379 | 0.007 |
| SSR38 | 381 | 0.817 |
| | 384 | 0.183 |
| SSR45 | 140 | 0.261 |
| | 141 | 0.711 |
| | 144 | 0.014 |
| | 145 | 0.014 |
| SSR68 | 111 | 0.908 |
| | 115 | 0.049 |
| | 116 | 0.042 |
| SSR92 | 352 | 0.299 |
| | 353 | 0.126 |
| | 354 | 0.057 |
| | 355 | 0.069 |
| | 356 | 0.046 |
| | 357 | 0.046 |
| SSR92 | 359 | 0.080 |
| | 360 | 0.149 |
| | 361 | 0.046 |
| | 362 | 0.023 |
| | 363 | 0.034 |
| | 366 | 0.011 |
| | 367 | 0.011 |
| | | |
| SSR109 | 393 | 0.831 |
| | 396 | 0.148 |
| | 399 | 0.021 |
| | Min | 0.007 |
| | Max | 0.993 |
| | Promedio | 0.222 |

Tabla 3.8: proporción de alelos únicos y exclusivos en todas las poblaciones. Na: número de alelos diferentes o riqueza alélica, Ne: número de alelos efectivos, % E total: proporción de alelos exclusivos en función del total.

| Fuente | Población | Na | Ne | % E total |
|----------------------|-----------|--------|--------|-----------|
| Capa Superior | a1 | 2.833 | 1.687 | 8.74 |
| | b1 | 3 | 2.249 | 11.65 |
| | c1 | 3.167 | 2.324 | 12.04 |
| | d1 | 3.167 | 2.48 | 12.85 |
| | e1 | 3 | 2.288 | 11.85 |
| | a2 | 2.333 | 1.826 | 9.46 |
| Capa Inferior | b2 | 1.833 | 1.54 | 7.98 |
| | c2 | 2 | 1.596 | 8.27 |
| | d2 | 2.333 | 2.02 | 10.46 |
| | e2 | 1.667 | 1.294 | 6.70 |
| Suma total | | 25.333 | 19.304 | 100.00 |

En la tabla 3.8 cabe resaltar que la población “c1” fue la que presentó un mayor porcentaje (12,85%) de alelos exclusivos lo cual contrasta con poblaciones como la a1, a2, b2,c2 y e2 cuyos valores son inferiores al 10% del total.

3.3.3.1.2. Estimación de variabilidad genética

Uno de los primeros índices de variabilidad hallados fue el polimorfismo (P%) encontrándose que todas las poblaciones de la capa superior presentaron un porcentaje de 83,33%, mientras que las poblaciones de la capa inferior generaron un valor de 66,67% con excepción de la población “d2”.

Por otro lado, el índice de Shannon (I) obtuvo valores desde 0.616 a 0.702 para las poblaciones e1 y d1 respectivamente y desde 0.310 hasta 0.588 para las poblaciones e2 y d2 respectivamente.

En cuanto a heterocigosidad observada (Ho), se hallaron valores promedio de 0.299 para el total de las poblaciones, la heterocigosidad esperada fue un valor promedio de 0.334 (tabla 3.9).

Tabla 3.9: valores estimados de variación genética mediante el uso de marcadores microsatélites SSRs. I: Índice de información de Shannon; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada imparcial; P (%): porcentaje de loci polimórfico.

| Fuente | Población | I | Ho | He | P (%) |
|-----------------------|------------------|----------|-----------|-----------|--------------|
| Capa Superior | a1 | 0.598 | 0.327 | 0.347 | 83.33% |
| | b1 | 0.648 | 0.332 | 0.354 | 83.33% |
| | c1 | 0.699 | 0.362 | 0.384 | 83.33% |
| | d1 | 0.702 | 0.348 | 0.384 | 83.33% |
| | e1 | 0.616 | 0.301 | 0.330 | 83.33% |
| Capa Inferior | a2 | 0.426 | 0.208 | 0.235 | 66.67% |
| | b2 | 0.437 | 0.287 | 0.343 | 66.67% |
| | c2 | 0.465 | 0.283 | 0.336 | 66.67% |
| | d2 | 0.588 | 0.343 | 0.397 | 83.33% |
| | e2 | 0.310 | 0.197 | 0.230 | 66.67% |
| Promedio total | | 0.549 | 0.299 | 0.334 | 76.67% |

En la figura 3.13., se puede visualizar el comportamiento anteriormente relatado de las poblaciones en función de sus patrones alélicos y de estimadores de variabilidad como el Índice de Shannon y la heterocigosidad.

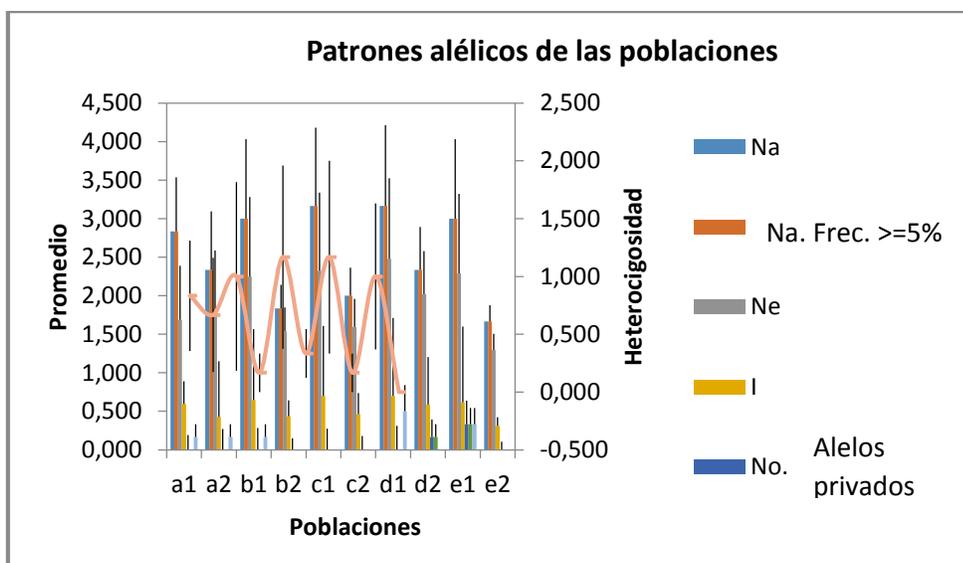


Figura 3.13: visualización gráfica del comportamiento de patrones alélicos y variabilidad de las poblaciones de *Fusarium proliferatum*.

3.3.3.2. Análisis interpoblacional

3.3.3.2.1. Identidad genética

Una vez evaluada la variedad o diversidad genética en el total poblacional, se prosiguió con un análisis de similitud, para lo cual se empleó la matriz de similitud genética en pares de Nei tal como se presenta en la tabla 3.10. Se puede apreciar que las distancias genéticas presentaron valores de ente 0.877 y 1. Donde 1 representó al máximo nivel de similitud y 0 fue el mínimo nivel de similitud entre dos individuos.

A medida que las poblaciones de las capas superiores (desde a1 hasta d1) e inferiores (desde a2 hasta d2) descienden, la similitud genética incrementa su valor, con excepción de las poblaciones correspondientes a las capas finales e1 y e2.

Tabla 3.10: matriz de distancias genéticas totales en pares de Nei (1973). Los colores amarillos y verdes representan el comportamiento de las capas superiores (orden descendente desde “a1” hasta “e1”) e inferiores (desde “a2” hasta “e2”) respectivamente.

| | a1 | a2 | b1 | b2 | c1 | c2 | d1 | d2 | e1 | e2 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| a1 | 1.000 | | | | | | | | | |
| a2 | 0.922 | 1.000 | | | | | | | | |
| b1 | 0.970 | 0.967 | 1.000 | | | | | | | |
| b2 | 0.896 | 0.903 | 0.917 | 1.000 | | | | | | |
| c1 | 0.972 | 0.932 | 0.985 | 0.896 | 1.000 | | | | | |
| c2 | 0.938 | 0.939 | 0.948 | 0.926 | 0.930 | 1.000 | | | | |
| d1 | 0.971 | 0.927 | 0.975 | 0.884 | 0.990 | 0.916 | 1.000 | | | |
| d2 | 0.914 | 0.948 | 0.951 | 0.952 | 0.919 | 0.962 | 0.904 | 1.000 | | |
| e1 | 0.968 | 0.955 | 0.980 | 0.879 | 0.971 | 0.915 | 0.975 | 0.915 | 1.000 | |
| e2 | 0.973 | 0.930 | 0.958 | 0.877 | 0.946 | 0.955 | 0.943 | 0.911 | 0.949 | 1.000 |
| | a1 | a2 | b1 | b2 | c1 | c2 | d1 | d2 | e1 | e2 |

3.3.3.2.2. Análisis de varianza molecular (AMOVA), coeficiente de varianza genética (PhiPT) y flujo génico (Nm)

Se desarrolló un análisis estadístico que permitió dar un soporte significativo de la varianza genética, para lo cual se realizó un análisis AMOVA, el cual permitió conocer que dentro de las poblaciones existe una varianza genética del 4% mientras que entre las poblaciones se encontró un 96%, tal como se puede ver en la figura 3.14 y en la tabla 3.11.

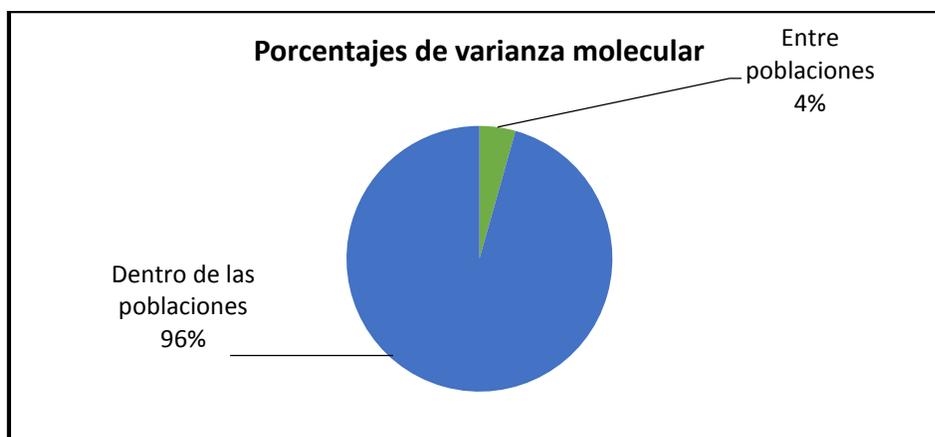


Figura 3.14: gráfico de pastel que esquematiza la distribución de varianza genética en el total poblacional de 143 aislados de *Fusarium proliferatum*.

Tabla 3.11: análisis de varianza molecular (AMOVA) para 143 aislados de *Fusarium proliferatum* provenientes de cebolla blanca (*Allium cepa*).

| Fuente o niveles jerárquicos | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Suma de cuadrados medios | Varianza (%) |
|------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|--------------|
| Entre Poblaciones | 9 | 15.385 | 1.709 | 4% |
| Dentro de la Población | 133 | 137.713 | 1.035 | 96% |
| Total | 142 | 153.098 | 2.744 | 100% |

A partir de los valores de varianza se procedió con el cálculo del estadístico (PhiPT), observándose un valor total de 0.044 con una significancia de $p < 0.003$ para todas las poblaciones. En cuanto al flujo génico total (Nm), se encontró un valor estimado de 7.3 (tabla 3.12).

Tabla 3.12: estimación de la varianza y flujo genético del total poblacional de 143 aislados de *Fusarium proliferatum* en base al valores estadísticos PhiPT y Nm respectivamente (significancia $p < 0.003$; 999 permutaciones).

| | PhiPT | P(rand >= dato) | Nm |
|------------------------|--------------|---------------------------|-----------|
| Población total | 0.044 | 0.003 | 7.3 |

En la tabla 3.13 se detallan los valores de PhiPT y Nm para cada población y las combinaciones determinadas entre estas.

PhiPT dentro de las poblacionales: cuando se evaluó el cambio de varianza dentro de las poblaciones de la capa superior en orden descendente desde la parte más externa a1 hasta la más interna e1 del bulbo de cebolla se generaron valores de cero. Un comportamiento similar se observó en las poblaciones de la capa inferior, a excepción de las combinaciones a2 con b2 y d2 con e2, con varianzas de 0.100 y 0.028 respectivamente.

PhiPT entre grupos poblacionales: cuando se comparan las varianzas entre las poblaciones de ambas capas (superior e inferior) se puede apreciar un incremento variable del estadístico PhiPT, encontrando el mayor valor (0.148) al comparar las capas poblaciones de las capas a1 con a2 de la cebolla.

Nm dentro de las poblacionales: se hallaron valores desde 4.758 (combinación d1 con e1) hasta 28.035 (combinación c1 con d1) para las poblaciones de la capa superior. En las capas inferiores se obtuvieron valores desde 3.069 (combinación a2 con b2) hasta 5.423 (combinación c2 con d2).

Nm entre grupos poblacionales: se determinaron valores desde 2.255 (combinación c2 con e1) hasta 16.363 (combinación a1 con e2).

