

CASASNOVAS, FRANCISC
Características gene



2013 72659

72659

MEM.
C. sif.
+ 813

72659



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas, Físico Química y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

Orientación Micología

**Características genéticas y patológicas de *Fusarium solani*
causante de la podredumbre parda de la raíz de maní**

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Microbiólogo Francisco Casasnovas

Octubre 2013

Agradecimientos;

A mi familia, por su apoyo incondicional en todo momento.


A mis Directoras, las Doctoras Adriana Torres y María Marta Reynoso que fueron mis guías a lo largo de este camino.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto y se presenta como requerimiento para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Director: Dra. Adriana M. Torres


Co-director: María Marta Reynoso




Miembros del Jurado:

Dra. Graciela Salerno

Dra. Adriana Fabra



Dra. Flavia Forchiassin



Río Cuarto, Octubre de 2013

RESUMEN

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es un cultivo económicamente importante para la provincia de Córdoba, donde se obtiene la mayor parte de la producción nacional. Actualmente Argentina se ha convertido en uno de los principales exportadores de maní de calidad a nivel mundial. En la última década se ha observado una marcada disminución en el número de productores dedicados a dicho cultivo debido a factores económicos, agronómicos y tecnológicos, siendo las enfermedades causadas por hongos una de las principales causas. La podredumbre parda de la raíz del maní (PPRM) es una enfermedad que se ha citado con características epidémicas sólo en Argentina, descrita desde la campaña 1992/93. La PPRM tiene incidencia variable y en algunas campañas ha alcanzado valores que significaron pérdidas importantes en la producción. Se ha reconocido al agente causal de esta enfermedad, como miembro del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC). El FSSC comprende aproximadamente 50 especies filogenéticamente distintas, morfológicamente sus miembros son idénticos o muy similares, y es imposible diferenciar las cepas patógenas de las saprofitas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el patosistema *Fusarium solani* - maní, para conocer la estrategia del patógeno para colonizar el huésped y determinar las características genéticas distintivas que permitan la identificación del mismo. Para lograr este objetivo se evaluó la patogenicidad en ensayos de invernadero de cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de PPRM y se determinó la producción de poligalacturonasas (PGs) como un factor de virulencia de las cepas. Además se desarrolló una técnica diagnóstica basada en PCR, con el diseño de cebadores específicos que permitieran identificar al agente causal de la enfermedad. Se demostró que uno de los factores que puede estar jugando un rol importante en la capacidad del patógeno de producir la enfermedad es la síntesis de PGs. En forma parcial se puede concluir que la patogenicidad no estaría en relación directa con los niveles de producción, sino con la producción sostenida en el tiempo o con una isoforma particular de PGs. Los resultados obtenidos del análisis filogenético usando las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal, y los genes EF-1 α y PBR2, realizado a un total de 17 cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de la enfermedad, confirma que el agente etiológico pertenece a dos especies filogenéticas del FSSC, llamadas FSSC 5 y FSSC 3+4 ubicadas dentro del Clade 3 del complejo. Los cebadores específicos diseñados a partir de marcadores moleculares (AFLPs), FS1 y FS2, permitieron la detección de las dos especies filogenéticas, FSSC 5 y FSSC 3+4 (*F. falciforme*) causantes de la podredumbre de la raíz de maní en muestras de suelo artificial y naturalmente contaminado, como así también en raíces enfermas. La especificidad y el alto grado de sensibilidad de los ensayos de PCR llevados a cabo para *F. solani* causante de podredumbre parda de la raíz de maní, proporcionan una buena herramienta para la detección temprana de dicho patógeno en muestras de suelo que serán destinadas al cultivo de esta oleaginosa, permitiendo de esta manera diseñar estrategias para prevenir la enfermedad y asegurar un apropiado manejo de la misma, además de ser de gran utilidad para la investigación básica en epidemiología y genética de poblaciones de hongos.

ABSTRACT

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an economically important crop for Cordoba Province, where most of the national production takes place. At present Argentina has become one of the main high quality peanut exporters worldwide. Diseases caused by soil pathogenic fungi is the more important cause limiting peanut production and can result in fields being taken completely out of peanut production. Peanut brown root rot (PBRR) was first observed in Cordoba province and is now widespread in Argentine peanut-growing regions. Since 1992, PBRR has been of epidemic proportions in Cordoba Province. The pathogen kills adult plants resulting in large economic losses. In seasons with long drought stress periods, this disease is the most important for peanut and may reach a 95% disease incidence in some cases. The etiological agent was first reported as *Fusarium solani* (Mart.) Appel and Wollenw. Snyder and Hans, but the pathogen has not yet been well described, it is known that it is a member of the *Fusarium solani* species complex (FSSC). The *F. solani* species complex (FSSC) contains approximately 50 phylogenetic species, which are impossible to distinguish morphologically; some of them are pathogenic and other saprophytes. The goal of this work was to study the *Fusarium solani*-peanut pathosystem, in order to know strategies of the pathogen to colonize the host, to determine distinctive genetic characteristics that allow the pathogen identification. To achieve this objective, the pathogenicity of different *Fusarium solani* strains isolated from roots with disease symptoms was evaluated in greenhouse tests, the production of polygalacturonase (PG) was determined as a virulence factor of the strains. Besides, work was done to develop a PCR based technique, with the primers design that allows detecting the etiological agent of PBRR. We showed that one of the factors of the pathogen that could play an important role in the potential to cause disease is the polygalacturonase production. To some extent we can conclude that the pathogenicity is not directly related with the levels of polygalacturonase produced, but with the sustainable production in the time or with a particular PG isoform. Phylogenetic analysis based on ITS region amplification, a portion of translation elongation factor EF-1 α gene and, a portion of PBR2 gene, performed with 17 strains of *F. solani* isolated from symptomatic peanut root, showed that the etiological agent of PBRR are two phylogenetic species in the FSSC, called FSSC5 and FSSC 3+4 belonging to clade 3. The specific primers designed based on molecular markers (AFLPs), FS1 and FS2 clearly distinguished the two phylogenetic species FSSC 5 and FSSC 3+4 (*F. falciforme*) etiological agents of PBRR in, artificially and natural contaminated soil samples, as well as in diseased roots. The availability of such a sensitive and rapid detection method for the pathogen causing PBRR in peanut has great practical importance, due to the need to evaluate the inoculum potential of the pathogen before planting to prevent occurrence of the peanut brown root rot. Besides, the developed method could be a helpful tool for epidemiological and population genetic studies.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	
I.1 El maní	1
I.1.1 Generalidades y características del cultivo	1
I.1.2 Importancia económica en Argentina y en la Provincia de Córdoba	2
I.1.3 Enfermedades del maní	6
I.1.4 Podredumbre parda de la raíz del maní	7
I.2 Agente causal de la podredumbre parda	9
I.2.1 Generalidades	9
I.2.2 Concepto filogenético de especies	11
I.2.3 Detección y aislamiento del agente causal	13
I.2.4 Mecanismos de patogenicidad en hongos: Enzimas	14
I.2.4.1 Poligalacturonasas	16
II. HIPÓTESIS	19
III. OBJETIVOS	19
IV. MATERIALES y MÉTODOS	
IV.1 Patogenicidad de cepas de <i>Fusarium solani</i> aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda	20
IV.1.1 Medios de cultivos	20
IV.1.2 Cepas fúngicas	20
IV.1.3 Preparación de suelo	20
IV.1.4 Semillas de maní	20
IV.1.5 Preparación de inóculo	21
IV.1.6 Inoculación de suelo y siembra de maní	21
IV.1.7 Condiciones de invernadero	22
IV.1.8 Microscopia electrónica de barrido	22
IV.1.9 Análisis estadístico	23
IV.2 Determinación de la producción de enzimas poligalacturonasas en las cepas de <i>Fusarium solani</i> causantes de podredumbre parda de la raíz de maní	23
IV.2.1.a Materiales	23
IV.2.1.b. Metodología	24
IV.2.2. Medición de la actividad enzimática	24
IV.2.3 Análisis de la producción enzimática de cepas de <i>Fusarium solani</i> por medio de electroforesis de isoelectroenfoque	25
IV.2.3.1 Inducción de la secreción de enzimas poligalacturonasas	25

IV.2.3.2 Isoelectroenfoque (IEF)	26
IV.2.3.2.1 Preparación de las muestras	26
IV.2.3.2.2 Desarrollo del isoelectroenfoque	26
IV.2.3.2.2.a. Materiales	26
IV.2.3.2.2.b. Metodología	27
IV.3 Diseños de cebadores específicos para cepas de <i>Fusarium solani</i> causante de podredumbre parda de raíz de maní	28
IV.3.1 Diseños de cebadores específicos a partir de marcadores monomórficos de AFLP	28
IV.3.1.1 Aislamiento de las bandas monomórficas de AFLP	28
IV.3.1.2 Evaluación de las condiciones de PCR	29
IV.3.1.3 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los cebadores	30
IV.3.3 Diseño de cebadores específicos a partir regiones conservadas ITS, Factor de Elongación (EF-1 α) y β -tubulina	31
IV.3.3.1 Elección y diseño de los cebadores	31
IV.3.3.2 Evaluación de las condiciones de PCR	31
IV.3.3.3 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los cebadores	32
IV.4 Determinación de la presencia del patógeno en suelo inoculado con <i>Fusarium solani</i> patógeno de maní usando cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP	33
IV.4.1 Medios de cultivo	33
IV.4.2 Preparación de inóculo	33
IV.4.3 Inoculación de suelo estéril	34
IV.4.4 Aislamiento e identificación de especies de <i>Fusarium</i>	34
IV.4.5 Producción de la biomasa fúngica	34
IV.4.6 Extracción, purificación y cuantificación del DNA fúngico	35
IV.4.6.1 Materiales	35
IV.4.6.2 Metodología	35
IV.4.7 Extracción de DNA a partir de las muestras de suelo	36
IV.4.8 Reacción de amplificación por PCR	36
IV.5 Determinación de la presencia del patógeno en el suelo naturalmente contaminado con <i>Fusarium solani</i> patógeno de maní a través de PCR con cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP	37
IV.5.1 Medios de cultivo	37
IV.5.2 Muestras de suelo naturalmente contaminado	37
IV.5.3 Aislamiento e identificación de <i>Fusarium solani</i> en suelo naturalmente contaminado	37
IV.5.4 Producción de la biomasa fúngica	37

IV.5.5 Extracción, purificación y cuantificación del DNA fúngico	38
IV.5.6 Extracción de DNA a partir de la muestra de suelo	38
IV.5.7 Reacción de amplificación por PCR	38
IV.6 Determinación de la presencia del patógeno en muestras de raíces con y sin síntomas de podredumbre parda a través de PCR con cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP	38
IV.6.1 Muestras vegetales	38
IV.6.2 Tratamiento de la raíz	39
IV.6.3 Aislamiento e identificación de especies de <i>Fusarium</i>	39
IV.6.4 Producción de la biomasa fúngica	39
IV.6.5 Extracción, purificación y cuantificación del DNA fúngico	39
IV.6.6 Extracción de DNA a partir de muestras de raíces	40
IV.6.7 Reacción de Amplificación por PCR	40
IV.7 Análisis filogenético molecular	41
IV.7.1 Cepas fúngicas	41
IV.7.2 Producción de la biomasa fúngica	42
IV.7.3 Extracción, purificación y cuantificación del DNA	42
IV.7.4 Reacciones de PCR	42
IV.7.4.1 Amplificación del gen que codifica para el factor de elongación	44
IV.7.4.2 Amplificación del gen de la RNA polimerasa II	45
IV.7.4.3 Amplificación de la región ITS del DNA ribosomal	45
IV.7.4.4 Amplificación del gen que codifica para la β -tubulina	46
IV.7.5 Secuenciación del DNA	47
IV.7.6 Análisis filogenético	47
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
V.1 Patogenicidad de cepas de <i>Fusarium solani</i> aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda	48
IV.2 Determinación de la producción de enzimas poligalacturonasas en las cepas de <i>Fusarium solani</i> causantes de podredumbre parda de la raíz de maní	53
V.2.1 Evaluación de la actividad poligalacturonasa	53
V.2.2 Perfil de isozimas	54
IV.3 Diseños de cebadores específicos para cepas de <i>Fusarium solani</i> causante de podredumbre parda de raíz de maní	58
IV.3.1 Diseños de cebadores específicos a partir de marcadores monomórficos de AFLP	58
IV.3.1.1 Optimización de la reacción y determinación de la especificidad y sensibilidad	60

IV.3.3 Diseño de cebadores específicos a partir regiones conservadas ITS, Factor de Elongación (EF-1α)y β-tubulina	63
IV.3.3.1 Optimización de la reacción y determinación de la especificidad y sensibilidad de los cebadores diseñados a partir de secuencias conservadas	69
V.4 Determinación de la presencia del patógeno en suelo artificialmente contaminado con <i>Fusarium solani</i> patógeno de maní usando cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP	70
V.5 Determinación de la presencia del patógeno en suelo naturalmente contaminado con <i>Fusarium solani</i> patógeno de maní usando cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP	74
V.6 Determinación de la presencia del patógeno en muestras de raíces de maní con y sin síntomas de podredumbre parda usando cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP	77
V.7 Análisis filogenético molecular	83
V.7.1 Análisis del gen del factor de elongación 1- α	91
V.7.2 Análisis del gen de la RNA polimerasa II	93
V.7.3 Análisis de la región ITS del DNA ribosomal	95
V.7.4 Análisis del gen de la β -Tubulina	97
V.7.5 Análisis filogenético combinado	99
VI. CONCLUSIONES	103
VII. BIBLIOGRAFÍA	105
VIII. ANEXOS	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1	Dispersión geográfica del cultivo de maní en Argentina en función del área sembrada promedio de las cinco campañas (2001/02 a 2005/06)	5
Figura I.2	Participación relativa de las provincias en la producción promedio de las cinco campañas (2001/02 a 2005/06)	5
Figura I.3	Corte longitudinal de raíz afectada por <i>Fusarium solani</i>	8
Figura I.4	Esquema general del sitio de acción de las PG en las cadenas de ácido poligalacturónico	17
Figura IV.1	Mapa de la región ITS del DNA ribosomal (A), gen TEF-1 α (B), gen PBR2 (C) y gen β -tubulina (D)	43
Figura V.1.	Efecto de la inoculación del suelo con <i>Fusarium solani</i> causante de la PPRM en las plantas de maní de durante el primer estrés hídrico (70 días post-inoculación)	49
Figura V.2	A) Síntomas observados durante el final del segundo estrés hídrico (90 días post-inoculación); B) Reanudación del riego después del segundo estrés hídrico	49
Figura V.3	A) Plántula de maní inoculada con la cepa MR313 mostrando los síntomas de marchitamiento. B) Raíz sin síntomas visibles de estrangulamiento; C) Raíz con síntomas visibles de podredumbre	51
Figura V.4	Sección longitudinal de la raíz de plantas enfermas, hifas del patógeno invadiendo la raíz, se visualizan la formación de cojines de infección (A) y apresorios (B).	52
Figura V.5	A) Zimogramas de las cepas de <i>Fusarium solani</i> productoras de podredumbre parda de la raíz de maní. A) geles obtenidos para las cepas MR528, MR436, MR338, MR313 y MR116 (superior) y para las cepas MR403, MR386, MR319 y MR013 (inferior). B) Puntos isoeléctricos de las isoformas observadas en el gel, obtenidos mediante electroforesis de isoelectroenfoque para cada una de las cepas ensayadas	55
Figura V.6	Secuencia del fragmento específico de las cepas de <i>Fusarium solani</i> causante de la podredumbre parda de la raíz de maní obtenida por AFLP. Las flechas verdes indican el sitio de apareamiento de los cebadores FS1/FS2. <i>pb</i> : pares de bases, <i>tm</i> : temperatura de melting en °C, <i>gc</i> : % contenido de guanina y citosina del cebador en porcentaje	59

Figura V.7	Producto de amplificación con DNA genómico de diferentes especies fúngicas usando los cebadores FS1/FS2. a) Líneas 1-8: <i>Fusarium solani</i> asociadas a podredumbre parda de la raíz de maní. Línea 9: control negativo (sin DNA templado). M: marcador de 100 pb. Línea 10: <i>F. solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (S-1008). Línea 11: <i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i> (S-580). Línea 12: <i>H. haematococca</i> (S-1274). Línea 13: <i>F. virguliforme</i> (NRRL34552). Línea 14: <i>F. tucumaniae</i> (NRRL34549). b) Líneas 1 – 4: <i>Fusarium solani</i> asociadas a podredumbre parda de la raíz de maní. Línea 5: control negativo (sin DNA templado). M: marcador de 100 pb. Línea 6: <i>Alternaria</i> spp. Línea 7: <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> . Línea 8: <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> . Línea 9: <i>Penicillium</i> spp. Línea 10: <i>F. oxysporum</i> (MR509).	61
Figura V.8	Productos de amplificación utilizando distintas concentraciones de DNA para evaluar la sensibilidad del método FS1/FS2. Líneas 1 – 4: 1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 100 pg de DNA de la cepa RC386. Líneas 5 – 8: 1 ng, 0,1 nd, 10 pg, 100 pg de DNA de la cepa RC401. Línea 9: control negativo (sin DNA templado). M: marcador de 100 pb.	62
Figura V.9	Alineamiento de la secuencia parcial de la región ITS a partir de las cepas de <i>Fusarium solani</i> causante de la podredumbre parda de la raíz de maní (MR013 y MR140) y de otras especies del complejo <i>F. solani</i> , con la localización de los sitios específicos: las flechas representan el sitio de las secuencias de los cebadores <i>forward</i> (A) y <i>reverse</i> (B).	64
Figura V.10	Alineamiento de la secuencia parcial del factor de elongación (EF-1 α) a partir de las cepas de <i>Fusarium solani</i> causante de la podredumbre parda de la raíz de maní (MR013 y MR140) y de otras especies del complejo <i>F. solani</i> , con la localización de los sitios específicos: las flechas representan el sitio de las secuencias de los cebadores <i>forward</i> (A) y <i>reverse</i> (B).	66
Figura V.11	Alineamiento de la secuencia parcial de La región β -tubulina partir de las cepas de <i>Fusarium solani</i> causante de la podredumbre parda de la raíz de maní (MR013 y MR140) y de otras especies del complejo <i>F. solani</i> , con la localización de los sitios específicos: las flechas representan el sitio de las secuencias de los cebadores <i>forward</i> (A) y <i>reverse</i> (B).	68
Figura V.12	Productos de amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos FS1/FS2. Línea 1: DNA puro de la cepa MR386 aislada de suelo artificialmente contaminado. Línea 2: DNA total extraído de suelo artificialmente contaminado con la cepa MR386. Línea 3: DNA total extraído de suelo artificialmente contaminado con la cepa MR386 dilución 1:50; Línea 4 – 6: DNA controles positivos, cepa MR319, Cepa MR338,	72

- cepa MR313 (respectivamente). Línea 7: DNA total extraído de suelo inoculado con agua estéril (control negativo); Línea 8: Control negativo de reactivos (sin DNA templado). M: Marcador de 100 pb.
- Figura V.13** Productos de amplificación de PCR con los cebadores específicos FS1/FS2 usando suelo inoculado con diferentes concentraciones de conidios. Líneas 1 – 6: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 conidios por gramo de suelo, respectivamente. Línea 7: control negativo (sin DNA templado). Línea 8: control positivo (DNA puro de la cepa J). M: marcador de 100 pb. respectivamente. Línea 7: control negativo (sin DNA templado). Línea 8: control positivo (DNA puro de la cepa J). M: marcador de 100 pb. 73
- Figura V.14** Producto de amplificación de PCR usando como templado, DNA de las cepas de *F. solani* PPRM aisladas de suelo contaminado. Línea 1 – 2: DNA de cepas aisladas del suelo SCC. Línea 3 – 4: DNA de cepas aisladas del suelo SI. Línea 5: DNA de cepas aisladas del suelo sin historia de maní. Línea 6: Control negativo. M: Marcador de 100 pb. 75
- Figura V.15** Productos de amplificación por PCR utilizando DNA total extraído a partir de muestras de suelos contaminados. Línea 1: suelo SI (sin diluir). Línea 2: suelo SCC (sin diluir). Línea 3: suelo SI dilución 1:2. Línea 4: suelo SSC dilución 1:2. Línea 5 – 6: controles positivos (suelo artificialmente contaminado). Línea 7 – 8: controles positivos (cepas MR386 y J). Línea 9: control negativo de reactivos. M: Marcador de 100pb.. 76
- Figura V.16** Productos de amplificación de PCR usando como templado DNA de raíces de maní infectado por *F. solani* causante de la PPRM. Línea 1: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR386 dilución 1:50, Línea 2: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR319 dilución 1:32. Línea 3: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR338 dilución 1:50. Línea 4: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR436 dilución 1:50. Línea 5: muestra de raíz de maní sin síntomas. Línea 6: control negativo. M: Marcador de 100 pb. 79
- Figura V.17** Productos de amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos FS1/FS2 en muestras de raíces de maní. Línea 1: DNA total extraído de raíz sin síntomas. Línea 2: muestras 1A dilución 1:16. Línea 3: muestra 2A dilución 1:16. Línea 4: muestra 3A dilución 1:16. Línea 5: muestra 4A dilución 1/16. Línea 6: muestra 5B dilución 1:16. Línea 7: muestras 1A dilución 1:32. Línea 8: muestra 2A dilución 1:32. Línea 9: muestra 3A dilución 1:32. Línea 10: muestra 4A dilución 1/32. Línea 11: muestra 5B dilución 1:32. Línea 12 – 13: controles positivos (cepas MR386 y J). Línea 14: control negativo, M: Marcador de 100 pb. 80

