



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

TEMA: ESTUDIO DE LA INFECCIÓN DE *Fusarium proliferatum* Y
Fusarium oxysporum EN CEBOLLA BLANCA USANDO CEPAS
TRANSFORMADAS QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA VERDE
FLUORESCENTE GFP Y LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE
tdTOMATO

AUTOR: NARANJO ESPINOZA, DANIEL SEBASTIÁN

DIRECTOR: Lcda. KOCH KAISER, ALMA ROSEL Mgs.

SANGOLQUÍ

2018



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, ***“ESTUDIO DE LA INFECCIÓN DE *Fusarium proliferatum* Y *Fusarium oxysporum* EN CEBOLLA BLANCA USANDO CEPAS TRANSFORMADAS QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE GFP Y LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE *tdTOMATO*”*** fue realizado por el señor ***NARANJO ESPINOZA, DANIEL SEBASTIÁN*** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, de Julio 13 del 2018

.....*Alma Rosel Koch Kaiser*.....

Alma Rosel Koch Kaiser

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **NARANJO ESPINOZA, DANIEL SEBASTIÁN**, declaro que el contenido ideas y criterios del trabajo de titulación: **“ESTUDIO DE LA INFECCIÓN DE *Fusarium proliferatum* Y *Fusarium oxysporum* EN CEBOLLA BLANCA USANDO CEPAS TRANSFORMADAS QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE GFP Y LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE *tdTOMATO*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, de Julio 13 del 2018

Daniel Sebastián Naranjo Espinoza

CC. 1717999591



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **NARANJO ESPINOZA, DANIEL SEBASTIÁN**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: ***“ESTUDIO DE LA INFECCIÓN DE *Fusarium proliferatum* Y *Fusarium oxysporum* EN CEBOLLA BLANCA USANDO CEPAS TRANSFORMADAS QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE GFP Y LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE *tdTOMATO*”*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 13 de julio del 2018

Daniel Sebastián Naranjo Espinoza

CC. 1717999591

DEDICATORIA

Al conocimiento científico de la vida y a mi sociedad.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que me apoyó durante el proceso académico; a los maestros apasionados que enseñaron sus asignaturas de forma profesional y didáctica; a mis compañeros que fueron mi equipo de trabajo (nasa: Carolina Carrión, Jare Recalde, Evelyn Quiroz, Salomé Calahorrano) gracias por aportar de sus cualidades para el bien común y a mi sociedad, ya que el ser agradecido es el primer paso para vislumbrar desde una perspectiva diferente y buscar el cambio positivo.

Específicamente deseo expresar mi gratitud y agradecimiento a Mgs. Alma Koch por ser mi mentora académica y personal y a las oportunidades que me brindó para poder demostrar mi pasión por el estudio de la vida. Asimismo a la Dra. Carla Garzón por quien pude realizar mi tesis en la OSU, por sus enseñanzas a nivel personal y científico. Al Ingeniero matemático Pedro Romero Saker por su ánimo en tiempos de dificultad, aptitud y precisión. A la Ing. Lucia Jiménez por su vocación para enseñar e impartir su amplio conocimiento.

Agradezco a aquellos maestros que contrastaron las cualidades mencionadas anteriormente.

Agradezco a Dios.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	2
1.3.1 Objetivo general.....	2
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Hipótesis	3
1.5 Marco Teórico	3
1.5.1 Características de la cebolla.....	3
1.5.2 Características del patógeno	4
1.5.3 Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i>	6
1.5.4 Características de la infección causada por <i>Fusarium</i>	6
1.5.5 Experimentos similares realizados en <i>Fusarium</i>	7
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	9

2.1	Participantes	9
2.2	Zona de estudio	9
2.3	Periodo de tiempo de investigación	9
2.4	Procedimiento	9
2.4.1	Cultivo y conservación de las cepas de <i>F. oxysporum</i> y <i>F. proliferatum</i>	9
2.4.2	Obtención del inóculo.	11
2.4.3	Preparación del material vegetal e inoculación.....	13
2.4.4	Observación con microscopía epifluorescente.	20
2.4.5	Diseño experimental y análisis estadístico.	25
	CAPÍTULO III. RESULTADOS.....	26
3.1	Observación de semillas y plántulas.....	26
3.1.1	Semillas.	26
3.1.2	Plántulas.....	28
3.2	Observación de raíces provenientes de bulbos.	32
3.3	Observación de hojas.	35
3.4	Observación de escamas de bulbos.	37
3.5	Prueba estadística (ANOVA).....	39
	CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	41
	CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	45
	CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES.....	46
	CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Cepas transformadas y del tipo salvaje de F. Oxysporum y F. Proliferatum usadas en el estudio.....</i>	10
Tabla 2. <i>Composición del medio de cultivo SNA.....</i>	10

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uso del triángulo para frotar micelio de A1WT de un cultivo SNA.	11
Figura 2. Cámara Neubauer y contador mecánico.	12
Figura 3. Muestra de la zona de crecimiento activo en el medio de un cultivo de A7G32.	13
Figura 4. Semillas de cebolla perla: a) inoculadas con A1WT y b) colocadas en papel germinativo.	14
Figura 5. Papel germinativo dentro de la cámara de crecimiento.	15
Figura 6. Bulbos de cebolla plantados en perlita.	16
Figura 7. Raíces de cebolla sumergidas en suspensiones de esporas.	17
Figura 8. Inoculación de hoja con pedazos de agar del cultivo de A1WT.....	18
Figura 9. Parte de un bulbo de cebolla inoculado con pedazos de agar.	19
Figura 10. Ejemplo del procesamiento de las imágenes capturadas.....	20
Figura 11. Corte transversal que detalla las partes de una semilla de cebolla blanca..	21
Figura 12. Corte transversal en la raíz y región del primordio de hoja.....	22
Figura 13. Raíces de bulbos de cebolla perla 3 días después de la inoculación con A1WT.....	23
Figura 14. Haz y envés de una hoja de cebolla inoculada con A1WT.	24
Figura 15. Auto fluorescencia de la semilla de cebolla.	26
Figura 16. Observaciones de semillas inoculadas con <i>F. proliferatum</i> y <i>F. oxysporum</i>	27
Figura 17. Observaciones de plántulas inoculadas con <i>F. proliferatum</i> y <i>F. oxysporum</i>	28
Figura 18. Observaciones de la colonización de A1G4-2 en el cotiledón.	29
Figura 19. Observaciones de cortes de plántulas inoculadas con <i>F. proliferatum</i> y <i>F. oxysporum</i>	30

Figura 20. Observación 14 y 20 ddi de cortes del primordio de hoja de plántulas inoculadas con A1G4-2.	31
Figura 21. Observaciones a los 3, 7 y 15 ddi con <i>F. proliferatum</i> y <i>F. oxysporum</i> de raíces provenientes de bulbos.	32
Figura 22. Observaciones a los 3, 7 y 15 ddi de cortes de raíces provenientes de bulbos, inoculadas con <i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i>	34
Figura 23. Observaciones a los 4 ddi de cortes de hojas inoculadas con <i>F. proliferatum</i> y <i>F. oxysporum</i>	36
Figura 24. Escama proveniente de un bulbo de cebolla, inoculada con pedazos de agar.	37
Figura 25. Observaciones de cortes de escamas de bulbos inoculadas con <i>F. proliferatum</i> y <i>F. oxysporum</i>	38
Figura 26. Resultados de la prueba estadística de Kruskal Wallis para <i>F. oxysporum</i>	39
Figura 27. Resultados de la prueba estadística de Kruskal Wallis para <i>F. proliferatum</i>	40

RESUMEN

El estudio de hongos filamentosos patógenos de plantas es facilitado al usar proteínas auto fluorescentes como marcadores visuales para observar el desarrollo del hongo en la planta. Se emplearon cepas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum* transformadas con las proteínas reporteras GFP y tdTomato con el objetivo de estudiar la infección empleando microscopia epifluorescente al ser inoculadas en tejidos de cebolla perla. Se mantuvo a las cepas en medio SNA. La inoculación de bulbos y hojas se hizo por medio de pedazos de agar. Para inocular semillas y raíces se prepararon suspensiones de esporas de los medios de cultivo. El material vegetal fue mantenido en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 12 h a 25°C. Los resultados mostraron que todas las cepas lograron colonizar la epidermis, penetrar hacia el interior del córtex y llegar al cilindro vascular central de la raíz de plántulas a los 26 ddi y en bulbos a los 15ddi. Se encontró que a los 14 ddi la zona del primordio de hoja fue colonizada sobre su epidermis pero el córtex cotiledonar permaneció libre del hongo. En hojas y escamas de bulbos a los 4ddi, tanto *F. oxysporum* como *F. proliferatum* crecieron superficialmente a menos que se aplique daño mecánico en el tejido con lo que las cepas crecieron intercelularmente en el córtex. Las proteínas reporteras GFP y tdTomato permitieron el estudio rápido y fácil del progreso de la infección de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* en tejido vivo de cebolla perla.

Palabras clave:

- GFP
- TDTOMATO
- FUSARIUM
- CEBOLLA BLANCA

ABSTRACT

The study of filamentous plant pathogen fungi is helped by the use of auto fluorescent proteins as visual markers to observe fungal development inside the plant. The GFP, tdTomato transformed strains of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium proliferatum* were used to study the progress of infection inside living tissues of white onions. Working strains were maintained in SNA culture media. Pieces of infected agar were used in bulb and leaf inoculation. For seed and root inoculation spore suspensions were used. All plant material were put inside a growing chamber with a photoperiod of 12 h, 25°C. Results showed that all the strains colonized the epidermis then grew extracellularly in the cortex and finally inside the inner vascular system 26 dai in roots and 15 dai in bulbs. At 14 dai the second leaf epidermis inside the cotyledon was surface colonized while the cortex remained clear. Bulb scales and leaves observation presented that at 4 dai both *F. oxysporum* and *F. proliferatum* grew superficially meanwhile in mechanically damaged tissues the fungi grew extracellularly inside the cortex. In this study both GFP and tdTomato were useful in studying the infection process of *F. oxysporum* and *F. proliferatum* inside living tissues of white onion.

Key words:

- GFP
- TDTOMATO
- FUSARIUM
- WHITE ONION

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La cebolla es un cultivo consumido y producido a nivel mundial, siendo sus principales productores: China, India, U.S.A, Turquía e Irán (FAO, 2016).

En la región interandina, el Ecuador produce localmente y para exportación cebolla de tres variedades: blanca, colorada y perla (Rivero & Romero, 2012).

Como en otros cultivos, la cebolla puede ser susceptible a numerosos patógenos fúngicos que reducen su producción y calidad (Bayford, 1996).

En muestras de tejidos de cebolla se ha encontrado la presencia de *Fusarium* sp. (Espinoza, Vivas, & Paz, 2005), el hongo puede causar pérdidas en la producción debido a la pudrición de la raíz y de la plántula (Bayford, 1996).

Un área puede permanecer infestada indefinidamente por *Fusarium*, el cual puede dispersarse a poca distancia a través del agua y herramientas agrarias contaminadas y a larga distancia a través de plántulas y suelo contaminado (Agrios, 2005).

En el presente estudio se quiere evaluar cómo las especies del hongo, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium oxysporum*, colonizan distintos tejidos de cebolla de diferente longevidad y de esta forma conocer su comportamiento en condiciones controladas aproximadas a situaciones reales en el campo.

Se analizan las vías por las cuales el hongo satisfactoriamente coloniza a su huésped con el fin de encontrar formas para prevenir la infección, evitar la contaminación alimentaria y pérdidas del material vegetal.

Las diferentes técnicas microbiológicas empleadas para realizar el estudio pueden ser aplicadas para otros similares del sector agro productivo del país. Además al evaluar y describir el comportamiento del hongo se podrá tener una percepción fitopatológica de otros hongos y de esta forma prevenir daños a cultivos y pérdida productiva.

1.2 Justificación del problema

Históricamente el género *Fusarium* ha causado grandes pérdidas como la devastación de la industria bananera alrededor de 1960, causada por *F. oxysporum* f. sp. cubense (Ploetz, 1990); pérdidas en trigo y cebada en la parte superior de Estados Unidos (Windels, 2000), mientras que en el suroeste causó una epidemia imprevista de fusariosis de la espiga de trigo (Cowger & Sutton, 2005), dichos eventos ocasionaron la quiebra de granjeros, afectando la economía del país.

Especies del género *Fusarium* causan pudrición basal de la cebolla (*Allium cepa*). El hongo infecta la placa basal del bulbo o las raíces; con el tiempo infecta las escamas del bulbo y causa pérdidas severas que ocurren en la etapa de almacenaje después de la cosecha (Entwistle, 1990).

En el Ecuador, las plantaciones de cebolla pierden productividad al ser atacadas por *Fusarium*. Debido a la demanda nacional e internacional de productos orgánicos, los agricultores evitan técnicas comunes como el uso de productos químicos (Cárdenas, 2014).

Así, se requiere explorar nuevas técnicas de control de enfermedades que sean amigables con el ambiente, eviten el uso de químicos persistentes y sean efectivas al combatir los agentes causantes de la enfermedad. Para conseguirlo, primero se pretende conocer y analizar la colonización del hongo sobre el tejido vegetal y la infección dentro de él.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Estudiar la infección de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium oxysporum* en cebolla blanca usando cepas transformadas que expresan la proteína verde fluorescente *gfp* y la proteína roja fluorescente *tdTomato*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aplicar protocolos para propagar, preservar y manipular al hongo y para inocularlo sobre el material vegetal.
- Usar microscopía epifluorescente para estudiar el desarrollo de cepas transformadas de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium oxysporum* en hojas, bulbos y raíces de cebolla blanca.
- Inocular semillas de cebolla blanca con cepas transformadas y del tipo salvaje de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium oxysporum* para evaluar su infectividad.

1.4 Hipótesis

•El uso de cepas transformadas que expresan proteínas fluorescentes *gfp* y *tdTomato* de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium oxysporum*, permiten analizar microscópicamente las características de la infección en tejidos de cebolla.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 Características de la cebolla

Las cebollas (*Allium cepa*) son cultivadas alrededor del mundo como un vegetal para el consumo humano. Después de su cosecha, los bulbos son consumidos crudos o cocidos (Jones, 1998).

Son apreciadas por su sabor fuerte, saborizante (Randler & Lancaster, 2002) y textura.

Además, la cebolla y el ajo (*Allium sativum*) poseen efectos medicinales que pueden ayudar y mejorar problemas coronarios (Augusti, 1990) y reducir el riesgo de sufrir cáncer gastrointestinal (Keusgen, 2002).

Crecen en climas templados, tropicales y subtropicales; son cultivos de días largos de tal forma que requieren una determinada duración del día para que se forme el bulbo; por ejemplo; las regiones del hemisferio norte con días de 14 a 16 horas, sin embargo en

zonas tropicales y sub tropicales se han adaptado para formar bulbos con días inferiores a 13 horas (Currah & Proctor, 1990).