Tabla 3.13: combinación entre poblaciones y valores de PhiPT y Nm.

| Combinación | Pop1 | Pop2 | PhiPT | P(rand >= data) | Nm |
|---|------|-------|-------|-----------------|--------|
| Dentro de las poblaciones de la capa superior | a1 | b1 | 0.000 | 0.460 | 19.043 |
| | b1 | c1 | 0.000 | 0.440 | 26.643 |
| | c1 | d1 | 0.000 | 0.450 | 28.035 |
| | d1 | e1 | 0.000 | 0.450 | 4.758 |
| Dentro de las poblaciones de la capa inferior | a2 | b2 | 0.100 | 0.020 | 3.069 |
| | b2 | c2 | 0.000 | 0.370 | 4.618 |
| | c2 | d2 | 0.000 | 0.350 | 5.423 |
| | d2 | e2 | 0.028 | 0.200 | 3.666 |
| Entre poblaciones de ambas capas | a1 | a2 | 0.148 | 0.010 | 3.123 |
| | a2 | b1 | 0.088 | 0.010 | 7.660 |
| | a1 | b2 | 0.122 | 0.020 | 5.787 |
| | b1 | b2 | 0.109 | 0.020 | 7.791 |
| | a1 | c1 | 0.000 | 0.350 | 11.202 |
| | a2 | c1 | 0.127 | 0.020 | 3.273 |
| | b2 | c1 | 0.091 | 0.020 | 6.614 |
| | a1 | c2 | 0.082 | 0.020 | 5.805 |
| | a2 | c2 | 0.034 | 0.180 | 3.187 |
| | b1 | c2 | 0.063 | 0.040 | 6.574 |
| | c1 | c2 | 0.065 | 0.020 | 9.874 |
| | a1 | d1 | 0.000 | 0.460 | 7.790 |
| | a2 | d1 | 0.134 | 0.010 | 2.346 |
| | b1 | d1 | 0.000 | 0.430 | 8.308 |
| | b2 | d1 | 0.101 | 0.040 | 3.131 |
| | c2 | d1 | 0.079 | 0.080 | 3.971 |
| | a1 | d2 | 0.076 | 0.050 | 5.679 |
| | a2 | d2 | 0.065 | 0.040 | 4.727 |
| | b1 | d2 | 0.039 | 0.100 | 9.983 |
| | b2 | d2 | 0.000 | 0.440 | 8.287 |
| | c1 | d2 | 0.056 | 0.050 | 4.525 |
| | d1 | d2 | 0.074 | 0.050 | 2.643 |
| | a1 | e1 | 0.000 | 0.410 | 9.585 |
| | a2 | e1 | 0.080 | 0.010 | 3.315 |
| | b1 | e1 | 0.000 | 0.370 | 8.446 |
| | b2 | e1 | 0.131 | 0.010 | 2.363 |
| | c1 | e1 | 0.000 | 0.480 | 4.685 |
| | c2 | e1 | 0.089 | 0.030 | 2.255 |
| | d2 | e1 | 0.084 | 0.020 | 2.618 |
| | a1 | e2 | 0.044 | 0.140 | 16.363 |
| | a2 | e2 | 0.013 | 0.280 | 3.424 |
| | b1 | e2 | 0.034 | 0.100 | 14.902 |
| b2 | e2 | 0.037 | 0.160 | 2.292 | |
| c1 | e2 | 0.033 | 0.190 | 11.557 | |
| c2 | e2 | 0.000 | 0.350 | 8.938 | |

3.3.3.2.3. Método sin ponderar de agrupamiento en pares con uso de media aritmética (UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y árbol de unión (NJ- Neighbor joining tree)

El dendograma UPGMA consenso que se muestra en la figura 3.15 fue construido a partir de las distancias genéticas de Nei y agrupó a los 143 aislados de *F. proliferatum* en dos grandes haplotipos **A** y **B**, con un Bootstrap de soporte de 100 y 50 respectivamente.

El haplotipo **A** está constituido por los aislados YM004, YM010 y YM011 (nivel de unión en el tramo de 0.20 a 0.25), por otro lado, el haplotipo **B** se encuentra dividido en dos subhaplotipos **B1** y **B2** (Bootstrap de soporte de 50 para ambos casos).

El subhaplotipo **B1** contiene a los aislados YM012, YM003, YM114, YM146, YM146, YM006, YM007, YM090, YM148, YM151, YM096, YM100, YM124, YM138 (nivel de unión en el tramo de 0.15 a 0.20).

El subhaplotipo **B2** a su vez contiene tres sub subhaplotipos así; **B2I** contiene a los aislados YM054, YM060; **B2II** contiene a YM013, YM014, YM005, YM117, YM125, YM134, YM102, YM003, YM135, YM002, YM101, YM015, YM063; finalmente **B2III** contiene a YM051, YM070, YM027, YM032, YM056, YM153, YM152, YM021, YM025, YM018, YM019, YM026, YM028, YM031, YM040, YM053, YM149, YM0001, YM009, YM008, YM023, YM022, YM033, YM038, YM059, YM042, YM080, YM047, YM092, YM115, YM086, YM048, YM084, YM020, YM121, YM071, YM074, YM081, YM082, YM094, YM097, YM098, YM104, YM139, YM140, YM141, YM142, YM030, YM035,

YM050, YM055, YM061, YM062, YM065, YM066, YM116, YM118, YM039, YM045, YM106, YM110, YM016, YM024, YM058, YM073, YM041, YM069, YM127, YM130, YM037, YM046, YM0123, YM126, YM036, YM052, YM120, YM122, YM034, YM067, YM078, YM083, YM111, YM113, YM143, YM144, YM029, YM049, YM088, YM089, YM091, YM093, YM095, YM099, YM068, YM077, YM131, YM132, YM017, YM043, YM057, YM072, YM085, YM087, YM133, YM137, YM107, YM108, YM075, YM109, YM128, YM129 (nivel de unión en el tramo de 0.15 a 0.20). Otro método de visualización de agrupamiento más detallado es el NJ, cuya imagen mostró un agrupamiento similar al relatado en el UPGMA (figura 3.16).

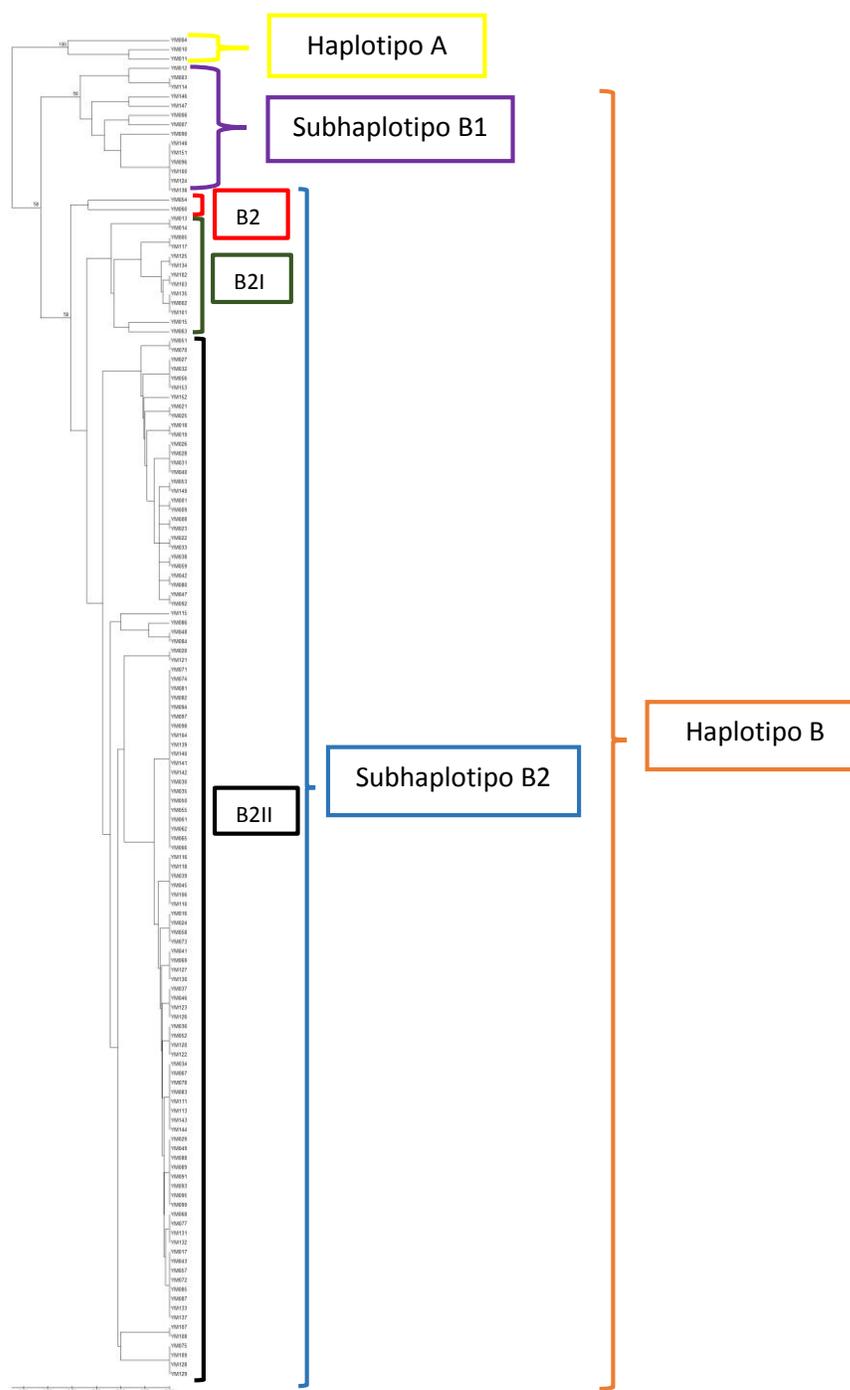


Figura 3.15: dendrograma UPGMA basado en las distancias de Nei entre poblaciones de *Fusarium proliferatum* (los corchetes de colores encierran a los haplotipos o ramas principales del árbol).

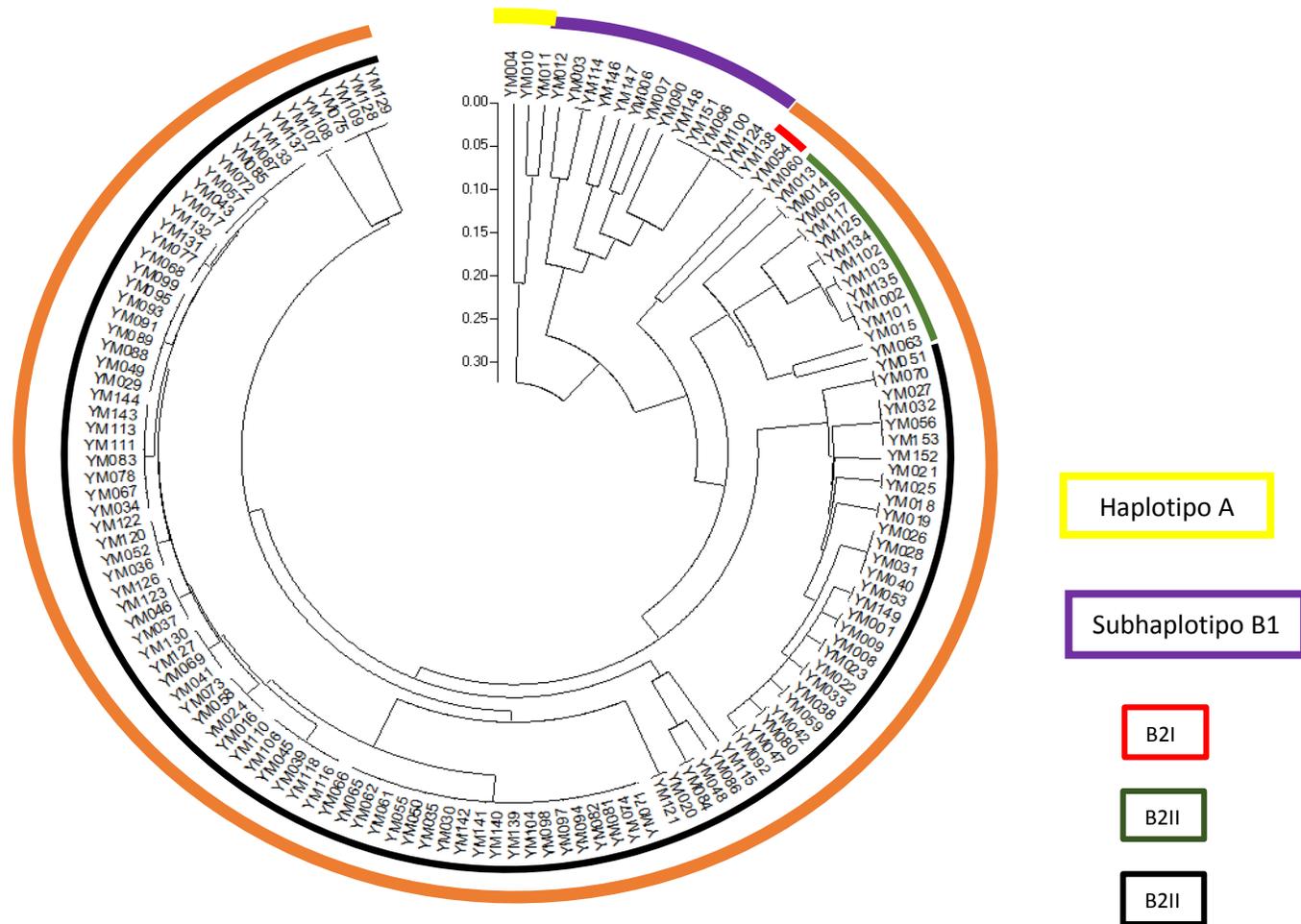


Figura 3.16: Neighbor-Joining entre poblaciones de *Fusarium proliferatum*; encerrado en círculos de colores amarillo, morado, rojo, verde y negro se delimitan a las muestras pertenecientes a los haplotipos.

3.3.3.2.3. Análisis de coordenadas principales (PCoA)

Mediante este estudio fue posible establecer una matriz Eigen (anexo E) de valores para cada aislado y determinar los tres mayores ejes de varianza tanto individual como acumuladas. Se encontraron porcentajes de varianza de 28,74%, 27,47% y 17,24% para la primera, segunda y tercera coordenada respectivamente, lo que sumó 73,45% correspondiente a la varianza total.

Se generó una representación visual de agrupamiento genético de las 143 aislados en las tres coordenadas principales (1vs2), (1vs3) y (2vs3), de entre ellos, la gráfica que presentó un claro agrupamiento de aislados fue la correspondiente a las coordenadas (2vs3). Se observaron cinco grandes agrupamientos con excepción del aislado de la capa b1 que se encuentra de manera independiente, es decir sin agrupación definida (figura 3.17).