- Figura V.18** Uno de los 461 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de las secuencias del gen TEF-1 α de las cepas de *F. solani* PPRM y de las 202 secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. staphyleae* (NRRL 22316) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas. 92
- Figura V.19** Uno de los 12 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de las secuencias del gen de la RPB2 de las cepas de *F. solani* PPRM y de las 152 secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. staphyleae* (NRRL 22316) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas. 94
- Figura V.20** Uno de los 20 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal de las cepas de *F. solani* PPRM y de las 202 secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. staphyleae* (NRRL 22316) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas. 96
- Figura V.21** Uno de los 13 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de la secuencia del gen de la β -tubulina de las cepas de *F. solani* PPRM y de las secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (CBS 491.97) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas. 98
- Figura V.22** Uno de los 25 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados (secuencias de los genes EF-1 α , PBR2 y la región ITS del DNA ribosomal) de las cepas de *F. solani* PPRM y de las secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. staphyleae* (NRRL 22316) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas. 100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1	Cultivo de maní en Argentina	3
Tabla I.2	Exportaciones de maní de los principales orígenes en los últimos años	4
Tabla IV.1	Cepas de <i>F. solani</i> aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda utilizadas en el ensayo de patogenicidad	21
Tabla IV.2	Secuencias de los cebadores diseñados específicos de <i>F. solani</i> PPRM	31
Tabla IV.3	Cepas de <i>F. solani</i> aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda utilizadas en el ensayo filogenético molecular	41
Tabla IV.4	Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar la región ITS, el gen de la β -tubulina, factor de elongación EF-1 α y PBR2.	44
Tabla V.1	Diferencias entre el peso fresco de raíz y partes aéreas de plantas sometidas a los ensayos de patogenicidad	51
Tabla V.2	Actividades enzimáticas obtenidas para las 9 cepas de <i>Fusarium solani</i> aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda	54
Tabla V.3	Condiciones de la reacción de PCR para evaluar la presencia de <i>F. solani</i> causante de PPRM en suelo	73
Tabla V.4	Concentración de DNA obtenido a partir de raíz de planta de maní con síntomas de podredumbre parda naturalmente contaminadas (A), y raíz artificialmente contaminadas en ensayos de patogenicidad con cepas de <i>F. solani</i> PPRM (B)	78
Tabla V.5	Condiciones de la reacción de PCR utilizado en matrices de DNA total de raíces de maní con y sin síntomas de podredumbre parda. Modificación de la técnica de PCR citada en la Tabla V.4	80
Tabla V.6	Análisis del alineamiento básico local de las secuencias de los genes para el factor de elongación (EF-1 α) y RNA polimerasa subunidad dos beta (RPB2) de cepas de <i>F. solani</i> causante de PPRM	85
Tabla V.7	Resumen de las secuencias y estadística de árboles generados por máxima parsimonia (datos individuales y combinados)	90
Tabla VIII.1	Cepas del complejo de especies <i>Fusarium solani</i> (FSSC) incluidas en el análisis filogenético molecular (secuencias de los genes PBR2, EF-1 α y región ITS del DNA ribosomal)	119
Tabla VIII.2	Cepas del complejo de especies <i>Fusarium solani</i> (FSSC) incluidas en el análisis filogenético molecular (secuencia del gen β -tubulina)	129

I. Introducción

1875-1876

I.1 El maní

I.1.1 Generalidades y características del cultivo

El maní, cultivo originario de Sudamérica, es una planta anual herbácea de porte erecto o rastrero, botánicamente pertenece al orden *Fabales* familia *Fabaceae* o *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoidea*, tribu *Aeschynomeneae*, género *Arachis*, especie *A. hypogaea* L. (Krapovickas y Gregory, 1994).

Se cultiva en un suelo de estructura liviana, franco-arenoso, profundo, bien drenado, libre de sales, de reacción ligeramente ácida (pH 6 a 6,5) y con un buen contenido de materia orgánica. En suelos con estas características desarrolla un sistema radicular amplio y profundo, confiriendo a la planta menor susceptibilidad a la sequía (INTA, 1998). Buen drenaje significa también buena aireación, lo cual es esencial para las leguminosas como el maní para fijar nitrógeno del aire (Pedelini y Casini, 1998).

La rotación de maní con otros cultivos, especialmente gramíneas como sorgo, maíz o pasturas, es determinante en la obtención de un buen rendimiento. Esto se debe a un mejor uso de la fertilidad residual y a una menor presión a enfermedades. El manejo adecuado de rastrojos de cultivo anterior con residuos en la superficie mejora la capacidad de retención de agua, aumentando la infiltración después de las lluvias e impidiendo la evaporación del agua acumulada (INTA, 2008).

Los cultivares disponibles en el mercado argentino pertenecen en su totalidad al tipo Runner. Actualmente se dispone de variedades alto oleico, una característica muy deseada por los mercados compradores, ya que la elevada relación oleico/linoleico otorga a estos maníes mayor perdurabilidad de los caracteres organolépticos deseables (INTA, 2008).

En cuanto al clima, la semilla de maní necesita un suelo cálido y húmedo para germinar y emerger rápidamente. La temperatura óptima del suelo para la siembra es igual o mayor a 16° C. Durante el crecimiento vegetativo requiere abundante radiación solar y una estación cálida de 120 a 140 días (INTA, 1998). Esto se debe a que la temperatura es el principal factor ambiental que determina la tasa de desarrollo del cultivo (Boogerd y van Rossun, 1997). Dicho cultivo es relativamente tolerante a la sequía y puede sobrellevar situaciones de estrés severo con ligeras reducciones de rendimiento (Boote *et al.*, 1982). No obstante necesita una precipitación moderada bien distribuida de aproximadamente 500 a 1200 mm, ya que cantidades mayores

inducen a un excesivo desarrollo vegetativo. Para una buena calidad del producto, se requiere de un ambiente seco durante la maduración y cosecha (ILACO, 1985).

La rentabilidad del cultivo de maní depende del rendimiento y de la calidad del producto cosechado. Los principales factores de manejo del cultivo determinantes del rendimiento final y de la calidad de los granos cosechados son, entre otros, la elección del lote, rotación de cultivos, fertilidad y laboreo del suelo, elección del cultivar, implantación del cultivo, control de malezas, insectos y enfermedades, riego suplementario, arrancado, cosecha, secado y almacenado.

I.1.2 Importancia económica en Argentina y en la Provincia de Córdoba

El maní es un cultivo de importancia en la economía provincial, nacional y mundial. En el ciclo 2008/09 ocupó el cuarto lugar de producción entre las principales semillas oleaginosas (soja, algodón y colza) al representar el 8,7% del total mundial (USDA, 2010). En el ciclo 2010/11 la producción mundial de maní estimada superó las 32 millones de toneladas (INTA, 2011) y Argentina aportó sólo el 2,03%. El área implantada en Argentina, en la campaña 2012/2013 fue de 418 mil hectáreas, con un rendimiento de 2,54 tn/ha, uno de los mayores rendimientos obtenido en los últimos 10 años (MAGyP 2013) (Tabla I.1).

El mercado de maní en Argentina se caracteriza por estar destinado en su mayor parte a la exportación, alrededor del 90% del total producido se vende principalmente a Europa (Ackermann, 2008). En el ciclo 2012, Argentina aparece como el principal exportador de maní al contribuir con el 27,6% de las ventas totales, seguido por China (20,9%), Estados Unidos (20,1%), India (19,6%) y Sudan (0,11%). En su conjunto estos países exportaron casi el 80 % del maní que se comercializó a nivel mundial en este ciclo. Además, existe un aumento estimado para la producción nacional para la campaña 2013/2014, ubicando nuevamente a la Argentina como el principal exportador de maní, que llegará al 30 por ciento de participación en las exportaciones, aunque en un contexto de precios más deprimidos (USDA 2013).

Tabla I.1 Cultivo de maní en Argentina.

Período	Superficie implantada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (tn)	Rendimiento (kg/ha)
2000/01	252.460	251.060	394.800	1.572
2001/02	222.370	222.370	361.900	1.627
2002/03	157.326	156.426	220.900	1.412
2003/04	170.223	167.473	292.950	1.749
2004/05	211.090	210.820	444.800	2.109
2005/06	174.037	163.677	347.323	2.122
2006/07	215.660	215.060	600.035	2.790
2007/08	227.889	227.389	625.349	2.750
2008/09	264.430	257.430	605.491	2.352
2009/10	222.053	218.828	611.040	2.792
2010/11	264.568	264.568	701.535	2.652
2011/12	307.238	307.166	685.722	2.232
2012/13	418.063	404.022	1.025.857	2.539

Fuente MAGyP (2013).

La legislación sanitaria internacional ha ido incrementando dramáticamente su rigurosidad y cada vez menos exportadores se encuentran capacitados para cumplirla. Por esta razón, en la última década han desaparecido virtualmente casi todos los países que tenían una participación en el mercado o aspiraban a tenerla: India, Sudáfrica, Vietnam, Nigeria, Sudán, Senegal y últimamente, incluso China. Hay algunas excepciones, aunque de escasa significación. Con esta situación, los únicos oferentes de maní de calidad hoy son Argentina, y en menor medida, Estados Unidos. No sólo los volúmenes que maneja Argentina son largamente superiores, sino que nuestro país tiene disponibilidad durante todo el año, mientras que los despachos norteamericanos son estacionales y limitados (Tabla I.2). Las exportaciones de manufacturas del Complejo Maní en Argentina alcanzan 88 países y generan un ingreso de divisas por unos US\$ 600 millones anuales (INTA, 2011).



Tabla I.2 Exportaciones de maní de los principales orígenes en los últimos años

PAIS	EXPORTACIONES (Toneladas de grano)					
	2005	2006	2007	2008	2009	2010
ARGENTINA	256000	409000	423000	398600	442900	496000
CHINA	700000	600000	400000	400000	400000	350000
EE.UU.	170000	192000	205000	280000	217000	250000

Fuente: FAS/USDA, US Dep. of Commerce, OECE/SENASA; CCCFNA

La zona manisera se concentra en la región centro-sur de la provincia de Córdoba, destacándose los departamentos de Río Cuarto, Juárez Celman, General San Martín y General Roca que en conjunto reúnen el 68% de la superficie provincial. El porcentaje restante de la producción nacional se divide entre las provincias de Salta, Formosa, Corrientes, San Luis y, a partir del año 2004, Santa Fe (SAGPyA, 2007). Otras fuentes consideran también a la provincia de La Pampa (INTA, 2011). La superficie y producción de maní en la Argentina ha sido por años desarrollada mayoritariamente dentro de los límites de la provincia de Córdoba. Tan importante es la actividad del sector, que en 2007, la Legislatura provincial impulsó el proyecto de ley que protege la designación de "Origen Maní de Córdoba", un sello de calidad diferenciada que va ganando reconocimiento global y que es un paradigma del agregado de valor (INTA, 2010). Se puede decir que en esta provincia se ha generado un fenómeno socio-geográfico denominado "Complejo Manisero" que tiene como actores principales a empresas, instituciones educativas, científicas, proveedores de insumos y servicios y demás actividades asociadas a la comercialización e industrialización de esta oleaginosa y sus subproductos. Desde 2006 a la fecha Argentina exporta más de 400.000 toneladas anuales de maní comestible, además de pasta y manteca de maní y unas 60.000 toneladas de aceite de maní (Cámara Argentina de maní, 2012).

El mapa de producción manisera ha demostrado algunos desplazamientos en sus zonas productoras, incluyendo provincias vecinas a Córdoba que han logrado instalarse en forma variable (INTA, 2011). La provincia de Córdoba es la de mayor participación a nivel nacional.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

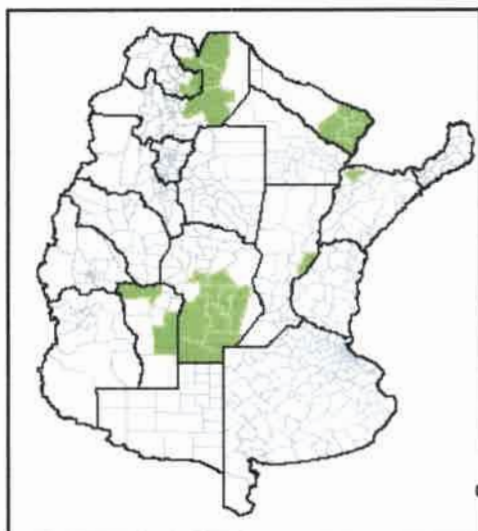


Figura I.1 Dispersión geográfica del cultivo de maní en Argentina en función del área sembrada promedio de las cinco campañas (2001/02 a 2005/06). Fuentes: Dirección de Coordinación de Delegaciones. Estimaciones Agrícolas, SAGPyA (2007).

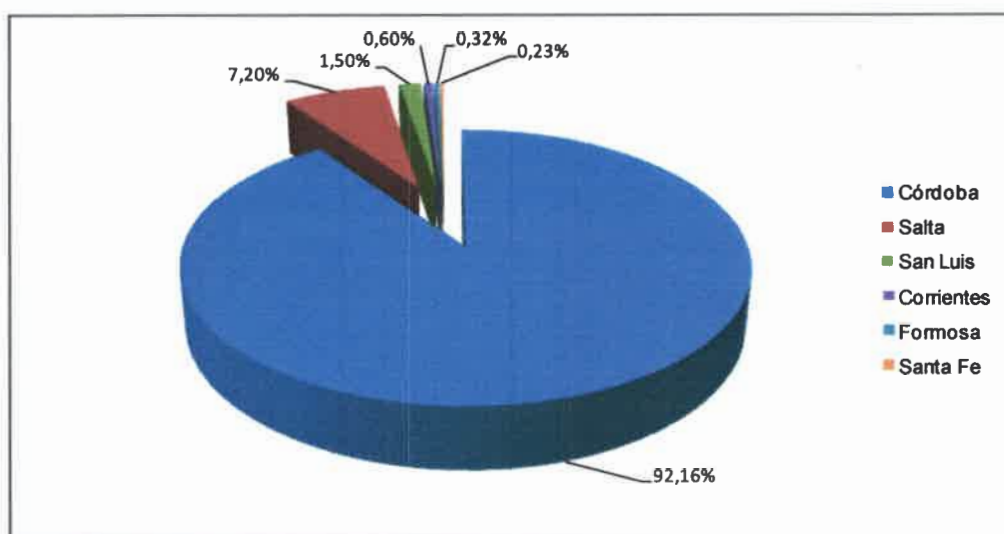


Figura I.2 Participación relativa de las provincias en la producción promedio de las cinco campañas (2001/02 a 2005/06). Fuentes: Dirección de Coordinación de Delegaciones. Estimaciones Agrícolas, SAGPyA (2007).

En el periodo 2009/10 la producción de la provincia de Córdoba disminuyó del 90% al 77% aproximadamente en su participación a nivel nacional. Busso *et al.* (2004) destacan que existen varios factores que se han combinado para reducir el área sembrada de maní por parte de pequeñas explotaciones agropecuarias, que son de índole económica, agronómica y tecnológica. Un primer factor de importancia desde el año 1998 es el económico, porque los pequeños productores de maní no han tenido

incentivos económicos suficientes, optando la gran mayoría de ellos por cultivos alternativos que han presentado mayor retorno por peso gastado, como es la soja. Un segundo factor es de orden agronómico, ya que el monocultivo de maní, al igual que otros monocultivos, origina problemas vinculados a enfermedades y deterioro del suelo que afecta la sustentabilidad de la producción en una misma unidad. Una de las principales causas de esta disminución son las enfermedades producidas por los hongos (Oddino, 2007), ya que causan pérdidas de hasta el 29% de la producción (March y Marinelli, 2005). Un tercer factor es de carácter tecnológico, dado que la producción de maní tiene una mayor complejidad relativa en la producción respecto a otros cultivos.

Muchos esfuerzos se realizan día a día para enfrentar los problemas que surgen del cultivo de maní en nuestro país. Básicamente en la actualidad dicho cultivo está en manos de productores de elite, expertos y profesionales; grupos de ingenieros agrónomos que monitorean permanentemente los campos (Cámara Argentina de Maní, 2007).

I.1.3 Enfermedades del maní

Las enfermedades que sufre el cultivo de maní han sido señaladas como una de las causas principales limitantes en su producción. La agricultura actual, caracterizada por la siembra de extensas superficies de una región con un mismo cultivo, e incluso muchas veces con un mismo cultivar, crea condiciones adecuadas al desarrollo de epidemias. Al reducirse la diversidad genética y funcional, se incrementa la vulnerabilidad a las enfermedades (Cowling, 1978), como ocurre con el maní en el área productora de Córdoba. Básicamente, además de la presencia del patógeno, para el desarrollo de la enfermedad es necesario un ambiente favorable. Como ambiente se consideran no solo al clima y al suelo, sino también al hombre y al sistema productivo por él desarrollado (March y Marinelli, 2005).

Uno de los principales problemas de enfermedades que sufre el cultivo de maní es causado por hongos. Se destacan las "viruelas" ampliamente difundidas y de enorme potencial como patógenos, que actualmente son controladas mediante fungicidas; los "marchitamientos", "tizones", "podredumbre de los frutos", "calidad sanitaria de las semillas" y "aflatoxinas" debidas a hongos patógenos del suelo, constituyen un problema complejo y una limitante real (March y Marinelli, 2005).

I.1.4 Podredumbre parda de la raíz del maní

La podredumbre parda de la raíz del maní (PPRM) es una enfermedad que se ha citado con características epidémicas en Argentina, pero que también ha sido reportada en diferentes países tales como Indonesia, Pakistán, Egipto y Australia (Ahmed *et al.*, 2012; Elsayed Abdalla y Abdel-Fattah, 2000; Fuhlbohm *et al.*, 2007; Saleh, 1997; Semangun, 1993; Widodo y Budiarti, 2009; Zaman y Ahmed, 2012).

En nuestro país, se observó por primera vez en cultivos del área rural de Carnerillo y Manfredi (provincia de Córdoba) en la campaña agrícola 1992/93 (Oddino, 2007). Desde entonces se ha diseminado paulatinamente a la mayor parte de la región productora, presentándose cada año con incidencia variable entre lotes, y alcanzando en algunas campañas valores que significaron importantes pérdidas de cosecha (Marinelli *et al.*, 1996, 1997; Oddino, 2007). Durante las campañas de 1993, 1994 y 1995 las pérdidas económicas en los Departamentos de Juárez Celman y Río Cuarto (Córdoba) fueron estimadas entre 14 y 18 millones de dólares (Oddino, 2007). Dicha enfermedad se presentó con carácter epidémico durante el año 1997, la cual estuvo asociada con condiciones ambientales predisponentes (March y Marinelli, 1998)

El primer síntoma de la enfermedad que se observa es el marchitamiento de la rama principal, con pérdida de turgencia, opacidad en la coloración (verde seco) y epinastía de hojas. La raíz, por su parte, presenta parcial o totalmente, coloración oscura y podredumbre, lo que frecuentemente lleva a su rotura a 7-8 cm por debajo de la corona, produciendo así pérdidas en el rendimiento. En un corte longitudinal, los vasos de conducción presentan coloración oscura (Figura 1.3), lo que dificulta paulatinamente la absorción y translocación de agua y nutrientes, generalmente se produce la muerte de plantas adultas, aunque también puede afectar a plántulas (March y Marinelli, 2005).



Figura 1.3 Corte longitudinal de raíz afectada por *Fusarium solani*.