Estructuralmente, el bulbo está compuesto por series concéntricas de hojas carnosas envueltas en hojas protectoras, delgadas y secas permitiendo su prolongado almacenamiento (Cooke, Jones, & Kaye, 2006).

Este cultivo es atacado por algunos agentes patógenos del suelo como *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Pyrenochaeta terrestris* (causante de la raíz rosa), *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp. y *Sclerotinia sclerotiorum*. La calidad y cantidad de la producción se ve disminuida alrededor de todo el mundo (Schwartz & Mohan, 1995).

1.5.2 Características del patógeno

1.5.2.1 *Fusarium oxysporum*.

Fusarium oxysporum es un patógeno de plantas distribuido en el suelo a nivel mundial. Esta especie probablemente causa más daño a cultivos que ninguna otra (Correll, 1991).

F. oxysporum es la más dispersa de las especies del género *Fusarium* y puede ser encontrado en la mayoría de los suelos: ártico (Kommedahl, Abbas, Buernes, & Mirocha, 1988) tropical o desierto (Joffe & Palti, 1977; Mandeel, Abbas, & Saeed, 1995) y cultivado o no (McMullen & Stack, 1983; 1984).

La especie tiene un alto grado de especificidad con más de 120 variedades y *formae speciales* aptas para causar marchitamiento vascular de muchos cultivos (Armstrong & Armstrong, 1981), caída de plántulas (Nelson, Horst, & Woltz, 1981), así como pudrición de la corona y raíz (Jarvis & Shoemaker, 1978).

Estas formas patógenas pueden ser aisladas de plantas no huéspedes, usualmente nativas de la zona de cultivo (Helbig & Carroll, 1984; Wang, Brubaker, & Burdon, 2004).

El hongo pertenece a un estado imperfecto de ascomiceto, es necrótrofo del suelo causante de enfermedad en cebollas en suelos con temperaturas altas (25 a 35°C) (Sherf & Macnab, 1986).

La temperatura óptima del suelo para que el hongo ocasione enfermedad es de 25 a 28°C, mientras que a 15°C la enfermedad raramente se presenta (Havey, 1995). El crecimiento linear máximo del hongo ocurre a 25°C y con un potencial osmótico de -1.0 MPa (Nelson, Burgess, & Summerell, 1990)

Fusarium oxysporum puede sobrevivir en suelo en ausencia de su huésped como micelio o como esporas (Agrios, 2005) y volverse activo cuando el suelo tiene un porcentaje de humedad que permite el crecimiento de la planta (Cooke, Jones, & Kaye, 2006).

La supervivencia del hongo en el suelo se debe a la formación de clamidosporas, con recubrimiento grueso; aunque también se forman macroconidias y, escasamente microconidias (Havey, 1995).

Para el estudio morfológico de *F. oxysporum*, se analizan la producción de microconidias en cabezas falsas sobre fiálides cortas formadas en las hifas, la producción de clamidosporas y la forma de las macro y microconidias (Leslie & Summerell, 2006).

El hongo se dispersa de diferentes formas, por el viento y en el suelo, mediante semillas y material vegetal infectado (Garibaldi, Giraldi, & Gullino, 2004).

1.5.2.2 *Fusarium proliferatum*

Fusarium proliferatum es un hongo patógeno de plantas, usualmente es confundido con *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. verticillioides*, y *F. thapsinum*; para su diferenciación se evalúan secuencias de ADN (Leslie, Zeller, Wohler, & Summerell, 2004).

F. proliferatum se encuentra en numerosos lugares del mundo. Causa pudrimiento radicular de plantas, pudrimiento de corona y decaimiento en plantas (Ocamb, Juzwik, & Martin, 2002; Elmer, Summerell, Burgess, Backhouse, & Abubaker, 1997).

El hongo presenta crecimiento lineal máximo a 25°C con un potencial osmótico de -1.0 MPa (Nelson, Burgess, & Summerell, 1990), las conidias germinan óptimamente a 30°C (Marin, y otros, 1996).

Bajo determinadas condiciones, el hongo puede producir β -glucosidasas (Fawzi, 2003), β -xylosidasas (Saha, 2002) y otras enzimas relacionadas con la degradación de compuestos que contienen ligninas (Regalado, y otros, 1999). *F. proliferatum* produce una gran variedad de micotoxinas (Logrieco, Moretti, Ritieni, Bottalico, & Corda, 1995), entre ellas, fumonosinas en niveles altos (Bacon & Nelson, 1994). Debido a su amplia distribución, se han podido recuperar fumonosinas de fuentes aparentemente libres de ellas (Seefelder, Gossmann, & Humpf, 2002).

1.5.3 Enfermedades causadas por *Fusarium*.

Una de las enfermedades causadas por *Fusarium* es el pudrimiento basal por *Fusarium* (FBR), es una enfermedad de la raíz y del bulbo de cebollas que crecen en clima templado y subtropical (Bayford, 1996).

El hongo coloniza la planta a través de las raíces y a la placa basal del tallo a través del suelo. La enfermedad avanza desde una decoloración ligera de la placa basal hasta la necrosis total, muerte de las hojas y planta y posteriormente pudrición de las escamas internas del bulbo (Cramer, 2000).

1.5.4 Características de la infección causada por *Fusarium*.

La infección puede ocurrir en cualquier momento durante el crecimiento del cultivo. Bajo el suelo, las raíces y la placa basal son infectadas. Debido a que las hojas se producen en la placa basal, pueden ser atacadas provocando clorosis o necrosis que

comienza en las puntas y desciende terminando en marchitez (Havey, 1995). Los haces vasculares son taponados por el cuerpo del hongo. El patógeno invade el xilema de raíces y tallos y produce enfermedad al interferir con el movimiento hacia arriba del agua a través del xilema (Agrios, 2005) Finalmente las raíces se pudren, las placas basales muestran decoloración parda y los bulbos se pudren progresivamente (Havey, 1995).

La intensidad de la colonización del tejido de cebolla varía según la producción de isoenzimas pectolíticas por parte del hongo (Özer, Köycü, Chilosi, & Magro, 2004).

Las especies patogénicas de *Fusarium* satisfactoriamente inactivan las sustancias tóxicas producidas por su huésped, además producen toxinas que aumentan su virulencia (Agrios, 2005).

Enfermedades causadas por *Fusarium* son más severas en clima seco, suelo cálido y en invernaderos (Agrios, 2005). En el suelo puede existir supresión de la actividad del hongo debido a interacciones microbianas en la rizósfera (Mazzola, 2004). Sin embargo, suelos que inhiben el marchitamiento causado por especies vasculares de *Fusarium* no son efectivos contra especies de *Fusarium* no vasculares (Weller, Raaijmakers, McSpadden, Gardener, & Thomashow, 2002).

1.5.5 Experimentos similares realizados en *Fusarium*.

Descripciones del crecimiento y colonización de tejidos vegetales por *Fusarium* han sido reportadas (Abawi, 1972; Lagopodi, y otros, 2002; Miller, Chabot, Ouellet, Harris, & Fedak, 2004; Skadsen & Hohn, 2004).

Según Skadsen & Hohn (2004), se transformó *F. graminearum* con la proteína reportera *gfp*. El hongo fue inoculado en espigas de cebada y en *Arabiopsis thaliana*. Los resultados demostraron la utilidad de *gfp* para evaluar el crecimiento del patógeno evitando malinterpretación causada por hongos contaminantes y útil para estudios de resistencia empleando el modelo de *Arabidopsis*.

En Miller et al., (2004), se describe la colonización de *F. graminearum* transformado con *gfp* sobre plantas de trigo en etapa de floración (*Triticum aestivum*). De igual forma, se pudo evaluar el crecimiento del hongo dentro y fuera del tejido vegetal, así como diferencias en la infección entre las variantes susceptible y resistente empleadas en el estudio.

Según Li et al., (2011), *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* transformado con *gfp* resultó útil para visualizar al patógeno sobre tejido vivo de banana, sin manipulación o procesamiento previo de la muestra. Esta propiedad permite fácilmente evaluar el desarrollo fúngico en la planta.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1 Participantes

La investigación fue dirigida por Mgs. Alma Koch Kaiser y el Dr. Francisco Flores Flor como asesor. Como estudiante investigador Daniel Naranjo Espinoza.

2.2 Zona de estudio

La parte experimental se la realizó en su totalidad en los laboratorios del Departamento de Entomología y Patología de plantas (ENTOPLP) de la Universidad Estatal de Oklahoma (OSU), en la ciudad de Stillwater del estado Oklahoma, Estados Unidos de América. El proyecto se llevó a cabo bajo la supervisión del Dr. Stephen Marek y la Dra. Carla Garzón.

2.3 Periodo de tiempo de investigación

El proyecto tuvo la duración de un año.

2.4 Procedimiento

La investigación es de naturaleza descriptiva y fue realizada en las siguientes fases: cultivo y conservación de las cepas de *F. oxysporum* y *F. proliferatum*, obtención del inóculo, preparación del material vegetal e inoculación y observación usando microscopía epifluorescente.

2.4.1 Cultivo y conservación de las cepas de *F. oxysporum* y *F. proliferatum*.

2.4.1.1 Cepas empleadas.

Las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio a cargo del Dr. Stephen Marek del departamento de Entomología y Patología de Plantas (ENTOPLP). El nombre, tipo de cepa y especie empleadas en el estudio, se muestra en la tabla 1:

Tabla 1.

Cepas transformadas y del tipo salvaje de F. oxysporum y F. proliferatum usadas en el estudio.

Denominación	Tipo de cepa	Especie
1. A1R1-4	Transformada con tdTomato.	<i>Fusarium oxysporum</i>
2. A1G4-2	Transformada con <i>gfp</i> .	
3. A1WT	Tipo salvaje (<i>wild type</i>).	
4. A7R8	Transformada con tdTomato.	<i>Fusarium proliferatum</i>
5. A7G32	Transformada con <i>gfp</i> .	
6. A7WT	Tipo salvaje (<i>wild type</i>).	

2.4.1.2 Medio de cultivo.

Todas las cepas fueron cultivadas en agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) según Leslie & Summerell (2006), detallado en la tabla 2:

Tabla 2.

Composición del medio de cultivo SNA.

Componente	Cantidad para 1L (g).
KH ₂ PO ₄	1
KNO ₃	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
Glucosa	0.2
Sucrosa	0.2
Agar	20

2.4.1.3 Mantenimiento de las cepas.

Todas las cepas fueron mantenidas en SNA y se realizaron hasta cuatro pases sucesivos, empleando un asa bacteriológica con la cual se tomó parte del micelio y se lo esparció sobre el medio sólido, fueron incubadas a 30 °C (Leslie & Summerell, 2006).

2.4.2 Obtención del inóculo.

Para efectuar la inoculación del hongo sobre el tejido vegetal se prepararon dos formas: suspensión de esporas y pedazos de agar de cultivos del hongo.

2.4.2.1 Suspensión de esporas.

Las cepas mencionadas anteriormente (tabla 1), fueron cultivadas en cajas Petri (100 x 15 mm) en SNA por 11 días, luego se añadió 20 ml de agua destilada estéril sobre el medio de cultivo y con un triángulo de acero se frotó el micelio para que las esporas sean suspendidas en el agua (Figura 1).



Figura 1. Uso del triángulo para frotar micelio de A1WT de un cultivo SNA.

Demostración de la técnica empleada para obtener suspensiones de esporas de cultivos SNA. Se frotó un triángulo sobre el medio de cultivo que contiene el hongo, para que sus esporas sean suspendidas en agua.

Se obtuvo una mezcla de agua con micelio y esporas, esta fue vertida sobre dos capas sobrepuestas de gasa estéril con el fin de retener pedazos grandes de micelio y dejar pasar esporas. El filtrado se recogió en tubos Falcon™ graduados. A continuación se realizó el conteo de esporas en cámara Neubauer (Figura 2) (Miller, Chabot, Ouellet, Harris, & Fedak, 2004) y se ajustó su concentración empleando factores de dilución según la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

En dónde C1 es la concentración medida mediante el conteo en la cámara, V1 volumen estimado a tomar, C2 concentración final deseada y V2 volumen final.



Figura 2. Cámara Neubauer y contador mecánico.

La foto de la izquierda muestra la cámara Neubauer siendo cargada con una suspensión de esporas, en la derecha se muestra el contador mecánico empleado para cuantificar esporas.

2.4.2.2 Pedazos de agar con el hongo.

Después de nueve días de cultivo en SNA, pedazos de 4 mm de la parte terminal del micelio (Figura 3), que corresponde a la zona de crecimiento activo del hongo (Prescott, Harley, & Klein, 2004), fueron extraídos para inocular las hojas y bulbos de cebolla.

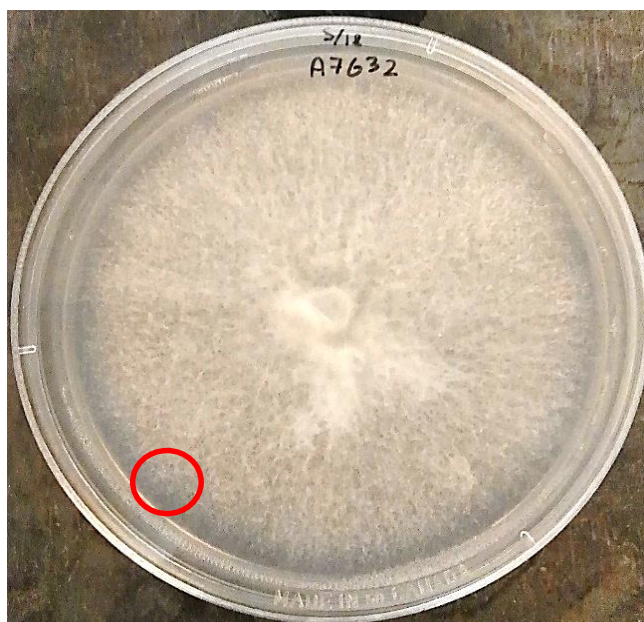


Figura 3. Muestra de la zona de crecimiento activo en el medio de un cultivo de A7G32.

La foto muestra crecimiento de A7G32 en SNA, la circunferencia roja indica la zona de crecimiento activo (marginal) de donde se tomaron pedazos de agar para la inoculación.

2.4.3 Preparación del material vegetal e inoculación.

En el ensayo se trabajó con semillas, plántulas, bulbos y hojas de cebolla perla. A continuación se detalla el procedimiento efectuado en cada una de las partes (Skadsen & Hohn, 2004; Taylor, y otros, 2013).

2.4.3.1 Siembra de semillas e inoculación.

Se trabajó con semillas de cebolla perla (*Allium cepa*), vendidas por la empresa Johnny's Selected Seeds®. Fueron esterilizadas superficialmente empleando una solución de etanol al 95% por un minuto, luego cloro comercial (Clorox®) al 20% por 15 min, se enjuagaron en agua desionizada estéril y se las dejó secar al ambiente. A continuación, sobre cada semilla se colocó una gota de 10 µl de una suspensión de esporas de las cepas transformadas: A1R1-4, A1G4-2, A7R8, A7G32, y sus tipos salvajes: A1WT y A7WT, cuya concentración fue de 1×10^6 esporas ml^{-1} (Figura 4), fueron dejadas en reposo y en sombra durante la noche. Luego, las semillas inoculadas fueron colocadas en papel germinativo autoclavado (Figura 4), se trabajó cerca de un mechero con el fin de evitar contaminación ambiental. Para cada cepa se empleó un solo papel germinativo que contuvo 15 semillas (Gei, Valdez, Piccolo, & Galmarini, 2014).