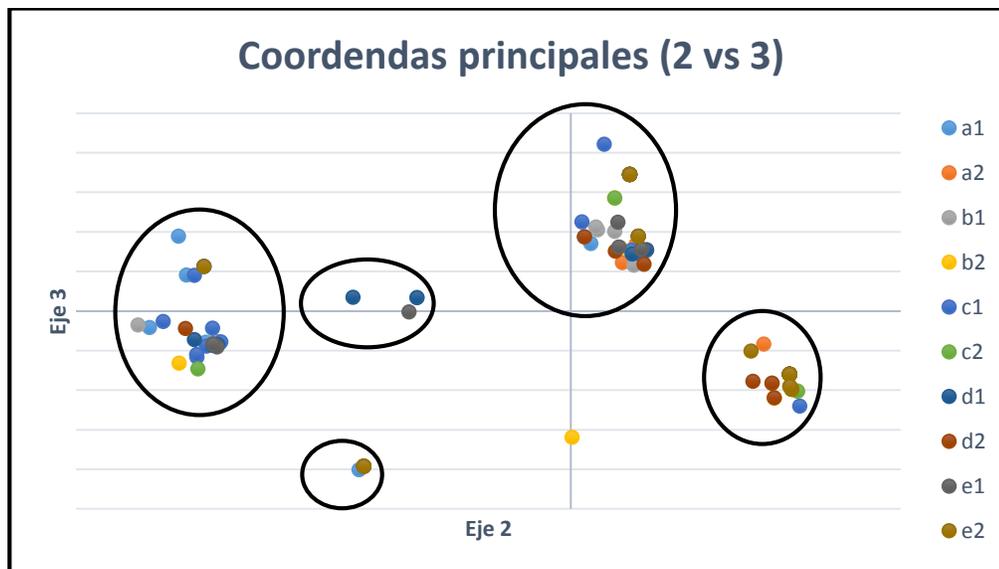


Figura 3.17: agrupamiento PCoA de 143 aislados de *Fusarium proliferatum*, en base a los ejes (2 vs 3). En círculos negros se resaltan los cinco grandes haplotipos, por otro lado encerrado en un círculo verde se encuentra el aislado (YM117) de la población “b1”.

3.3.3.2.4. Asignación genética mediante análisis Bayesiano

El análisis Bayesiano permitió determinar el número de ancestros (K) o agrupamientos más probables para los aislados analizados. Se realizaron estudios para valores de K entre 1 a 10, con un período de quema de 20 y soporte de 1000 repeticiones. Las pruebas realizadas mediante el método de Evanno (figura 3.18; tabla 3.2) mostraron que la máxima probabilidad estuvo en K=9 con un valor delta K de 4.854.

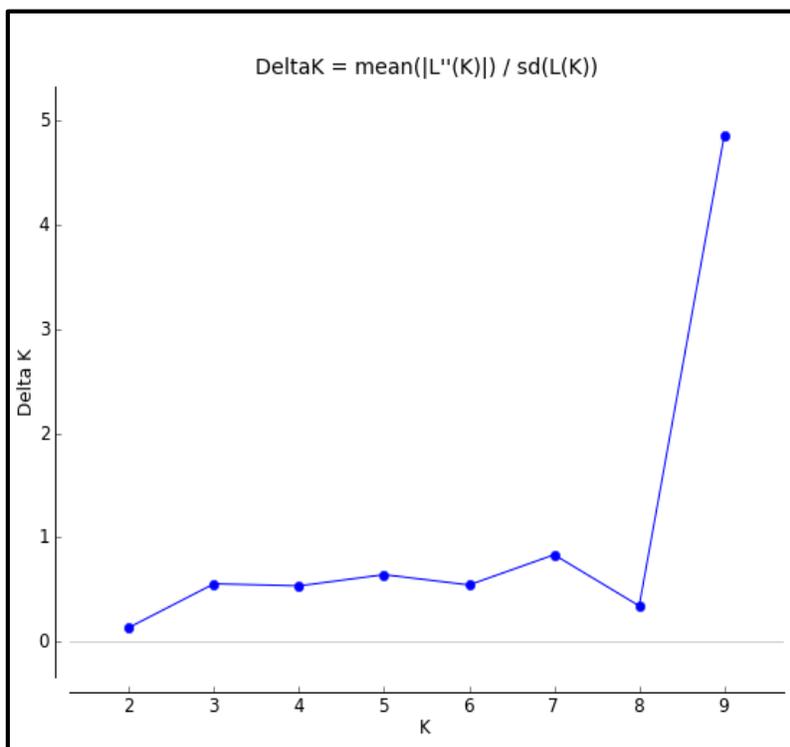


Figura 3.18: determinación del valor de K mediante método de Evanno; en el eje de las x se puede apreciar los valores de K (1 a 9) y en el eje de las y los valores de delta K.

Tabla 3.14: matriz de datos para construcción de método gráfico de análisis.

Resaltado en verde se denota el nivel más alto de delta K.

| K | Mean LnP(K) | Stdev LnP(K) | Ln'(K) | Ln''(K) | delta K |
|----|-------------|--------------|---------|---------|---------|
| 1 | -641.790 | 0.513 | — | — | — |
| 2 | -716.370 | 43.365 | -74.580 | 5.860 | 0.135 |
| 3 | -785.090 | 105.598 | -68.720 | 58.580 | 0.554 |
| 4 | -795.230 | 160.552 | -10.140 | 85.830 | 0.534 |
| 5 | -719.540 | 136.495 | 75.690 | 87.690 | 0.642 |
| 6 | -731.540 | 128.010 | -12.000 | 69.590 | 0.543 |
| 7 | -673.950 | 69.764 | 57.590 | 58.150 | 0.833 |
| 8 | -674.5100 | 87.679 | -0.560 | 30.030 | 0.342 |
| 9 | -645.0400 | 5.831 | 29.470 | 28.310 | 4.854 |
| 10 | -643.8800 | 3.996 | 1.160 | — | — |

Cada uno de los valores de K=9 quedan sustentados por el estadístico Fst, cuyos valores promedio se presenta a continuación (tabla 3.15).

Tabla 3.15: soporte estadístico Fst para cada uno de los K generados en el estudio con una significancia de $p < 0.001$ (STRUCTURE versión 2.3.4).

| K | Estadístico Fst |
|---|-----------------|
| 1 | 0.022 |
| 2 | 0.072 |
| 3 | 0.133 |
| 4 | 0.024 |
| 5 | 0.034 |
| 6 | 0.007 |
| 7 | 0.021 |
| 8 | 0.008 |
| 9 | 0.0135 |

En la figura 3.19 se ilustra la asignación de cada aislado y su distribución en $K=9$, cada color en el histograma de la figura corresponde a una fuente genética en común. Además, el nivel o la proporción de las barras de colores corresponden a la porción del genoma que cada individuo posee de un determinado ancestro (nueve en común).

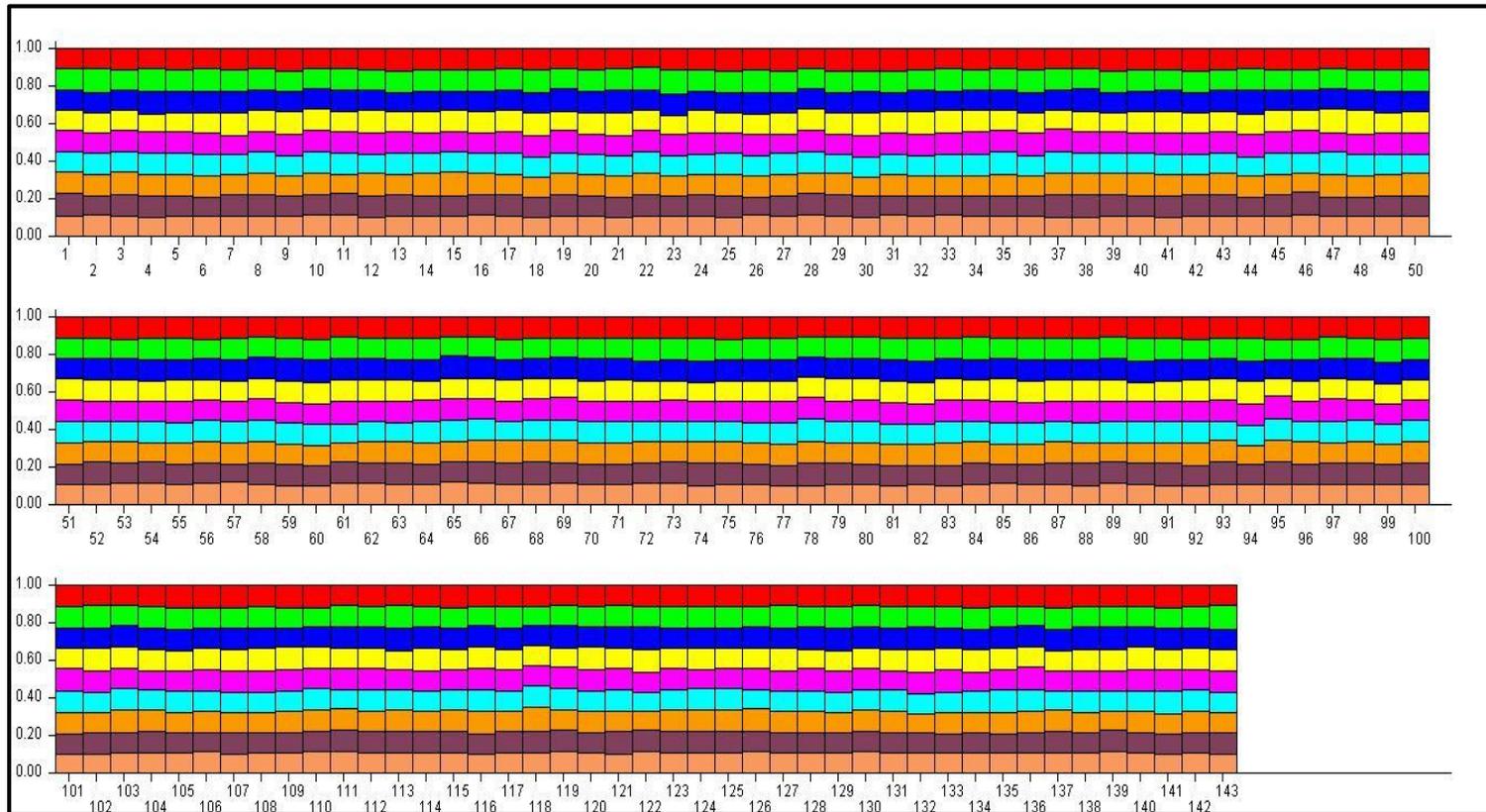


Figura 3.19: agrupamiento $K=9$ para 143 aislados de *Fusarium proliferatum* empleando método bayesiano en el Software Structure versión 2.3.4. Cada una de las barras de colores rojo, verde, azul, rosado, celeste, amarillo, morado y naranja corresponden a los ancestros en común que cada aislado contiene. Las líneas verticales negras representan la separación de cada aislado.

3.3.4. Detección de gen Fum8 asociado con la generación de fumonisinas

Mediante la detección y amplificación PCR del gen productor de micotoxina Fum8 con el par de primers –Antfum8F-Antfum8R, se encontró que de 143 aislados, 128 detectaron al gen. Las 15 muestras restantes no amplificaron. La visualización de productos de PCR fue realizada en geles de agarosa al 2% (anexo F), los productos poseen un tamaño de banda de alrededor de 600 pares de bases.

En base a lo anterior se encontró que los aislados pertenecientes a las poblaciones de las capas superiores de cebolla presentaron un menor nivel de detección (86%) del gen Fum8 en comparación con los de capas inferiores (94%), tal como se puede apreciar en la figura 3.20.

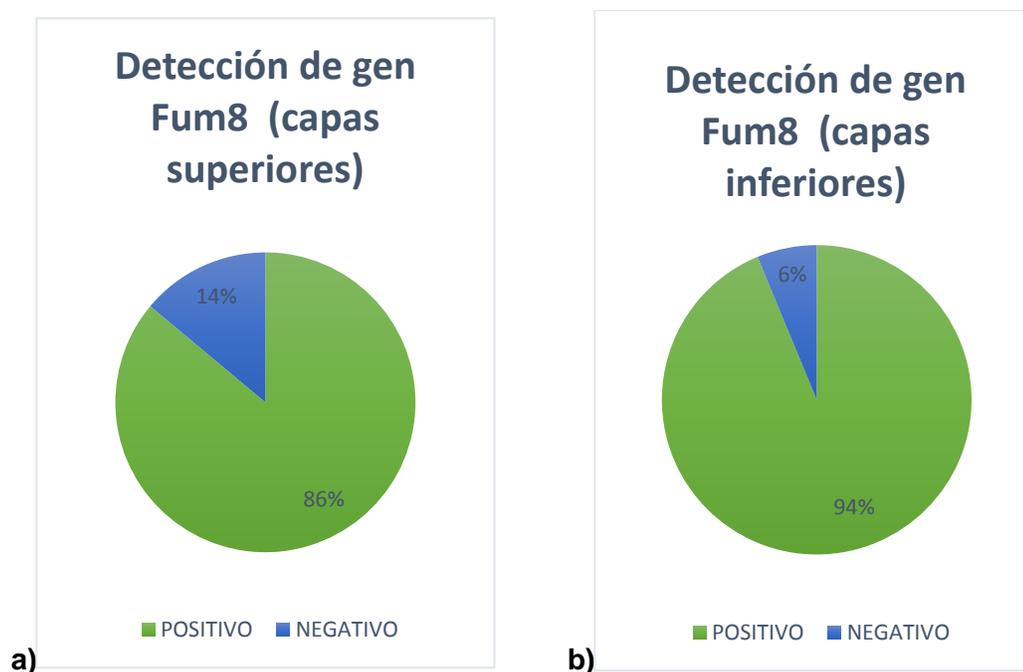


Figura 3.20: los gráficos de pastel (a y b) representando los niveles de detección del gen Fum8 mediante amplificación en PCR empleando el par de primers Antfum8; positivo: detectó el gen; negativo: gen no detectado.

En la tabla 3.16., se puede apreciar que los aislados que no poseen o no amplificaron el gen Fum8, pertenecen en su mayoría a las poblaciones recolectadas de la parte superior de cebollas.

Tabla 3.16: listado de aislados de *Fusarium proliferatum* que no amplificaron para el gen Fum8 (ID: nombre del aislado); (-): gen Fum8 no detectado.

| Capa | ID | Población | Gen Fum8 |
|----------|-------|-----------|----------|
| Superior | YM103 | a1 | - |
| | YM122 | a1 | - |
| | YM123 | b1 | - |
| | YM146 | b1 | - |
| | YM131 | c1 | - |
| | YM147 | c1 | - |
| | YM013 | d1 | - |
| | YM148 | d1 | - |
| | YM034 | e1 | - |
| | YM092 | e1 | - |
| Inferior | YM126 | e1 | - |
| | YM132 | a2 | - |
| | YM151 | b2 | - |
| | YM129 | c2 | - |
| | YM134 | e2 | - |

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

“GRUPO A”

4.1. Perfil Genético

La caracterización de las 12 muestras de cebolla con *Fusarium* comenzó con la detección del gen TEF1 α , encontrándose su presencia en todos los aislados. El rango de tamaño de banda apreciado en gel se aproxima a la medida de 700 pares de bases, detallada por Geiser *et al.*, 2004; Proctor *et al.*, 2010.