El desarrollo de epidemias de enfermedades provocadas por patógenos de suelo está marcadamente ligado a los factores climáticos, siendo la cantidad y frecuencia de las precipitaciones el más importante. El factor determinante para el desarrollo de las epidemias de la PPRM ha sido un período de al menos 2 semanas sin precipitaciones o con precipitaciones menores a 5 mm. Un buen desarrollo radicular ayuda a la absorción de agua, y por lo tanto a soportar mejor el estrés hídrico, que es un factor que favorece al desarrollo de epidemias de la PPRM (March *et al.*, 2004). Otras condiciones del cultivo que predisponen la ocurrencia de la PPRM son la cantidad de inóculo, épocas de siembra y la compactación del suelo. Con respecto a la cantidad de inóculo del patógeno, éste ha sido correlacionado positivamente con la incidencia de la PPRM, por lo que se podría estimar el nivel de riesgo de cada lote antes de la siembra (Oddino *et al.*, 2004). A su vez la semilla puede actuar como fuente importante de inóculo primario, tal como fuera demostrado por Zuza, 2003. Por otra parte siembras tempranas con temperaturas de suelo no adecuadas para la germinación y emergencia del cultivo, también predisponen infecciones por este patógeno.

La PPRM, como otras enfermedades causadas por patógenos del suelo, puede ser influenciada por las prácticas de labranza y las rotaciones de cultivo (Bockus y Shroyer, 1998). Oddino *et al.* (2008) realizaron ensayos durante dos años utilizando

diferentes prácticas agrícolas y demostraron que la rotación de cultivos de maní con soja y maíz combinado con la utilización de un subsolador Paratill antes de la siembra, en un sistema de labranza cero, produjo una mejora en el crecimiento de las raíces, una reducción del déficit de agua, se incrementaron las poblaciones nativas de los agentes de biocontrol y se redujo la PPRM. El control biológico también es una herramienta para el manejo de la enfermedad. En nuestro laboratorio se demostró que *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 fue efectivo en controlar la enfermedad, en campos contaminados natural y artificialmente con el patógeno, disminuyendo la severidad de la PPRM e incrementando la frecuencia de plantas sanas y el rendimiento (Rojo *et al.*, 2007).

Vargas Gil *et al.* (2008) demostraron que la utilización de arados de rejas para la preparación del suelo en lotes con historia de cultivo de soja previa a la siembra de maní aumentaba significativamente la influencia de la podredumbre parda al final de la cosecha. El proceso de solarización, que consiste en exponer el suelo húmedo cubierto con láminas de polietileno transparentes, genera un incremento notable de la temperatura lo que conlleva a una disminución en la incidencia de la podredumbre parda y el recuento de *F. solani* y un aumento en los agente potenciales de biocontrol (Widodo y Tati Buriarti, 2009).

I.2 Agente causal de la podredumbre parda

I.2.1 Generalidades

El agente causal de la podredumbre parda de la raíz de maní pertenece al complejo de especies *Fusarium solani* (Oddino, 2007). *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenweber (teleomorfo = *Nectria haematococca* Berk & Br) comprende un complejo de especies (FSSC, por su sigla en inglés) donde se han reconocido por lo menos 50 especies filogenéticamente distintas distribuidas en tres clados (Nalim *et al.*, 2012; O'Donnell *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). El FSSC contiene tanto especies heterotálicas como homotálicas, así como especies sin un estado sexual conocido. Los peritecios se encuentran frecuentemente en el campo, particularmente en frutos caídos (Rossman *et al.*, 1999). Cuando los miembros del FSSC son aislados del suelo y otros sustratos, generalmente no se observa el teleomorfo. Snyder y Hansen (1941) consideraron a *F. solani* como una única especie, 12 variedades y 6 formas descritas en las secciones *Martiella* y *Ventricosum* por Wollenweber y Reinking (1935). El

sistema de Nelson *et al.* (1983) siguió el sistema de Snyder y Hansen (1941), aunque estudios de apareamiento determinaron que *F. solani* comprende al menos 7 especies filogenéticas (*Nectria haematococca* poblaciones de apareamiento I–VII) (Matuo and Snyder 1973) que se correlacionaban con su rango de huéspedes. El concepto morfológico de *F. solani* propuesto por Snyder y Hansen (1941) y Nelson *et al.* (1983) se caracteriza por la producción de macroconidios levemente curvados, generalmente con 3 septos, célula apical roma y célula basal en forma de pie, esporodoquios color crema pero algunas veces pueden ser verdes, azules o rojos, abundantes clamidosporas y producción de conidios aéreos que se forman a partir de monofialides largas. Morfológicamente, las cepas patógenas y saprófitas son similares o idénticas y es imposible diferenciarlas usando este concepto. Esto sólo se puede conseguir a través de ensayos de patogenicidad, análisis de grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) o diagnóstico molecular (Leslie y Summerell, 2006).

Fusarium solani tiene distribución cosmopolita, y puede encontrarse ampliamente distribuido en diferentes tipos de suelos naturales. Dentro del complejo se encuentran especies saprófitas y fitopatógenas. Actualmente, se reconoce que las especies patógenas afectan un amplio y diverso rango de plantas huésped y causan grandes pérdidas en cultivos económicamente importantes en todo el mundo.

La correcta identificación de las especies de *Fusarium* ha sido siempre problemática aún para taxónomos expertos. Tradicionalmente, para la identificación de las formas especiales, se han observado las características morfológicas, ensayos de patogenicidad para la especificidad de huésped, y pruebas de compatibilidad sexual para la especificidad de apareamiento. Dichas técnicas de identificación para fines diagnósticos no son de uso común debido a que consumen demasiado tiempo y en algunos casos son poco concluyentes. Esto último es debido a que las pruebas de patogenicidad son afectadas por factores como el medio ambiente y la composición genética del huésped; y las pruebas de compatibilidad sexual por la fertilidad de los individuos, (Leslie y Summerell, 2006). También, la degeneración de los cultivos y la producción de mutantes pueden ocasionar problemas adicionales para la identificación de las especies. En cuanto a los ensayos de patogenicidad requieren mucho tiempo para ajustar las condiciones y pueden demandar hasta 4 o 6 meses para su desarrollo (Priest y Letham, 1996).

Las cepas de *F. solani* causante de PPRM comparten las siguientes características: la esporulación generalmente es rápida y abundante (5 a 7 días), esporodoquios de color crema o azules formados abundantemente en agar papa

glucosado (APG), agar sintético con bajo nivel de nutrientes (SNA, Nirenberg, 1990) y agar hojas de clavel (CLA, Leslie y Summerell, 2006). Poseen conidióforos aéreos abundantes en SNA y CLA, generalmente no ramificados, ocasionalmente ramificados formando monofiálides. Presentan clamidosporas tanto en las hifas como en los conidios, principalmente subglobosas, hialinas, frecuentemente terminales, ocasionalmente intercalares, solitarias o en pares, raramente en cadenas. Las cepas de *F. solani* PPRM forman varios tipos de conidios que son consistentes en tamaño y forma con los descriptos para las cepas representantes del FSSC. El color y la morfología de la colonia observada entre las cepas que causan PPRM no han sido suficientes para distinguir claramente este grupo de cepas de *F. solani* a nivel de especie. Los diámetros de las colonias a 20, 25 y 30° C después de 3 días de crecimiento están dentro del rango reportado para otras especies de *F. solani* (Reynoso *et al.*, 2006)

1.2.2 Concepto filogenético de especies

El término de especie filogenética se refiere al menor grupo de individuos que comparten un único carácter derivado o apomórfico, es decir, no presente en sus ancestros afines (Nixon y Wheeler, 1990). La ventaja de esta definición es que permite establecer grupos individuales de forma fácil pero la decisión para situar el límite de especie resulta subjetiva. Para evitar esta subjetividad a la hora de determinar el límite de especie filogenética se ha establecido el concepto de concordancia filogenética.

El concepto de concordancia filogenética fue propuesto por Avise y Ball (1990) y consiste en utilizar más de un gen para llevar a cabo el estudio filogenético. De esta manera obtenemos diferentes genealogías, las cuales se comparan entre sí para establecer el límite de especie en el punto de coincidencia entre todas ellas. El método que utiliza este concepto se conoce como *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR) (Taylor *et al.*, 2000), aunque también se utilizan más comúnmente los términos de análisis multigénico o multilocus, y está basado en el análisis conjunto de las secuencias de diferentes genes estructurales y ribosómicos. Este método ha demostrado su utilidad en diversos estudios realizados tanto con bacterias como con organismos eucariotas.

El concepto de especie filogenética ha sido aplicado en especies de *Fusarium* no solo para definir especies dentro del género sino también para hacer predicciones de compatibilidad de apareamientos, definir evolución de metabolitos secundarios como

micotoxinas y estudiar las relaciones filogenéticas y filogeográficas de entre los distintos taxones (Aoki *et al.*, 2005; Leslie y Summerell, 2006; O'Donnell, 1996, 2000; O'Donnell *et al.*, 2008).

La información sobre similitudes genéticas y diferencias a nivel molecular constituye una herramienta indispensable para establecer las relaciones filogenéticas, permitiendo el acercamiento de las relaciones evolutivas entre los grupos de hongos superiores y la delineación del concepto de especies. Muchas de las especies filogenéticas se han identificado sobre la base de las secuencias de nucleótidos de la región del DNA ribosomal, en particular, los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y genes que codifican para la β -tubulina, tipo de apareamiento, factor de elongación 1 α , calmodulina e histona H3 (Leslie y Summerell, 2006). Estos genes se encuentran como copia única en las especies de *Fusarium*, y poseen un alto nivel de polimorfismo de secuencias entre especies estrechamente relacionadas (Geiser *et al.*, 2004).

Los estudios filogenéticos muestran que el FSSC es sumamente variable y consiste de tres subgrupos, llamados clades 1, 2 y 3 (O'Donnell *et al.*, 1996; O'Donnell 2000; O'Donnell *et al.*, 2008). El clado 1 comprende sólo dos miembros, ambos aislados de Nueva Zelanda. El clado 2 está compuesto al menos por ocho especies filogenéticas, incluyendo los patógenos que causan el síndrome de la muerte súbita en soja, tales como *F. viguliforme*, *F. tucumaniae* y otros (Aoki *et al.*, 2003) hipotetizándose que estarían distribuidos solo en América del Sur. El clado 3 es el grupo más grande y diverso, conteniendo 18 linajes y las siete poblaciones de apareamiento definidas por Matuo y Snyder (1973). La mayoría de las especies de *Fusarium* asociadas con suelo y plantas y todos los aislados patógenos de humanos se encuentran en este clado (Zhang *et al.*, 2006). La mayoría de los estudios han demostrado que el clado 3 consiste al menos de 35 especies filogenéticas (O'Donnell *et al.*, 2008; Nalim *et al.*, 2012) que muestran cierto grado de subestructura biogeográfica, conteniendo clados con posibles conexiones de América del Sur, Asia y África (O'Donnell, 2000).

Por otro lado, para los estudios de taxonomía molecular y para evaluar la diversidad de las poblaciones fúngicas a nivel de especie, cepas y biotipos, una excelente herramienta ampliamente utilizada es la generación de marcadores a partir de análisis de AFLPs, que tienen una alta reproducibilidad y la posibilidad de analizar el genoma completo (Barros *et al.*, 2007; Bogale *et al.*, 2009; Chulze *et al.*, 2000; Majer *et al.*, 1996; Reynoso *et al.*, 2009; Vos *et al.*, 1995; Zéller *et al.*, 2000, 2003, 2004).

Reynoso *et al.* (2006) investigaron por medio de polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) a *F. solani* agente causal de la PPRM aislados de distintas localidades de la provincia de Córdoba junto con otras cepas fitopatógenas representativas del complejo de especies *F. solani*. Los resultados obtenidos en los análisis de AFLP, de las cepas de *F. solani* aisladas de raíces con síntomas de la PPRM, efectivamente definieron a este grupo de cepas como distintas dentro del FSSC y separado de aquellas que causan la podredumbre de raíz en otras leguminosas. Las similitudes entre las cepas de maní y otras cepas de la FSSC se encuentran en un rango indeterminado (40 - 60%), lo que sugiere que, si bien estas cepas están estrechamente relacionadas, su estado de especie sigue sin resolverse y serían necesarios marcadores diferentes a los AFLPs para aclarar su relación.

1.2.3 Detección y aislamiento del agente causal

La detección de microorganismos fitopatógenos a partir de material vegetal y reservorios naturales como el suelo, es de vital importancia para garantizar las condiciones fitosanitarias de los sistemas agrícolas. En los últimos años, las técnicas de diagnóstico han evolucionado permitiendo la detección rápida y confiable de diferentes patógenos, incluso la detección de inóculo en sitios de siembra; puntos críticos para cualquier programa de manejo integrado de enfermedades. En el caso específico de la PPRM, es muy importante determinar si el suelo está infectado y el grado de incidencia del patógeno antes de la siembra para asegurar un apropiado manejo de la enfermedad. Actualmente, en nuestra región se solicita dicho análisis para la toma de decisiones en los arrendamientos de campos para la siembra de maní (Oddino, comunicación personal).

Los métodos tradicionales para el aislamiento y detección de *F. solani* en suelo o tejido vegetal incluyen el cultivo de dichas muestras en medio PCNB modificado (Cho *et al.*, 2001; Huang y Hartman, 1996). Sin embargo, dicho método es limitado en cuanto a su sensibilidad y especificidad ya que otros miembros del FSSC que cohabitan en el suelo y/o tejido vegetal pueden desarrollar también en este medio semiselectivo (Li *et al.*, 2003). Además la identificación morfológica de esos hongos insume mucho tiempo (mayor a 20 días) y requiere un extensivo conocimiento de la taxonomía clásica.

En los últimos años, el uso de métodos moleculares ha incrementado y han permitido resolver muchos de los problemas asociados con los sistemas de

identificación fenotípicos (Donaldson *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999). Con el uso de métodos moleculares además de identificar fehacientemente un organismo determinado, se ha logrado también establecer hipótesis de relaciones filogenéticas y estimar la variación dentro de las poblaciones. A su vez permiten localizar y aislar genes de interés o regiones específicas del genoma, una herramienta muy poderosa en la biología molecular.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece ventajas frente a los métodos convencionales de aislamiento e identificación en medios de cultivo ya que no se necesita aislar al patógeno del suelo y/o de cualquier material vegetal para poder detectarlo. El diseño de cebadores a partir de marcadores moleculares es una herramienta útil para diseñar técnicas de detección rápida y específica de hongos fitopatógenos basadas en PCR (Cipriani, 2009; Li *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004) debido a que nos permite desarrollar una herramienta de detección temprana.

1.2.4 Mecanismos de patogenicidad en hongos: Enzimas

Los hongos son organismos principalmente de vida saprofítica. Menos del 10% de todas las especies descritas son capaces de colonizar a las plantas y una fracción aún menor son verdaderos fitopatógenos causantes de enfermedad.

Diversos mecanismos han sido evolutivamente seleccionados en la interacción planta-patógeno que permitieron a los fitopatógenos desarrollar estrategias para colonizar los tejidos de un huésped específico. Los procesos de colonización son eventos claramente complejos que, en muchos casos, implican la secreción de una mezcla de enzimas hidrolíticas y proteolíticas, cuya composición varía dependiendo de cada interacción hongo-planta en particular. Durante la penetración, las enzimas hidrolíticas y los mecanismos de defensa de la planta generan moléculas activas, principalmente oligosacáridos, que pueden inducir en el huésped una amplia variedad de respuestas de defensa contra la penetración del patógeno (Horbach *et al.*, 2011).

La pared celular vegetal representa una importante barrera a la invasión microbiana que debe ser superada con éxito para cualquier microorganismo patógeno. Es una estructura compleja que, aparte de dar soporte a los tejidos vegetales, tiene la capacidad de condicionar el desarrollo de las células (Carpita y McCann, 2000; Reignault *et al.*, 2008). Está compuesta principalmente por una red de carbohidratos y diferentes clases de proteínas estructurales, embebidas en una matriz gelatinosa de carbohidratos y proteínas (Carpita y Jibeaut, 1993; Showalter, 1993). Químicamente



consiste en cuatro grupos mayores de polisacáridos complejos: celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. La pared celular primaria (presente en todas las células vegetales) está compuesta por una red de microfibrillas de celulosa y hemicelulosa embebida en una matriz gelatinosa de sustancias pécticas. La pectina es una familia de polisacáridos complejos y se encuentra como componente principal de la lamela media en la pared celular de las plantas dicotiledóneas y de las monocotiledóneas no-gramíneas. Es responsable, junto con la hemicelulosa, de la integridad y coherencia de los tejidos vegetales así como de la textura de vegetales y frutas (Pilnik y Voragen, 1991; D'Ovidio *et al.*, 2004).

Por otro lado, las enzimas pécticas son producidas en grandes cantidades por numerosos microorganismos asociados en forma patógena a las plantas (Rombouts y Pilnik, 1980; Cooper, 1983; Alaña *et al.*, 1990, 1991; Bateman, 1996; Polizeli *et al.*, 1991). Muchos de los hongos fitopatógenos secretan enzimas degradadoras de pectinas durante la patogénesis. Las pectinasas son las primeras enzimas secretadas por los patógenos fúngicos cuando ellos atacan la pared celular de las plantas (Collmer y Keen, 1986; Idnurm y Howlett, 2001). Algunas de ellas son: pectina metilerasas, poligalacturonasas, pectato liasas y pectina liasa. La degradación de la pectina debilita la pared celular y expone otros componentes a otras enzimas como las celulasas y las hemicelulasas (Reignault *et al.*, 2008). Finalmente esto lleva a la pérdida de la coherencia del tejido y facilita el crecimiento de la hifa fúngica dentro del tejido vegetal (Raiola *et al.*, 2008).

La acción de las enzimas pécticas, en especial de las poligalacturonasas, parece ser un requisito indispensable para que actúen las demás enzimas degradadoras de pared celular. La aparición secuencial de las enzimas degradadoras de la pared celular podría tener su explicación en el hecho de que sólo después de que hayan actuado las enzimas pécticas, la red de celulosa antes rodeada por la pectina, estaría accesible y los inductores de celulasas y hemicelulasas serían liberados (De Lorenzo *et al.*, 1997). Por ello, la mayoría de los estudios sobre enzimas degradadoras de pared celular se han centrado en las enzimas pécticas y en especial en las poligalacturonasas (PGs).

Dentro del complejo de especies de *F. solani*, los estudios realizados sobre enzimas pectinolíticas han demostrado divergencias en los diferentes patosistemas. En podredumbre de tallo de zapallo causado por *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raza 1 la ruptura de sustancias pécticas y maceración del tejido involucra una endopectatoliasa (Hancock, 1968). Crawford y Kolattukudy (1987) reportaron que *F. solani* f. sp. *pisi*

produce una pectatoliasa en cultivo y sugirieron que podría estar involucrada en la patogénesis del hongo en plantas de arvejas. Zhang *et al.* (1999) sugieren que la PG es la principal enzima pectinolítica secretada por *F. solani* durante la infección de frutos de melón.

Debido a la importancia de las PGs como las primeras enzimas en actuar para romper la pectina de pared celular vegetal y en los procesos de comunicación molecular entre el huésped y el patógeno, se han realizado numerosos estudios para determinar cuál es el papel real que juegan estas enzimas en los procesos de virulencia y patogenicidad, pero todavía existe controversia sobre el tema, ya que, en la bibliografía se observan ejemplos que apoyan teorías contradictorias. Así, por ejemplo, mediante el desarrollo de técnicas de producción de mutaciones dirigidas, han aparecido trabajos que demuestran que las PGs no juegan un papel determinante en la virulencia. En *F. oxysporum*, se ha informado que dos mutantes, una en el gen *pg5* que codifica para una ENDO-PG (Garcia-Maceira *et al.*, 2001) y la otra en el gen *pgx4* que codifica para una EXO-PG (Garcia-Maceira *et al.*, 2000) mantienen los mismos niveles de virulencia en plantas susceptibles que las cepas salvajes. Es posible que la existencia de otros genes de PGs aún no caracterizados confiera a las cepas mutantes actividad PG residual, impidiendo conclusiones determinantes.

1.2.4.1 Poligalacturonasas

Las poligalacturonasas son enzimas pectinolíticas que catalizan el clivaje hidrolítico de las cadenas de ácido poligalacturónico introduciendo una molécula de agua en el puente oxígeno que mantiene unidos a los oligómeros que conforman la sustancia péctica (Figura 1.4). Se clasifican en endo-poligalacturonasas (endo-PGs) y exo-poligalacturonasas (exo-PGs) dependiendo de su modo de acción. Las endo-PGs catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos internos en las cadenas de poligalacturonatos de modo aleatorio dando como producto oligalacturonatos, mientras que las exo-PGs actúan sobre el extremo no reductor del sustrato, liberando ácido monogalacturónico. Ambos productos tienen propiedad de azúcares reductores, característica que es utilizada en los métodos de detección.