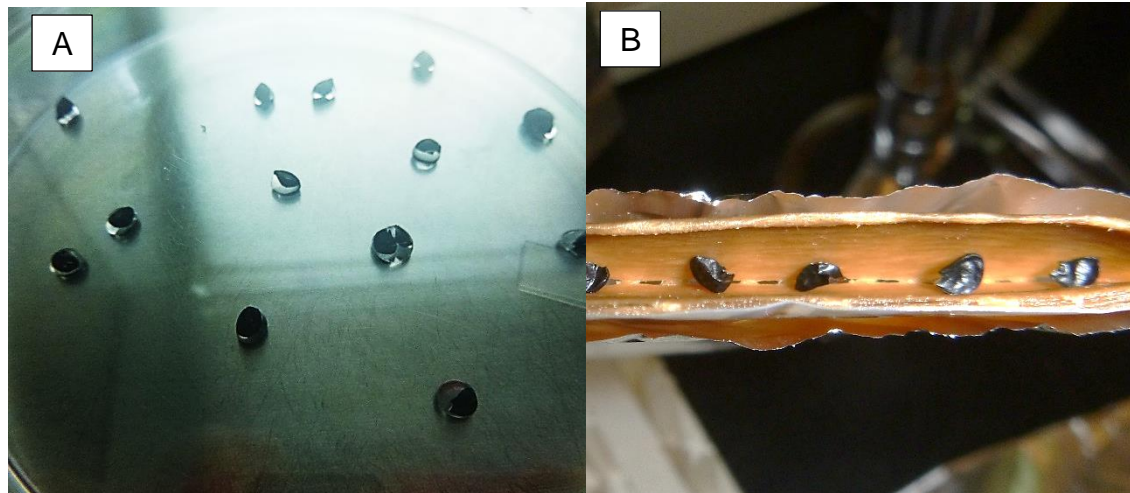


Figura 4. Semillas de cebolla perla: a) inoculadas con A1WT y b) colocadas en papel germinativo.

En la izquierda se muestra a las semillas de cebolla inoculadas con una gota de una suspensión de esporas de A1WT. A la derecha se visualiza desde arriba a las semillas inoculadas dentro del papel germinativo.

El papel germinativo fue envuelto en papel aluminio para evitar que la semilla reciba iluminación y colocado en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12 h a 25°C que está en el rango de la temperatura óptima para el desarrollo de *Fusarium* (Abawi, 1972); se emplearon gradillas plásticas para mantener el papel germinativo erguido y a 40 cm de la fuente de luz (Figura 5).



Figura 5. Papel germinativo dentro de la cámara de crecimiento.

Se muestra la disposición del papel germinativo, cubierto por papel aluminio, colocado en gradillas plásticas, dentro de la cámara de crecimiento.

2.4.3.2 Siembra de bulbos de cebolla e inoculación en raíz.

Se adquirieron bulbos listos para plantar de la empresa Van Zyverden, Inc., se retiró su cáscara exterior, luego fueron esterilizados superficialmente según Gei et al. (2014) al sumergirlos en etanol al 95% por un minuto, luego cloro comercial (Clorox®) al 10% por 15 min, se enjuagaron en agua desionizada estéril cuatro veces y se plantaron en cajas Magenta™ llenas de perlita humedecida y autoclavada. Se colocaron tres bulbos por caja y fueron puestos en una cámara de crecimiento a 25°C, 12h fotoperiodo por una semana. Transcurrido este tiempo, los bulbos tuvieron abundantes raíces y hojas (Figura 6).



Figura 6. Bulbos de cebolla plantados en perlita.

Fotografía de cajas Magenta™ que contienen bulbos de cebolla de una semana, plantados en perlita.



Figura 7. Raíces de cebolla sumergidas en suspensiones de esporas.

La imagen muestra raíces de cebolla completamente sumergidas en suspensiones de esporas, cada frasco contuvo una cepa (A1R1-4, A1G4-2, A1WT, A7R8, A7G32, A7WT). Nótese que los bulbos no tienen mayor contacto con el líquido.

Para la inoculación, los bulbos fueron retirados de la perlita, se enjuagaron sus raíces con agua estéril y fueron sumergidas por una hora en suspensiones de esporas de 1×10^6 esporas ml^{-1} de las cepas transformadas: A1R1-4, A1G4-2, A7R8, A7G32, y sus tipos salvajes: A1WT y A7WT (Figura 7). Como control se usó agua estéril. Los bulbos fueron plantados en perlita estéril y observados 3, 7, 15 días después de la inoculación (ddi) (Skadsen & Hohn, 2004).

2.4.3.3 Inoculación en hojas.

Las hojas de cebolla provenientes de bulbos plantados por una semana (Figura 6) fueron cortadas y colocadas dentro de cajas Petri (100 x 15 mm) que contenían papel filtro estéril de nueve centímetros de diámetro, remojado con agua estéril. Usando una aguja de disección, se realizó una punción en la hoja y se colocó pedazos de agar de la zona de crecimiento activo de cultivos de las cepas (2.4.2.2). Se ubicaron los pedazos sobre la hoja punzada y sobre la hoja no lastimada, el espacio entre los pedazos fue de dos centímetros (Figura 8). En los controles se puso medio no inoculado. Finalmente las cajas fueron ubicadas en una cámara de crecimiento a 25°C, 12 h fotoperiodo por cuatro días.

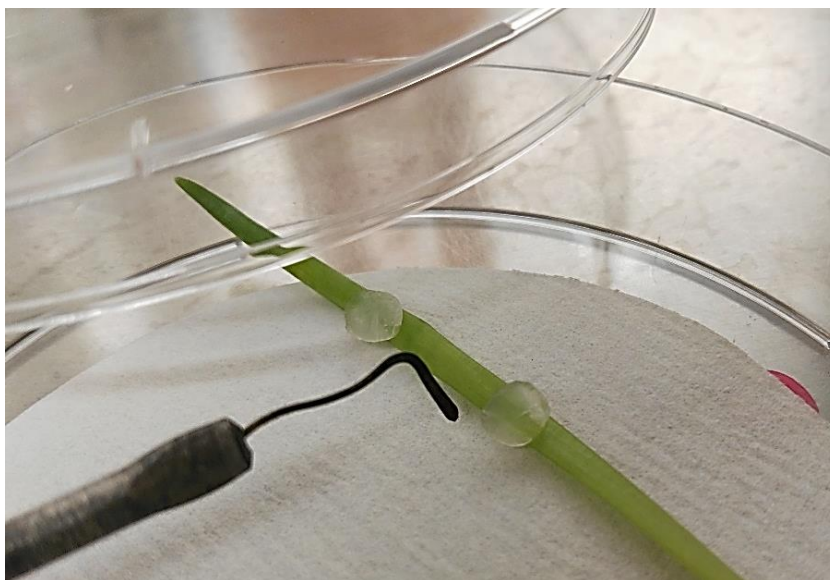


Figura 8. Inoculación de hoja con pedazos de agar del cultivo de A1WT.

Se observa una hoja de cebolla con dos pedazos de agar provenientes de la zona de crecimiento activo de un cultivo de A1WT, se muestra la aguja de disección empleada para realizar una herida en la hoja.

2.4.3.4 Inoculación en bulbos maduros.

Los bulbos de cebolla blanca maduros fueron adquiridos en el supermercado local, se removió su cobertura externa y se separaron sus capas/escamas medias las cuales fueron desinfectadas superficialmente con una solución de etanol al 95% por un minuto, 10% de cloro comercial (Clorox®) por 15 min y se enjuagó con agua desionizada estéril (Gei, Valdez, Piccolo, & Galmarini, 2014). Posteriormente las capas de cebolla fueron colocadas en recipientes plásticos autoclavados y parcialmente llenos con agua estéril, con el fin de mantener un ambiente húmedo. Se realizó una punción sobre el tejido y luego se colocaron pedazos de agar (2.4.2.2), sobre el sitio de punción y sobre el tejido sano, fueron incubadas a 25°C por cuatro días.



Figura 9. Parte de un bulbo de cebolla inoculado con pedazos de agar.

Se muestra una escama proveniente de un bulbo de cebolla maduro y dos pedazos de agar con el hongo sobre su superficie.

2.4.4 Observación con microscopía epifluorescente.

Para la observación se empleó microscopía epifluorescente. Se usó el microscopio Nikon Eclipse E800 equipado con una lámpara de vapor de mercurio empleando los filtros UV-2E/C DAPI, GFP-3535B y G-2E/C TRITC. A través de los filtros se capturaron imágenes monocromáticas empleando una cámara Qimaging Retiga 2000R CCD, luego fueron coloreadas artificialmente y combinadas sobre una imagen tomada en campo claro empleando el software QCapture Pro versión 7 (Figura 10) (Flores, Marek, Anderson, Mitchell, & Walker, 2015).

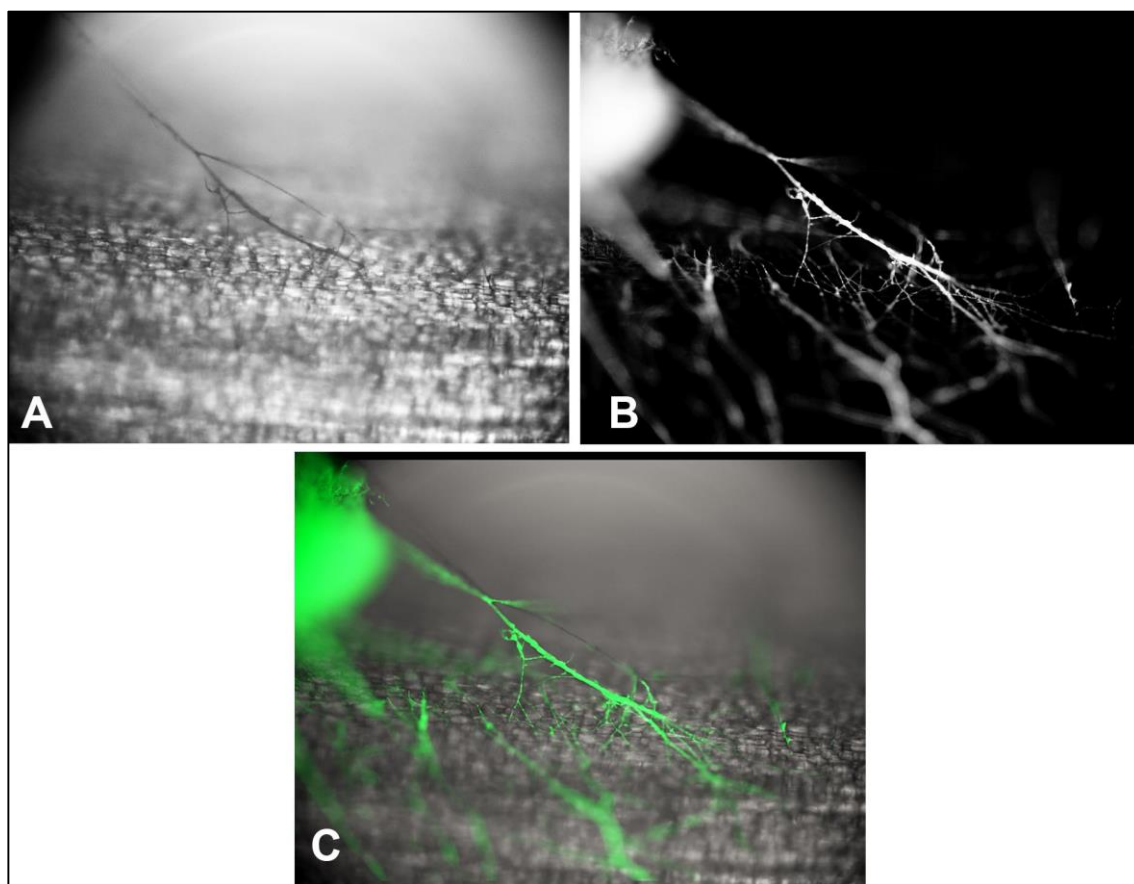


Figura 10. Ejemplo del procesamiento de las imágenes capturadas.

Se muestra un ejemplo del procesamiento aplicado para las imágenes. Imagen tomada en campo claro (A), imagen empleando el filtro GFP (B), combinación de A y B coloreada empleando el software QCapture Pro versión 7 (C).

Se efectuaron observaciones superficiales e internas de los tejidos, para lo cual fueron diseccionados. A continuación se detalla el procedimiento seguido para cada tejido.

2.4.4.1 Cortes de semillas y plántulas.

Se cortaron semillas transversalmente por su lado más corto (Figura 11) para observar la testa, el endospermo y el embrión siete días después de la inoculación.

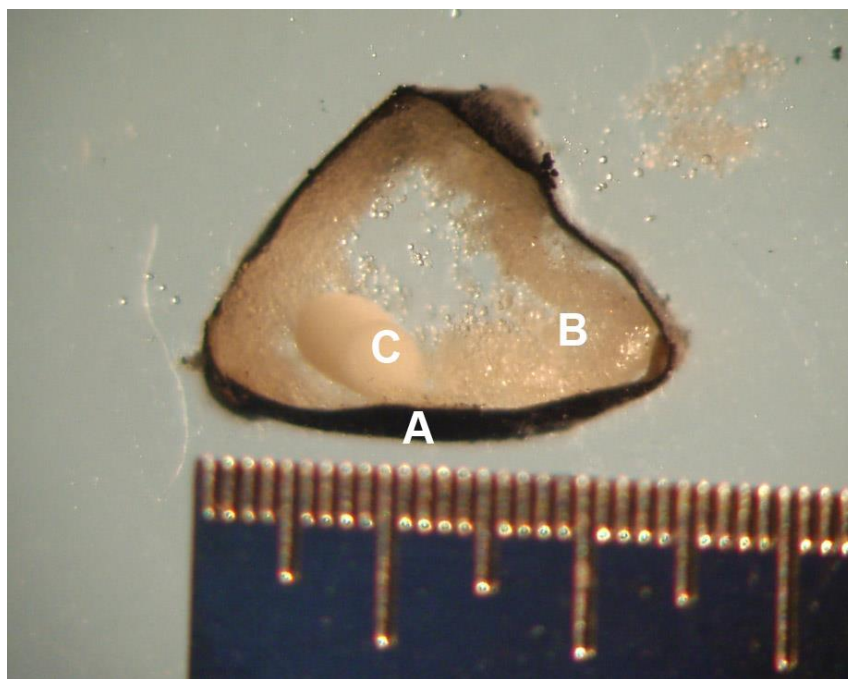


Figura 11. Corte transversal que detalla las partes de una semilla de cebolla blanca.