Debido a que esta región amplificada como copia única acapara más de la mitad del tamaño del amplicón generado por todas las especies conocidas de *Fusarium*, se deduce que es un buen indicador de identificación de este género, superando a regiones como la del ITS (espaciador de transcrito interno) (O'Donnell *et al.*, 2000), demostrando ser altamente informativo a nivel de especies de *Fusarium*, lo cual valida los resultados previamente encontrados.

La discriminación de *F. proliferatum* entre las especies del género fue realizada por amplificación PCR mediante los primers PRO1-PRO2 (Mule *et al.*, 2004; Rahjoo *et al.*, 2008) y ProliF-TEF1R (Amatulli *et al.* 2012), encontrándose que los aislados S1, S3, A1, A7 dieron positivo para ambos primers con excepción del aislado A9, el cual dio positivo únicamente para los primers PRO1-2.

La búsqueda en NCBI confirmó los resultados obtenidos por los primers PRO1-2, sugiriendo un falso positivo del aislado A9. En cuanto a los demás

aislados, fueron identificados como *F. oxysporum*, en contraste con la base de datos MLST la cual ubica a los aislados S3 y A7 como *F. pseudonygami*, a los S1 y A1 como *F. proliferatum*, y al restante de aislados como *F. oxysporum*.

De lo anterior se puede deducir que tanto los primers Prolif-TEF1R y PRO1-2 generaron falsos positivos lo cual sugiere que estos podrían no ser lo suficientemente específicos y que por tanto su efectividad es inaplicable en estrategias de identificación. Similares evidencias han sido reportadas por Rahjoo *et al.*, 2008 y Amatulli *et al.* 2012, en cuyos estudios se propone que eventos como estos pudieron haberse debido al alto nivel de variabilidad genética dentro de la especie.

Como se pudo apreciar, las bases de datos contradicen sus propios hallazgos por lo cual la decisión final de la identificación verdadera de un aislado fue realizada de acuerdo a dos soportes. El primero fue el propuesto por Geiser *et al.*, 2004, de que una interpretación a través de la base de datos MLST podría ser la más acertada puesto que este sitio acapara una mayor y más reciente información especializada únicamente en *Fusarium*. El segundo aspecto tomado en cuenta fue el agrupamiento mediante árbol filogenético consenso basado en las secuencias polimórficas del gen TEF1 α en el cual se encontraron tres genotipos A (aislados S3, DCR, D5, D3, A5, S2, D7, A9), B (S1, A1) y C (S3, A7), con valores Bootstrap superiores a 50%. Relacionando a estos grupos de aislados con las especies *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudonygami* respectivamente.

Cabe anotar que los resultados deducidos anteriormente para la discriminación entre especies de *Fusarium* han sido registrados en Lievens *et al.*, 2008, quien menciona la alta especificidad de este tipo de análisis (Webb *et*

al., 2012). El hallazgo fue apoyado posteriormente por homología de secuencias en MLST, mediante identificación y confirmación de las identidades de las secuencias analizadas previamente.

4.2. Detección de genes productores de micotoxina fumonisina y producción *in vitro*

Los genes Fum1, Fum8 fueron encontrados en un 33 y 83% de la población total respectivamente (individuos identificados como *F. proliferatum* y *F. pseudonygami*). Por otro lado, el gen Fum7 no fue detectado en ninguno de los aislados. La técnica empleada fue PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que según Stepien *et al.*, 2013, representa un método altamente sensible y de rápida actuación en casos de predicción de genes con capacidad biosintética.

De lo anterior, se deduce que las muestras poseen la capacidad de codificar las enzimas poliquétido sintetasa y oxoamina sintetasa en la ruta metabólica de fumonisinas. Posteriormente se evaluó la capacidad de los aislados de generar niveles de micotoxina mediante inducción *in vitro* y contaminación en maíz triturado y en una combinación de sorgo-avena (50/50).

La evaluación determinó que el aislado *F. pseudonygami* (A7) produjo los mayores niveles de micotoxina (>700 ppm) en maíz y (>350 ppm) en sorgo-avena, seguido de una concentración de 0.2 ppm en maíz, por parte de un aislado identificado como *F. proliferatum* (A1). El resto de muestras no presentaron niveles detectables de micotoxina, a pesar de encontrarse la existencia de al menos dos de los genes encargados de esta función.

De acuerdo con López *et al.*, 2007 y Jurado *et al.*, 2008, 2010 la presencia de los genes Fum1 y Fum8 no necesariamente se traduce o es acompañada de una producción de fumonisinas. Según Proctor *et al.*, 2006, la falta de una actividad toxigénica puede deberse a una mutación puntual que cambia el marco de lectura abierto o genera un codón de parada, pero se debe destacar que la tasa de mutación no siempre es elevada.

La superioridad de producción de micotoxina por *F. pseudonygami* y su falta por parte de algunos de los aislados podría quedar explicada por autores como Duncan *et al.*, 2010, quienes mencionan a factores como un pH ácido (4.5) como su posible causa. Por otro lado, De la Torre *et al.*, 2014 sugiere la existencia de genes fuera del locus FUM que pueden actuar como represores de expresión en condiciones determinadas; este es el caso del gen PAC1, regulador de la actividad metabólica y represor cuando las condiciones de pH han sido alteradas.

La diferencia en los niveles ha sido reportada previamente en varias especies de *Fusarium*, situación que ocurre a pesar de que las cepas crezcan bajo las mismas condiciones y con un sustrato en común, en este caso el maíz y sorgo-avena (Stepien *et al.*, 2010).

Finalmente, como se pudo apreciar se generó una mayor producción de fumonisinas por parte de los aislados que contaminaron maíz; probablemente se deba al hecho de que el maíz contiene un mayor contenido de fuente de carbono 73,9% (en 100 gramos de grano crudo) en comparación con la avena (65,2%) y el sorgo (73,7%) según Coello, 2010.

El contenido de carbono de la combinación de granos de sorgo y avena fue mayor que el del maíz, se notó que la avena fue la única en presentar sintomatología de *Fusarium* (crecimiento de texturas blanquecinas), en contraste con el sorgo, sugiriendo que este último no es un hospedero de predilección de *Fusarium*. Probablemente la fuente única de carbono fue la avena, con una producción menor de micotoxina en comparación con el maíz (Kim & Woloshuk, 2011).

“GRUPO B”

4.3. Perfil Genético

Los 143 aislados otorgados por parte del Laboratorio para Investigación y Control de Pestes del Instituto de Investigación Agrícola (ARO) de Israel, identificados como *F. proliferatum* (designación de identidad mediante caracterización morfológica y evaluación de cultivo por parte del proveedor de los aislados) tuvieron concentraciones variables de DNA, sugiriendo que el método de extracción de DNA no fue el apropiado o que las muestras sufrieron algún grado de degradación en el transporte. En base a esto, se decidió trabajar la caracterización molecular de identidad, con un rango de concentraciones de 0.7 a 25 ng/μL mediante normalización.

Hasta el momento gran parte de los estudios empleados para identificación de especies de *Fusarium* han basado sus resultados en la amplificación de un solo gen, usando regiones como el espaciador intergénico (IGS), B-tubulin, calmodulin, citocromo P450 reductasa y más recientemente el gen translation elongation factor (TEF1α) (Proctor *et al.*, 2010). De ahí, que en el presente estudio se haya empleado variantes del gen calmodulin (CAM), empleando los primers PRO1-PRO2 sugeridos por Mule *et al.*, 2004 y Rahjoo *et al.*, 2008., como posible soporte discriminatorio de especies de *F. proliferatum*.

De 143 aislados, 141 amplificaron y dos no lo hicieron. En primera instancia, se creería que las dos muestras pertenecen a otra especie de *Fusarium*, por lo cual se tomó la decisión de someter a los aislados a una amplificación del gen translation elongation factor- TEF1 α (Amatulli *et al.* 2012). Así se realizó una doble secuenciación y posterior búsqueda de coincidencias con las secuencias en las bases de datos NCBI y MLST, cuyos algoritmos identificaron una similitud del 100% con *F. proliferatum*.

Si bien el gen CAM reportó altos niveles de especificidad de detección en estudios similares (hasta de un 85%), los resultados de esta tesis sugieren que Quazi *et al.*, (2013) no toma en cuenta la alta variabilidad genética o presencia de hibridación que especies como *F. proliferatum* poseen. Por tanto, la detección basada en amplificación PCR de un solo gen pudiera no ser una herramienta suficiente de identificación.

Autores como O'Donnell *et al.*, 2007; Bayraktar *et al.*, 2010 y Kalia *et al.*, 2011, proponen que el empleo de microsatélites como SSRs (secuencias de repetición simple) puede superar la limitación anteriormente expuesta, ya que tienen la capacidad de detectar un alto nivel polimórfico en múltiples locus, lo cual genera una mejor perspectiva de la relación de cada miembro de una población y especie determinada, superando a los marcadores moleculares basados en la amplificación de una sola región del genoma. Tomando en consideración lo anterior, en el presente estudio se empleó seis pares de SSRs marcadores fluorescentes para la elaboración del perfil genético de los 143 aislados.

La amplificación de los SSRs con su respectiva validación mediante visualización en geles de agarosa dio como resultado bandas de tamaño molecular diverso (rango entre 100 a 500 pares de bases), indicador de la variabilidad de polimorfismos en las poblaciones. Posteriormente, al analizar los datos de la electroforesis capilar, se encontró la existencia de 27 alelos en el conjunto poblacional, de los cuales, el locus representado por el SSR92 es el que presentó un mayor nivel de multialelismo (13 alelos). Allendor & Luikart, 2007, recomiendan que la generación de gran diversidad alélica en un locus permite generar una disgregación de grupos filogenéticos variados sugiriendo que este locus es el más informativo.

Por otro lado, uno los alelos con mayor frecuencia en este locus, fue el alelo 372 con una prevalencia de 0.993 en todas las poblaciones. Cabe destacar que las frecuencias alélicas encontradas en las poblaciones permitieron la generación de parámetros de análisis intra e interpoblacionales.

4.3.1. Análisis intrapoblacional

Uno de los primeros datos estimados de variabilidad a analizar fue el polimorfismo, cuyo valor promedio fue de 83% para las poblaciones de las capas superiores de cebolla y de 70% para las poblaciones de las capas inferiores. Si bien este parámetro muestra una ligera variación entre los dos grupos poblacionales, hay que tomar en cuenta que el valor es preliminar y solo da una visión general de la diversidad genética, ya que tiende a ser muy variable puesto que al aumentar el número de muestras en una población, la probabilidad de encontrar un nuevo alelo también aumenta, generándose constantes cambios, por tanto no muestra un valor lo suficientemente consistente e informativo.

Otros valores de estimación, como el índice de Shannon así como Heterocigosidad observada y esperada, arrojaron valores promedio de 0.6526, 0.334, 0.3598 para las poblaciones superiores; mientras que para las poblaciones inferiores, se obtuvieron valores de 0.4452, 0.2636 y 0.3082 respectivamente.

Las poblaciones de capas superiores presentan una ligera superioridad de diversidad genética en comparación con las inferiores, pero al igual que en el caso del polimorfismo, no hay una diferencia representativa (significancia estadística) para establecer un criterio de separación entre los grupos. De acuerdo con autores como Frankham *et al.*, (2009), la falta de diferenciación que presentan estos parámetros puede deberse a una sensibilidad del tamaño muestral. Por otro lado, no se han reportado valores comparativos de los índices para la especie.

4.3.2. Análisis interpoblacional

En esta sección se analizó en primera instancia el nivel de similitud genética de Nei entre poblaciones encontrándose que todas las poblaciones presentaron identidades de entre un 90% hasta un 99%. El siguiente paso fue establecer un soporte estadístico de la variación genética.

Se empleó un análisis AMOVA, el cual dedujo que la varianza genética entre las poblaciones es de 4% y dentro de las población de 96%. Estos valores se encuentran apoyados por los estadísticos PhiPT y Nm, cuyos valores promedio del total poblacional fueron de 0.044 y 7.3 respectivamente, con una significancia de $p < 0.003$. Los valores indican un bajo nivel de variación (PhiPT < 0.1) entre poblaciones, parámetro apoyado por el valor de Nm, que al ser superior a 4, determina que el proceso evolutivo dominante es el flujo

genético. Los individuos de *F. proliferatum* podrían estar funcionando como un todo evolutivo, superando los efectos de la deriva génica (Eguiarte *et al.*, 2010).

Sin embargo, si se hace un análisis de varianza en las poblaciones de las capas superiores e inferiores y no como un todo poblacional, se puede encontrar que las poblaciones a1, b1, c1, d1, y e1 no poseen una variabilidad genética ($\Phi_{PT}=0$), mientras que en las poblaciones en las a2, b2, c2, d2 y e2 existe una ligera variación (promedio $\Phi_{PT}=0.032$). Este hecho podría sugerir que la varianza en la genética poblacional de las especies disminuye a medida que la infección avanza desde la parte inferior de las cebollas hasta las capas superiores. Se puede deducir, además, que la fuente de infección o inóculo, podría provenir del suelo, en donde existe una mayor diversidad poblacional con respecto a un inóculo aéreo, de acuerdo a Rodríguez *et al.*, 2001 y Jiménez, 2011.

El nivel de varianza mostró la probabilidad de encontrar algún nivel de agrupamiento para lo cual se elaboraron los dendogramas UPGMA y NJ, que coincidieron en la existencia de dos grandes ramificaciones o haplotipos (A, B). El haplotipo B, a su vez, se dividió en los subhaplotipos B1 y B2. Este último presentó tres subhaplotipos B2I, B2II y B2III. En total, se contabilizaron cinco genotipos o haplotipos en *F. proliferatum*.

Cabe destacar que los aislados de las poblaciones estudiadas se agruparon de manera independiente de la población o capa de cebolla a la que pertenecían. Por otro lado, en el análisis gráfico de PCoA (73,45% de la varianza total en las dimensiones reales), se encontró el mismo número de agrupamientos (con excepción del aislado YM117), lo que podría confirmar que

el número de genotipos encontrados previamente es el más cercano a la realidad.

Otro aspecto a analizar en cuanto a caracterización genética, es la determinación del número de fuentes genéticas que comparten los aislados. Se encontraron nueve ancestros ($K=9$) comunes en el acervo genético de las poblaciones. El número de haplotipos hallado en el análisis contrasta con lo obtenido previamente, quizás se deba a que el método de determinación de K empleado por Evanno *et al.*, 2005, no ofrece una perspectiva de la realidad poblacional investigada y, por tanto, se debería considerar la posibilidad de otras estrategias de selección.