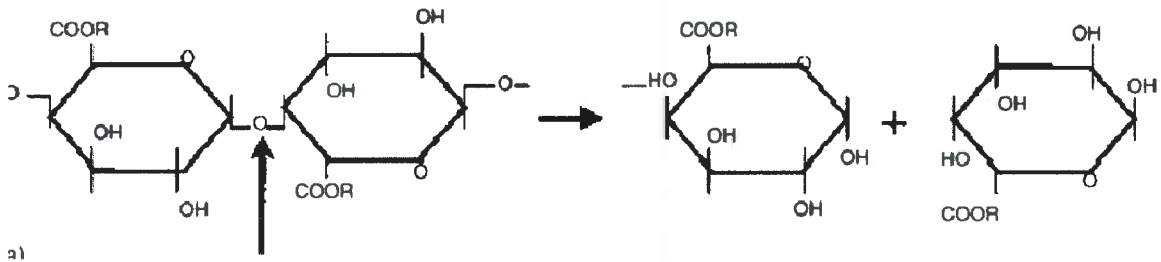


Figura I.4 Esquema general del sitio de acción de las PG en las cadenas de ácido poligalacturónico

Las endo-PG se encuentran ampliamente distribuidas entre hongos, bacterias y algunas levaduras, en tanto que las exo-PG son de ocurrencia menos frecuente. También existen reportes de presencia de enzimas poligalacturonasas en plantas superiores (Lang y Dorneburg, 2000).

La familia de las poligalacturanasas comparten la misma estructura central consistente en cadenas β paralelas formando una hélice dextrógira definida como β -hélice paralelas. Esta estructura de β -hélices paralelas confieren, a las enzimas que las poseen, una alta estabilidad lo que consecuentemente hace que su actividad enzimática sea efectiva en una gran variedad de ambientes.

Las poligalacturonasas difieren mucho en cuanto a sus funciones biológicas y propiedades físico-químicas dependiendo del tipo de microorganismo que las produzca. La mayoría tienen un pH óptimo de acción de 3,5 a 5,5 y un rango de temperatura óptima de 30-50° C. La mayoría de las PGs tienen actividad enzimática óptima dentro de un rango de pH ácido, pero existen también reportes de PGs alcalinas (Ranveer *et al.*, 2005).

El rol de las enzimas PGs en la interacción planta-patógeno no ha sido bien establecido, sin embargo no cabe duda de su importancia. Tanto es así, que las plantas superiores han desarrollado mecanismos específicos de defensa como son la Proteínas Inhibidoras de Poligalacturonasas (PGIP: de sus sílabas en inglés) que unen específicamente a sitios de las enzimas PGs (Bishop, 2005). Las exo-PGs descomponen oligagalacturanos elicitores de la defensa del huésped liberados por las endo-PG (Roncero, 2003). En general, la importancia de las PGs en patogenicidad podría ser diferente en cada patosistema, pero la mayoría de las PGs fúngicas están directamente involucradas en la patogénesis y son denominadas "factores de virulencia" de dichos organismos (Niture, 2008).

En relación a la enfermedad solo se conocen los factores agroclimáticos que influyen en su desarrollo (March y Marinelli, 2005; Oddino, 2004), pero no hay información acerca del patógeno y sus estrategias para la colonización de la raíz, ni el estadio de desarrollo de la misma en la cual sucede la infección. Un aspecto de interés en relación a los hongos fitopatógenos es el amplio espectro de enzimas hidrolíticas que están involucradas en la penetración y colonización del tejido de la planta durante la infección (Kikot *et al.*, 2009; Polizeli *et al.*, 1991; Waksman *et al.*, 1991).

II. Hipótesis

III. Objetivos

II. HIPÓTESIS

Para el desarrollo del presente trabajo de tesis se plantearon las siguientes hipótesis:

- a) *Fusarium solani*, agente causante de la podredumbre parda de la raíz de maní es filogenéticamente diferente de los patógenos descritos dentro del complejo de especies *F. solani*.
- b) La producción de poligalacturonasas es uno de los factores de virulencia del patógeno.
- c) Los estudios de caracterización genética permitirán obtener regiones de DNA distintivas del patógeno para el desarrollo de cebadores específicos para la identificación del mismo

III. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el patosistema *Fusarium solani* - maní para conocer la estrategia que utiliza el patógeno para colonizar el huésped y determinar las características genéticas distintivas que permitan la identificación del patógeno en suelo y tejido vegetal para realizar estudios epidemiológicos.

III.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evaluar la patogenicidad de las cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda.
- b) Determinar la producción de poligalacturonasas como un factor de virulencia de las cepas.
- c) Comparar a nivel molecular las cepas de *F. solani* causante de la podredumbre parda de raíz de maní con otras especies del complejo utilizando concordancia filogenética.
- d) Desarrollar un método simple y eficiente basado en PCR para la detección específica de *F. solani* patógeno de maní en muestras de suelo y raíces de maní natural y artificialmente contaminadas.

IV. Materiales y Métodos

IV.1 Patogenicidad de cepas de *Fusarium solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda

IV.1.1 Medios de cultivos

- Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA) (Nürnberg, 1976): KH_2PO_4 1 g, KNO_3 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, KCl 0,5, glucosa 0,2 g, sacarosa 0,2 g, agar-agar 20 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml.

IV.1.2 Cepas fúngicas

Para los ensayos de patogenicidad se utilizaron 9 cepas aisladas previamente en nuestro laboratorio a partir de raíces con síntomas de podredumbre parda de la raíz de maní las cuales fueron identificadas como *F. solani* por metodología clásica y molecular (Reynoso *et al.*, 2006) (Tabla IV.1). Todas las cepas se mantienen en la colección de cultivos del laboratorio de Micología (UNRC) a -80°C , liofilizadas y en el medio SNA (Leslie y Summerell, 2006).

IV.1.3 Preparación de suelo

Cinco kilogramos de tierra tamizada se colocaron en bolsas de polietileno y se esterilizaron tres veces en autoclave a 121°C (1 atm, 20 minutos) durante tres días consecutivos. Luego, se realizó una mezcla 50% tierra esterilizada y 50% arena fina y se colocó en macetas de 20 cm de alto y 15 cm de ancho.

IV.1.4 Semillas de maní

Las semillas de maní utilizadas pertenecen al cultivar Alto Oleico (PEPE ASEM INTA) y fueron gentilmente cedidas por Mg. Claudio Oddino de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Universidad Nacional de Río Cuarto.

Tabla IV.1 Cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda utilizadas en el ensayo de patogenicidad (Reynoso *et al.*, 2006).

Cepa	Número de acceso en GenBank				Origen
	PBR2	TEF	ITS	β -tub	
MR013	JF700526	GQ121885	GQ121900	GQ121900	Córdoba, Gral. Deheza
MR116	–	GQ121884	GQ121899	GQ121899	Córdoba, Gral. Cabrera
MR313	–	GQ121889	GQ121904	GQ121904	Córdoba, Hernando
MR319	JF700530	GQ121887	GQ121902	GQ121902	Córdoba, Hernando
MR338	–	GQ121890	GQ121905	GQ121905	Córdoba, Hernando
MR386	JF700533	GQ121888	GQ121903	GQ121903	Córdoba, Hernando
MR403	–	GQ121883	GQ121898	GQ121898	Córdoba, Etruria
MR415	JF700531	GQ121881	GQ121896	GQ121896	Córdoba, Etruria
MR436	–	GQ121891	GQ121906	GQ121906	Córdoba, Etruria
MR528	JF700532	GQ121882	GQ121897	GQ121897	Córdoba, Carnerillo

IV.1.5 Preparación de inóculo

Para la preparación de inóculo, 100 g de semillas de sorgo granífero se esterilizaron en autoclave a 121° C (1 atm, 20 minutos) tres veces por tres días consecutivo. Luego, las semillas estériles se hidrataron con agua destilada estéril y se inocularon un cultivo de *F. solani* causante de podredumbre parda en maní. El patógeno fue desarrollado en medio SNA sólido y a partir de este se tomaron discos de agra (5mm) de los bordes de la colonia en activo crecimiento. Las semilla inoculadas se incubaron en cámara 15 días a 25°C, bajo ciclos de 12h/12h de luz blanca y luz negra. Se agitaron manualmente cada dos días.

IV.1.6 Inoculación de suelo y siembra de maní

En las macetas con la mezcla de tierra más arena (relación 1:1), se realizaron orificios de 6 cm de profundidad y se colocaron 5 semillas de sorgo inoculadas con cada cepa de *F. solani*. Inmediatamente después se agregaron 2 cm del sustrato y se colocó una semilla de maní por orificio. Como control negativo se usó el sustrato sin inocular. Todas las macetas se regaron con agua corriente hasta alcanzar capacidad de campo (Volúmen de agua que es capaz de retener el suelo).

IV.1.7 Condiciones de invernadero

Se usaron 15 macetas por cepa y 15 macetas como controles negativos, las cuales fueron sembradas con 5 semillas de maní. Dichas macetas se colocaron bajo condiciones de invernadero (aproximadamente 25/30° C durante el día y 10/15° C durante la noche). Luego de la emergencia, se dejaron 3 plantas por maceta seleccionadas al azar. Las plantas se regaron con agua corriente cada dos días hasta los 15 días post emergencia, y posteriormente se pusieron bajo estrés hídrico mediante la interrupción del regado hasta observar marchitamiento de las hojas. Luego se reanudó el riego durante los siguientes 30 días. Cumplido este paso se aplicó un segundo estrés hídrico durante un periodo de 15 días adicionales. Las plantas fueron cosechadas a los 120 días post-inoculación para la evaluación de síntomas de la enfermedad, la determinación del peso fresco de la raíz y de la parte aérea, y finalmente para el aislamiento e identificación de *F. solani* causante de podredumbre parda a través de metodología clásica (punto IV.6.2 y IV.6.3) y molecular usando cebadores específicos (punto IV.6.4; IV.6.5 y IV.6.7). A su vez se tomaron muestras del material vegetal a fin de determinar mediante PCR la presencia del patógeno en la raíz (punto IV.6.6 y IV.6.7).

IV.1.8 Microscopia electrónica de barrido

Para observar la capacidad de infección del patógeno se realizó microscopia electrónica de barrido (SEM). Las raíces con y sin síntomas (control) fueron fijadas por inmersión total en solución de glutaraldehído al 2,5% (v/v) durante 24 h a 4° C. Enseguida las muestras fueron deshidratadas utilizando una serie de soluciones de concentración creciente de etanol y se secaron por punto crítico empleando dióxido de carbono (Denton Vacuum DCP1). Las muestras fueron fijadas con cinta bifaz sobre soporte de aluminio y recubiertas con oro, Denton Vacuum DeskIV (22-24 nm espesor) y examinadas en el microscopio electrónico de barrido JEOL Modelo JSM 6480 LV SEM (Japan). Las examinaciones fueron realizadas en la Universidad Nacional de Salta.

IV.1.9 Análisis estadístico

En las pruebas de patogénesis se utilizó un diseño completamente al azar con 3 repeticiones de 15 plantas inoculadas con cada cepa de *Fusarium solani* (45 plantas en total para cada cepa)

Los datos de peso fresco de raíz y de las partes aéreas fueron sometidos a análisis de la varianza, cuando los datos no se ajustaron a normalidad o variancia se los transformó con raíz cuadrada. Las diferencias entre medias fueron evaluadas mediante el test de Holm Sidak utilizando el paquete estadístico Sigma Stat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc., USA).

IV.2 Determinación de la producción de enzimas poligalacturonasas en las cepas de *Fusarium solani* causantes de podredumbre parda de la raíz de maní

IV.2.1.a. Materiales

- Medio de cultivo Czapek-Dox modificado (Martinez et al., 1991): Concentrado Czapek 10 ml; K_2HPO_4 1 g; glucosa 5 g; pectina cítrica 5 g; Agua destilada c.s.p 1000 ml.
- Reactivo de Somogyi:
 - A. 24 g Na_2CO_3 anhidro, 12 g tartrato sódico – potásico. Disolver en 250 ml de agua
 - B. 4 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ disolver en 40 ml de agua., agregar la mezcla B en A agitando.
 - C. Sobre la mezcla A+B agregar 16 g $NaHCO_3$
 - D. 180 g Na_2SO_4 anhidro. Agregar a 500 ml de agua, hervir para expulsar el aire aproximadamente 30 min.
Una vez frío mezclar C+ D, agua c.s.p. un litro
- Reactivo de Nelson:
 - A. 50 g molibdato de amonio anhidro disolver en 900 ml H_2O ,
 - B. 42 ml H_2SO_4
 - C. 6 g $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ previamente disuelto en 50 ml de H_2O .
Mezclar A + B+ C, llevar a un litro con agua
- Agar Papa Glucosado: Infusión de papa 4 g, glucosa 20 g, agar-agar 15 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml.

IV.2.1.b. Metodología

Para el estudio de producción de poligalacturonasas (PGs) se seleccionaron las 9 cepas de *F. solani* aisladas de raíz de maní con síntomas de podredumbre parda (Reynoso *et al.* 2006) (punto IV.1.2). Las cepas se cultivaron en agar papa glucosado (APG) a 25° C y luego de 7 días de incubación se extrajeron con sacabocado dos porciones de 5 mm de diámetro que fueron inoculados en frascos Erlenmeyer de 1000 ml que contenían 500 ml de caldo Czapek-Dox modificado. Los frascos inoculados se incubaron a 37° C en agitación durante 7 días. A partir del tercer día se extrajeron, bajo esterilidad, 4 ml de cada cultivo hasta el sexto día post-inoculación. Los 4 ml de muestra se llevaron a tubos Falcon y se centrifugaron a 10.000 rpm por 1 h. Se tomaron 200 µl del sobrenadante y se congelaron hasta el momento de estudio de la actividad poligalacturonasa.

IV.2.2 Medición de la actividad poligalacturonasa

El producto de la actividad exopoligalacturonasa de las cepas fue determinado por medida espectrofotométrica, siguiendo la metodología propuesta por Nelson (1944) y modificada por Somogyi (1952). De cada muestra de sobrenadante obtenido en el punto IV.2.1.1 se extrajeron por duplicado 10 µl que se incubaron durante 15 min en baño termostatizado a 37° C en la siguiente mezcla de reacción: 10 µl de buffer acetato 50 mM, 180 µl de buffer sustrato (ácido poligalacturónico 0,1%) en un volumen final 200 µl.

Para determinar la actividad poligalacturonasa del medio de cultivo y la presencia de azúcares reductores en el sobrenadante se realizaron controles de sobrenadante en cada ensayo de medición para cada una de las muestras. El control de sobrenadante se realizó incubando 15 min a 37° C la siguiente mezcla de reacción: 190 µl de buffer acetato 50 mM pH 5, 10 µl de sobrenadante (volumen final 200 µl).

Para determinar los productos de reacción presentes en el sustrato se hicieron controles de sustrato para cada uno de los ensayos realizados. El mismo se hizo incubando 15 min a 37° C la siguiente mezcla de reacción: 180 µl de buffer sustrato (ácido poligalacturónico 1M), 20 µl de buffer acetato 50 mM pH 5 (volumen final 200 µl).

Seguido el período de incubación requerido para la reacción enzimática, a cada uno de los tubos se le agregó 200 µl de reactivo de Somogyi y se llevó a un baño de

agua hirviendo por 10 min. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 200 µl de reactivo de Nelson. Finalmente se diluyó con 1,8 ml de agua destilada.

Se midió la absorbancia de la mezcla de la reacción en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La actividad enzimática se expresó Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml), esto es, cantidad de azúcares reductores producidos, en nmoles, por minuto por mililitro a 37°C.

La conversión de la absorbancia a nmoles de azúcares reducidos producidos se realizó utilizando una curva patrón con cantidades variables del azúcar. La inversa de la pendiente se utilizó como el factor para convertir la absorbancia y obtener los nmoles de azúcares producidos.

Los datos de actividad enzimática se graficaron en función del tiempo de cultivo. Las actividades obtenidas se analizaron estadísticamente mediante la utilización de un test ANOVA de una vía (Método de Holm-Sidak) usando el programa estadístico SigmaStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc., USA).

IV.2.3 Análisis de la producción enzimática de cepas de *Fusarium solani* por medio de electroforesis de isoelectroenfoque

IV.2.3.1 Inducción de la secreción de enzimas poligalacturonasas.

Las cepas se cultivaron en APG por 7 días a 25° C y luego se extrajeron con sacabocado de 5 mm dos trozos del borde en activo crecimiento de las colonias, los que fueron utilizados para inocular frascos Erlenmeyer de 1000 ml conteniendo 500 ml de caldo Czapek-Doc modificado. Los caldos inoculados se incubaron a 37° C en agitación a 250 rpm por 4 días. En el cuarto día, el cultivo fue sometido a dos filtraciones primero con papel Whatman N° 4 y luego, con un filtro clarificador de 65 µm de diámetro de poro. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio a 25° C. El filtrado concentrado se desalinizó usando una columna Sephadex G-25 y el eluido desalinizado, finalmente se liofilizó y se conservó a -20° C hasta el momento de ser usado. El liofilizado se suspendió en 200 µl de agua destilada.

IV.2.3.2 Isoelectroenfoque (IEF)

IV.2.2.2.1 Preparación de las muestras

La concentración proteica de las muestras se midió utilizando el método de Bradford (1976). Para ello, 50 µl de muestra o estándar (Soluciones de concentración conocida de albúmina) se mezclaron con 10 µl de NaOH 1N y 200 µl de Reactivo de Bradford. Se incubó durante 5 min y la lectura se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Con la absorbancia observada en los estándares se realizó una gráfica de concentración vs absorbancia. Mediante la ecuación de la recta se obtuvieron los valores de la concentración proteica en las muestras. Las muestras se llevaron a una concentración de proteínas de 1000 µg/ml.

IV.2.3.2.2 Desarrollo del isoelectroenfoque

IV.2.3.2.2.a. Materiales

- Gel de poliacrilamida al 10%: agua destilada 13,75 ml, glicerol (25%, p/v) 5 ml, anfolitos (Pharmalyte 3,5-10) 1,25 ml, acrilamida-bisacrilamida (25%T, 3%C) 5 ml. Porcentaje de T define el reticulado del gel que es la concentración total de monómeros (acrilamida + bisacrilamida; porcentaje peso /volumen) porcentaje de C es la dureza de del gel que está dada por la relación de la cantidad de bisacrilamida al total de monómeros.
- Solución fijadora: ácido sulfosalicílico 4 g, metanol 30 ml, ácido tricloroacético 12,5 g, agua destilada c.s.p. 100 ml.
- Solución colorante: CuSO₄ 500 mg, ácido acético glacial 10 ml, etanol 27 ml, Coomassie Brilliant Blue R-250 40 mg, agua destilada cantidad suficiente para 100 ml.
- Solución decolorante I: ácido acético glacial 7 ml, etanol 12 ml, CuSO₄ 500 mg, agua destilada cantidad suficiente para 100 ml.
- Solución decolorante II: ácido acético glacial 7 ml, etanol 12 ml, agua destilada cantidad suficiente para 100 ml.

IV.2.2.2.2.b. Metodología

La electroforesis de isoelectroenfoco se realizó en un gel de 25 ml de poliacrilamida al 10%. Se realizaron 2 geles idénticos donde se sembraron 5 µl de muestra y 5 µl de marcador de puntos isoelectrónicos, con el mismo orden de posición en cada gel. Uno de los geles se usó para la determinación de pIs correspondientes a los puntos isoelectrónicos de las especies proteicas presentes en el sobrenadante y el otro para el desarrollo del zimograma.

El enfoque se llevó a cabo en tres etapas a voltaje constante: 1) 100V 15 min; 2) 200V 15 min; y 3) 450V 60 min. Transcurridas estas etapas tiempo para la determinación del punto isoelectrónico de las distintas especies proteicas presentes en la muestra, uno de los geles se sumergió en la solución fijadora durante 30 min. Posteriormente, se trató con una solución colorante durante 2 h y luego se decoloró lavándolo 3 veces con la solución decolorante I y una vez con la solución decolorante II hasta obtención de un fondo incoloro. Se utilizó como marcador una mezcla de proteínas de amplio rango de punto isoelectrónico. La determinación de los valores de pI se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés, tomando como referencia la posición del cátodo.

El segundo gel obtenido, se usó para revelar la presencia de actividad poligalacturonasa en las especies proteicas. Para esto el gel de poliacrilamida se enfrentó a un gel de agarosa conteniendo ácido poligalacturónico al 0,2% (p/v) y se incubó por 10 min a 37° C. Finalmente, el gel de agarosa se tiñó con una solución de rojo de rutenio y la presencia de actividad enzimática en las proteínas del gel se reveló por la presencia de un halo transparente en el gel de agarosa teñido.