Corte transversal de una semilla de cebolla, se observa la testa (A), el endospermo (B) y parte del embrión (C).

Tras 20 días, las plántulas que no mostraron necrosis severa fueron colocadas en cajas Petri (100 x 15 mm), luego usando una cuchilla de afeitar, se cortó transversalmente segmentos cada tres milímetros empezando por la punta de la raíz. La región correspondiente al primordio de hoja fue cortada transversalmente por la mitad despreciando el patrón de tres milímetros para observar su estructura interna (Figura 12).

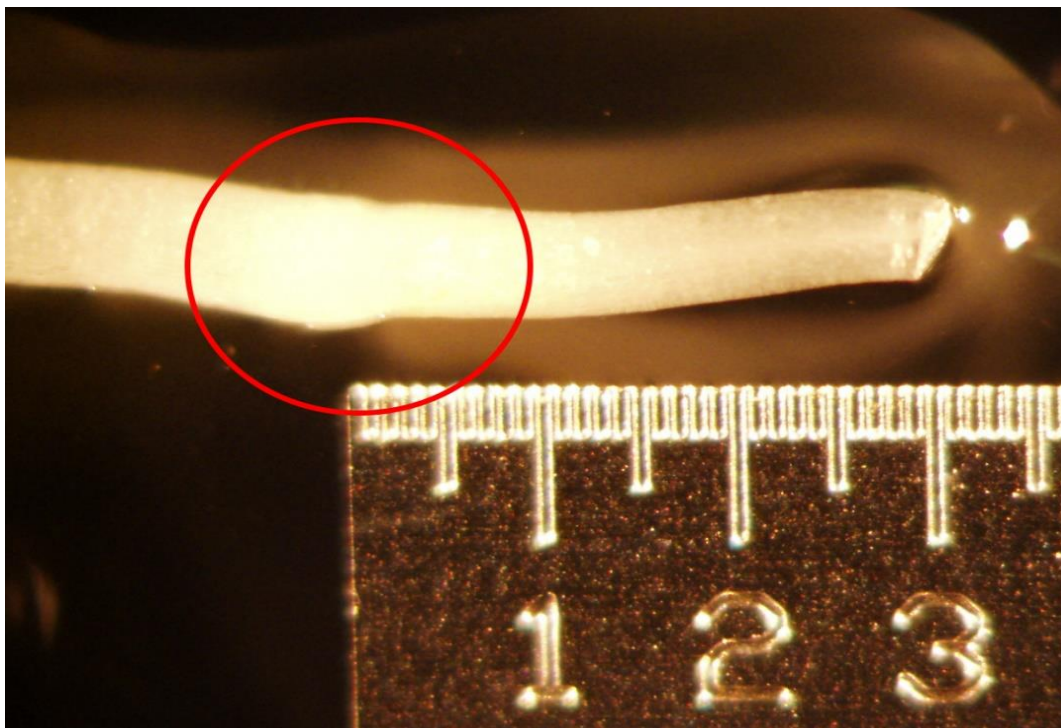


Figura 12. Corte transversal en la raíz y región del primordio de hoja.

Se observa un corte transversal hecho tres milímetros a partir de la punta de una raíz de una plántula de cebolla. La circunferencia roja muestra la zona en dónde se encuentra el primordio de hoja, identificado como una protuberancia al inicio de la raíz de la plántula (Hoffman, 1993).

Los segmentos obtenidos fueron montados en agua para evitar su deshidratación e inmediatamente observados en el microscopio.

2.4.4.2 Cortes de raíces provenientes de bulbos.

Para evaluar la colonización superficial de las raíces, estas fueron removidas del bulbo, enjuagadas con agua estéril y colocadas en un porta objetos. Con el fin de analizar la colonización interna, se realizaron cortes transversales como en la anterior sección (2.4.4.1) con la diferencia de que se lo hizo en tres partes: a tres milímetros de la punta de la raíz, en la mitad de su extensión longitudinal y en el extremo opuesto a la punta de la raíz. Los cortes obtenidos fueron montados en agua y observados en el microscopio.



Figura 13. Raíces de bulbos de cebolla perla 3 días después de la inoculación con A1WT.

Se observan raíces de cebolla 3ddi con A1WT, sembradas en perlita. Para su observación las raíces fueron cortadas en su base y enjuagadas con agua estéril.

2.4.4.3 Cortes de hojas.

Se removió el pedazo de agar y luego se observaron superficialmente el haz y envés de la zona inoculada (con o sin punción). Para la el examen interno se hicieron cortes transversales de la hoja, estos fueron montados en agua y observados al microscopio (Figura 14).

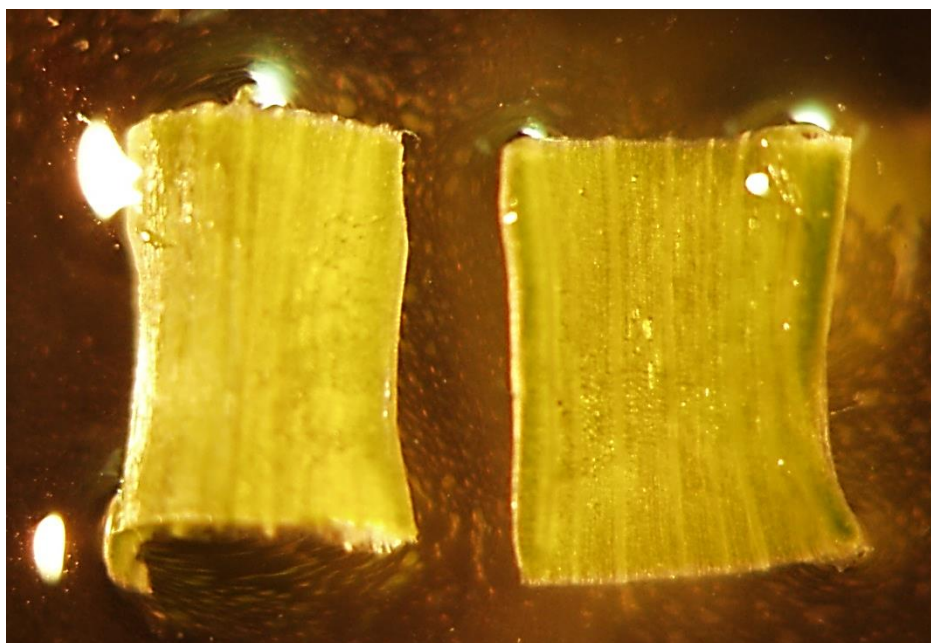


Figura 14. Haz y envés de una hoja de cebolla inoculada con A1WT.

De izquierda a derecha se observan el haz y envés de una hoja inoculada, ambas superficies fueron vistas al microscopio para evaluar la colonización superficial del hongo.

2.4.4.4 Cortes de bulbos maduros.

Las escamas de bulbos inoculadas fueron observadas superficialmente (haz y envés) e internamente mediante cortes transversales en sentido paralelo y perpendicular a sus haces vasculares, los cortes se efectuaron en la zona inoculada con o sin punción, cuatro días después de su inoculación.

2.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico.

Con el fin de evaluar si existe diferencia en la facultad de inhibir la germinación de las semillas por parte de las cepas transformadas y del tipo salvaje, se observaron diariamente las semillas y se registró su día de germinación. Se plantaron 15 semillas (repeticiones) por tratamiento, los factores empleados fueron: cepa empleada (A1R1-42, A1G4-23, A1WT, A7R8, A7G32, A7WT) y concentración de esporas del inóculo (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 esporas ml^{-1}) lo que resultó en un diseño 6x3 con un total de 270 muestras.

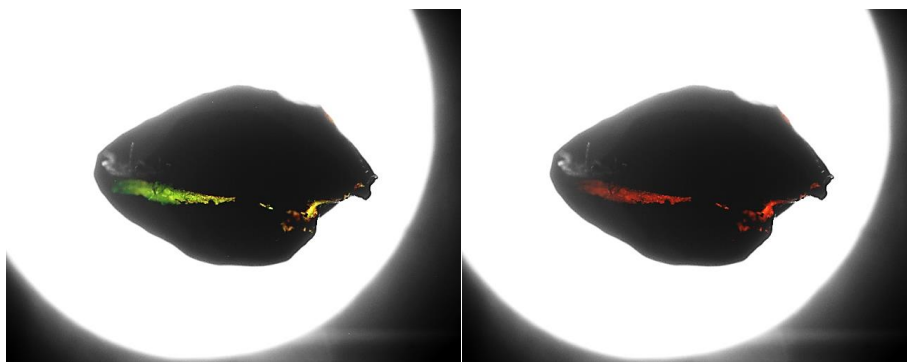
Debido a que la variable de respuesta (día de germinación) es una variable discreta que no tiene una distribución normal (Gutierrez & De la Vara, 2008), se aplicó el análisis de la varianza (ANAVA) propuesto por Kruskal y Wallis con comparación de a pares. Se usó el software estadístico Infostat®.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Observación de semillas y plántulas.

3.1.1 Semillas.

En el estudio primeramente se observaron los tejidos que no fueron inoculados (blanco) para identificar la presencia de auto fluorescencia y no confundirla con la emitida por las proteínas reporteras del hongo. En semillas, la testa no presentó auto fluorescencia sin embargo el endospermo exhibió colores verde y rojo (*Figura 1Figura 15*).**Auto**



fluorescencia de la semilla de cebolla

Figura 15. Auto fluorescencia de la semilla de cebolla.

Observación de auto fluorescencia verde (izquierda) y roja (derecha) en una semilla de cebolla.

Al observar las semillas al tercer día después de la inoculación se encontraron pocas hifas del hongo sobre la testa, a partir del séptimo día se evidenció que el hongo presentaba mayor colonización en la zona del hilo y sobre la raíz de las semillas que germinaron (*Figura 16A, B*), en este tiempo el hongo colonizó las aberturas de la testa, producidas por la absorción de agua y por la emergencia de la raíz (*Figura 16C*). A continuación comenzó la colonización del interior de la semilla, se observaron hifas entre el espacio inter celular del endospermo, a su alrededor (*Figura 16D*) y creciendo entre y sobre las células del embrión (*Figura 16E*). A partir de 14 ddi la colonización del exterior e interior fue completa (*Figura 16F*) y hubo pudrición del tejido. Tanto *F. proliferatum* como *F. oxysporum* presentaron el mismo comportamiento.

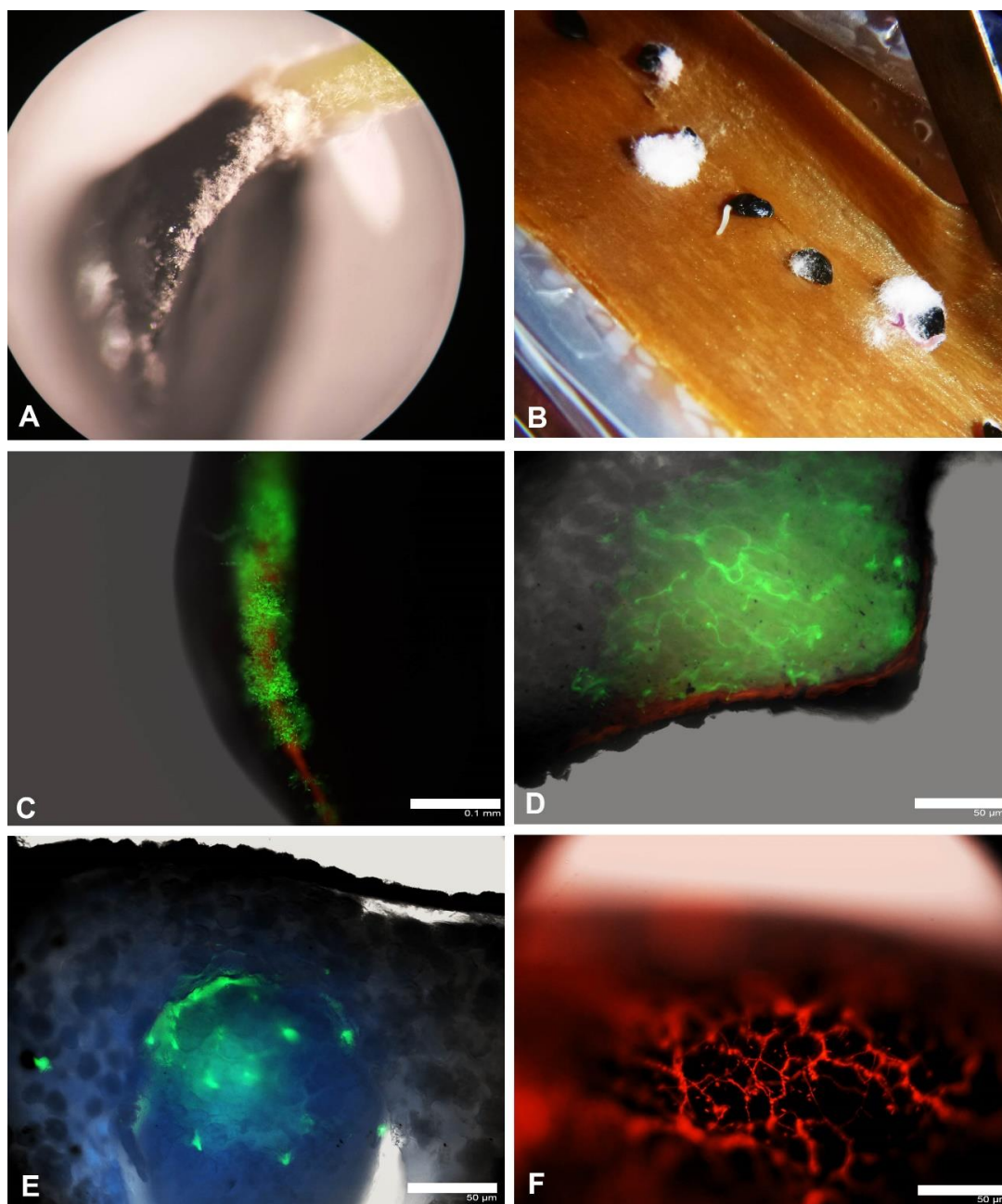


Figura 16. Observaciones de semillas inoculadas con *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

Se observa crecimiento de A7G32 3 ddi en la zona del hilo de una semilla germinada (A). Crecimiento masivo de A1WT sobre semillas en papel filtro (B). Crecimiento de A7G32 sobre una apertura en la testa 7 ddi (C). Hifas de A7G32 en el endospermo (D), en el embrión (E). Crecimiento masivo de A7R8, 14 ddi sobre la testa de la semilla (F).

3.1.2 Plántulas.

Se observaron las plántulas en busca de colonización del hongo, a simple vista, hubo más crecimiento sobre las raíces (Figura 17C) que sobre el cotiledón. El sitio de inoculación (testa), todavía no desprendido del cotiledón emergente, fue colonizado intensamente por el hongo (Figura 17B), en plántulas no inoculadas, el cotiledón se desarrolló normalmente hasta que emergieron las primeras hojas foliares (Figura 17A). Las plántulas que fueron totalmente colonizadas murieron y tomaron una coloración entre violeta a parda (Figura 17D). Las observaciones no difieren entre las dos especies de hongos utilizadas.