4.4. Detección de gen Fum8 asociado con la generación de fumonisinas.

En el presente estudio, el gen Fum8 fue confirmado por PCR en 128 aislados de un total de 143. Su presencia en aislados de *F. proliferatum* podría ser un indicador de la expresión de la enzima oxoamina sintetasa (Stepien *et al.*, 2013), aminotransferasa que actúa en la segunda etapa metabólica de producción de fumonisinas (Waalwijk *et al.*, 2004), deduciéndose una producción potencial de la misma.

En los resultados se obtuvo una mayor represión del gen en aislados de las capas superiores de cebolla. Probablemente, mecanismos de regulación como factores ambientales, nutricionales y moleculares de señalización, hayan incidido en la inhibición o falta de detección del gen (De la Torre *et al.*, 2014). Por lo tanto, los factores de regulación deben ser estudiados más a fondo con el fin de identificar un mecanismo de acción para detener la producción de fumonisina, beneficiando al sector agrícola, de salud humana y animal.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- En el grupo A de aislados, mediante amplificación PCR de genes específicos, se identificaron a tres especies bien diferenciadas del género *Fusarium* como *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudonygami*. Por otro lado, en el grupo B, mediante el empleo de microsatélites SSRs, se identificaron a cinco genotipos o variantes de la especie *F. proliferatum*.

GRUPO A:

1. La discriminación de especies mediante los primers Ef1/Ef2 (gen TEF1 α) confirmó la presencia de individuos pertenecientes al género *Fusarium*. Mediante secuenciación doble del citado gen fue posible inferir tres especies predominantes (*F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudonygami*), confirmado por comparación de homología de secuencias en la base de datos MLST y agrupación mediante árbol filogenético con un soporte Bootstrap de 1000 repeticiones. Los primers discriminatorios para la especie *F. proliferatum* PRO1/2 (gen CAM) y Prolif/TEF1R (gen TEF1 α) presentaron contradicciones en la identidad de los individuos analizados.
 - 1.1. Se determinó que los primers PRO 1/2 y Prolif/TEF1R presentaron un bajo nivel de especificidad en cuanto a detección de especie. De ahí que la identidad de especie fuese conseguida a partir de las secuencias amplificadas del gen TEF1 α cuyo nivel de polimorfismo posibilita la discriminación entre especies.
 - 1.2. El árbol filogenético obtenido en base a las secuencias TEF1 α consenso permitió apreciar tres ramificaciones principales, lo cual es

un indicador de la diferencia genética en los aislados, hecho apoyado mediante soportes porcentuales Bootstrap de 100%, 53% y 96%, que relacionan a los individuos analizados con las secuencias de referencia externa correspondientes a *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. pseudonygami*. Se infiere, por tanto, que las identidades generadas en MLST concuerdan con los grupos filogenéticos hallados.

2. Los primers Fum1F1-Fum1R2 y Antfum8F-Antfum8R para detección de los genes Fum1 y Fum8, confirmaron su presencia de los mismos en todos los individuos analizados. Es un indicador de la potencial habilidad de producción metabólica de fumonisinas. En contraste, los primers Fum7eF-Fum8eR para detección del gen Fum7 no lo detectaron en los aislados. Se deduce la presencia de las enzimas poliquétido sintetasa y oxoamina sintetasa codificadas por los genes Fum1 y Fum8.
3. La especie genéticamente identificada como *F. pseudonygami* mostró los mayores niveles de fumonisina en maíz y en avena-sorgo (50/50) en comparación con la especie *F. proliferatum*, quizás la cantidad de carbono contenida en cada grano represente un parámetro limitante para la producción de metabolitos fúngicos.

GRUPO B

4. Se encontró que 141 individuos poseen el gen CAM (primers PRO1/2), hecho que los identifica como *F. proliferatum*. Los dos aislados restantes fueron confirmados como *F. proliferatum* al emplear secuencias amplificadas con el gen TEF1 α . Esto demuestra cierto inespecificidad de detección por parte de los marcadores.

5. El perfil genético de los 143 individuos identificados como *F. proliferatum* demostró la existencia de cinco genotipos agrupados en función de las matrices de distancia genética de Nei. Por otro lado, se encontró gran nivel de diferencia genética en las poblaciones, parámetro apoyado por valores estadísticos.
 - 5.1. Los seis SSRs aplicados en el estudio generaron un total de 27 alelos, siendo el loci SSR92 el de mayor diversidad multialélica (13 alelos). Por otro lado, el alelo 372 ubicado en el loci SSR18 fue el de mayor prevalencia en todas las poblaciones.
 - 5.2. Mediante el análisis AMOVA se determinó la existencia de una varianza genética de 96% dentro de las poblaciones y de 4% entre las mismas. Específicamente se encontró que la diferencia genética entre poblaciones varía al comparar las poblaciones de las capas superiores de la cebolla con las inferiores.
 - 5.3. Al analizar los dendogramas consenso UPGMA y NJ se identificó la existencia de cinco genotipos o variantes de la especie *F. proliferatum*, agrupados en los dendogramas en base a las distancias genéticas de Nei existente entre estas.
 - 5.4. En el análisis de coordenadas principales PCoA, se visualizaron cinco agrupamientos en los ejes de varianza 2 vs 3.

- 5.5. La asignación genética mediante análisis bayesiano determinó la existencia de nueve ancestros comunes en todos los individuos analizados.

6. EL gen Fum8 codificante de la enzima oxoamina sintetasa fue hallado en la mayoría de individuos (128). Por otro lado, a partir de los 15 aislados restantes se pudo inferir que las poblaciones que presentaron un mayor nivel de inhibición o detección del gen fueron las de la capa superior de la cebolla.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Comparar métodos de extracción de DNA y evaluar la eficiencia de los mismos.
- Establecer o diseñar nuevos primers de discriminación entre especies, en base a otros genes característicos de este género de hongo.
- Se sugiere analizar aislados de *F. proliferatum* de otras regiones geográficas aplicando los mismos microsatélites SSR del presente estudio, con el fin de evaluar, validar y comparar los parámetros genéticos de variabilidad encontrados.
- Con el fin de reducir aún más el coste del análisis de fragmentos aplicados a microsatélites, sería óptimo estandarizar la lectura de más loci por muestra estudiada.
- Considerar el diseño de nuevos microsatélites que generen un mayor número de alelos, con lo cual se elevará el nivel de diferenciación entre poblaciones de interés.
- Los genotipos identificados en el presente estudio deberían ser estudiados en términos de identificación de genes de resistencia con el fin de desarrollar métodos de erradicación fúngica menos invasivos.
- Analizar a mayor profundidad factores ambientales y epigenéticos que podrían influenciar la inhibición o expresión de los genes productores de micotoxina, con el fin de generar mecanismos de acción para control de los mismos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology (Fifth edition.). London: Elsevier Academic Press.

Aguirre, X. (2004). Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: aportaciones para el manejo y la conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 73 pp.

Allendorf, F. & Luikart, G. (2007). Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Australia.

Amatulli, M., Spadaro, D., Lodovica, M. & Garibaldi, A. (2012). Conventional and real-time PCR for the identification of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum* from diseased rice tissues and seeds. Springer- Eur J Plant Pathol. 134:401–408.

Bayraktar, H., Türkkán, M., & Dolar, F. (2010). Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Turkey based on vegetative compatibility and rDNA RFLP analysis. Journal of Phytopathology.158: 691-697.

Carter, L., Leslie, J. & Webster, R. (2008). Population Structure of *Fusarium fujikuroi* from California Rice and Water Grass. The American Phytopathological Society (Population Biology).

Carter, L., Leslie, L. & Webster, R. (2008). Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and Water Grass. *Phytopathology*. 9: 992–998.

Caujapé, J. & Baccarani, M. (2005). Transformer-3: A program for analysis of molecular population genetic data. EXEGEN software, Jardín Botánico Canario “Viera & Clavijo”. Gran Canaria, España.

Coello, G. (2010). Elaboración y valoración Nutricional de tres productos alternativos a base de cebada para escolares del proyecto Runa Kawsay. Escuela Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Químicas.

De la Torre, M., Sánchez, D., Galeana, E. & Plasencia, J. (2014). Fumonisin – síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 17(1):77-91.

Dieffenbach, C. & Dveksler, G. (2003). PCR Primer: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Duncan, E. & Howard, R. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 23: 6–16.

Eckert, K. & Hile, S. (2009). Every microsatellite is different: intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Mol Carcinog*. 48: 379: 388.

Eguiarte, L., Aguirre, E., Scheinvar, E., Gonzalez, A. & Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas, versión 4. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. (2007). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Universidad Nacional Autónoma de México - Comisión Nacional para el Conocimiento Instituto Nacional de Ecología y uso de la Biodiversidad.

Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611–2620.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2012).

Frankham, R., Ballou, J. & Briscoe, D. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. United Kingdom. 617.

Frankham, R., Ballou, J., & Briscoe, D. (2009). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Gaikwad, K., Shobha, U., & Kakulte, V. (2014). Management of fungal diseases of onion (*Allium cepa* L.) by using plant extract. International Journal of Life Science & Pharma Research. Life Science. 4 (2): 28-30.

Galván, G., Koning-Boucoiran, C., Koopman, W., Burger-Meijer, K., González, P., Waalwijk, C., Kik, C., & Scholten, O. (2008). Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. European Journal of Plant Pathology. 121:499-512.

Ganassi, S., Moretti, A., Stornelli, C., Fratello, B., Bonvincini, A., Logrieco, A., & Sabatini, M. (2000). Effect of *Fusarium*, *Paecilomyces* and *Trichoderma* formulations against aphid *Schizaphis graminum*. Mycopathologia. 151:131-138.

Geiser, M., Aoki, T., Bacon, W., Baker, E. & Bhattacharyya, K. (2013). One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. Phytopathology. 103:8-400.

Geiser, M., Jiménez, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., Zhang, N., Kuldau, G. & O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur J Plant Pathol. 110: 473–479.

González, E. (2008). Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex perado* ssp. *Lopezilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria - Departamento de Biología.

Gonzalez, E. (2011). Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Departamento de Biología.

Griffiths, P. & Gray, R. (2005). Three Ways to Misunderstand Developmental Systems Theory. *Biology & Philosophy*. 20:417-425.

Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. (2004). *Molecular Cell Biology*, 5th edition, New York, NY, W.H. Freeman and Company.

Hedrick, P. (2000). *Genetic of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, USA.

Hedrick, P. (2000). *Genetics of Populations 2nd Ed*, Boston: Jones and Bartlett.

Holsinger, E. (2010). *Lecture Notes in Population Genetics*. Department of Ecology & Evolutionary Biology, University of Connecticut Storrs, CT 06269-3043.

Jeney, A., Beki, F., Keszthelyi, A., Leslie, J. & Hornok, L. (2007). Cloning and characterization of *Fpmtrl*, an amino acid transporter gene of *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*). *J Basic Microbiology*. 47:16-24.

Jiménez, D. (2011). Estudio de la interacción de *Fusarium* sp. con cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas. Instituto de Agricultura Sostenible. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Córdoba.

Jiménez, P. & Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. 2: 237-248.

Jurado, M., Marín, P., Magan, N., & González, M. (2008). Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. Appl Environ Microbiol. 74:2032–2036.

Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., & González, M. (2010). Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. Food Microbiol. 27:50–57.

Kalia, R., Rai, M., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. (2011). Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. Euphytica. 177 (3):309-334.

Kapetanov, M., Potkonjak, D., Stojanov, I., Milica, Živkov–Baloš. & M., Jakšić, S. (2013). Clinical and pathomorphological diagnostics of mycotoxicosis in parent

poultry flock caused by t-2 trychotecene. Journal. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad.124:137-143.

Kasson, M., O'Donnell, K. Rooney, A., Sink, S., Ploetz, R., Ploetz, J., Konkol, J., Carrillo, D., Freeman, S., Mendel, Z., Smith, J., Black, A. (2013). An inordinate fondness for *Fusarium*: Phylogenetic diversity of fusaria cultivated by ambrosia beetles in the genus *Euwallacea* on avocado and other plant hosts. Fungal Genetics and Biology. 56:147–157.

Kim, H. & Woloshuk, C. (2011). Functional characterization of *fst1* in *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. Mol Plant Microbe Interact. 24(1): 18-24.

Kotowicz, N., Frac, M. & Lipiec, J. (2014). The Importance of *Fusarium* Fungi in Wheat Cultivation – Pathogenicity and Mycotoxins Production: A Review. Journal of Animal & Plant Sciences. 21 (2): 3326-3343.

Lager, S. (2011). Survey of *Fusarium* species on yellow onion (*Allium cepa*) on Öland. Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Uppsala Swedish University of Agricultural Science, SLU. Växtskyddcentralen Kalmar, Jordbruksverket.

Leslie, J. & Summerell, B. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual USA (Fifth edition): Blackwell Publishing, Ames, IA.

Lievens, B., Rep, M., & Thomma, B. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*. 64: 781-788.

Life Technologies – Applied Biosystems. (2012). DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. Publication Number 4474504 Rev. A.

López, E., Vázquez, C., Jiménez, M., & González, M. (2007). Real Time RT-PCR assay to quantify the expression of FUM1 and FUM19 genes from the fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *J Microbiol Methods*. 68:312:317.

Lori, G., Wolcan, S. & Larran, S. (2008). Fusarium yellows of celery caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *apii* in Argentina. *Journal of Plant Pathology*. 90:173-178.

Ma, L., Geiser, M., Proctor, R., Rooney, A., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D., Manners, J. & Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*. 67:399–416.

Mankevicien, A., ButkutW,B., Gaurilcikien,I., & Dabkevicius, Z.(2011). Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control*. 22: 970-976.

Meirmans, P. (2006). Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 60(11): 2399-2402.

Mulè, G., Susca, A., Stea, G. & Moretti, A. (2004). Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 230:235–240.

Nassiry, M., Javanmard, A., & Tohidi, R. (2009). Application of Statistical Procedures for Analysis of Genetic Diversity in Domestic Animal Populations. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences.* 4:136-141.

O'Donnell, K., Rooney, A., Proctor, R., Brown, D., McCormick, S., Ward, T., Frandsen, R., Lyse, E., Rehner, S., Aoki, T., Robert, V., Crous, P., Groenewald, J, Kang, S., & Geiser, D. (2013). Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology.* 52: 20–31.