IV.3 Diseño de cebadores específicos para cepas de *Fusarium solani* causante de podredumbre parda de raíz de mani

IV.3.1 Diseño de cebadores específicos a partir de marcadores monomórficos de AFLP

IV.3.1.1 Aislamiento de las bandas monomórficas de AFLP

Las cepas del complejo de especies *Fusarium solani* responsables de la PPRM se caracterizaron usando marcadores morfológicos y moleculares (Reynoso *et al.* 2006). En dicho estudio, se utilizaron cuatro combinaciones de cebadores durante la amplificación selectiva: *EcoRI*+TT/*MseI*+CA, *EcoRI*+TT/*MseI*+AC, *EcoRI*+GG/*MseI*+CA, y *EcoRI*+GG/*MseI*AC lo que permitió identificar fragmentos específicos de especies.

A partir de las radiografías con los patrones de bandeo de AFLP se ubicaron las bandas específicas de especie en el papel secante. Con un alfiler se marcó el contorno de la banda en la radiografía de manera de marcar el papel secante. Con un bisturí previamente esterilizado con la llama de un mechero se recortó la banda del papel secante y se colocó la porción de papel obtenido en un microtubo estéril de 1,5 ml. Se agregó 30 μ L de agua bidestilada estéril y se incubó a 37° C por 1 hora.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 2 μ l del DNA eluido y se usó como templado en la reacción de amplificación usando los cebadores selectivos *EcoRI*+GG/*MseI*+AC: Las reacciones de amplificación se realizaron usando 2 μ l de DNA eluido, 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM), 1X Buffer AFLP, *Taq* DNA polimerasa (*GoTaq* DNA Polymerase, Promega, Madison, WI) (5U/ μ l), 27,8 ng/ μ l del cebador *EcoRI*+GG, 6,7 ng/ μ l en un volumen final de 17,2 μ l.

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) siguiendo el siguiente programa: 1 ciclo a 94° C por 30 s, 65° C por 30 s, 72° C por 60 s (bajar 0,7° C en cada ciclo durante los próximos 12 ciclos); seguido por 23 ciclos a 94° C por 30 s, 56° C por 30 s, 72° C por 30 s y una extensión final de 5 minutos a 72° C una vez transcurridos los 23 ciclos.

Los fragmentos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se visualizaron con un transiluminador UV a fin de verificar la amplificación de un único producto y estimar aproximadamente su tamaño. Se obtuvo un único fragmento de aproximadamente de 200 pb comparándolo con DNA

testigo (New England Biolabs, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 – 1500 pb. Dichos fragmentos se purificaron utilizando columnas de purificación de DNA (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Ambas cadenas de DNA se secuenciaron con cada par de cebadores (*EcoRI*+GG/*MseI*+CA) utilizados, usando un secuenciador Applied Biosystem ABI 3730 sequencer (Applied Biosystem), en Kansas State University. Las secuencias de ambas cadenas de DNA de los productos de PCR se alinearon usando la aplicación *ClustalW Multiple alignment* (Thompson *et al.*, 1994) del programa BioEdit versión 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNasaP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>) y cuando fue necesario, se ajustaron manualmente. Se obtuvo una secuencia de 217 pb, la cual se comparó con la base de datos en el GeneBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information) para determinar su homología con otras especies fúngicas. El programa que se utilizó para comparar las secuencias con otras secuencias en la base de datos fue BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

A partir de dicha secuencia, se diseñaron dos pares de cebadores mediante el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Se eligieron manualmente los cebadores que tuvieran una longitud entre 17 y 25 pb y se evaluaron en cuanto al tamaño del producto de PCR, temperatura de apareamiento y el porcentaje de Guanina/Citosina. Ambos cebadores específicos se sintetizaron en Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) y se designaron como FS1 y FS2.

IV.3.1.2 Evaluación de las condiciones de PCR

Una vez obtenidos los cebadores, se optimizaron las condiciones de amplificación por PCR para el par de cebadores FS1 y FS2. En todas las reacciones de amplificación se usó como templado, DNA extraído de cepas de *F. solani* aislados de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda previamente obtenidas en nuestro laboratorio (Reynoso *et al.*, 2006). Se probaron diferentes condiciones de PCR a fin de optimizar la metodología, lograr buena intensidad de amplificación y especificidad. Se variaron las concentraciones de MgCl₂, cebadores y la temperatura de apareamiento y, se mantuvieron constantes las concentraciones de DNA templado y dNTPs.

Las mezclas de amplificación consistieron en: 1 μ l de DNA templado (1 – 20 ng/ μ l), 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM), 1X Buffer PCR (Green Go Taq Reaction Buffer, Promega, Madison, WI), 0,5 U/ μ l y 0,1 U GoTaq DNA polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI) (5U/ μ l), 0,1, 0,2, 0,5 y 1 μ M de cada cebador FS1 y FS2 (10 μ M) y 1,5, 1,75, 2, 2,25 y 2,5 mM de MgCl₂ (50 mM) en un volumen final de 10 μ l. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PCT 200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) usando programas diferentes: 1 ciclo a 94° C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94° C por 30 s, se probaron 3 temperaturas de apareamiento, 50° C, 55° C y 60° C por 30 s., 72° C por 30 s y una extensión final de 5 minutos a 72° C una vez transcurridos los 35 ciclos.

Un control negativo, el cual contenía todos los reactivos excepto el DNA templado, se usó en todas las reacciones de PCR. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se estimó el tamaño del fragmento obtenido por comparación con DNA testigo (New England Biolabs, 100-bp Ladder).

IV.3.1.3 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los cebadores

A fin de evaluar la sensibilidad de los cebadores se usaron diferentes concentraciones de DNA genómico de *Fusarium solani* PPRM: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 100 pg, 0,1 pg y 0,01 pg/ μ l en una mezcla de reacción de 10 μ l.

Se comprobó la especificidad de los cebadores enfrentándolos con DNA de hongos aislados de suelo donde se cultiva maní (*Aspergillus* sección *Flavi*, *Aspergillus* sección *Nigri*, *Penicillium* spp., *Alternaria* spp.), otras especies pertenecientes al complejo *Fusarium solani* (*Fusarium virguliforme*, *F. tucumaniae*, *F. solani* f. sp. *pisii*, *F. solani* f. sp. *phaseoli*, *H. haematococca*) y *Fusarium* spp. aisladas de suelo.

IV.3.3 Diseño de cebadores específicos a partir regiones conservadas ITS, Factor de Elongación (EF-1 α) y β -tubulina

IV.3.3.1 Elección y diseño de los cebadores

A partir de las secuencias obtenidas alineadas IV.7.4, se analizaron de manera visual los supuestos sitios para el diseño de cebadores específicos de las especies de *F. solani* PPRM teniendo en cuenta aquellas regiones conservadas en las secuencias de las cepas de *Fusarium solani* asociadas a la enfermedad, pero distintas a las demás cepas del FSSC. Se eligieron manualmente los cebadores que tuvieran una longitud entre 17 y 25 bases y se evaluaron en cuanto al tamaño del producto de PCR, temperatura de apareamiento y porcentaje de Guanina/Citosina usando el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). (Tabla IV.2). Todos los cebadores específicos se sintetizaron en Invitrogen Argentina.

Tabla IV.2 Secuencias de los cebadores diseñados específicos de *Fusarium solani* PPRM

Región secuenciada	Nombre	Secuencia
ITS	ITS-F1	5'-ACA GAC GGC CCT GTA ACA AC-3'
	ITS-R1	5'-TGT AAT GAC GCT CGA ACA GG-3'
	ITS-R2	5'-GGG CCT GAG GGT TGT AAT G-3'
Factor de elongación (TEF-1 α)	EF-F1	5'-ATT TTG GGA CTC GGG AGA AG-3'
	EF-R1	5'-CCT CAT CGC GAT CTG CTT AT-3'
	EF-R2	5'-CGA CCA CCG TAA GTC AAA CC-3'
β -tubulina	Bt-F1	5'-GTC TCT TTT GCT GGC AGG AT-3'
	Bt-R1	5'-GCC AGA GGC CTA CAG ATG TC-3'
	Bt-F2	5'-CTG GCG GGA TGC TCA TAA TC-3'
	Bt-R2	5'-ACC AGA AGC CTA CAG ATG TCA-3'
	Bt-F3	5'-GCT CAT AAT CCG CAG GGT AA-3'
	Bt-R3	5'-AGT TGT CGG GAC GGA AGA G-3'

IV.3.3.2 Evaluación de las condiciones de PCR

En todas las reacciones de amplificación se usó como templado, DNA extraído de cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda

previamente obtenidas en nuestro laboratorio (Reynoso *et al.*, 2006). Se probaron diferentes condiciones de PCR a fin de optimizar la metodología, lograr buena intensidad de amplificación y especificidad. Se variaron las concentraciones de $MgCl_2$, cebadores y la temperatura de apareamiento y, se mantuvieron constantes las concentraciones de DNA templado y dNTPs.

Las mezclas de amplificación consistieron en: 1 μ l de DNA templado (1 – 20 ng/ μ l), 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM), 1X Buffer PCR (Green Go Taq Reaction Buffer, Promega, Madison, WI), 0,5 U/ μ l y 0,1 U GoTaq DNA polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI) (5U/ μ l), 0,1, 0,2, 0,5 y 1 μ M de cada cebador (10 μ M) y 1,5, 1,75, 2, 2,25 y 2,5 mM de $MgCl_2$ (50 mM) en un volumen final de 10 μ l. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PCT 200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) usando programas diferentes: 1 ciclo a 94° C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94° C por 30 s, se probaron diferentes temperaturas de apareamiento de acuerdo al cebador usado por 30 s., 72° C por 30 s y una extensión final de 5 minutos a 72° C una vez transcurridos los 35 ciclos.

Un control negativo, el cual contenía todos los reactivos excepto el DNA templado, se usó en todas las reacciones de PCR. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se estimó el tamaño del fragmento obtenido por comparación con DNA testigo (New England Biolabs, 100-bp Ladder).

IV.3.3.3 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los cebadores

Se usaron diferentes concentraciones de DNA genómico de *Fusarium solani* PPRM: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 100 pg, 0,1 pg y 0,01 pg/ μ l en una mezcla de reacción de 10 μ l. Se comprobó la especificidad de los cebadores enfrentándolos con DNA de hongos aislados de suelo donde se cultivó maní (*Aspergillus* sección *Flavi*, *Aspergillus* sección *Nigri*, *Penicillium* spp., *Alternaria* spp.), otras especies pertenecientes al complejo *Fusarium solani* (*Fusarium virguliforme*, *F. tucumaniae*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *phaseoli*, *H. haematococca*) y *Fusarium* spp. aisladas de suelo.

IV.4 Determinación de la presencia del patógeno en suelo inoculado con *Fusarium solani* patógeno de maní usando cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP

IV.4.1 Medios de cultivo

- *Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA)*: Descrito en el punto IV.1.1
- *Pentacloronitrobenceno (PCNB)*: Peptona 15 g, PO₄KH₂ 1 g, SO₄Mg 7 H₂O 0,5 g, pentanitroclorobenceno 1 g, agar-agar 12 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml. Una vez estéril, se le adicionó al medio templado: Estreptomina (stock al 5%) 20 ml y sulfato de neomicina (stock al 1%) 12 ml, por litro de medio preparado. Solución stock: 5 g de sulfato de estreptomina en 1000 ml de agua destilada; 1 g de sulfato de neomicina en 1000 ml de agua destilada c.p.s.
- *Wickerham*: Glucosa 40 g, peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, extracto de malta 3 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml.

IV.4.2 Preparación de inóculo

Para la preparación de inóculo se usó la cepa MR386 aislada de raíz de maní con síntomas de PPRM identificada como *F. solani* por metodología clásica y molecular (Reynoso *et al.*, 2006). A partir del cultivo en SNA conservado a 4° C, se realizaron repiques en placas de Petri conteniendo el mismo medio y se cultivaron a 25° C por 7 días con ciclo de luz (12 h de luz blanca y 12 h de luz negra) a fin de permitir una alta esporulación. Luego del periodo de incubación se realizó la recolección de las esporas agregando a cada placa agua destilada estéril (10-15 ml) sobre la superficie del cultivo. Se disgregó la colonia con la ayuda de un ansa y se recolectó la suspensión en un tubo estéril. Luego, la suspensión se filtró a través de dos pliegues de gasa estériles con el fin de retener resto de hifas y el líquido se trasvasó a un tubo limpio y estéril. Finalmente, se realizó el recuento de los conidios en cámara de recuento en microscopio a 40x, previa agitación en vortex. La concentración de inóculo se ajustó por dilución con agua destilada estéril.

IV.4.3 Inoculación de suelo estéril

Ciento cincuenta gramos de muestras de suelo se colocaron en frascos de vidrio con tapa rosca de 1000 ml de capacidad y se esterilizaron en autoclave 3 veces a 121° C (1 atm, 20 min), una vez por día durante 3 días consecutivos. Posteriormente se inocularon con 1 ml de una suspensión (aproximadamente 10^6 UFC/g de suelo) de esporas de la cepa *F. solani* MR386 y se incubó 7 días a 25° C en oscuridad. Como control negativo se inoculó suelo estéril con 1 ml de agua destilada estéril. Luego de los 7 días, se tomaron 10 g de suelo contaminado para realizar el recuento de colonias en medio PCNB (Leslie y Summerell 2006) y otros 5 g que se conservaron a -20° C hasta realizar la extracción de DNA.

IV.4.4 Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium*

El aislamiento de las especies de *Fusarium* presentes en el suelo artificialmente contaminado se realizó utilizando el método de disseminación en placa. Las muestras de suelo (10 g) artificialmente contaminado se transfirieron a frascos Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 90 ml de agua peptonada estéril al 0,1%. La homogenización de las muestras se realizó en agitador rotatorio, a 200 rpm durante 30 min y, luego se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-3} y alícuotas de 0,1 ml se inocularon por duplicado en placas con medio PCNB (Leslie y Summerell, 2006). Dichas placas se incubaron a 25° C (12 h de luz blanca y 12 h de luz negra) durante 7 días.

Luego del período de incubación, se observaron macroscópicamente las colonias desarrolladas y se realizó el recuento total de las especies de *Fusarium*. Las colonias con características macroscópicas semejantes a *F. solani* (reverso amarillento) se transfirieron al medio SNA y se incubaron durante 7 días a 25° C bajo ciclos de 12 h de luz blanca y 12 h de luz negra, para su posterior identificación.

Aquellas colonias que se identificaron morfológicamente como *F. solani* se transfirieron a medio Wicker Man, para la producción de biomasa y posterior extracción de DNA.

IV.4.5 Producción de la biomasa fúngica

A partir de los cultivos desarrollados en SNA e identificados morfológicamente como *F. solani* se tomó una porción de 5 mm x 5 mm de cada cepa y se transfirió a

frascos Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio Wikerham. Los frascos inoculados se incubaron a 25° C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm) y el micelio se cosechó por filtración, lavándolo con agua destilada estéril y secándolo entre papel absorbente. Las muestras secas se almacenaron a -20° C hasta el momento de realizar la extracción del DNA.

IV.4.6 Extracción, purificación y cuantificación del DNA fúngico

IV.4.6.1 Materiales

- Buffer CTAB al 2%: 2% CTAB, 100 mM Tris-ClH (pH 8), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl.
- Buffer TE 1x: 10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA (pH 8).
- Buffer TAE (50X): 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial; 0,5 M EDTA (pH 8).

IV.4.6.2 Metodología

El micelio congelado se pulverizó con nitrógeno líquido en morteros y se recogió en microtubos estériles de 1,5 ml. El DNA fue extraído siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006). Al micelio congelado (aproximadamente 1,5 a 2 g) se le adicionó 700 µl de buffer CTAB al 2% calentado previamente a 65° C, y 15 µl de 2-mercaptoetanol, cada tubo fue agitado 2 min en vortex y se incubó a 65° C durante 30 min. Luego se agregó 400 µl de una solución de cloroformo:isoamilalcohol (24:1, v/v), se agitó la mezcla durante 2 a 3 min en vortex y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Se tomó 600 µl de la fase acuosa y se transfirió a un microtubo limpio y estéril de 1,5 ml y se precipitaron los ácidos nucleicos con 600 µl de isopropanol. Finalmente, los tubos se colocaron a 4° C durante 24 h. Luego de centrifugar durante 10 min a 10.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos invertidos sobre papel absorbente. El residuo se lavó 2 veces con 500 µl de etanol frío al 70% (v/v) y se secó a temperatura ambiente durante 5 min. Por último, el residuo se disolvió en 100 µl de buffer TE 1X.

El DNA genómico fúngico se cuantificó por comparación visual usando DNA del bacteriófago λ digerido con *Hind*III (New England, BioLabs, Inc.) como DNA testigo teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en gel de agarosa al 0,8 – 1% en buffer TAE

1X. Las muestras de DNA se conservaron a -20°C hasta el momento de la amplificación con cebadores específicos FS1 y FS2.

IV.4.7 Extracción de DNA a partir de las muestras de suelo

La extracción de DNA genómico total a partir de las muestras de suelo artificialmente contaminado se realizó utilizando el kit comercial MoBio PowerSoil DNA (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de DNA se realizó por fluorometría utilizando Quant-It Assay (Invitrogen). Las muestras de DNA se conservaron a -20°C hasta el momento de la amplificación con cebadores específicos FS1 y FS2.

IV.4.8 Reacción de amplificación por PCR

Las reacciones de amplificación en las que se utilizó DNA extraído de las cepas de *F. solani* aisladas de muestras de suelo artificialmente contaminado se realizaron usando $2\ \mu\text{l}$ de DNA ($1 - 20\ \text{ng}/\mu\text{l}$), $0,2\ \text{mM}$ de cada dNTPs ($2\ \text{mM}$), 1X Buffer PCR (Green Go *Taq* Reaction Buffer, Promega, Madison, WI), $0,5\ \text{U}/\mu\text{l}$ Go*Taq* DNA polimerasa (Go*Taq* DNA Polymerase, Promega, Madison, WI) ($5\text{U}/\mu\text{l}$), $0,2\ \mu\text{M}$ de cada cebador FS1/FS2 ($10\ \mu\text{M}$) y $1,75\ \text{mM}$ de MgCl_2 ($2,5\ \text{mM}$) en un volumen final de $20\ \mu\text{l}$.

Las reacciones de amplificación en las que se utilizó DNA extraído de suelo artificialmente contaminado se realizaron usando $2\ \mu\text{l}$ de DNA ($1 - 20\ \text{ng}/\mu\text{l}$), $0,2\ \text{mM}$ de cada dNTPs ($2\ \text{mM}$), 1X Buffer PCR (Green Go *Taq* Reaction Buffer, Promega, Madison, WI). A fin de optimizar las condiciones de la reacción se probaron $0,5\ \text{U}/\mu\text{l}$ y $1\ \text{U}/\mu\text{l}$ Go*Taq* DNA polimerasa (Go*Taq* DNA Polymerase, Promega, Madison, WI) ($5\text{U}/\mu\text{l}$); $0,2\ \mu\text{M}$ y $0,5\ \mu\text{M}$ de cada cebador FS1/FS2 ($10\ \mu\text{M}$), y $1,75\ \text{mM}$ de MgCl_2 ($2,5\ \text{mM}$) en un volumen final de $20\ \mu\text{l}$. A su vez también se utilizó $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Albúmina Sérica Bovina (BSA) como control de inhibidores ($10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PCT 200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) usando el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s y una extensión final de 5 min a 72°C una vez transcurridos los 35 ciclos.

Un control negativo, el cual contenía todos los reactivos excepto el DNA templado, se usó en todas las reacciones de PCR. Además se incluyó como control positivo, DNA de diferentes cepas de *F. solani* PPRM. Los productos amplificados se

analizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se estimó el tamaño del fragmento obtenido por comparación con DNA testigo (New England Biolabs, 100-bp Ladder).

IV.5 Determinación de la presencia del patógeno en suelo naturalmente contaminado con *F. solani* patógeno de maní a través de PCR con cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP

IV.5.1 Medios de cultivo

Se usaron los medios de cultivos descritos en el punto IV.4.1

IV.5.2 Muestras de suelo naturalmente contaminado

Se usaron muestras de suelo con historia de cultivo de maní provenientes de la región de General Cabrera (Córdoba) denominadas "Suelo Infeccioso" (SI) y "Suelo Criadero el Carmen" (SCC) y una muestra sin historia de cultivo de maní (SH) proveniente de la zona de Mataldi (Córdoba). Dichas muestras fueron gentilmente cedidas por el Mg. Oddino de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC).