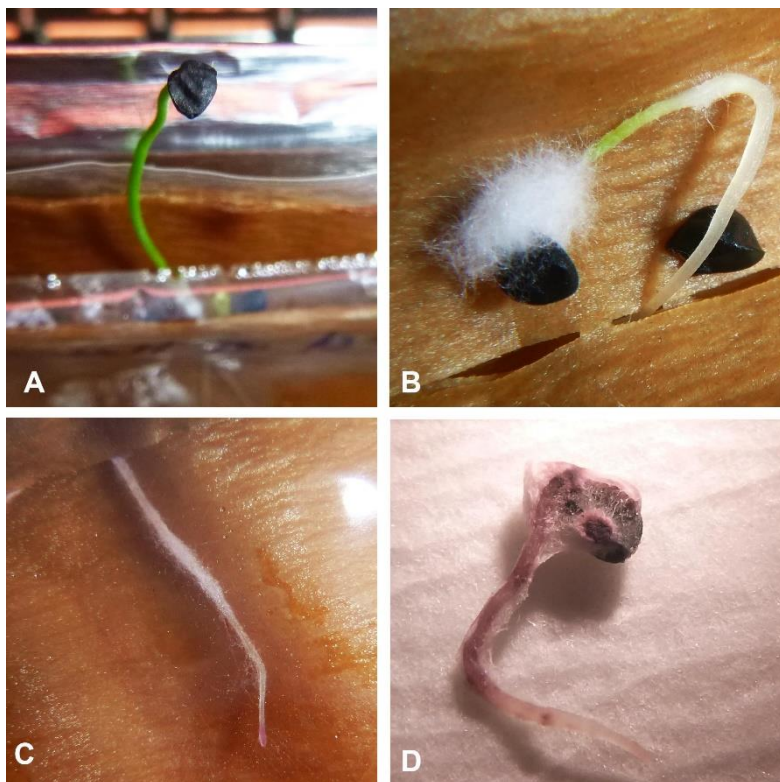


Figura 17. Observaciones de plántulas inoculadas con *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

Plántula sin inocular creciendo en papel germinativo (A). Crecimiento masivo de A1WT sobre la testa en una plántula en desarrollo (B). Colonización de A1WT presente en la radícula (C). Plántula completamente colonizada por A7G32 y muerta (D).

Se procedió a diseccionar las plántulas para ser observadas en el microscopio de fluorescencia; los cortes transversales fueron inmediatamente montados en agua (Figura 19A) con el fin de evitar la desecación del tejido. Se examinó el tejido no inoculado y se encontró auto fluorescencia de la epidermis y del cilindro vascular central (Figura 19B), al igual que del tejido verde parenquimático del cotiledón (Figura 18B). Pasados más de 14 ddi, el hongo colonizó levemente el cotiledón de forma superficial y no penetró en tejido alguno (Figura 18A, B).

Al observar raíces de plántulas que no fueron severamente infectadas, 14 días después de la germinación, se notó que el hongo colonizó más intensa y rápidamente el exterior de las raíces y no su interior, su crecimiento tuvo prevalencia longitudinal por lo que se esparció a lo largo del tejido (Figura 19C, D).

Las raíces de plántulas evaluadas alrededor de 20 ddi tuvieron crecimiento interno del hongo, este inició en la epidermis hasta penetrar en el parénquima cortical y esparcirse aparentemente alrededor de sus células, no se presencié la formación de apresorio (Figura 19E). A los 26 ddi se advirtió que el hongo colonizó el cilindro vascular central y que los tejidos infectados presentaron auto fluorescencia (Figura 19F). A este tiempo las plántulas murieron, sus tejidos se tornaron muy suaves y tomaron coloración violeta oscura. Las observaciones no variaron entre *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

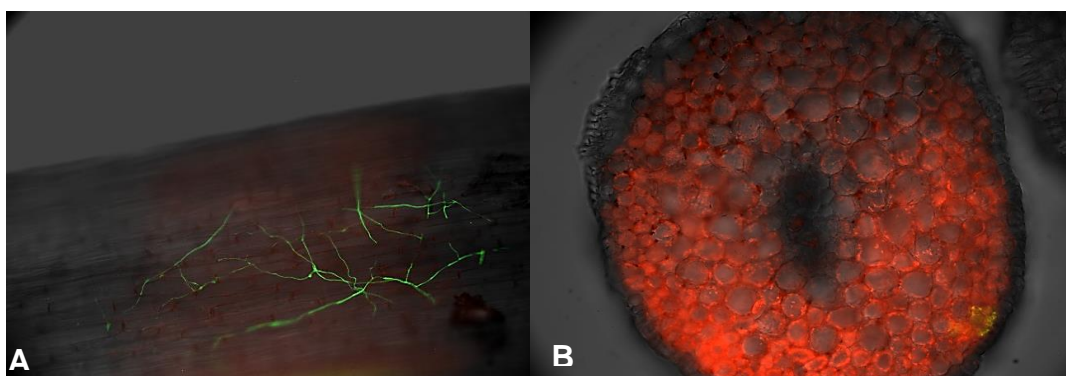


Figura 18. Observaciones de la colonización de A1G4-2 en el cotiledón.

Colonización de A1G4-2 sobre el cotiledón de una plántula 14 ddi (A). Corte transversal (20x) del cotiledón inoculado con A1G4-2, no se observa colonización interna del tejido, el brillo se debe a la auto fluorescencia del tejido vegetal, vista con el filtro Endow GFP Longpass Emission (usado únicamente para esta toma) (B).

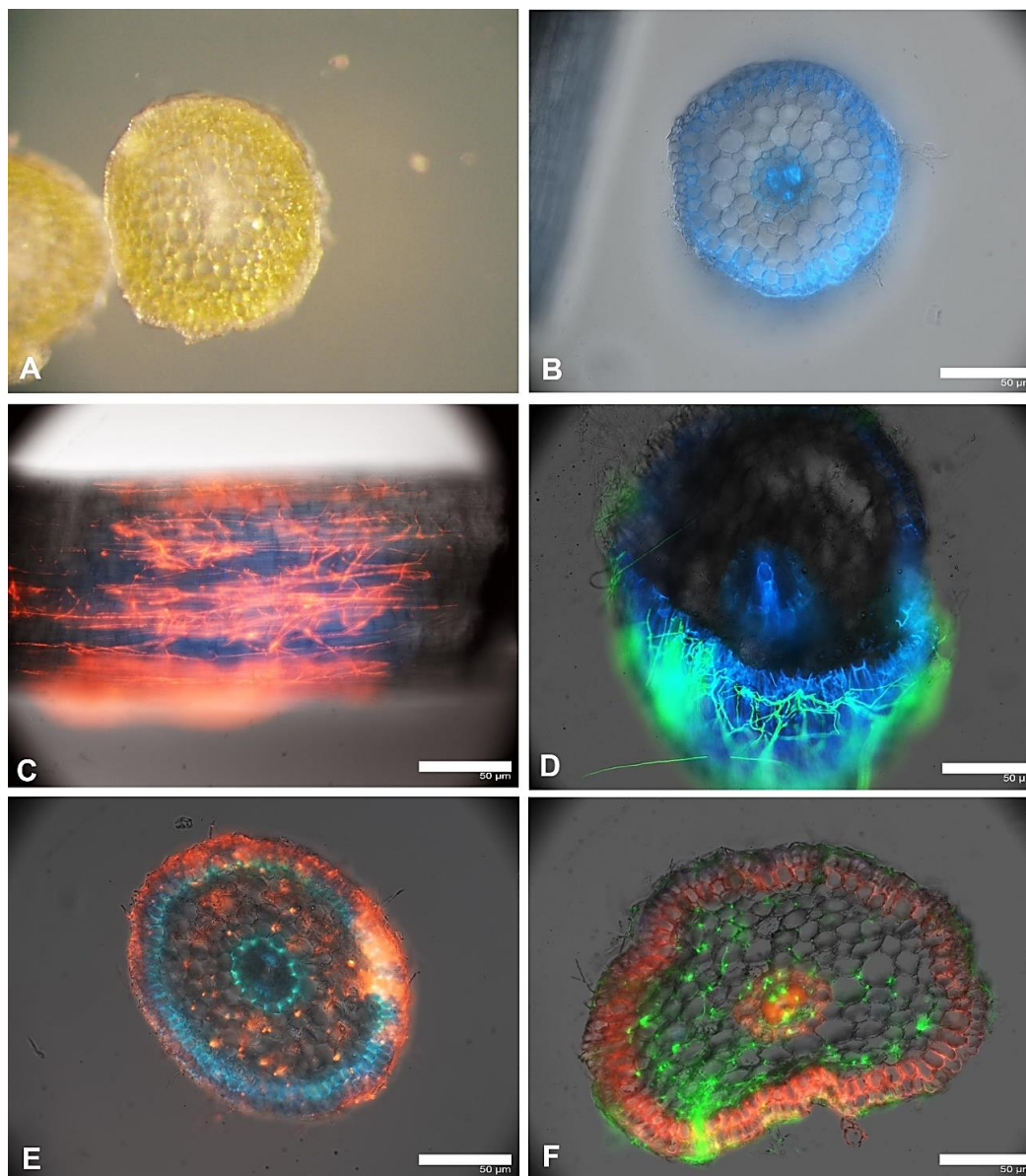


Figura 19. Observaciones de cortes de plántulas inoculadas con *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

Fino corte transversal del cotiledón de una plántula montado en agua y visto en campo claro 10x (A). Auto fluorescencia de tejidos presente en la epidermis y en el cilindro vascular central (B). Plántulas de 14 días de edad, en rojo se nota la colonización superficial de su radícula por A7R8, obsérvese la tendencia longitudinal del crecimiento (C), colonización superficial 14ddi de A1G4-2, el parénquima cortical está libre del hongo (D). Raíz de plántula 20 ddi, colonización intercelular del parénquima cortical por A7R8, nótese que el cilindro vascular está libre del hongo (E). Colonización del cilindro vascular central de la raíz por A7G32, 26 ddi (F).

Al examinar plántulas de 14 días de edad en la región correspondiente al primordio de hoja (Figura 12) se observó mayor crecimiento superficial del hongo en esta región que en zonas adyacentes. Los cortes transversales revelaron colonización del espacio entre la epidermis del primordio de hoja y el córtex cotiledonar, no se detectó invasión de tejidos (Figura 20B). Las cortes de plántulas a los 20 ddi, mostraron intensa colonización en la cavidad dentro del cotiledón (Figura 20C), y se advirtió intensa fluorescencia del primordio de hoja, posiblemente debido a la colonización del hongo (Figura 20D).

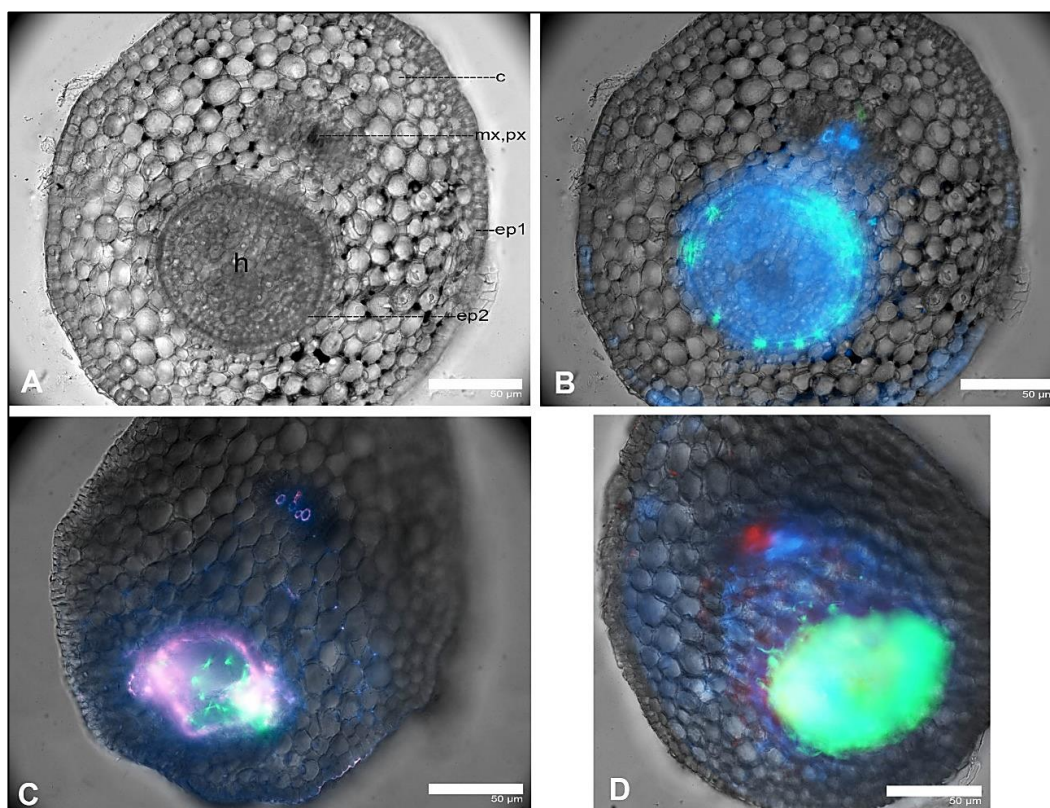


Figura 20. Observación 14 y 20 ddi de cortes del primordio de hoja de plántulas inoculadas con A1G4-2.

Corte transversal del cotiledón en la zona del primordio de hoja de una plántula de 14 días de edad, visto en campo claro, se señalan sus partes según Hoffman (1993): *c*, córtex; *mx*, metaxilema; *px*, protoxilema; *ep1*, epidermis del cotiledón; *ep2*, epidermis del primordio de hoja; *h*, primordio de hoja (A). Composición de color de la misma imagen, se detectó fluorescencia del hongo alrededor de *ep2* (B). Observaciones 20 ddi de la misma región, se advierte colonización de la cavidad del primordio de hoja (C), la existencia de intensa fluorescencia demuestra colonización del primordio de hoja (D). En todas las observaciones: el córtex (*c*), la epidermis del cotiledón (*ep1*), el protoxilema (*px*) y el metaxilema (*mx*) estuvieron libres del hongo.

3.2 Observación de raíces provenientes de bulbos.

Las raíces de bulbos sembrados en perlita fueron examinadas a los tres, siete y 15 días después de ser inoculadas. Los síntomas entre sepas fueron similares por lo que se describió solo fotos representativas (Figura 21). Se encontró síntomas desde la primera observación y crecimiento algodonoso del hongo sobre la raíz (Figura 21A), a los siete días las raíces tomaron una coloración púrpura y estuvieron recubiertas de una sustancia viscosa (Figura 21B), 15 ddi las raíces se tornaron púrpura oscuro hasta llegar a negro, se desprendieron fácilmente del bulbo, el cual también empezó a descomponerse y emitió olor de pudrición (Figura 21C). Los bulbos que no fueron inoculados se desarrollaron normalmente hasta la última observación a los 15 días (Figura 21D). La sintomatología de la raíz fue similar en los dos hongos.