O'Donnell, K., Sutton, D., Rinaldi, M., Sarver, B., & Balajee, S. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying *Fusaria* from human and animal infections. *J. Clin. Microbiology.* 48:3708–18.

O'Donnell, K., Nirenberg, H., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience.* 41:61-78.

O'Donnell, K., Sarver, B., Brandt, M., Chang, C., Noble-Wang, J., Park, B., & Sutton, D. (2007). Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including from the multistate contact

lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiology*. 45:2235-2248.

Pacin, M., González, H., Etcheverry M, Resnik, S., Vivas, L., & Espín, S. (2003). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. Kluwer Academic Publishers. *Mycopathologia*. 156: 87-92.

Park, B., Park, J., Cheong, K., Choi, J., Jung, K., Kim, D., Lee, Y., Ward, T., O'Donnell, K., Geiser, K., & Kang S. (2011). Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. Published by Oxford University Press (*Nucleic Acids Research*). 39:640–D646.

Peakall, R. (2009). *Molecular Marker Analysis of Plant Population Structure and Process* at Copenhagen University, Denmark.

Peakall, R., & Smouse, P. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.

Pearse, D. & Crandall, K. (2004). Beyond FST: analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*. 5: 585–602.

Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics Society of America*. 155: 945: 959.

Proctor, R., Desjardins, A., & Moretti, A. (2010). Biological and Chemical Complexity of *Fusarium proliferatum*. The Role of Plant Pathology in Food Safety and Food Security, Plant Pathology in the 21st Century. Volume 3. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science & Business Media. 97-111.

Proctor, R., Plattner, R., Desjardins, A., Busman, M. & Butchko, R. (2006). Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. J Agric Food Chem. 54:2424–2430.

Quazi, S., Meon, S., Jaafar, H., & Ahmad, Z. (2013). Characterization of *Fusarium proliferatum* through Species Specific Primers and its Virulence on Rice Seeds. Int. J. Agric. Biol. 15: 649–656.

Rabiei-Motlagh, E., Falahati-Rastegar, M., Rouhani, H., Jafarpour, B., & Jahanbakhsh, V. (2010). Root Diseases of Onion caused by some Root Colonizing Fungi Northeast of Iran. American-Eurasian J. Agricultural & Environmental, Society. 7 (4): 484-494, 2010.

Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, A., Mirzadi, A., Okhovvat, S., Bihamta, M., Razzaghian, M., & Klemsdal, S. (2012). Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. Journal of Plant Pathology. 90 (3), 463-468.

Ramana, M., Balakrishna, K., Chandra, H., Murali, S., & Batra, H. (2011). Multiplex PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in rice and finger millet collected from southern India. *J Sci Food Agric (Society of Chemical Industry)*. 91: 1666–1673.

Rodríguez, M., Torres, T., Tello, J., Blanco, A., & Núñez, E. (2001). Caracterización de las poblaciones de *Fusarium* Link de suelos de dehesas de Badajoz. *Bol. San. Veg. Plagas*. 27: 433-437.

Rossetto, M., Kooyman, R., Sherwin, W., & Jones, R. (2008). Dispersal limitation, rather than bottlenecks on habitat specificity, can restrict the distribution of rare and endangered rainforest trees. *American Journal of Botany*. 95: 321-329.

Salemi, M., & Vandamme, A. (2003). *The Phylogenetic Handbook: A practical approach to DNA and protein phylogeny*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Salvalaggio, A. (2013). First report of *Fusarium proliferatum* causing rot on Garlic and Onion in Argentina. *The American Phytopathological Society*. 97 (4): 556.

Schwartz, F. (2011). *Soil-Borne Diseases of Onion*. Colorado State University-bioagricultural sciences and pest management. Production and IPM, Bulletin 547A.

Sherwin, W., Jobot, F., Rush, R., & Rossetto, M. (2006). Measurement of biological information with applications from genes to landscapes. *Molecular Ecology*. 15: 2857-2869.

Somasundaram, S., & Kalaiselvam, M. (2011). Molecular tools for assessing genetic diversity. International Training Course on Mangroves and Biodiversity, Annamalai University, India. 82–91.

Sosa, P., Batista, F., González, M., & Bouza, N. (2002). La Conservación Genética de las Especies Amenazadas. En: Bañares, Á. (ed.). *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de diagnóstico del estado de conservación*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. España. 133-160.

Stepien, L., Koczyk, G., & Waskiewicz, A. (2011). FUM cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. *British Mycological Society. Fungal Biology*. 115: 112-123.

Takayuki, A., O'Donnell, K., Geiser, D. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *J Gen Plant Pathol*. 80:189–201.

Toshiaki, O., Iori, I., Fumio, N., Hitoshi, K., & Takashi, T. (2004). *REN1* Is Required for Development of Microconidia and Macroconidia, but Not of Chlamydoconidia, in the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics Society of America*. 166: 113:124.

Tsavkelova, E., Bomke, C., Netrusov, A., Weiner, J., & Tudzynski, B. (2008). Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. *Fungal Genetic Biology*. 45:1393-1403.

U.S. Food and Drug Administration- Department of Health and Human Services. (2009).

Verticillioides during colonization of maize kernels. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24(1):18-24.

Waalwijk, C., Van der Lee, T., De Vries, I., Hesselink, T., Arts, J., & Kema, G. (2004). Synteny in toxigenic *Fusarium* species: the fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *Eur J Plant Pathol*. 110:533–544.

Wan, Q., Wu, H., Fujihara, T. & Fang, S. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue. *Electrophoresis*. 25:2165–2176.

Webb, K., Covey, P., & Hanson, L. (2012). Pathogenic and phylogenetic analysis of *Fusarium oxysporum* from sugarbeet in Michigan and Minnesota. *Journal of Sugar Beet Research*. 49: 38-56.

Webster, J. & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi* (Third Edition). Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. & Kahl, G. (2005). DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods and Applications, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton. 106-107.

ANEXOS

ANEXO A: método de extracción de DNA aplicado a las muestras del grupo A.

“DNA fingerprinting in Plants and Fungi”

PRIMERA PARTE

- Pesar de 50 a 100 mg de tejido y añadir 1 mL de buffer de extracción.
- Colocar los tubos de extracción en un homogenizador por tres ocasiones cada repetición de 20 s.
- Anadir 0.5 mL de cloroformo: 150 amilalcohol 24:1, invertir los tubos dos veces.
- Incubar los tubos a 58°C por 30 min en un mezclador térmico, cada 10 min invertir los tubos suavemente. (Nota: la temperatura no puede exceder los 61°C).
- Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente (alrededor de 5 min), luego centrifugar a 14000 rpm por 20 min a 4°C.
- Transferir el sobrenadante sin tocar la interface, en un nuevo tubo esterilizado.
- Anadir 1 o 1.5 volúmenes de isopropanol. Invertir los tubos y colocar dentro del refrigerador por 1 h (toda la noche).

SEGUNDA PARTE

- Luego centrifugar los tubos por 30 min a 14000 rpm. Si se visualiza el pellet o isopropanol, sacarlo inmediatamente de los tubos, si no, centrifugar otra vez hasta observarlo.
- Retirar el sobrenadante y lavar el pellet con 100 uL de etanol al 70%
- Centrifugar por 10 min a 14000 rpm, retirar el etanol y colocar los tubos boca abajo.
- Dejar secar y añadir de 50 a 100 uL de buffer TE o un buffer de extracción de kit.

ANEXO B: secuencias de aislados pertenecientes al Grupo A de muestras de *Fusarium* aisladas a partir de cebolla blanca (*Allium cepa*).

>Fusarium1

GGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTGGACGTTGAGCTTATCTGCCAT
CGTGATCCTGACCAAGATCTGGCGGGGTACATCTTGAAGACAACATGCTGACATCGCTTCACAGAC
CGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTGAGAAGGTTAG
TCACTTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTCTGCCACCGATTTCACTTGCGATTGAAACGTGCCTGCTA
CCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGGGATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCAC
TCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTCTGTCCACAACCTCAATGAGCGCATTGTCACGTGTCAA
GCAGCGACTAACCATTGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTG
GGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTC
GAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATACCTCATCCTACTTCCTCATA
CTAACACATCATTGAGACGCTCCCGGTACCGTGATTCA

>Fusarium2

CGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCAT
CGTCAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGAC
CGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTGAGAAGGTTAGT
CACTTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTTTGCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTAC
CCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGAATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACT
TGAGCGACGGGAGCGTTTGCCTCTTAACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTCGTCACGTGTCA
AGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTG
GGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTC
GAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCTCTTCG
TACTAACATCACTCAGACGCTCCC

>Fusarium3

CGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTGGACGATGAGCTTATCTGCCA
TCGTGATCCTGACCAAGATCTGGCGGGGTACATCTTGAAGACAATATGCTGACATCGCTTCACAGA
CCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTGAGAAGGTTA
GTCACCTTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTCTGCCACCGATTTCACTTGCGATTGAAACGTGCCTGCT
ACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGGGATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCA
CTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTCTGTCCACAACCTCAATGAGCGCATTGTCACGTGTCA
AGCAGCGACTAACCATTGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCT
GGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTC
CGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATACTCCATCCTACTTCCTCAT
ACTAACATATCATTGAGACGCTCCC

>Fusarium4

CGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTGGACGTTGAGCTTATCTGCCA
TCGTGATCCTGACCAAGATCTGGCGGGGTACATCTTGAAGACAACATGCTGACATCGCTTCACAGA
CCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTGAGAAGGTTA
GTCACCTTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTCTGCCACCGATTTCACTTGCGATTGAAACGTGCCTGCT
ACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGGGATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCA
CTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTCTGTCCACAACCTCAATGAGCGCATTGTCACGTGTCA
AGCAGCGACTAACCATTGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCT
GGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTC

CGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATACCTCATCCTACTTCCTCAT
ACTAACACATCATTAGACGCTCCC

>Fusarium5

NGNTNCNGACNNCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCATCGTCAATCCCGACCA
AGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGACCGGTCACTTGATCTAC
CAGTGCAGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCTTCGATC
GCGCGTCTTTGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAA
AAATTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGC
GTTTGGCCTCTTAACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTCGTACGTGTCAAGCAGTCACTAACCA
TTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCT
CAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTGAGACTCCTCGCTA
CTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCTCTTCGTAACATCACTCA
GACGCTCCC

>Fusarium6

TCGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCA
TCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGA
CCGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTGAGAAGGTTA
GTCACCTTTCCCTTCGATCGCGCGTCTTTGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCT
ACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCA
CTTGAGCGACGGGAGCGTTTGGCCTCTTAACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTCGTACGTGT
CAAGCAGTCACTAACCAATCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCC
TGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGT
TCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGC-
TTCATTCTACTTCTCTTCGTAAC

>Fusarium7

TCGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTGGACGATGAGCTTATCTGCC
ATCGTGATCCTGACCAAGATCTGGCGGGGTACATCTTGAAGACAATATGCTGACATCGCTTCACAG
ACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTGAGAAGGTT
AGTCACTTTCCCTTCGATCGCGCGTCTCTGCCACCGATTTCACTTGCGATTGAAACGTGCCTGC
TACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTGCGATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCA
CTCGAGCGATGGGCGGTTTTTGGCCTTCTGTCCACAACCTCAATGAGCGCATTGTCACGTGTCA
AGCAGCGACTAACCAATCGACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCT
GGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGT
CGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATACTCCATCCTACTTCCTCAT
ACTAACATATCATTAGACGCTCCC

>Fusarium8

CGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCAT
CGTCAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGAC
CGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTGAGAAGGTTAGT
CACTTTCCCTTCGATCGCGCGTCTTTGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTAC
CCCGCTCGAGACCAAAAATTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACT
TGAGCGACGGGAGCGTTTGGCCTCTTAACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTCGTACGTGTCA
AGCAGTCACTAACCAATCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTG
GGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTC

GAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCTCTTCG
TACTAACATCACTCAGACGCTCCC

>Fusarium9

TCGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCA
TCGTC AATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGA
CCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTA
GTCAC TTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTTTGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCT
ACCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCA
CTTGAGCGACGGGAGCGTTTGCCCTCTTAACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGT
CAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCC
TGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGT
TCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCTCTT
CGTACTAACATCACTCAGACGCTCCC

>Fusarium10

CCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCATCGT
CAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGACCGG
TCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTCAC
TTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTTTGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCC
GCTCGAGACCAAAAATTTTGAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGA
GCGACGGGAGCGTTTGCCCTCTTAACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTCAAGC
AGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGT
TCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTGAG
ACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCTCTTCGACT
AACATCACTCAGACGCTCCC

>Fusarium11

CGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCAT
CGTCAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGAC
CGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGT
CACTTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTTTGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTAC
CCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACT
TGAGCGACGGGAGCGTTTGCCCTCTTAACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTCA
AGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTG
GGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTG
GAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCTCTTCG
TACTAACATCACTCAGACGCTCCC

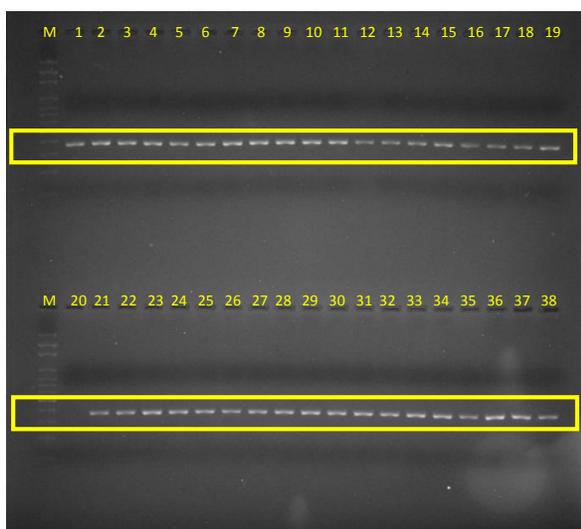
>Fusarium12

CGGCCACGTGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCAT
CGTCAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGAC
CGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGT
CACTTTCCCTTCGATCGCGCGTCCTTTGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTAC
CCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACT
TGAGCGACGGGAGCGTTTGCCCTCTTAACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTCGTCACGTGTCA
AGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTG
GGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTG
GAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTCATTCTACTTCTCTTCG
TACTAACATCACTCAGACGCTCCC

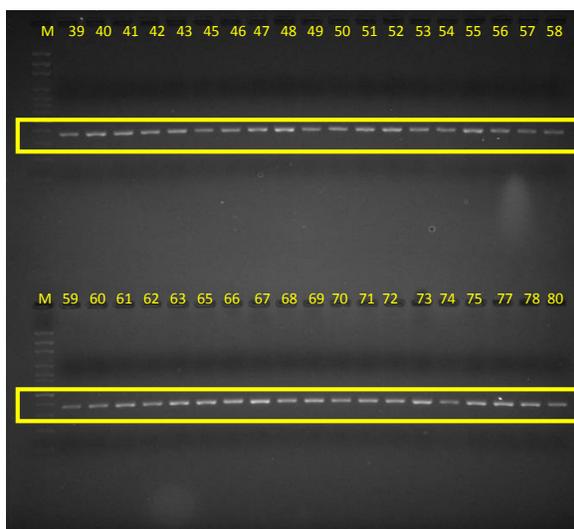
ANEXO C: validación de los microsatélites fluorescentes SSR 18, 38, 45, 68, 92, 109 en *Fusarium proliferatum* mediante amplificación PCR y lectura en gel de agarosa 2% a una potencia de 100 voltios por dos horas y media, (-): control negativo, (M): marcador molecular de 100 pares de bases; (a, b, c, d, e): orden secuencial de muestras.