IV.5.3 Aislamiento e identificación de *Fusarium solani* en suelo naturalmente contaminado

A partir las muestras de suelo (SI, SCC y SH) se tomaron 5 g de cada una y se conservaron a -20° C hasta el momento de extracción de DNA, y 10 g a fin de realizar el aislamiento e identificación de especies de *Fusarium*.

El aislamiento de las especies de *Fusarium* presentes en el suelo naturalmente contaminado se realizó utilizando el método de diseminación en placa según lo descrito en el punto IV.4.4).

IV.5.4 Producción de la biomasa fúngica

La producción de la biomasa fúngica a partir de los cultivos desarrollados en SNA e identificados morfológicamente como *F. solani* se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto IV.4.5.

IV.5.5 Extracción, purificación y cuantificación del DNA fúngico

El DNA fúngico de cada cepa de *F. solani* aislada de las muestras de suelo naturalmente contaminadas fue extraído siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006), según se describe en el punto IV.4.6.

IV.5.6 Extracción de DNA a partir de la muestra de suelo

La extracción de DNA a partir de las muestras naturalmente contaminadas se realizó según lo descrito en el punto IV.4.7.

IV.5.7 Reacción de amplificación por PCR

Las reacciones y las condiciones de amplificación donde se utilizó DNA extraído de las cepas de *F. solani* aisladas de muestras de suelo naturalmente contaminado y las muestras de suelo SI, SCC y SH se realizaron usando la metodología descrita en el punto IV.4.8.

IV.6 Determinación de la presencia del patógeno en muestras de raíces con y sin síntomas de podredumbre parda a través de PCR con cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP

IV.6.1 Muestras vegetales

Las muestras vegetales analizadas consistieron en:

- Muestras de raíces de plantas de maní con síntomas de podredumbre parda provenientes de la zona de General Cabrera gentilmente cedidas por el Mg. Oddino de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC). Dichas muestras se denominaron 1A, 2A, 3A, 4A y 5B.
- Muestras de raíces con síntomas de podredumbre parda obtenidas de un ensayo de patogenicidad anterior realizado en nuestro laboratorio y,
- Muestras de raíces de maní sin síntomas de enfermedad provenientes de la localidad de Los Molles (Córdoba).

IV.6.2 Tratamiento de las raíces

Las raíces de cada muestra fueron lavadas bajo agua corriente para remover el suelo adherido. Todas las muestras de raíces se desinfectaron superficialmente utilizando NaOCl al 1% por 5 min y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril durante 3 min. Las zonas con oscurecimiento (podredumbre) fueron cortadas longitudinalmente para evaluar síntomas internos.

Los fragmentos de las raíces se subdividieron en dos partes:

- a) Para el aislamiento e identificación de *F. solani*.
- b) Para extracción y purificación de DNA para una posterior identificación de *F. solani* mediante PCR usando los cebadores específicos.

IV.6.3 Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium*

Las porciones de raíces se colocaron sobre la superficie de placas de Petri conteniendo el medio PCNB (Leslie y Summerell, 2006). Dichas placas se incubaron a 25° C (12 h de luz blanca y 12 h de luz negra) durante 7 días.

Luego del período de incubación las colonias con características macroscópicas semejantes a *F. solani* se transfirieron al medio SNA y se incubaron durante 7 días bajo las mismas condiciones anteriormente descritas para su posterior identificación.

Aquellas colonias que se identificaron morfológicamente como *F. solani* se transfirieron al medio Wikerham, para la producción de biomasa y posterior extracción de DNA (Leslie y Summerell, 2006).

IV.6.4 Producción de la biomasa fúngica

La producción de la biomasa fúngica a partir de los cultivos desarrollados en SNA e identificados morfológicamente como *F. solani* se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto IV.4.5.

IV.6.5 Extracción, purificación y cuantificación del DNA fúngico

El DNA fúngico de cada cepa de *F. solani* aisladas de las muestras de raíces fue extraído siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006) según se describe en el punto IV.4.6.

IV.6.6 Extracción de DNA a partir de muestras de raíces

La extracción de DNA a partir de las muestras de raíz con y sin síntomas de podredumbre parda se realizó utilizando el kit comercial Qiagen (DNA easy Plant Mini kit). En todos los casos, dichas muestras se molieron en mortero con nitrógeno líquido hasta transformarlas en polvo y luego se procedió con el protocolo de extracción propuesto por el fabricante. La cuantificación de DNA se realizó por fluorometría utilizando Quant-It Assay (Invitrogen). Las muestras de DNA se conservaron a -20°C hasta el momento de la amplificación con cebadores específicos.

IV.6.7 Reacción de amplificación por PCR

Las reacciones de amplificación en las que se utilizó DNA extraído de las cepas de *F. solani* aisladas de las muestras de raíces con y sin síntomas de la enfermedad se realizaron usando la metodología descrita en el punto IV.4.8.

En el caso de las reacciones de amplificación usando DNA extraído de las muestras vegetales se optimizaron las concentraciones de los reactivos y condiciones del programa de PCR. Para las muestras de raíces de maní se usó 2 μl de DNA templado (1 – 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$), 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM), 1X Buffer PCR (Green Go Taq Reaction Buffer, Promega, Madison, WI), 0,5 U/ μl y 1 U/ μl GoTaq DNA polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI) (5U/ μl), 0,2 μM y 0,5 μM de cada cebador FS1 y FS2 (10 μM), 1,75 mM de MgCl_2 (2,5 mM) y 1 μg de Albúmina BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en un volumen final de 20 μl . Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PCT 200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) usando dos programas diferentes: 1 ciclo a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 s, se probaron 2 temperaturas de apareamientos, 55°C y 57°C por 30 s, 72°C por 30 s y una extensión final de 5 minutos a 72°C una vez transcurridos los 35 ciclos.

Un control negativo, el cual contenía todos los reactivos excepto el DNA templado, se usó en todas las reacciones de PCR. Además se incluyó como control positivo, DNA de diferentes cepas de *F. solani* PPRM. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se estimó el tamaño del fragmento obtenido por comparación con DNA testigo (New England Biolabs, 100-bp Ladder).

IV.7 Análisis filogenético molecular

IV.7.1 Cepas fúngicas

Para el estudio filogenético se utilizaron 15 cepas aisladas de raíces con síntomas de podredumbre parda de la raíz de maní, identificadas como *Fusarium solani* por metodología clásica y molecular, obtenidas de diferentes regiones maniseras de la provincia de Córdoba (Reynoso *et al.*, 2006). Las secuencias de DNA obtenidas en el presente estudio han sido depositadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) (Tabla IV.3).

Dichas cepas se mantienen liofilizadas y almacenadas a 4° C en la colección de cultivos del Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Tabla IV.3 Cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda utilizadas en el ensayo filogenético molecular

Cultivo	Número en GenBank				Origen
	PBR2	TEF	ITS	β -tub	
MR010	–	GQ121880	GQ121895	GQ121895	Córdoba, Gral. Deheza
MR013	JF700526	GQ121885	GQ121900	GQ121900	Córdoba, Gral. Deheza
MR016	–	GQ121886	GQ121901	GQ121901	Córdoba, Gral. Deheza
MR114	JF700529	GQ121878	GQ121893	GQ121893	Córdoba, Gral. Cabrera
MR116	–	GQ121884	GQ121899	GQ121899	Córdoba, Gral. Cabrera
MR133	JF700527	–	–	–	Córdoba, Gral. Cabrera
MR140	JF700528	GQ121877	GQ121892	GQ121892	Córdoba, Gral. Cabrera
MR313	–	GQ121889	GQ121904	GQ121904	Córdoba, Hernando
MR319	JF700530	GQ121887	GQ121902	GQ121902	Córdoba, Hernando
MR338	–	GQ121890	GQ121905	GQ121905	Córdoba, Hernando
MR386	JF700533	GQ121888	GQ121903	GQ121903	Córdoba, Hernando
MR403	–	GQ121883	GQ121898	GQ121898	Córdoba, Etruria
MR415	JF700531	GQ121881	GQ121896	GQ121896	Córdoba, Etruria
MR436	–	GQ121891	GQ121906	GQ121906	Córdoba, Etruria
MR514	–	GQ121879	GQ121894	GQ121894	Córdoba, Carnerillo
MR528	JF700532	GQ121882	GQ121897	GQ121897	Córdoba, Carnerillo
J FC-2011	JF700525	–	–	–	

Por otro lado, se recopilaron secuencias de la región ITS del DNA ribosomal y de los genes del factor de elongación (TEF-1 α), PBR2 y de la β -tubulina disponible en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) pertenecientes a otras especies del FSSC, lo que permitió ampliar el número de cepas analizadas y disponer de una mayor variabilidad genética. La cepa de *F. staphyleae* (NRRL22316) fue incluida en el presente estudio como grupo externo en el análisis filogenético de las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal, TEF-1 α y PBR2, mientras que la cepa *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (ATCC 11939) se incluyó como grupo externo en el análisis del gen de la β -tubulina (Tabla VIII.1 y VIII.2).

IV.7.2 Producción de la biomasa fúngica

La producción de la biomasa fúngica a partir de los cultivos desarrollados en SNA e identificados morfológicamente como *F. solani* se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto IV.4.5.

IV.7.3 Extracción, purificación y cuantificación del DNA

El DNA fúngico de cada cepa de *F. solani* aisladas de las muestras de raíces fue extraído siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006) según se describe en el punto IV.4.6.

IV.7.4 Reacciones de PCR

Las secuencias de la región ITS (espaciador interno transcripto) del DNA ribosomal (White *et al.*, 1990), el gen de la β -tubulina (O'Donnell y Cigelnik, 1997), el factor de elongación (TEF-1 α) (O'Donnell 2000) y el gen de la RNA polimerasa II (RPB2) (O'Donnell *et al.*, 2008) (Figura IV.1) fueron amplificadas por PCR usando los cebadores descritos en la Tabla IV.4.

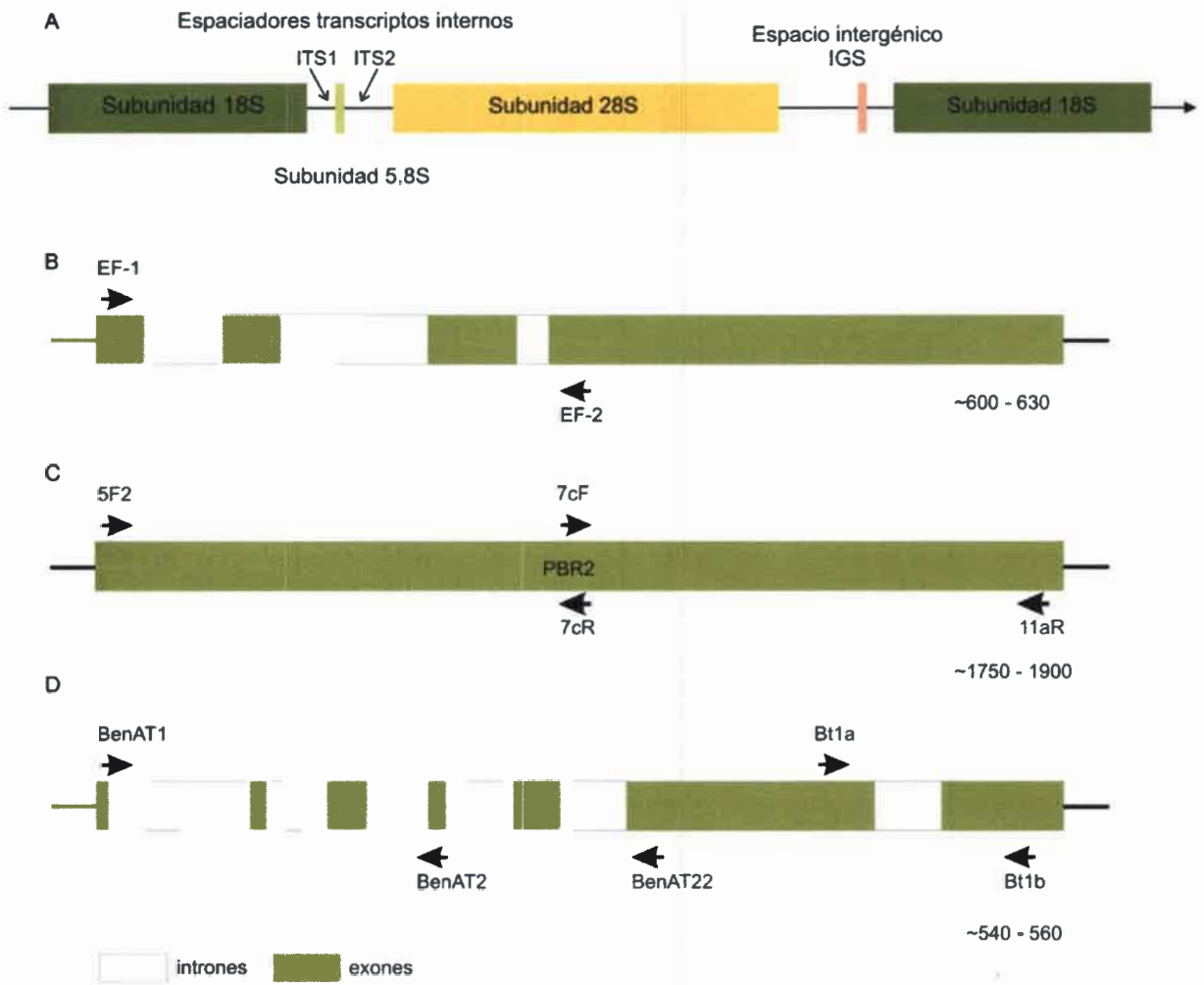


Figura IV.1 Mapa de la región ITS del DNA ribosomal (A), gen TEF-1 α (B), gen RPB2 (C) y gen β -tubulina (D).

Tabla IV.4 Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar la región ITS, el gen de la β -tubulina, factor de elongación EF-1 α y PBR2.

Gen	Cebador	Secuencia	Referencia
ITS - DNAr	ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	White <i>et al.</i> 1990
	ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'	
TEF-1 α	EF-1H	5'-ATG GGT AAG GAA GAC AAG AC-3'	O'Donnell 2000
	EF-2T	5'-GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT-3'	
β -tubulina	T1	5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3'	O'Donnell y Cigelnik 1997
	T2	5'-TAG TGA CCC TTG GCC CAG TTG-3'	
PBR2	5f2	5'-GGG GWG AYC AGA AGA AGG C-3'	O'Donnell <i>et al.</i> 2008
	7cr	5'-CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT-3'	
	7cf	5'-ATG GGY AAR CAA GCY ATG GG-3'	
	11ar	5'-GCR TGG ATC TTR TCR TCS ACC-3'	

IV.7.4.1 Amplificación del gen que codifica para el factor de elongación

La amplificación del gen del factor de elongación (EF-1 α) se realizó usando los cebadores EF-1H/EF-2T (O'Donnell, 2000) (Tabla IV.4). La reacción de PCR se realizó en una mezcla de 20 μ l que contenía 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM); 1x Buffer PCR (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂) (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI); 1 μ M de cada cebador (10 μ M); 1 – 20 ng de DNA genómico y 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI). Un control negativo que no contenía el templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos.

La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94° C por 5 min., seguido por 35 ciclos a 94° C por 30 s, 62° C por 45 s, 72° C por 60 s. Se realizó una extensión final de 7 min a 72° C después de los 35 ciclos.

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 – 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se visualizaron con un transiluminador UV. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por

comparación con DNA testigo (New England Biolabs, Inc., 100-bp Ladder) con bandas de referencia que varían entre 100 – 1500 pb.

IV.7.4.2 Amplificación del gen de la RNA polimerasa II

Para la obtención de la secuencia del gen de la RNA polimerasa II (RPB2) se amplificaron y secuenciaron dos fragmentos. Dichas secuencias fueron: la región RPB2 5-7 con los cebadores 5f2/7cr y la región RPB2 7-11 con los cebadores 7cf/11ar (O'Donnell *et al.*, 2008) (Tabla IV.4). La amplificación del fragmento RPB2 5-7 se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 0,8 μ M de cada cebador (10 μ M), 1x de buffer PCR (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂) (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI), 0,2 μ M de cada dNTPs (2 mM) y 1,25 U de *Taq* DNA polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI).

La mezcla de reacción para la región RPB2 7-11 se realizó en un volumen final de 50 μ l conteniendo, 0,2 μ M de cada cebador (10 μ M), 1x de buffer PCR (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂) (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI), 0,2 μ M de cada dNTPs (2 mM) y 7,25 U de *Taq* polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI).

Ambas amplificaciones se realizaron en un Termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94° C 5 min, 35 ciclos de 94° C 50 s, 58,5° C 50 s, 72° C 1 min y un ciclo de extensión final de 7 min a 72° C.

Los productos de amplificación se examinaron de acuerdo a lo descrito en el punto IV.7.4.1.

IV.7.4.3 Amplificación de la región ITS del DNA ribosomal

La amplificación de la región ITS se realizó usando los cebadores ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) (Tabla IV.4). La reacción de PCR se realizó en una mezcla de 50 μ l que contenía 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM); 1x Buffer PCR (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂) (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI); 1 μ M de cada cebador (10 μ M); 1 – 20 ng de DNA genómico y 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI). Un control negativo que no contenía el templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos.

La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95° C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 95° C por 30 s, 52° C por 30 s, 72° C por 60 s. Se realizó una extensión de 10 min a 72° C después de los 35 ciclos.

Los productos de amplificación se examinaron de acuerdo a lo descrito en el punto IV.7.4.1.

IV.7.4.4 Amplificación del gen que codifica para la β -tubulina

La amplificación del gen de la β -tubulina se realizó usando los cebadores T1/T2 (O'Donnell y Cigelnik, 1997) (Tabla IV.4). La reacción de PCR se realizó en una mezcla de 20 μ l que contenía 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM); 1x Buffer PCR (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂) (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI); 0,3 μ M de cada cebador (3 μ M); 1 – 20 ng de DNA genómico y 0,3 U de Taq DNA polimerasa (GoTaq DNA Polymerase, Promega, Madison, WI). Un control negativo que no contenía el templado se incluyó en cada experimento a fin de probar posibles contaminaciones de los reactivos.

La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94° C por 2 min., seguido por 35 ciclos a 94° C por 30 s, 58° C por 30 s, 72° C por 60 s. Se realizó una extensión de 7 min a 72° C después de los 35 ciclos.

Los productos de amplificación se examinaron de acuerdo a lo descrito en el punto IV.7.4.1.

IV.7.5 Secuenciación del DNA

Los fragmentos amplificados a partir de las tres secuencias analizadas se purificaron utilizando columnas de purificación de DNA (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Ambas cadenas de DNA se secuenciaron con cada par de cebadores utilizados usando un secuenciador Applied Biosystem ABI 3730 sequencer (Applied Biosystem) en la Universidad de Kansas, USA. Las secuencias de ambas cadenas de DNA de los productos de PCR se alinearon usando la aplicación *ClustalW Multiple alignment* (Thompson *et al.* 1994) del programa BioEdit versión 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNasaP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>) y en el caso que fue necesario, se ajustaron manualmente. Las

secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el GeneBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information) para determinar su homología con otras especies.

IV.7.6 Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se realizó mediante el método de máxima parsimonia utilizando el programa PAUP* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) versión 4.0b8 (Swofford, 2001). Todos los caracteres tuvieron el mismo peso en el análisis y los espacios insertados (*gap*) se trataron como un quinto carácter. Se realizó una búsqueda heurística de 100 repeticiones con adición aleatoria de taxones (*random sequence addition*) y con intercambio de ramas (*branch-swapping*) de tipo TBR (*tree bisection reconnection*). Se dejó la opción *Multrees* por defecto (PAUP* guarda todos los árboles mínimos que encuentra durante el intercambio de ramas) y se colapsaron las ramas con longitud máxima igual a cero. Los árboles resultantes se visualizaron con el programa TreeView (Win32) versión 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>). Además del número de pasos, en los análisis se obtuvo el índice de consistencia (CI) y el índice de retención (RI). La medida de confianza o fiabilidad de los grupos obtenidos se valoró mediante un análisis de *bootstrap* de 1000 réplicas.

En el caso de generación de árboles de máxima parsimonia uniendo la información de las tres secuencias amplificadas, se realizó previamente un test ILD (*Incongruence Length Difference*) también denominado en el software del PAUP* *partition homogeneity test* (PHT) para conocer la posibilidad de combinar las diferentes regiones analizadas. Si el valor de ILD generado por la unión de nuestros genes tenía una $P < 0.001$ los genes se combinaron para el análisis (Cunningham, 1997).