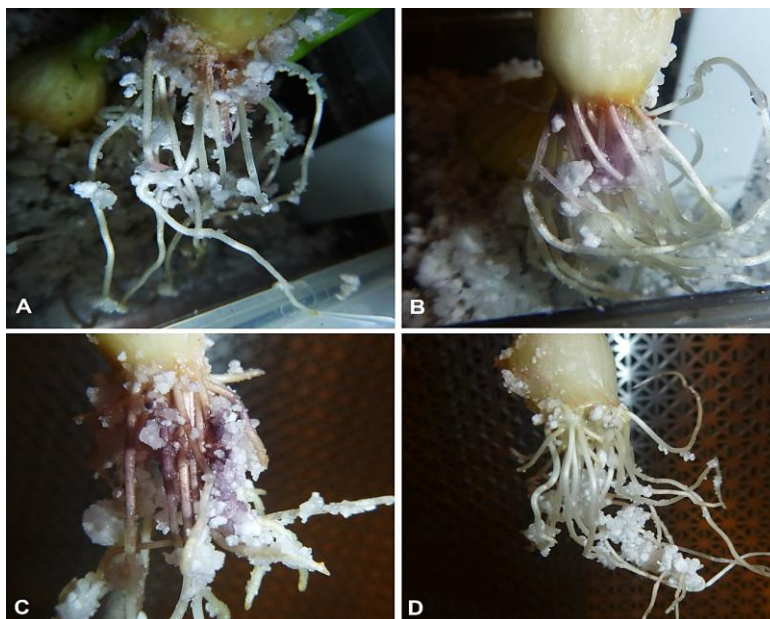


Figura 21. Observaciones a los 3, 7 y 15 ddi con *F. proliferatum* y *F. oxysporum* de raíces provenientes de bulbos.

Las raíces presentan colonización a los 3 ddi con A1WT, hay crecimiento algodonoso y ellas se tornaron ligeramente moradas (A). Coloración púrpura de las raíces inoculadas, 7ddi de A7R8 (B). A los 15 ddi de A7G32, las raíces se desprenden fácilmente del bulbo, se observó necrosis y coloración parda (C). Raíces de 15 días, no inoculadas, asintomáticas y de coloración blanca (D).

Las observaciones en el microscopio de fluorescencia de los tejidos revelaron que a los tres ddi, las esporas del hongo comenzaron a germinar sobre la superficie de la raíz y a crecer a lo largo de esta (Figura 22B), el hongo colonizó externamente las raíces y se formaron redes de hifas (Figura 22A). Siete ddi el hongo penetró en células de la epidermis e invadió el córtex (Figura 22D), la observación longitudinal de la raíz (Figura 22C) mostró que *F. proliferatum* produjo clamidosporas (flecha) y se encontró grandes agrupaciones de macroconidias posiblemente en un esporodoquio (*) que se extendía internamente y a lo largo de la raíz. Además se notaron hifas circinadas (enrolladas). En algunas raíces a los 15 ddi todavía no se evidenciaba infección del parénquima cortical ni del cilindro vascular central (Figura 22E), sin embargo en raíces que mostraron deterioro en su estructura, hinchamiento y coloración morada, la colonización del hongo fue total, abundante en el exterior y en menor grado al adentrarse en el tejido (Figura 22F).

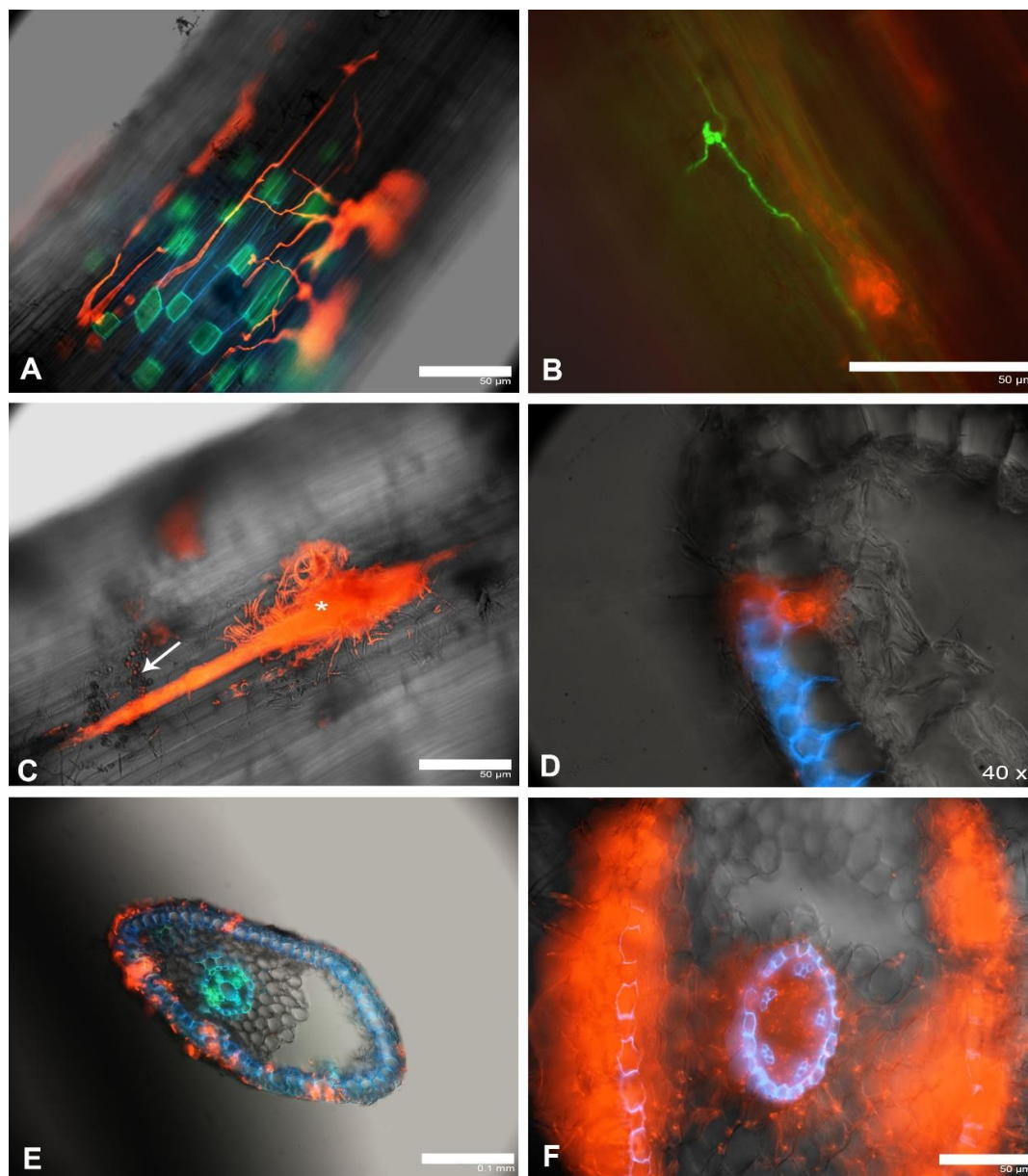


Figura 22. Observaciones a los 3, 7 y 15 ddi de cortes de raíces provenientes de bulbos, inoculadas con *F. proliferatum*, *F. oxysporum*.

Se observa crecimiento longitudinal de redes de hifas de A7R8 sobre raíz, 3ddi (A). Germinación de una agrupación de esporas de A1G4-2 sobre la superficie de la raíz, 3ddi (B). Vista de una sección longitudinal de raíz a los siete ddi con A1R1-4, se observa: intensa colonización que se extiende interna y longitudinalmente en la raíz, clamidosporas (flecha), macroconidias e hifas enrolladas (*) (C). Invasión de células epidérmicas de auto fluorescencia azul por A1R1-4, siete ddi (D). Observaciones a los 15 ddi: infección de epidermis por A1R1-4, el córtex y el cilindro vascular están libres del hongo (E); infección total de A7R8 desde la epidermis hacia el córtex y finalmente en el cilindro vascular central (F).

3.3 Observación de hojas.

Cuatro días después de la inoculación, el pedazo de agar y la superficie de la hoja fueron completamente colonizados, el crecimiento fue notorio a simple vista y también bajo el estereomicroscopio (Figura 23A), al revisar el sitio de inoculación, se encontró que la colonización fue total sobre la superficie de la hoja sin importar si se efectuó o no daño sobre esta (Figura 23B). El hongo pudo o no penetrar en los estomas (▲) ubicados en la superficie de la hoja (Figura 23B, E), cuando hubo penetración del estoma, el hongo comenzó a esparcirse internamente a su alrededor (Figura 23E).

Observaciones de la cara interna de la hoja que no fue perforada demostraron ausencia de crecimiento del hongo (Figura 23F), mientras que en hojas perforadas el crecimiento tuvo prevalencia longitudinal, siguiendo el sentido de los haces vasculares (*) (Figura 23C). De igual forma se encontró crecimiento en la cara interior de los cortes transversales de la hoja y en el tejido parenquimatoso. Los haces vasculares no fueron infectados (flecha) (Figura 23D). No se observaron estructuras especializadas del hongo para la invasión de tejidos. No hubo diferencias notorias en el comportamiento de *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

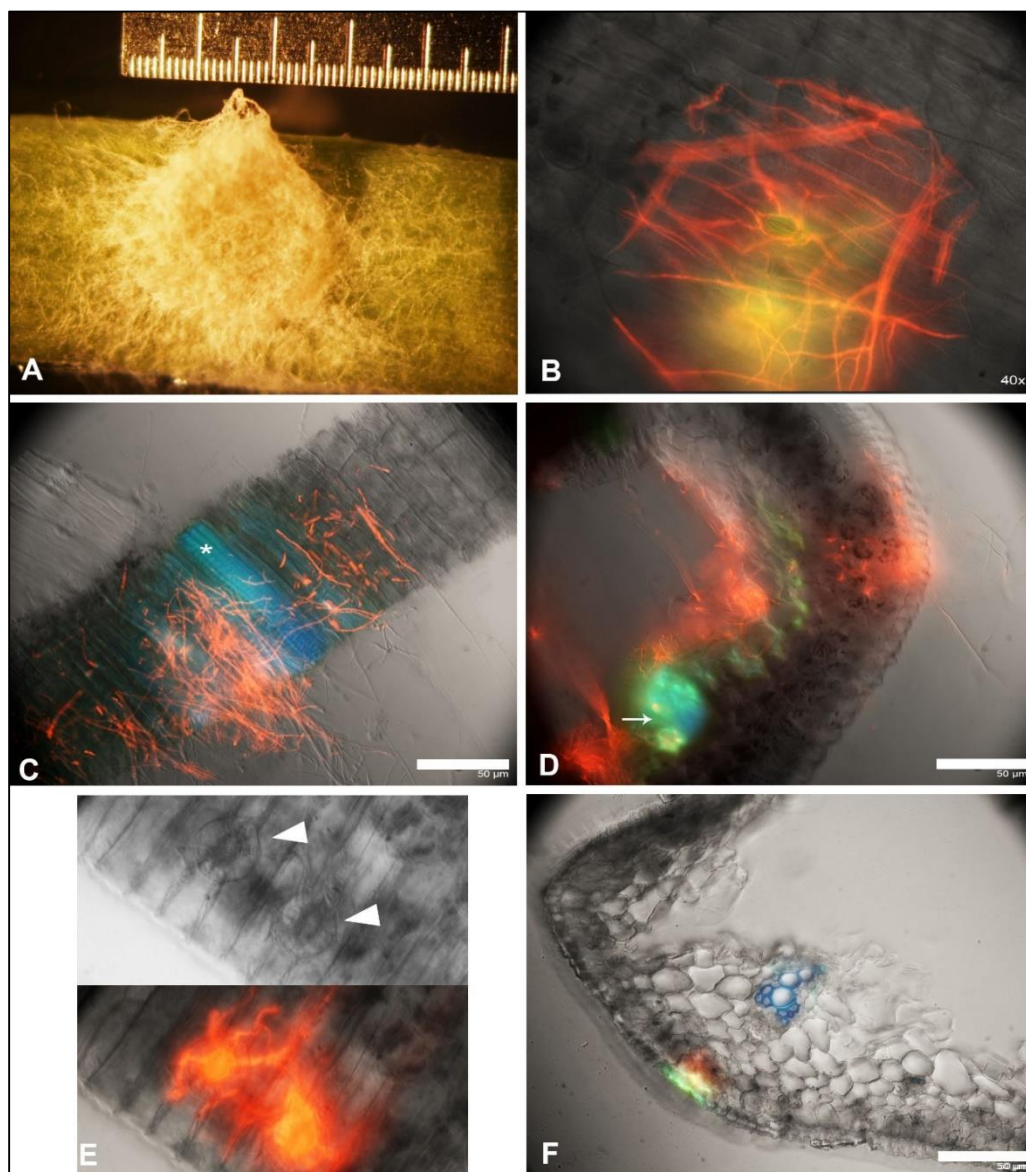


Figura 23. Observaciones a los 4 ddi de cortes de hojas inoculadas con *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

A los 4 ddi en hojas se evidenció que el pedazo de agar y la superficie de la hoja fueron colonizadas totalmente (A), A1R1-4 sobre la superficie de la hoja, nótese que el estoma no fue invadido por el hongo (B). Vista longitudinal de la cara interna de la hoja, se observa auto fluorescencia azul del haz vascular (*) y abundante colonización de A7R8 (rojo) (C). Corte transversal de hoja que presenta colonización en la cara interna y del parénquima por A7R8, el haz vascular (flecha) no fue colonizado (D). Invasión de estomas (▲) por A7R8 (E). Ausencia de colonización en la cara interna de hojas que no fueron dañadas por la punción, se observa el haz vascular en azul (F).

3.4 Observación de escamas de bulbos.

Por último se observaron las escamas provenientes de bulbos maduros, inoculados con o sin punción. A simple vista se encontró crecimiento algodonoso del hongo sobre y alrededor del pedazo de agar en ambos sitios inoculados (Figura 24).



Figura 24. Escama proveniente de un bulbo de cebolla, inoculada con pedazos de agar.

Se observa una escama de un bulbo de cebolla, se visualizan dos sitios de inoculación (con y sin daño). A simple vista, existe crecimiento algodonoso de A1WT sobre los pedazos de agar.

Las observaciones de la zona que no fue lastimada mostraron que el hongo colonizó la superficie de la escama sin invadir su interior (Figura 25A), asimismo no hubo colonización de la cara interna de la escama (Figura 25B). Los cortes transversales del sitio de punción (*) mostraron severa colonización del hongo a lo largo del espacio dejado por la aguja de disección, se observa auto fluorescencia (Figura 25C). En este caso hubo amplia colonización de la cara inferior de la escama (Figura 25E). Los cortes transversales en sentido perpendicular a los haces vasculares mostraron que hubo colonización del espacio inter celular del tejido (Figura 25D), de igual forma se evidenció crecimiento al observar cortes paralelos (Figura 25F). A este tiempo de observación, no se evidenció infección de las células por *F. oxysporum* ni por *F. proliferatum*.