SSR18 (tamaño entre 300 a 400 bp)

a) 37 aislados



b) 37 aislados

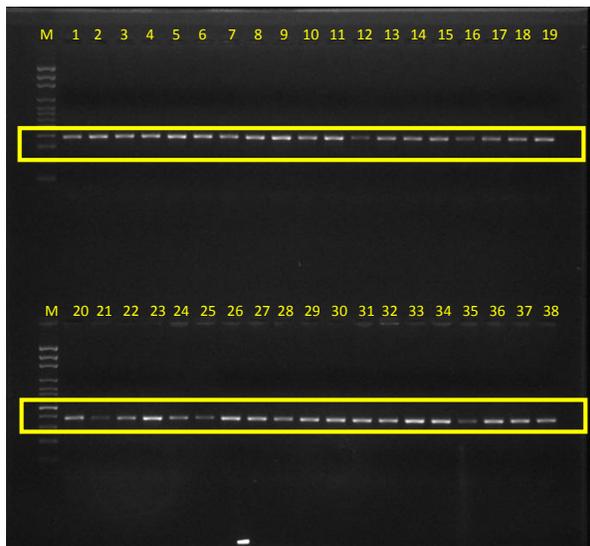


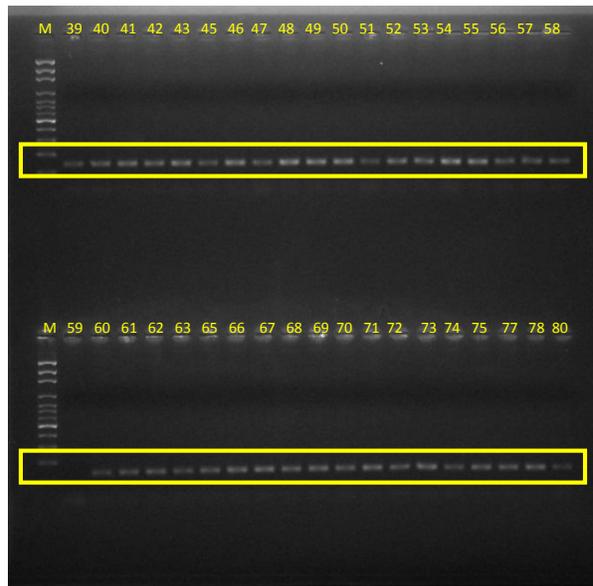
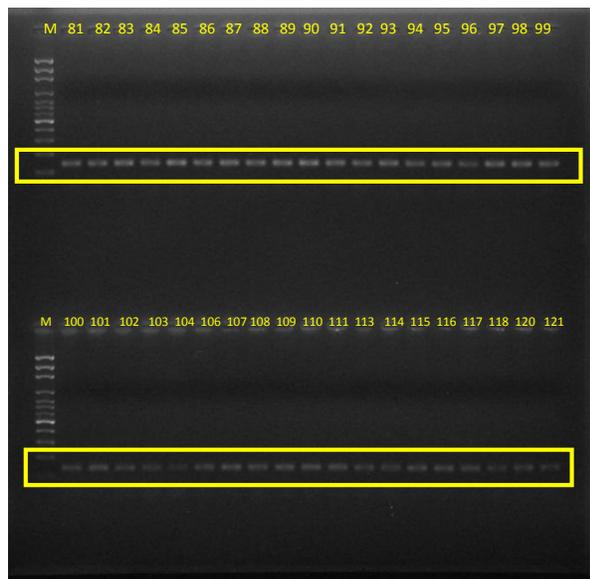
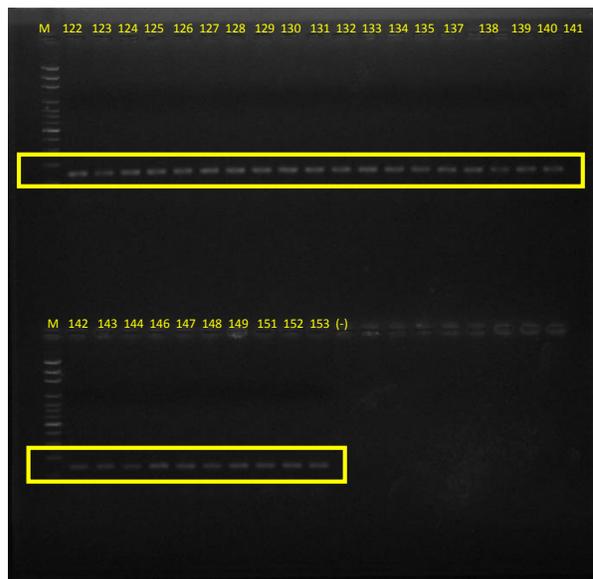
c) 37 aislados



d) 32 aislados

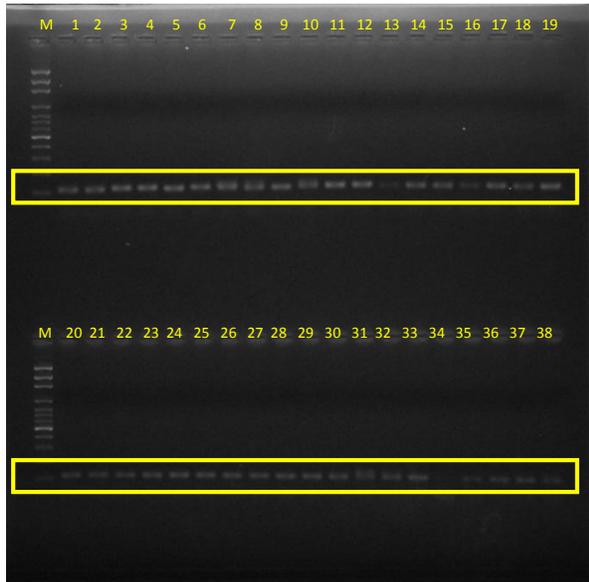


SSR38 (tamaño entre 300 a 400 bp)**a) 37 aislados****b) 37 aislados****c) 37 aislados****d) 32 aislados**

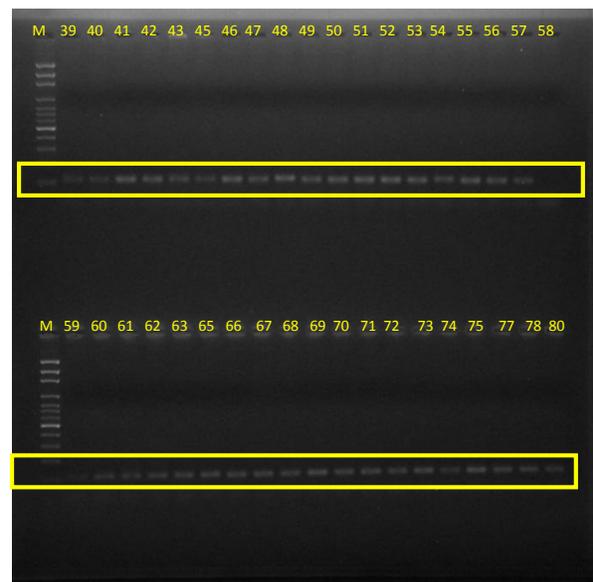
SSR45 (tamaño entre 100 a 200 bp)**a) 37 aislados****b) 37 aislados****c) 37 aislados****d) 32 aislados**

SSR68 (tamaño entre 100 a 200 bp)

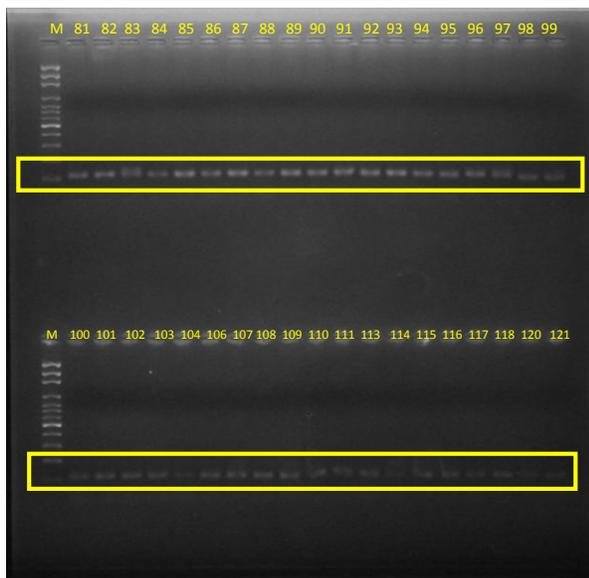
a) 37 aislados



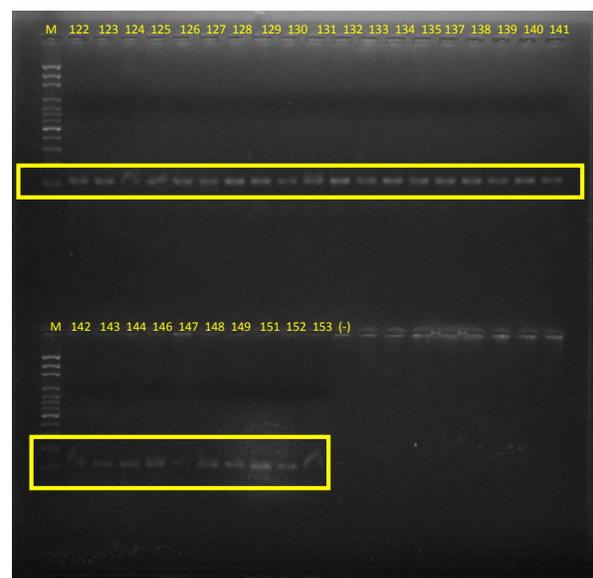
b) 37 aislados

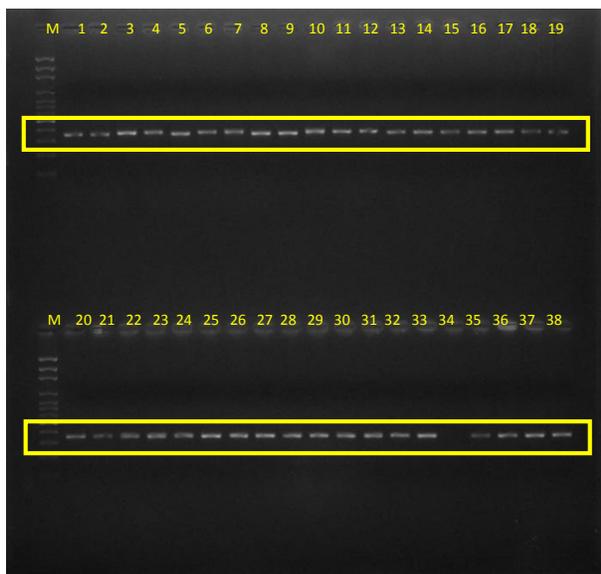
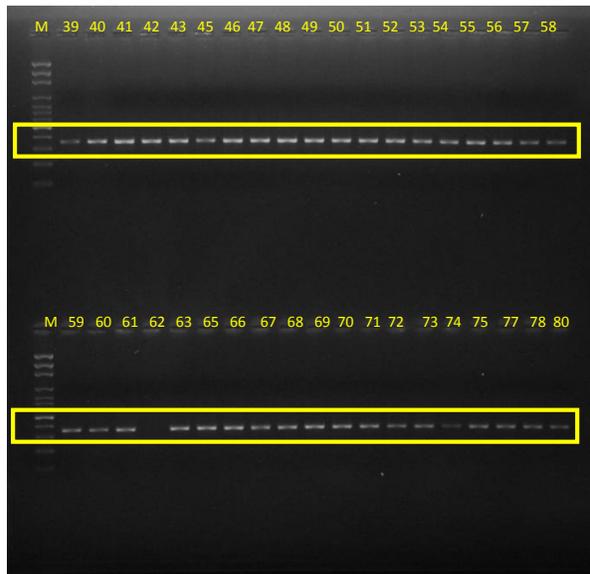
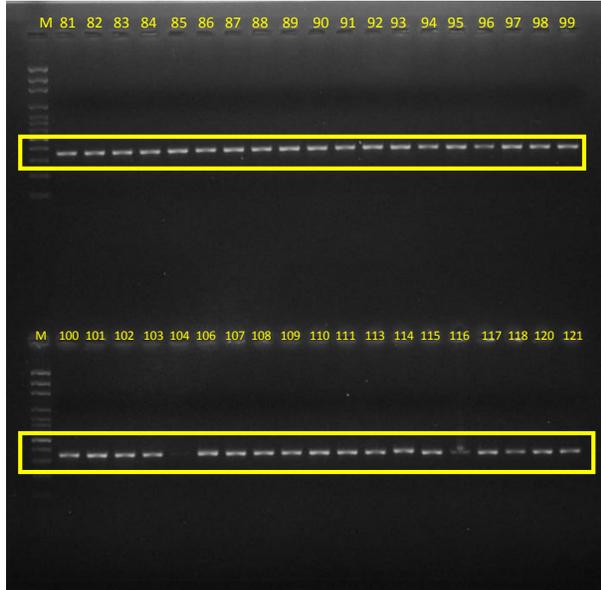
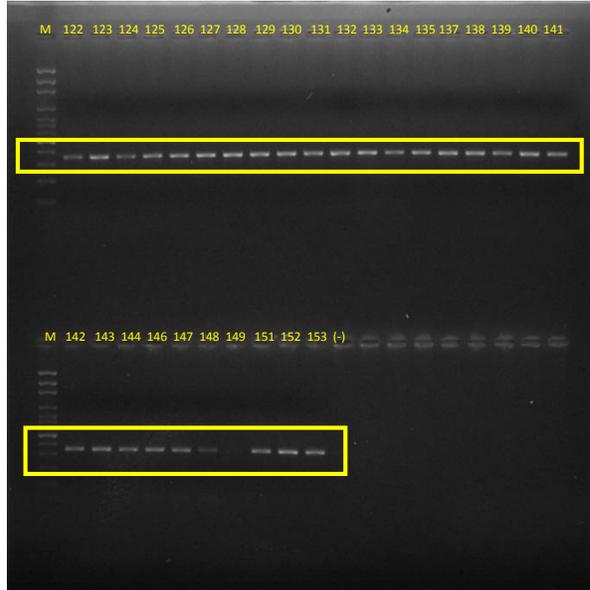