V. Resultados y Discusión

V.1 Patogenicidad de cepas de *Fusarium solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda

Se evaluó la patogenicidad de cepas de *Fusarium solani* aisladas de maní con síntomas de podredumbre parda, para dicho ensayo se utilizaron 9 cepas identificadas como *F. solani* por caracteres morfológicos y a través de marcadores moleculares (AFLPs) (Reynoso *et al.*, 2006) y se denominaron *F. solani* PPRM.

En todas las plantas crecidas en suelos inoculados con las cepas de *F. solani* PPRM, se observó diferencias de coloración entre las hojas de las plantas tratadas y el control. En general, dichas plantas presentaron marchitamiento de la rama principal, con pérdida de turgencia, opacidad en la coloración (verde seco y claro) y epinastia de hojas, comparado con un verde oscuro de las plantas no inoculadas (Figuras V.1 y V.2). Aunque no se observaron plantas de maní muertas en ninguno de los tratamientos ni en el control negativo, se observó una mayor resistencia al estrés hídrico en las plantas desarrolladas en suelos no inoculadas con el patógeno. La recuperación del estado de las plantas tratadas fue igual a la del control cuando se reanudaron los ciclos de riego luego de cada estrés hídrico.

Cuando se realizó la evaluación visual de las raíces para evaluar síntomas de la enfermedad se observó que las plantas tratadas presentaban los síntomas característicos, presencia parcial o total de coloración oscura y podredumbre, principalmente en aquellas plantas tratadas con la cepa MR313, la cual produjo una incidencia de la enfermedad del 40% (Figura V.3). En las demás plantas tratadas el índice de la enfermedad varió entre el 10 y el 20%, mientras que en las plantas inoculadas con la cepa MR436 no se observaron raíces con síntomas visibles de PPRM. En las macetas que se utilizaron como testigo con semillas de sorgo esterilizadas sin inóculo, no se observaron plantas con síntomas en ninguno de los cultivos. Contrariamente a lo esperado, la incidencia de la enfermedad fue muy baja, pero se demuestra que la mayoría de las cepas (principalmente las cepas MR313 y MR386) pueden causar la enfermedad.



Figura V.1 Efecto de la inoculación del suelo con *Fusarium solani* causante de la PPRM en las plantas de maní durante el primer estrés hídrico (70 días post-inoculación).



Figura V.2 A) Síntomas observados durante el final del segundo estrés hídrico (90 días post-inoculación); B) Reanudación del riego después del segundo estrés hídrico.

Oddino (2007) evaluó la patogenicidad de cepas de *F. solani* aisladas de plantas de maní con síntomas característicos de podredumbre de la raíz en poroto, soja y maní. En maní los síntomas observados fueron los característicos de la enfermedad y la incidencia de la enfermedad varió entre el 45 y el 90%. En poroto se observaron síntomas de necrosis a nivel radical extendiéndose en algunos hasta el primer nudo y marchitez en la parte aérea, mientras que en soja los síntomas fueron leves con cambio de coloración en la porción superior de la raíz principal y síntomas de marchitez general en algunas hojas de las plantas más afectadas. El índice de la enfermedad en poroto y soja varió entre el 20 y 65% y, entre el 20 y el 35%, respectivamente.

En el presente estudio, además de determinar visualmente los síntomas de enfermedad se evaluó el peso fresco de la raíz y de las partes aéreas de las plantas. En dicha evaluación se observó una marcada disminución en el peso fresco de la raíz de las plantas inoculadas con las cepas MR013, MR114, MR116 y MR313, mostrando diferencias significativas con respecto al control. Esto demuestra que dichas cepas son las más efectivas para causar la podredumbre radicular. (Tabla V.1) (Figura V.3).

Por otro lado, la severidad de los síntomas de enfermedad externos e internos variaron con cada cepa de *F. solani*. Las cepas MR013, MR114, MR116 y MR313 resultaron ser más patógenas ocasionando tanto síntomas externos como internos, mientras que con excepción de la cepa MR436, todos las demás fueron capaces de ocasionar síntomas internos. En diversos estudios se ha demostrado que las cepas de *Fusarium* que causan SDS (muerte súbita en hoja) pueden diferir en su patogenicidad en este cultivo. Por ejemplo, en estudios separados las cepas NRRL 22823, NRRL 22825 (= *F. virguliforme*, Aoki *et al.*, 2003) y FSA-1 han demostrado ser patógenas en soja (Roy, 1997; Rupe *et al.*, 2001), sin embargo Achenbach *et al.* (1996) informaron que dichas cepas no causaron síntomas foliares en soja, mientras que otra cepa, la Mo1792 causó un 38% de plantas enfermas, incluso cuando se inocularon en un cultivar altamente susceptible. Gray *et al.* (1996) mostraron que las cepas NRRL 22825 y AR269 causaron menos síntomas foliares que otras cepas incluyendo la cepa NRRL 22292 (Mont-1 = *F. virguliforme*, Aoki *et al.*, 2003). Además, las plantas de soja inoculadas con las cepas de *F. solani* f. sp. *Glycines* (12, 1B and NRRL 22292) presentaron una incidencia de la enfermedad menor o igual al 50% (Rupe *et al.*, 2001). La pérdida de virulencia y/o pérdida de la producción de toxinas puede ayudar a explicar esta variación patogénica observada entre las cepas que causan SDS u otras enfermedades como la PPRM. Es conocido, por ejemplo, que los cultivos utilizados

para las pruebas de patogenicidad deben ser recientemente aislados de plantas enfermas y mantenidos en medios de cultivos con bajo contenido de nutrientes (Burgess *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 1983; Nirenberg, 1990; Windels, 1992). En el presente trabajo los cultivos reunían estas condiciones, por lo cual consideramos que la variabilidad en la patogenicidad es inherente a la cepa.

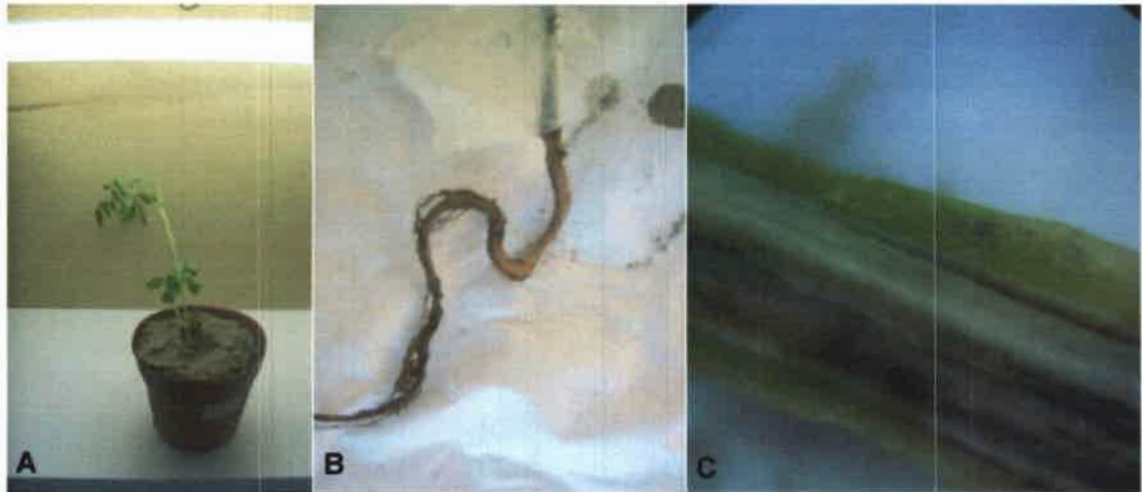


Figura V.3 A) Plántula de maní inoculada con la cepa MR313 mostrando los síntomas de marchitamiento. B) Raíz sin síntomas visibles de estrangulamiento; C) Raíz con síntomas visibles de podredumbre.

Tabla V.1 Diferencias entre el peso fresco de raíz y partes aéreas de plantas sometidas a los ensayos de patogenicidad.

Cepa	Peso fresco	
	Raíz (g)	Parte aérea (g)
MR013	0,48±0,17*	9,06±7,43
MR114	0,49±0,18*	7,28±1,87*
MR116	0,40±0,06*	7,17±3,30*
MR313	0,39±0,15*	7,10±3,44*
MR319	0,53±0,14	11,96±5,14
MR338	0,51±0,15	ND
MR386	0,74±0,27	11,50±5,90
MR436	0,60±0,12	10,52±3,92
MR528	0,59±0,22	11,02±6,15
Control	0,62±0,18	10,89±3,41

* indica diferencia significativa con el control, Test de Holm-Sidak ($P < 0,001$)

ND: no determinado

El mecanismo de penetración de hongos fitopatógenos ha sido ampliamente discutido por mucho tiempo. En general, la penetración puede tener lugar de forma mecánica o por digestión enzimática a través de enzimas hidrolíticas secretadas por el patógeno. Las raíces de las plantas enfermas fueron sometidas a microscopia electrónica de barrido a fin de evaluar el efecto del patógeno. En las microfotografías se observaron las hifas del patógeno presentes en las células epidérmicas de la raíz con intensas ramificaciones. Se encontraron también signos de penetración de la pared radical, ya que se observaron apresorios y la formación de agregados hifales que reciben el nombre de cojines de infección. Estudios citológicos y genéticos indican que la presión generada por los apresorios permite al hongo penetrar la cutícula y la pared celular (Emmett *et al.*, 1975). Los cojines de infección han sido descritos en varias especies fúngicas fitopatógenas, tales como, *Rhizotocnia* spp., *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y recientemente en *F. graminearum* (Armentrout y Downer, 1987; Boenisch y Schäfer, 2011; El-Samra *et al.*, 1981; Hofman y Jongebloed, 1988; Huang *et al.*, 1999; 2008; Marshall y Rush, 1980; Pannecouque y Hofte, 2009; Tenberge, 2004; Weihold y Sinclair, 1996). La presencia de dichas formaciones características demuestran que *F. solani* puede penetrar la superficie intacta de la raíz (Figura V.4).

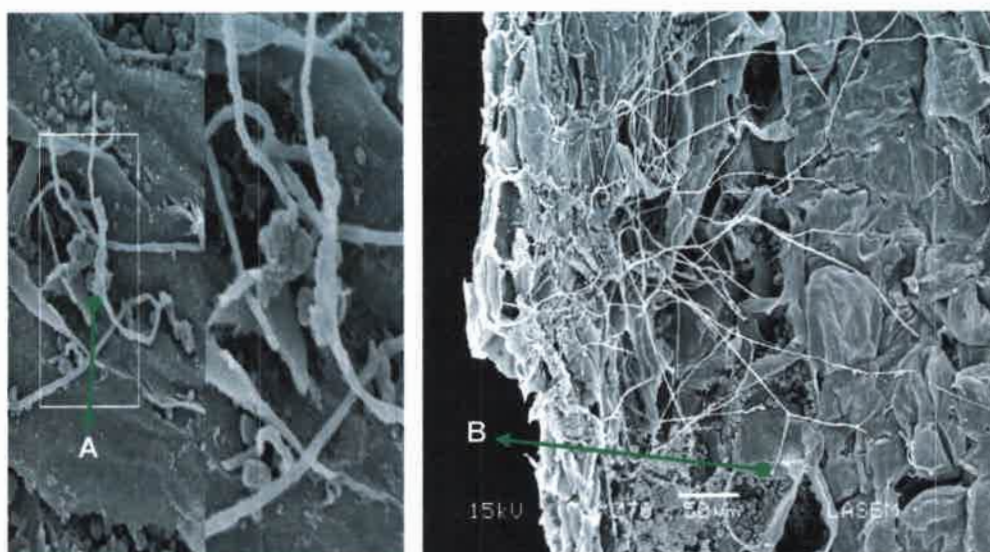


Figura V.4 Sección longitudinal de la raíz de plantas enfermas, hifas del patógeno invadiendo la raíz, se visualizan la formación de cojines de infección (A) y apresorios (B).

A fin de comprobar los postulados de Koch, se cultivaron 10 muestras de raíces sintomáticas y asintomáticas de cada tratamiento en el medio PCNB (Leslie y Summerell, 2006). Cada muestra se desinfectó superficialmente a fin de aislar el patógeno desde el tejido interno de la raíz. De todas las plantas se logró el reaislamiento de la misma especie de *Fusarium* con idénticas características morfológicas observadas al momento de la inoculación. Se observaron plantas debilitadas en todos los tratamientos con respecto al control, el re aislamiento de las cepas de *F. solani* desde las raíces sintomáticas y asintomáticas cumple con los postulados de Koch y confirma que todas las cepas evaluadas son capaces de invadir la raíz del maní y debilitar la planta haciéndola menos resistente al estrés hídrico.

El material vegetal enfermo colectado se conservó a -20° C hasta el momento de la extracción de DNA y posterior amplificación mediante PCR usando los cebadores específicos.

IV.2 Determinación de la producción de enzimas poligalacturonasas en las cepas de *Fusarium solani* causantes de podredumbre parda de la raíz de maní

V.2.1 Evaluación de la actividad poligalacturonasa

La evaluación de acción poligalacturonasa (PG) se determinó a fin de establecer una relación entre el nivel de patogenicidad de cada cepa y la actividad de este grupo de enzimas. Para dicho ensayo se utilizaron las 9 cepas identificadas morfológica y molecularmente como *F. solani* (Reynoso *et al.*, 2006) y que fueron ensayadas en su patogenicidad en el presente estudio.

La actividad enzimática se detectó a los diferentes tiempos de incubación en todas las cepas evaluadas, con valores que variaron entre 0,66 y 6,52 U/ml.min a 37° C. El máximo nivel se observó entre el tercer y cuarto día post-inoculación en medio con pectina cítrica en la mayoría de las cepas. Los valores de actividades enzimáticas determinadas para las diferentes cepas en los diferentes días post inoculación en medios con pectina se muestran en la Tabla V.2. En la misma se han incluido los valores y las diferencias significativas ($p < 0,001$) obtenidas al tercer día post-inoculación. El análisis estadístico nos permitió discernir entre cepas de mayor, media y menor actividad poligalacturonasa dentro del grupo de cepas ensayadas.

Las cepas que presentaron mayor actividad enzimática fueron MR386 y MR319 a los 3 días post-incubación (6,52 y 6,03 U/ml, respectivamente), mientras que las que

presentaron menor actividad fueron MR013 y MR116. La cepa MR313 mostró un aumento en la actividad desde el tercer al sexto día (Tabla V.2).

Tabla V.2 Actividades enzimáticas obtenidas para las 9 cepas de *Fusarium solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda.

Cepa	Actividad promedio a 37° C (U/ml \pm DS)*			
	Tercer día	Cuarto día	Quinto día	Sexto día
Cepas de actividad intermedia				
MR 338	3,36 \pm 0,17 ^a	2,15 \pm 0,2	1,84 \pm 0,3	2,00 \pm 0,21
MR 436	4,03 \pm 0,35 ^a	2,31 \pm 0,4	2,50 \pm 0,46	2,17 \pm 0,41
MR 528	3,74 \pm 0,48 ^a	3,18 \pm 0,18	3,31 \pm 0,25	2,78 \pm 0,49
MR 313	3,36 \pm 0,52 ^a	3,68 \pm 0,6	3,44 \pm 0,46	4,75 \pm 0,58
Cepas de menor actividad				
MR 013	1,67 \pm 0,36 ^b	1,55 \pm 0,3	1,21 \pm 0,47	1,23 \pm 0,43
MR 403	1,86 \pm 0,17 ^b	1,24 \pm 0,09	1,84 \pm 0,3	2,00 \pm 0,21
MR 116	1,90 \pm 0,47 ^b	1,59 \pm 0,16	1,45 \pm 0,23	2,31 \pm 0,16
Cepas de mayor actividad				
MR 319	6,03 \pm 0,31 ^c	3,03 \pm 0,23	2,10 \pm 0,09	0,66 \pm 0,20
MR 386	6,52 \pm 0,5 ^c	3,39 \pm 0,1	2,01 \pm 0,15	0,78 \pm 0,15

^{a, b y c} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Test HolmSidak. Nro de repeticiones=2, Nro de experimentos=3.

V.2.2 Perfil de isoenzimas

Todas las cepas evaluadas produjeron al menos una isoenzima con capacidad de degradar el ácido poligalacturónico después de los 4 días post-inoculación (Figura V.5.A). En la Figura V.5.B se muestran las diferentes isoenzimas encontradas en cada cepa y sus puntos isoeléctricos, los cuales variaron desde 5,05 a 9,22. Las cepas que presentaron mayor actividad enzimática (cepas MR319 y MR386) mostraron una isoforma de pI: 9,22, que no fue observada en las demás cepas evaluadas.



B)

Cepa	Puntos isoeléctricos de las diferentes isoformas	
	Ácido	Básico
MR 013	5,73	6,08
MR 116	5,1	
MR 313	5,54	
MR 319	5,56	9,22
MR 338	5,3	
MR 386	5,56	5,73
MR 403	5,73	6,17
MR 436	5,05	5,3
MR 528	5,05	5,3
	Acido	Básico

Figura V.5 A) Zimogramas de las cepas de *Fusarium solani* productoras de podredumbre parda de la raíz de maní. A) gels obtenidos para las cepas MR528, MR436, MR338, MR313 y MR116 (superior) y para las cepas MR403, MR386, MR319 y MR013 (inferior). **B)** Puntos isoeléctricos de las isoformas observadas en el gel, obtenidos mediante electroforesis de isoelectroenfoque para cada una de las cepas ensayadas

Nuestros resultados muestran que las diferentes cepas de *F. solani* patógenas del maní producen enzimas poligalacturonasas, con niveles variables entre ellas. Otro dato informativo que obtuvimos a través del análisis de zimograma, fue que en el sobrenadante del cultivo se encuentra más de una isoforma de las enzimas poligalacturonasas. Las cepas que presentaron mayor actividad enzimática (cepas MR 319 y MR 386), mostraron una isoforma de pI 9,22, que no fue observada en las demás cepas con menor producción de enzimas. Una segunda característica de estas cepas fue que mostraron una disminución marcada en la producción de PGs durante los siguientes días, llegando a niveles, incluso más bajos que las cepas de menor producción al sexto día.

Los hongos patógenos de plantas producen una amplia variedad de enzimas extracelulares importantes para el proceso de patogénesis (Walton, 1994). La mayoría son enzimas que depolimerizan la pectina, uno de los componentes principales de la pared celular y de la lamela media. Algunas de ellas son: pectina metilerasas, poligalacturonasas, pectatoliasas y pectina liasa (Reignault *et al.*, 2008). El interés por las enzimas poligalacturonasas es, en parte, debido a la importancia que tienen en los procesos de interacción entre huésped y patógeno y a su posible implicancia en la patogénesis. Esta interacción se lleva a cabo gracias a una serie de señales complejas (Esquerre-Tugay *et al.*, 2000), en donde también juegan un papel importante las PGs. Además de la degradación de la pared celular, la importancia de estas enzimas líticas en la patogenicidad incluye la liberación de oligogalacturónicos por la acción de las PGs, que son de un gran interés en el diálogo molecular que se establece durante el proceso de patogénesis. Estos compuestos pueden ser utilizados como nutrientes por el hongo y por otro lado, también se ha comprobado, que pueden actuar como elicitores; suprimir el sistema de defensa de la planta (Davis *et al.*, 1984; Lu y Higgins, 1993; Marques *et al.*, 2006) o interactuar con proteínas de la planta que pueden modular la actividad de las PGs (proteínas inhibidoras de las poligalacturonasas [PGIPs]) (Cervone *et al.*, 1989).

Los primeros estudios de poligalacturonasas se realizaron en cultivos *in vitro* y el uso de técnicas como el isoelectroenfoco (IEF) permitió poner de manifiesto la presencia de una gran cantidad de isoformas en los cultivos, y el patrón de expresión de estas enzimas varía en función de diferentes condiciones, dependiendo del aislamiento, así como, de las condiciones del cultivo (Caprari *et al.*, 1993; Guevara *et al.*, 1997; Stratilova *et al.*, 1998). La técnica de medición de azúcares reductores para estudiar la actividad poligalacturonasa de una cepa no hace referencia a una enzima

en particular sino a dos grupos de enzimas: exo y endopoligalacturonasas (Di Pietro y Roncero, 1996).