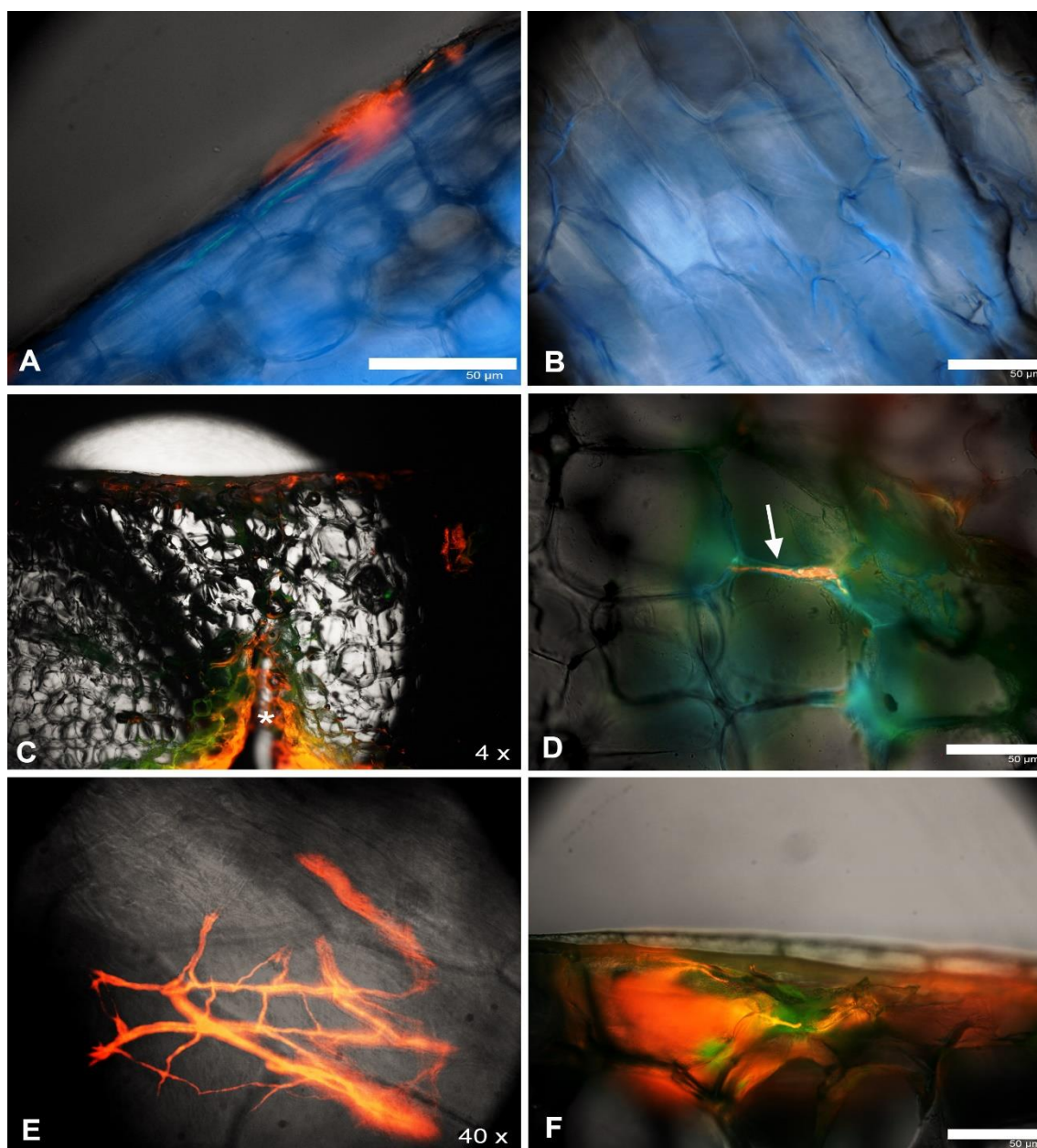


Figura 25. Observaciones de cortes de escamas de bulbos inoculadas con *F. proliferatum* y *F. oxysporum*.

Observaciones a los 4 ddi de escamas de bulbos. Corte transversal que muestra a A1R1-4 colonizando solamente la superficie de una escama no punzada (A), la cara interior de escamas que no fueron dañadas estuvieron libres del hongo (B). Colonización de A7R8 en la zona que fue dañada por la punción (*), se observa colonización en la cara externa e interna de la escama (C). Corte transversal que muestra crecimiento de A1R1-4 en el espacio intercelular de una escama dañada (D). Colonización de A7R8 sobre la cara interior de una escama punzada (E). Crecimiento intercelular de A1R1-4 en un corte transversal de una escama punzada (F).

3.5 Prueba estadística (ANOVA).

Con los datos obtenidos (Anexo 1) se efectuó la prueba de Kruskal Wallis con comparación de a pares entre las medias de los tratamientos. La hipótesis nula de la prueba dice que no existe diferencia entre las medias μ , es decir que las muestras vienen de poblaciones similares. Se tomó un valor p de 0.05.

$H_0 =$ no existe diferencia significativa entre las medias

$H_A =$ existe al menos un par con diferencia significativa entre sus medias

Se realizaron dos pruebas, una para las cepas de *F. Oxysporum* y otra para las de *F. Proliferatum*. Del software se obtuvieron los siguientes resultados:

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Cepa	Concentración	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Días	AlG4-2	10000	15	6.40	6.48	6.00	8.50	0.3076
Días	AlG4-2	100000	15	6.07	5.71	5.00		
Días	AlG4-2	1000000	15	6.87	7.32	6.00		
Días	AlR1-4	10000	15	4.73	5.89	3.00		
Días	AlR1-4	100000	15	2.93	3.45	3.00		
Días	AlR1-4	1000000	15	5.73	6.41	4.00		
Días	Alwt	10000	15	4.40	5.55	0.00		
Días	Alwt	100000	15	1.87	3.40	0.00		
Días	Alwt	1000000	15	5.80	4.74	6.00		

Figura 26. Resultados de la prueba estadística de Kruskal Wallis para *F. oxysporum*

Se obtuvo un valor $p = 0.3076$, por lo tanto se acepta H_0 : no existe diferencia significativa entre las medias.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Cepa	Concentración	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Días	A7G32	10000	15	4.07	5.28	3.00	5.43	0.5364
Días	A7G32	100000	15	3.53	5.72	0.00		
Días	A7G32	1000000	15	5.13	7.72	0.00		
Días	A7R8	10000	15	5.00	7.22	0.00		
Días	A7R8	100000	15	5.67	7.49	0.00		
Días	A7R8	1000000	15	2.53	5.54	0.00		
Días	A7wt	10000	15	6.20	6.95	3.00		
Días	A7wt	100000	15	1.80	4.38	0.00		
Días	A7wt	1000000	15	3.07	4.33	0.00		

Figura 27. Resultados de la prueba estadística de Kruskal Wallis para *F. proliferatum*

Se obtuvo un valor $p = 0.5364$, por lo tanto se acepta H_0 : no existe diferencia significativa entre las medias.

Se consideraron diferencias significativas a los valores cuyo p fue menor que 0.05; los valores p de las pruebas para *F. oxysporum* (0.3076) y de *F. proliferatum* (0.5364) no satisficieron la condición ($p < 0.05$) y por lo tanto se aceptó la hipótesis nula (H_0), es decir que no existen diferencias significativa entre las tres cepas (transformada con gfp, tdTomato y tipo salvaje) a las concentraciones probadas en las cepas de *F. oxysporum* (A1) y en las cepas de *F. proliferatum* (A7).

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Gracias a la transformación con proteínas reporteras de hongos filamentosos patógenos de plantas se puede observar su interacción con tejidos vivos sin ningún procesamiento de la muestra, lo cual facilita la evaluación del desarrollo fúngico en la planta de forma no destructiva (Lorang, y otros, 2001; Larrainzar, O´Gara, & Morrissey, 2005).

Tanto *F. oxysporum* como *F. proliferatum* presentaron fluorescencia uniforme en esporas e hifas, esto demuestra la expresión abundante de *gfp* y *tdTomato* en el citoplasma celular, lo cual concuerda con Wu et al. (2016) en donde se expresó uniformemente los genes reporteros *gfp* y *DsRed* en *Fusarium verticillioides*. En otros estudios (Spellig, Bottin, & Kahmann, 1996; Maor, Puyesky, Horwitz, & Sharon, 1998) y en el presente, no se observó efecto de la transformación en el crecimiento del hongo o en su capacidad infectiva.

El análisis estadístico empleado, comparó el efecto de la transformación sobre la capacidad del hongo para inhibir la germinación y demostró que no existen diferencias significativas entre las cepas transformadas y el tipo salvaje, lo que concuerda con otros estudios en donde se transformó hongos filamentosos sin inhibir su infectividad (Li, et al., 2011; Skadsen & Hohn, 2004; Lagopodi, et al., 2002; Miller, Chabot, Ouellet, Harris, & Fedak, 2004; Oren, Ezrati, Cohen, & Sharon, 2003). Los valores *p* para *F. oxysporum* y *F. proliferatum* fueron de $p=0.3076$ y $p=0.5364$ respectivamente.

La auto fluorescencia observada en tejidos necróticos, lesionados e infectados de cebolla puede deberse a: compuestos fenólicos que fluorescen de color verde en el mismo rango que *gfp*, constituyentes similares a la lignina y a otros compuestos como antocianinas en sitios colonizados por el hongo (Brammall & Higgins, 1988), sin embargo dicha auto fluorescencia no interfirió en las observaciones epifluorescente del hongo lo que concuerda con Lorang et al. (2001) y Spellig et al. (1996). Aunque no hubo interferencia relevante, las cepas A1R1-4 y A7R8 con fluorescencia roja presentaron más utilidad que la verde de *gfp* en A1G4-2 y A7G32, por no confundirse con los tejidos necróticos.

En varias imágenes (Figuras: 16D, E; 20B; 22D, F; 23D, E; 25A, C, F) se observa fluorescencia dispersa que se debe a la naturaleza refractaria y a las propiedades dispersantes de luz de las paredes celulares vegetales (Haseloff & Amos, 1995), esto dio indicios de la ubicación del hongo en relación a la pared celular.

Según Abawi & Lorbeer (1972), la germinación de semillas en suelo infectado con *F. oxysporum* provoca la muerte de plántulas emergentes que concuerda con lo observado también en *F. proliferatum*. Las semillas fueron severamente colonizadas y murieron, algunas semillas lograron germinar y fueron colonizadas totalmente en la punta de su raíz y sobre la testa cerca del hilo, luego murieron. La colonización inicial de la punta de la raíz y la posterior hinchazón de su estructura es consistente con lo observado por Upasani et al. (2016), Lagopodi (2002) y Fang et al. (2012).

En Abawi & Lorbeer (1972) se reporta que la proliferación del hongo es mayor en sustrato esterilizado y en presencia del huésped, en este estudio raíces de bulbos de cebolla perla sufrieron necrosis y colonización total 15 días después de la inoculación en sustrato estéril (Figura 22). Además las observaciones del micelio aéreo de *F. oxysporum* concuerdan con las de Agrios (2005) presentándose incoloro al inicio, luego amarillento, rosa pálido y finalmente morado (Figuras: 17, 21, 24).

Otro factor que posiblemente influyó sobre la intensidad de la proliferación del hongo en el tejido vegetal fue la alta concentración del inóculo (1×10^6 esporas ml^{-1}). Cabe resaltar que en condiciones naturales el comportamiento fúngico podría variar debido a que el potencial del inóculo es bajo (Katan, 1971).

Agrios (2005) reporta que la pudrición causada por *Fusarium* se vuelve más severa cuando las plantas están expuestas a estrés por agua excesiva, lo cual pudo haber influido en el estudio ya que las cajas magenta que contenían perlita no permitían la buena decantación del agua (Figura 6).

Abawi & Lorbeer (1972) detectaron la formación de clamidosporas en *F. oxysporum* en suelo, dichas esporas fueron encontradas en la superficie de la raíz de plántulas

sembradas en perlita. Esta fue la única diferencia visible entre *F. oxysporum* y *F. proliferatum*, que no produce clamidosporas (Leslie & Summerell, 2006).

En este estudio hubo presencia de clamidosporas y de microconidias de *F. oxysporum* sobre la epidermis radicular, lo que concuerda con las observaciones de Li et al. (2011; 2013). Luego del crecimiento superficial, las hifas penetraron directamente la epidermis radicular sin la formación de estructuras especializadas lo cual es consistente con varios estudios (Fang, Kuo, You, Finnegan, & Barbetti, 2012; Jiménez-Fernández, Landa, Kang, Jiménez-Díaz, & Navas-Cortés, 2013; Upasani, Gurjar, Kadoo, & Gupta, 2016). Una vez dentro, el crecimiento del hongo alrededor del margen celular dio indicios de crecimiento intercelular no solamente en el córtex de raíces de plántulas (Figura 19 E, F) sino también en células del embrión, endospermo de semillas (Figura 16 D, E), y de bulbos (Figura 22 F), dichos hallazgos concuerdan con lo reportado por Spellig et al. (1996) y Jiménez-Fernández et al. (2013). Mediante las técnicas de microscopía empleadas en el estudio, no se detectó la formación de aposiciones en la pared celular de las raíces (Figura 19 E, F, 22 D), lo que concuerda con los resultados de Olivian et al. (2003) en donde se reportó la formación leve de aposiciones en raíces de lino al ser expuestas a variedades patogénicas de *F. oxysporum*. Los resultados corroboran la susceptibilidad de la cebolla blanca a las cepas de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* empleadas a lo largo del estudio.

Para entender los posibles mecanismos de invasión de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* en cebolla, se observó la localización del hongo en la planta a lo largo del tiempo; se nota el siguiente patrón: el hongo se adhiere a la epidermis de la raíz (Figura 19 D), el tubo germinativo de esporas o el micelio penetra las puntas de la raíz o entra a través de heridas o en el punto de formación de raíces laterales (Figura 22 E), crece intercelularmente a través del córtex (Figura 19 E), llega a los tejidos del xilema (Figura 19 F) y se dispersa longitudinalmente a través del sistema vascular de los pseudo vástagos (Figura 22 C). Estas observaciones concuerdan con reportes previos de formas especiales de *F. oxysporum* en raíces de banana (Li, y otros, 2013), tomate (Agrios, 2005), garbanzo (Upasani, Gurjar, Kadoo, & Gupta, 2016), fresa (Fang, Kuo, You, Finnegan, & Barbetti, 2012) y en plántulas de tomate (Brammall & Higgins, 1988).