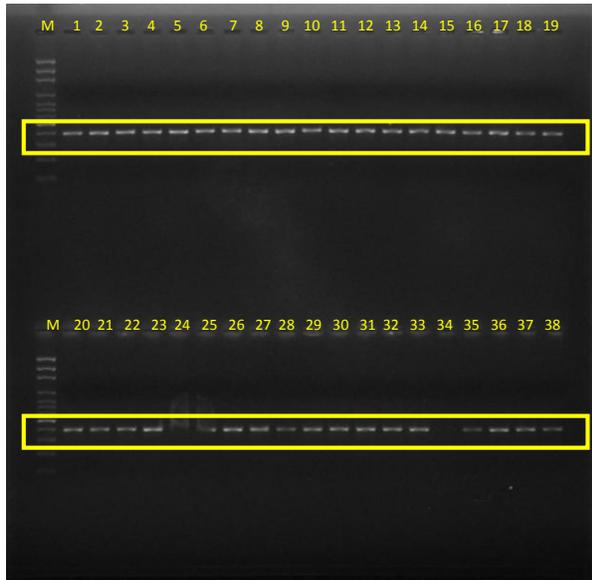
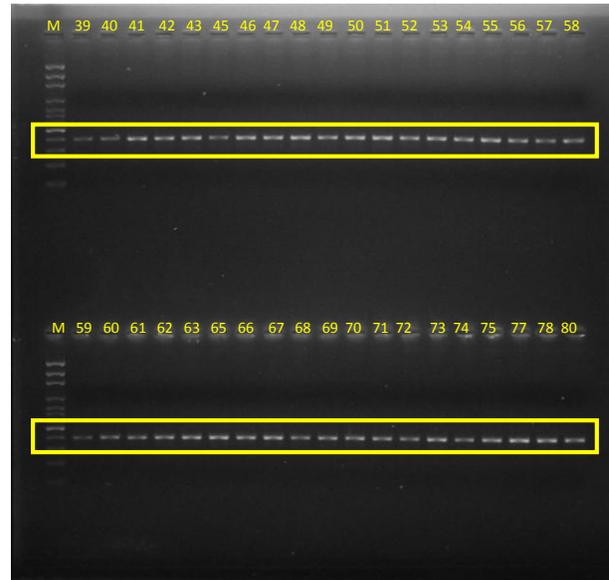
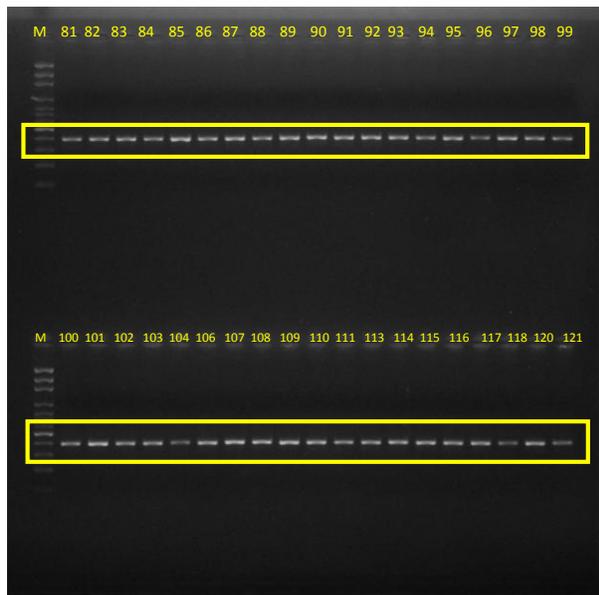
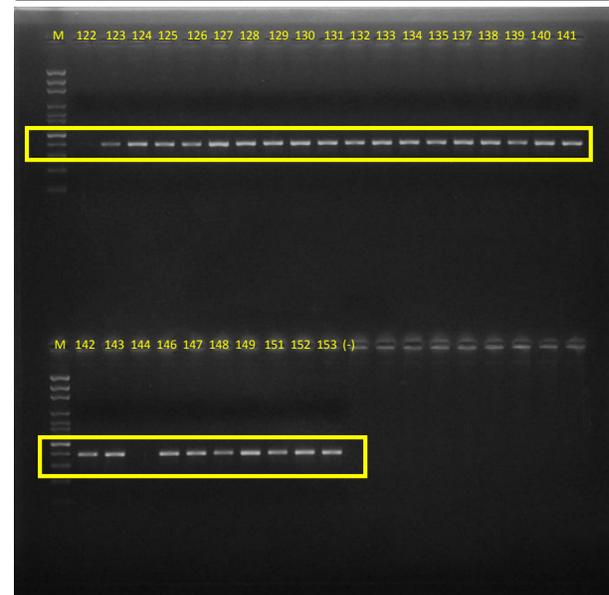
c) 37 aislados



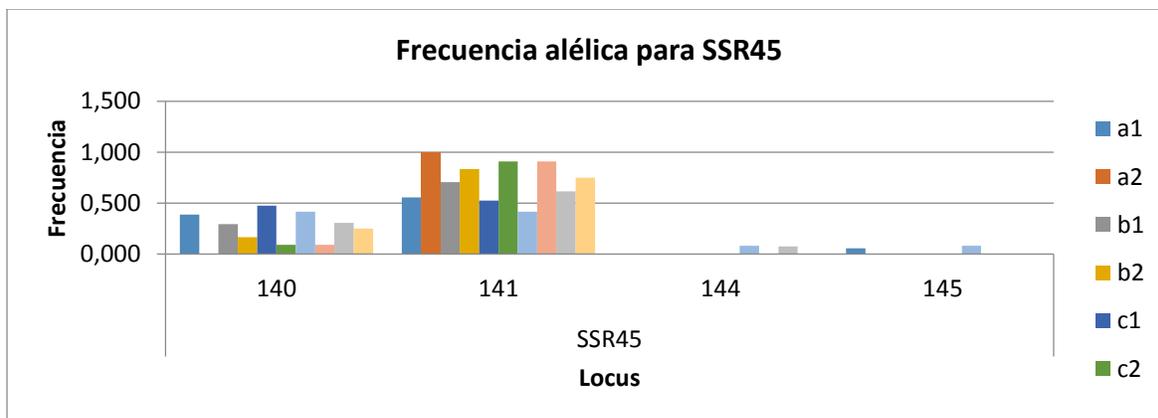
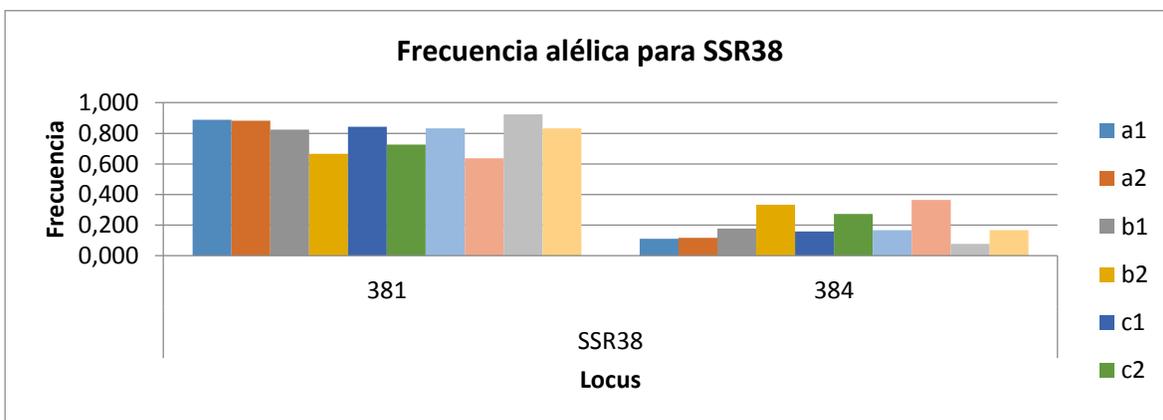
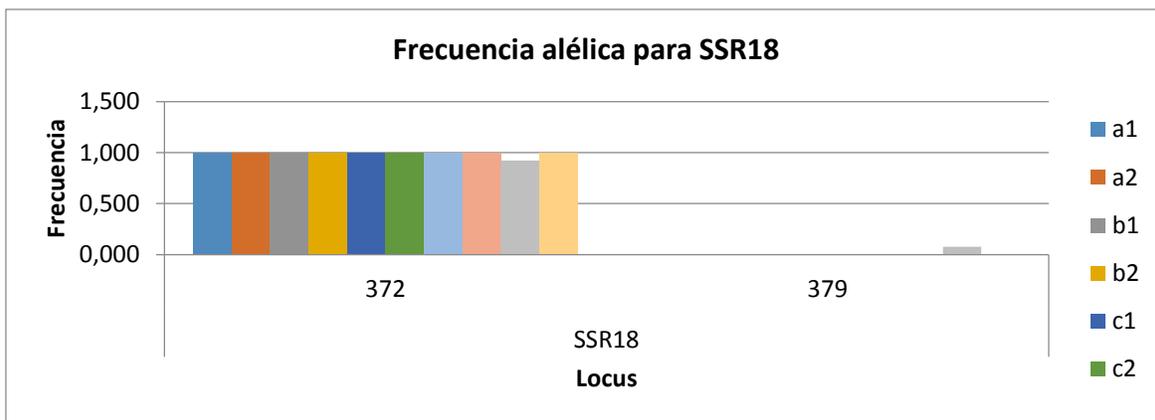
d) 37 aislados



SSR92 (tamaño entre 300 a 400 bp)**a) 37 aislados****b) 37 aislados****c) 37 aislados****d) 32 aislados**

SSR109 (tamaño aproximado 500 bp)**a) 37 aislados****b) 37 aislados****c) 37 aislados****d) 32 aislados**

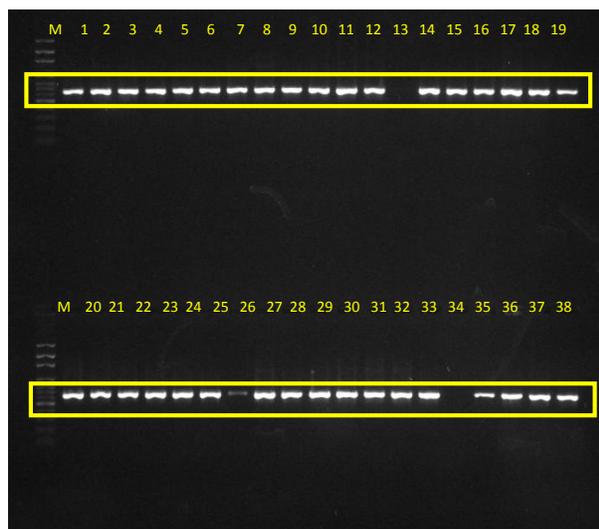
ANEXO E: frecuencias alélicas generadas en el análisis de microsatélites realizado en *Fusarium proliferatum*. En el lado derecho de las imágenes se puede apreciar las correspondencias de colores para cada población.



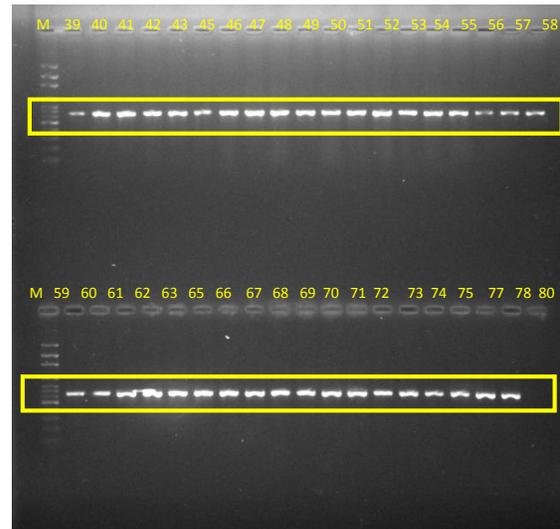
ANEXO F: visualización en gel de agarosa TAE 2% de productos de PCR amplificados con los primers Antfum8 para detección del gen Fum8 en 143 aislados de cebolla contaminada con *Fusarium proliferatum* (tamaño de banda observado alrededor de 600 pares de bases), orden secuencial de aislados **a, b, c, d**.

Gen Fum8 amplificado con primers Antfum8

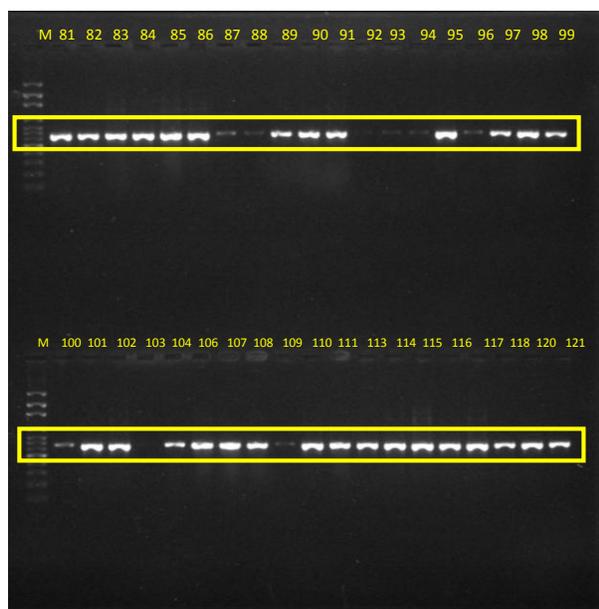
a) 37 aislados



b) 37 aislados



c) 37 aislados



d) 32 aislados