Observaciones de cortes transversales del primordio de hoja, que se encuentra entre el cotiledón y el hipocótilo de plántulas, muestran que el hongo puede colonizar el espacio comprendido entre la epidermis del primordio de hoja (*ep2*) y el córtex (*c*) (Figura 20) sin haber tenido que invadir otros tejidos, lo cual puede suceder si el hongo entra en la cavidad que alberga el primordio de hoja a través de una abertura existente en la base del cotiledón (Figura 17) descrita por Hoffman (1993). Como el hongo no taponó los haces vasculares de dichas plántulas, no hubo síntomas de enfermedad (Agrios, 2005), lo que sugiere que a los 14 y 20 ddi *F. oxysporum* pudo residir en *Allium cepa* asintóticamente, lo cual también fue reportado por Jiménez et al. (2013) y en otros huéspedes según Katan (1971) y Fassihiani (2000). Se conoce que tanto las especies patogénicas como las no patogénicas de *Fusarium* pueden penetrar las raíces pero solamente causar enfermedad cuando infectan tejidos vasculares (Olivain & Alabouvette, 1997), lo que podría sugerir que especies patogénicas de *Fusarium* emplean la ruta aquí descrita para colonizar asintóticamente plántulas de cebolla perla, permanecer latentes y luego expresar la enfermedad cuando las condiciones sean apropiadas o influir junto a otros mecanismos aún no descritos a que el patógeno sobreviva y prospere.

Al igual que en el presente estudio, se ha reportado que *Fusarium* ingresa al huésped a través de los tejidos radiculares, sin embargo se evaluó la colonización del hongo en tejido aéreo, lo cual no ha sido estudiado a profundidad (Agrios, 2005; Fang, Kuo, You, Finnegan, & Barbetti, 2012; Li, y otros, 2013; Upasani, Gurjar, Kadoo, & Gupta, 2016). En bulbos y hojas el hongo creció solo superficialmente (Figura 23 B, F; 25 A, B) con preferencia a las uniones de la pared celular epidérmica, mientras que en los tejidos mecánicamente dañados y al tiempo evaluado, el crecimiento se limitó al espacio extracelular del tejido, sin invadir tejido vascular. Comportamientos similares del hongo fueron reportados por Fang et al. (2012) donde *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* creció solamente en la epidermis de una variedad resistente de fresa y por Jiménez et al. (2013) que describió diferencias en el grado de colonización de plantas de lino resistentes a *Fusarium* patogénico. Esta ruta de colonización de tejidos aéreos fue probada experimentalmente y posiblemente sea menos satisfactoria en condiciones más secas de campo.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

En conclusión:

Las proteínas reporteras *gfp* y *tdTomato* permiten estudiar rápida y fácilmente la infección de *F. proliferatum* y *F. oxysporum* en cebolla blanca *in vivo* en condiciones experimentales de laboratorio.

Tanto el proceso de infección de *F. oxysporum* y de *F. proliferatum* ocurre de forma similar: ambas especies penetran la epidermis, atraviesan extracelularmente el córtex e invaden los tejidos vasculares internos de raíces.

Cuando la inoculación se hace en partes aéreas de la planta, el crecimiento del hongo es limitado a sus exteriores. Pero cuando se efectúa daño mecánico, el hongo crece intercelularmente.

La proteína reportera *tdTomato* resultó más conveniente para el estudio por ser más brillante y no interferir con la auto fluorescencia verde de los tejidos lesionados y necróticos.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

Investigar los mecanismos de defensa a nivel fisiológico en las raíces y partes aéreas de la cebolla perla frente a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum*.

Realizar estudios que evalúen continuamente todas las fases del desarrollo de la cebolla blanca y que simulen sus condiciones comerciales de cultivo comercial.

Emplear las técnicas de este estudio para estudiar los mecanismos de infección en huéspedes susceptibles a *Fusarium* y a otros hongos patógenos de interés económico.

CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abawi, G. (1972). Several Aspects of the Ecology and Pathology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology*, 62(8), 870.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed., Vol. 1). doi:<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Armstrong, G. M., & Armstrong, J. K. (1981). Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. (P. E. Nelson, T. A. Toussoun, & R. J. Cook, Edits.) *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*, 391-399.
- Augusti, K. T. (1990). Therapeutic and medicinal values of onions and garlic. *Onions and Allied Crops*, 93-108.
- Bacon, C. W., & Nelson, P. E. (1994). Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection*, 514-521.
- Bayford, D. (1996). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Mycopathologia*, 39–40.
- Brammall, R., & Higgins, V. (1988). A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible or resistant to *Fusarium* crown and root rot disease. *Canadian Journal of Botany*, 66, 915-925.
- Cárdenas, J. (2014). *Control biológico de Fusarium en hortalizas de la parroquia de San Joaquín*. Cuenca: Universidad del Azuay.
- Cooke, B. M., Jones, D. G., & Kaye, B. (2006). *The Epidemiology of Plant Diseases*. Springer Science+Business Media B.V.
- Correll, J. C. (1991). The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 1061-1064.

- Cowger, C., & Sutton, A. (2005). The Southeastern U . S . Fusarium Head Blight Epidemic of 2003. *Plant Health Progress*(October).
- Cramer, C. (2000). Breeding and genetics of Fusarium basal rot resistance in onion. *Euphytica*, 115(3), 159-166.
- Currah, L., & Proctor, F. (1990). Onions in tropical regions. *Natural Resources Institute*, 232.
- Elmer, W. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., Backhouse, D., & Abubaker, A. A. (1997). Fusarium species associated with asparagus crowns and soil in Australia and New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 255-261.
- Entwistle, A. R. (1990). Root diseases. En H. D. Rabinowitch, & J. L. Brewster, *Onions and Allied Crops* (págs. 103-154). Boca Raton: CRC Press.
- Espinoza, M., Vivas, V., & Paz, C. (2005). *Identificación y determinación de la biología de los agentes causales de los principales problemas fitosanitarios de los cultivos*. Guayaquil: INIAP.
- Fang, X., Kuo, J., You, M., Finnegan, P., & Barbetti, M. (2012). Comparative root colonisation of strawberry cultivars Camarosa and Festival by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Plant and Soil*, 358(1-2), 75-89.
- FAO. (28 de 7 de 2016). *FAOSTAT, Production /Crops [production chart]*. Obtenido de Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
- Fassihiani, A. (2000). Symptomless Carriers of the Causal Agent of Tomato Wilt Pathogen. *Agr. Sci. Tech.*, 27-32.
- Fawzi, E. M. (2003). Production and purification of β -glucosidase and protease by *Fusarium proliferatum* NRRL 26517 grown on *Ficus nitida* wastes. *Annals of Microbiology*, 463-476.

- Flores, F. J., Marek, S. M., Anderson, J. A., Mitchell, T. K., & Walker, N. R. (2015). Infection and Colonization of Several Bermudagrasses by *Ophiosphaerella korrae*. *Phytopathology*, 656-661.
- Garibaldi, A., Giraldi, G., & Gullino, M. L. (2004). Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Phytoparasitica*, 61-65.
- Gei, P., Valdez, J., Piccolo, R., & Galmarini, C. (2014). Influence of *Fusarium* spp . isolate and inoculum density on resistance screening tests in onion. *Tropical plant pathology*, 39(February), 19-27.
- Gutierrez , H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos* (2nd ed.). Mexico DF: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. .
- Haseloff, J., & Amos, B. (1995). GFP in plants. *Trends in Genetics*, 328–329. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(95\)90186-8](https://doi.org/10.1016/0168-9525(95)90186-8)
- Havey, M. J. (1995). *Fusarium* basal plate rot. En H. F. Schwartz, & S. K. Mohan, *Compendium of Onion and Garlic Disease* (págs. 10-11). Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Helbig, J. B., & Carroll, R. B. (1984). Dicotyledonous weeds as a source of *Fusarium oxysporum* pathogenic on soybean. *Plant Disease*, 694-696.
- Hoffman, C. (1993). Developmental Morphology of *Allium cepa*. *Botanical Gazzete*, 279–299.
- Jarvis, W. R., & Shoemaker, R. A. (1978). Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology*, 1679-1680.
- Jiménez-Fernández, D., Landa, B., Kang, S., Jiménez-Díaz, R., & Navas-Cortés, J. (2013). Quantitative and Microscopic Assessment of Compatible and Incompatible Interactions between Chickpea Cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Races. *PLoS ONE*, 8(4).

- Joffe, A. Z., & Palti, J. (1977). Species of *Fusarium* found in uncultivated desert-type soils in Israel. *Phytoparasitica*, 119-122.
- Jones, D. G. (1998). *The Epidemiology of Plant Diseases*. London: Kluwer Academic Publishers.
- Katan, J. (1971). Symptomless carriers of the tomato *Fusarium* wilt pathogen. *Phytopathology*. doi:<https://doi.org/10.1094/Phyto-61-1213>
- Keusgen, M. (2002). Health and Alliums. *Allium Crop Science: Recent advances*, 357-378.
- Kommedahl, T., Abbas, H. K., Buernes, P. M., & Mirocha, C. J. (1988). Prevalence and toxigenicity of *Fusarium* spp. from soils of Norway near the Arctic Circle. *Mycologia*, 790-794.
- Lagopodi, a., Ram, a., Lamers, G., Punt, P., Van den Hondel, C., Lugtenberg, B., & Bloemberg, G. (2002). Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Mol.Plant-Microbe Interact.*, 15(2), 172-179.
- Larrainzar, E., O'Gara, F., & Morrissey, J. P. (2005). Application of auto- fluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol*, 257-277.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Wohler, M., & Summerell, B. A. (2004). Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *European Journal of Plant Pathology*, 610-618.
- Leslie, J., & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (Vol. 1). Blackwell Publishing.
- Li, C., Chen, S., Zuo, C., Sun, Q., Ye, Q., Yi, G., & Huang, B. (2011). The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 131(2), 327-340.

- Li, C., Shao, J., Wang, Y., Li, W., Guo, D., Yan, B., . . . Peng, M. (2013). Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *BMC Genomics*, 851. doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-851>
- Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A., & Corda, P. (1995). Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease*, 727-731.
- Lorang, J. M., Tuori, R. P., Martinez, J. P., Sawyer, T. L., Redman, R. S., & Rollins, J. A. (2001). Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environment Microbiology*, 1987-1994.
- Mandeel, Q. A., Abbas, J. A., & Saeed, A. M. (1995). Survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain: II. Spectrum of species on five isolation media. *Sydowia*, 223-239.
- Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B. A., & Sharon, A. (1998). Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol. Res.*, 491-496.
- Marin, S., Sanchis, V., Teixido, A., Saenz, R., Ramos, J., Vinas, I., & Magan, N. (1996). Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Canadian Journal of Microbiology*, 1045-1050.
- Mazzola, M. (2004). Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology*, 35-59.
- McMullen, M. P., & Stack, R. W. (1983). *Fusarium* species associated with grassland soils. *Canadian Journal of Botany*, 2530-2538.
- McMullen, M. P., & Stack, R. W. (1984). The effects of surface mining and reclamation on *Fusarium* populations of grassland soils. *Reclamation and Revegetation Research*, 253-266.

- Miller, S., Chabot, D., Ouellet, T., Harris, L., & Fedak, G. (2004). Use of a *Fusarium graminearum* strain transformed with green fluorescent protein to study infection in wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26(4), 453-463.
- Nelson, P. E., Burgess, L. W., & Summerell, B. A. (1990). Some morphological and physiological characters of *Fusarium* species in sections *Liseola* and *Elegans* and similar new species. *Mycologia*, 99-106.
- Nelson, P. E., Horst, R. K., & Woltz, S. S. (1981). *Fusarium* diseases of ornamental plants. En *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University.
- Ocamb, C., Juzwik, M. J., & Martin, F. B. (2002). *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: Root disease pathogens and taxa associated with seed. *New Forests*, 67-79.
- Olivain, C., & Alabouvette, C. (1997). Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *New Phytopathol.*, 481-494.
- Olivain, C., Trouvelot, S., Binet, M., Cordier, C., Pugin, A., & Alabouvette, C. (2003). Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5453-5462.
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D., & Sharon, A. (2003). Early Events in the *Fusarium verticillioides* Maize Interaction Characterized by Using a Green Fluorescent Protein Expressing Transgenic Isolate Early Events in the *Fusarium verticillioides* Maize Interaction Characterized by Using a Green Fluorescent Pro. *Applied and Environmental Microbiology*, 1695-1701.
- Özer, N., Köycü, N., Chilosi, G., & Magro, P. (2004). Resistance to *Fusarium* basal rot of onion in greenhouse and field and associated expression of antifungal compounds. *Phytoparasitica*, 32(4), 388-394.
- Ploetz, R. C. (1990). *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press.

- Prescott, Harley, & Klein. (2004). *Microbiología* (5ta ed.). España: Mc Graw Hill.
- Randler, W. M., & Lancaster, J. E. (2002). Sulphur compounds in Alliums in relation to flavour quality, in *Allium Crop Science: Recent Advances. CAB International*, 329-356.
- Regalado, V., Perestelo, F., Rodriguez, A., Carnicero, A., Sosa, F. J., de la Fuente, G., & Falcon, M. A. (1999). Activated oxygen species and two extracellular enzymes: Laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 388-390.
- Rivero, W., & Romero, M. (2012). *Estudio del potencial agroindustrial y exportador de la península de Santa Elena y de los recursos necesarios para su implementación; caso cebolla perla y chirimoya*. Guayaquil-Ecuador: Escuela Politécnica del Litoral.
- Saha, B. C. (2002). Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, 1279-1284.
- Schwartz, H. F., & Mohan, S. K. (1995). *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. St Paul: APS Press.
- Seefelder, W., Gossmann, M., & Humpf, H. U. (2002). Analysis of fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2778-2781.
- Sherf, A. F., & Macnab, A. A. (1986). *Onions, garlic, leeks and shallots, in Vegetable Diseases and Their Control*. New York: John Wiley & Sons.
- Skadsen, R., & Hohn, T. (2004). Use of *Fusarium graminearum* transformed with gfp to follow infection patterns in barley and Arabidopsis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64(1), 45-53.

- Spellig, T., Bottin, A., & Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* , 503-509.
- Taylor, A., Vagany, V., Barbara, D., Thomas, B., Pink, D., Jones, J., & Clarkson, J. (2013). Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay. *Plant Pathology*, 62(1), 103-111.
- Upasani, M., Gurjar, G., Kadoo, N., & Gupta, V. (2016). Dynamics of colonization and expression of pathogenicity related genes in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* during chickpea vascular wilt disease progression. *PLoS ONE*, 11(5), 1-21.
- Wang, B., Brubaker, C. L., & Burdon, J. J. (2004). *Fusarium* species and *Fusarium* wilt pathogens associated with native *Gossypium* populations in Australia. *Mycological Research*, 35-44.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden, Gardener, B. B., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 309-348.
- Windels, C. E. (2000). Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 17-21.
- Wu, L., Conner, R., Wang, X., Xu, R., & Li, H. (2016). Variation in Growth, Colonization of Maize, and Metabolic Parameters of GFP- and DsRed-Labeled *Fusarium verticillioides* Strains. *Phytopathology*, 106(8), 890-899.