De acuerdo a Niture et al (2008), si bien la importancia de las PGs podría ser diferente cada patosistema la mayoría de estas enzimas fúngicas están directamente involucradas en la patogénesis y son denominadas "factores de virulencia". Basados en esta afirmación, el planteamiento realizado al principio del trabajo era que las cepas que tenían mayores niveles de actividad poligalacturonasa presentarían mayor virulencia. Si tenemos en cuenta la clasificación de cepas según los niveles de actividad PGs, podemos observar que la cepa MR386 es la que tiene mayores niveles, y la cepa MR436 y MR313 son de actividad media. Si evaluamos a las cepas desde el punto de vista de la patogenicidad vemos que MR013, MR114, MR116 y MR313 presentaron diferencias significativas con respecto a las otras cepas, y que MR313 es la única que aumenta la actividad de PGs a lo largo del tiempo, llegando a producir en el sexto día 4,75 U/ml a 37° C, mientras que todas las otras cepas disminuyen la producción de poligalacturonas con el tiempo. Otra característica que presentó la cepa MR 313 fue de producir una isoforma que no se repite en ninguna de las demás cepas evaluadas, con un pl de 5,54, a su vez es la única forma detectable en el zimograma. Esto podría ser una explicación, que habría que confirmar ensayando un mayor número de cepas. Como expresamos anteriormente, la producción de pectinasas, que cumplen el rol de degradar la pared celular vegetal, podría estar relacionada con la capacidad del fitopatógeno de producir la enfermedad en el huésped (Ten Have *et al.*, 2002), ya que los compuestos pécticos son los principales componentes de la laminilla media de la pared celular vegetal la cual es la primer barrera de ingreso del patógeno hacia su huésped. En el presente caso sería necesaria la producción sostenida de las enzimas poligalacturonasas para que ocurra la PPRM, y una disminución significativa en el rendimiento en peso de la planta, obviamente debido a la falta de captación de nutrientes de la raíz.

V.3 Diseños de cebadores específicos para cepas de *Fusarium solani* causante de podredumbre parda de raíz de maní

IV.3.1 Diseños de cebadores específicos a partir de marcadores monomórficos de AFLP

La podredumbre parda de la raíz del maní es una enfermedad que se ha diseminado paulatinamente a la mayor parte de la región productora de maní, presentándose cada año con incidencia variable entre lotes. La evaluación de la presencia y nivel de inóculo del patógeno condiciona las decisiones de arrendamiento de campos para la siembra de maní (Oddino, comunicación personal).

Previo a esta tesis se realizaron estudios moleculares de cepas de *F. solani* aisladas de raíz de maní con síntomas de PPRM a fin de evaluar las relaciones genéticas entre dichas cepas, entre especies pertenecientes al FSSC y otras especies de *Fusarium*. Se determinó la diversidad genética de dichas poblaciones a través del uso de marcadores moleculares neutros (AFLP) (Reynoso *et al.*, 2006) incluyéndose dos cepas de *F. solani*, cepas J y B, aisladas originalmente de plantas enfermas, cuya patogenicidad ha sido evaluada tanto en invernadero como a campo (Oddino *et al.*, 2005). A través de la evaluación de los perfiles genéticos generados por AFLPs se demostró una clara diferencia entre las cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda y las cepas de referencias: *F. solani* f. sp. *phaseoli* (S-1008), *F. solani* f. sp. *pisi* (S-580), *F. tucumaniae* (NRRL 34549), *F. virguliforme* (NRRL 34552), *Haematonectria haematococca* (S- 1274) y cuatro cepas de *F. oxysporum* aisladas de raíces de maní. A través del análisis visual de los patrones de bandas obtenidos con la combinación de los cebadores EcoRI+GG–MceI+AC, se observó la presencia de bandas monomórficas específicas las cuales estaban presentes solamente en las cepas de *F. solani* aisladas de raíz de maní con síntomas de PPRM y no, en las otras especies de *Fusarium* evaluadas (Reynoso *et al.*, 2006).

En el presente estudio el DNA de dichas bandas fue purificado y secuenciado para generar cebadores específicos de *F. solani* causante de la PPRM, con el objetivo de desarrollar una técnica rápida y específica basada en PCR para la identificación de dicha especie. Se obtuvo una secuencia de 217 pb, la cual se comparó con la base de datos en el GenBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information). No se

encontró homología con ninguna secuencia de DNA ni proteína publicada. A partir de la secuencia obtenida del DNA de la banda monomórfica se diseñó un par de cebadores específicos para esta región del genoma, los cuales se denominaron FS1/FS2 (Figura V.6).

Nombre	start	longitud	tm	gc%	secuencia
FS1	32	20 pb	60.07	45.00	GCAGGTATGGCTTTTTGGAA
FS2	206	21 pb	59.79	47.62	AGTAAACTCCGACAGGTGCAA

TAMAÑO DE LA SECUENCIA : 217 pb

TAMAÑO DEL PRODUCTO : 175 pb

```

1 CTGCGTACCAATTCGGCAACGGGGCTTGTAGGCAGGTATGGCTTTTTGGAACCCCTGTTTC
      FS1 ----->
61 TTGAACCCGATGCATTTCTTTCGACGCCAGTGATTCTTCGGTGAAACCCATGATTAGTT
121 TCTGTGAAGGCGGATGCCAATCTCTGTTTTCCGCATCAGGCTTAGACGTGATAGAGAAGT
181 ACAAGTTGCACCTGTCTGGAGTTTACTCAGGACTCATC
      <----- FS2

```

Figura V.6. Secuencia del fragmento específico de las cepas de *Fusarium solani* causante de la podredumbre parda de la raíz de maní obtenida por AFLP. Las flechas verdes indican el sitio de apareamiento de los cebadores FS1/FS2. pb: pares de bases, tm: temperatura de melting en °C, gc: % contenido de guanina y citosina del cebador en porcentaje .

V.3.1.1 Optimización de la reacción y determinación de la especificidad y sensibilidad

Para el par de cebadores obtenidos a partir de los fragmentos específicos de las cepas de *Fusarium solani* asociado a podredumbre parda de maní se optimizaron las condiciones de PCR variando la concentración de los cebadores, $MgCl_2$ y temperatura de apareamiento. Las condiciones óptimas encontradas para la amplificación específica fueron las siguientes: 1x de Buffer PCR, 0,2 mM de cada dNTPs, 2,0 mM de $MgCl_2$, 2 μ M de cada cebador, 0,25 U de *Taq* DNA polimerasa y 1-20 ng de DNA templado en un volumen final de 10 μ l.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PCT 200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) y los mejores resultados se obtuvieron aplicando el siguiente programa: 1 ciclo a 94° C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94° C por 30 s, 55° C por 30 s, 72° C por 30 s y una extensión final de 5 min a 72° C una vez transcurridos los 35 ciclos.

Tras la optimización del ensayo y condiciones de PCR, la especificidad de los cebadores FS1/FS2 se comprobó con una amplia variedad de cepas del FSSC y con otras especies fúngicas que co-habitan en el suelo (*Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*). Bajo las condiciones óptimas de PCR se pudo amplificar un único fragmento de 175 pb a partir de todos los DNA de cepas de *F. solani* PBRR evaluadas (Figura V.7.A) y no se observó reacciones cruzadas con otras especies fúngicas (Figura V.7.B). La sensibilidad de la técnica de PCR desarrollada permitió obtener productos de reacción hasta una concentración mínima de 0,001 ng/ μ l de DNA total del patógeno (Figura V.8).

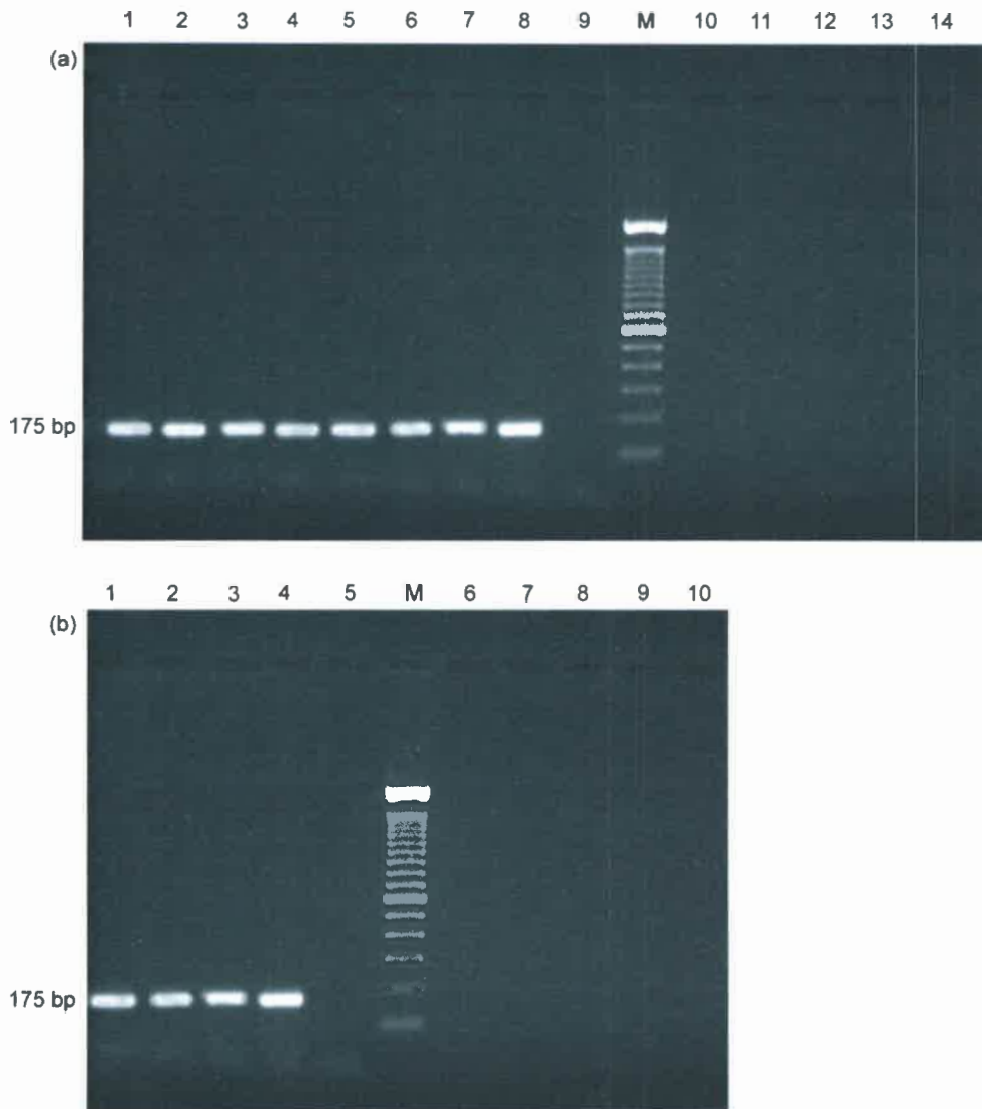


Figura V.7 Producto de amplificación con DNA genómico de diferentes especies fúngicas usando los cebadores FS1/FS2.

a) Líneas 1-8: *Fusarium solani* asociadas a podredumbre parda de la raíz de maní. Línea 9: control negativo (sin templado). M: marcador de 100 pb. Línea 10: *F. solani* f. sp. *phaseoli* (S-1008). Línea 11: *F. solani* f. sp. *pisi* (S-580). Línea 12: *H. haematococca* (S-1274). Línea 13: *F. virguliforme* (NRRL34552). Línea 14: *F. tucumaniae* (NRRL34549).

b) Líneas 1 – 4: *Fusarium solani* asociadas a podredumbre parda de la raíz de maní. Línea 5: control negativo (sin templado). M: marcador de 100 pb. Línea 6: *Alternaria* spp. Línea 7: *Aspergillus* sección *Flavi*. Línea 8: *Aspergillus* sección *Nigri*, Línea 9: *Penicillium* spp. Línea 10: *F. oxysporum* (MR509).

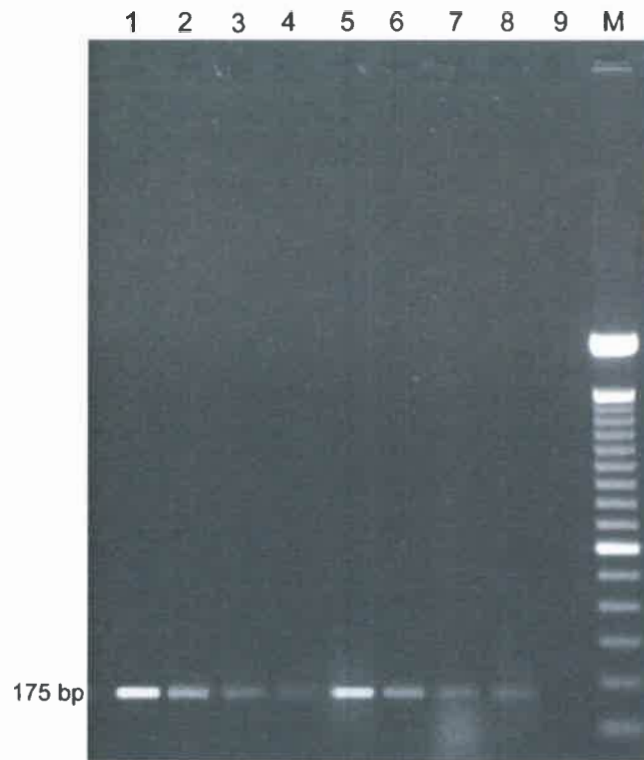


Figura V.8 Productos de amplificación utilizando distintas concentraciones de DNA para evaluar la sensibilidad del método FS1/FS2. Líneas 1 – 4: 1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 100 pg de DNA de la cepa RC386. Líneas 5 – 8: 1 ng, 0,1 nd, 10 pg, 100 pg de DNA de la cepa RC401. Línea 9: control negativo (sin DNA templado). M: marcador de 100 pb.

V.3.3 Diseño de cebadores específicos a partir de regiones conservadas ITS, Factor de Elongación (EF-1 α) y β -tubulina

En las secuencias de la región ITS se observó 97,5% de identidad para las cepas de *F. solani* PBRR mientras que para las secuencias del gen del factor de elongación (EF-1 α) y del gen de la β -tubulina se observó 98,1% y 96,7%, respectivamente. Por lo tanto, los resultados de secuenciación de todas las regiones analizadas mostraron regiones útiles para diseñar cebadores específicos para las cepas de *F. solani* PPRM (Figuras V.9, V.10, V.11, respectivamente).

Usando la variación de las secuencias encontradas en las tres regiones estudiadas se diseñaron un grupo de cebadores específicos para *F. solani* PBRR. Estos fueron elegidos con divergencia en la posición 3'.

A

	65	75	85	95	105	115
MR013	TGAACATACC	TAA-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCTGTAA	CAACGGGCCG
MR140	TGAACATACC	TAA-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCTGTAA	CAACGGGCCG
<i>F. illudens</i>	TGAACATACC	TAC-GTCGTT	GCTTCGGCGG	GA-ACAGACG	GC-CCCCT-A	ACACGGGCCG
<i>F. plagianthi</i>	TGAACATACC	TAC-GTCGTT	GCTTCGGCGG	GA-ACAGACG	GC-CCCCT-A	ACACGGGCCG
<i>F. phaseoli</i>	TGAACTTACC	TAT-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAAACCGACG	GC-CCCCT-A	AGACGGGCCG
<i>f. sp. phaseoli</i>	TGAACATACC	TA--AACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCCCT-G	AAACGGGCCG
<i>F. brasiliense</i>	TGAACTTACC	TAT-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAAACCGACG	GC-CCCCT-A	AGACGGGCCG
<i>F. cuneirostrum</i>	TGAACTTACC	TAT-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAAACCGACG	GC-CCCCT-A	AGACGGGCCG
<i>F. virguliforme</i>	TGAACTTACC	TAT-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAAACCGACG	GC-CCCCT-A	AGACGGGCCG
<i>F. tucumaniae</i>	TGAACTTACC	TAT-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAAACCGACG	GC-CCCCT-A	AGACGGGCCG
<i>f. sp. cucurbitae</i>	TGAACTTTT	ACC-AACGTT	GCTTCGGCGG	GANACAGATG	GC-CCTGT-A	GAACGGGCCA
<i>f. sp. mori</i>	TGAACATACC	TA--AACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCCCT-G	AAACGGGCCG
<i>f. sp. piperis</i>	TGAACTTTT	ACCCAACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGATG	GC-CCCCTGA	AAACGGGCCA
<i>f. sp. pisi</i>	TGAACATACC	TA--AACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCCCT-G	AAACGGGCCG
<i>F. ambrosium</i>	TGAACATACC	TA--AACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCCCTAA	C-ACGGGCCG
<i>N. vasinfecta</i>	TGAACTTACC	TAT-AACGTT	GCTTCGGCGG	GANACAGACG	GC-CCCCT-A	AAACGGGCCG
<i>H. haematococca</i>	TGAACATACC	TAA-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCCCTAA	-AACGGGCCG
<i>F. striatum</i>	TGAACATACC	TAA-AACGTT	GCTTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCCCTAA	-AACGGGCCG
<i>f. sp. batatas</i>	TGAACATACC	CA--AACGTT	GCCTCGGCGG	GAA-CAGACG	GC-CCTGAAA	CGATGGGCCG
<i>f. sp. robiniae</i>	TGAACATACC	TAN-AACGTT	GCTTCGGCGG	GANATAGACG	GC-CCCCT-A	AAACGGGCCG
MR509	TGAA-ATACC	ACT---TGTT	GCCTCGGCGG	AT--CAGCCC	GCTCCCGGTA	AAACGGGACG

B

	305	315	325	335	← 345	355	
MR013	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
MR140	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>F. illudens</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAC	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTCC	GAGCGTCATT	AACAACCCTC	AGG
<i>F. plagianthi</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAC	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTCC	GAGCGTCATT	AACAACCCTC	AGG
<i>F. phaseoli</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTCC	GAGCGTCATT	A-CAACCCTC	AGG
<i>f. sp. phaseoli</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>F. brasiliense</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTCC	GAGCGTCATT	A-CAACCCTC	AGG
<i>F. cuneirostrum</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTCC	GAGCGTCATT	A-CAACCCTC	AGG
<i>F. virguliforme</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTCC	GAGCGTCATT	A-CAACCCTC	AGG
<i>F. tucumaniae</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTCC	GAGCGTCATT	A-CAACCCTC	AGG
<i>f. sp. cucurbitae</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAC	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	ANCAACCCTC	AGG
<i>f. sp. mori</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>f. sp. piperis</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>f. sp. pisi</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>F. ambrosium</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>N. vasinfecta</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	ANCAACCCTC	AGG
<i>H. haematococca</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>F. striatum</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>f. sp. batatas</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	AC-AACCCTC	AGG
<i>f. sp. robiniae</i>	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	ANCAACCCTC	AGG
MR509	CACATTGCGC	CCGCCAGTAT	TCTGGCGGGC	ATGCCTGTTC	GAGCGTCATT	TC-AACCCTC	AAG

Figura V.9 Alineamiento de la secuencia parcial de la región ITS a partir de las cepas de *Fusarium solani* causante de la podredumbre parda de la raíz de maní (MR013 y MR140) y de otras especies del complejo *F. solani*, con la localización de los sitios específicos: las flechas representan el sitio de las secuencias de los cebadores *forward* (A) y *reverse* (B)

A

	365	375	385	395	405	415
MR013	CGGTCGGACC	GCAAAAATTT	TGGGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTATC
MR140	CGGTCGGACC	GCAAAAATTT	TGGGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTATC
<i>F. illudens</i>	CGGTCGGACC	GCAAAATATT	TGTGACTCGG	GAGGGG	---C	AGCGGGCGCA GA-GCGATTC
<i>F. plagianthi</i>	CGATCGGACC	GCAAAAT---	-----CTCGG	GAGGGG	---A	AGCGGGCGCA AA-GCGATTC
<i>F. phaseoli</i>	CGGTCGCGCC	GCAAAATTTT	-GTGACTCGG	GAGGGG	----	AGCGGGCGCA GA-GCGGATC
<i>f. sp. phaseoli</i>	CGGTCGCGCC	GCAAAATTTT	-GTGACTCGG	GAGGGG	----	AGCGGGCGCA GA-GCGGATC
<i>F. brasiliense</i>	CGGTCGCGCC	GCAAAATTTT	-GTGACTCGG	GAGGGG	----	AGCGGGCGCA GA-GCGGATC
<i>F. cuneirostrum</i>	CGGTCGCGCC	GCAAAATTTT	TGCGACTCGG	GAGGGG	----	AGCGGGCGCA GA-GCGGATC
<i>F. virguliforme</i>	CGGTCGCGCC	GCAAAATTTT	TGTGACTCGG	GAGGGG	----	AGCGGGCGCA GA-GCGGATC
<i>F. tucumaniae</i>	CGGTCGCGCC	GCAAAATTTT	-GTGACTCGG	GAGGGG	----	AGCGGGCGCA GA-GCGGATC
<i>f. sp. cucurbitae</i>	CGGTCGGACC	GCAAAAATTT	TGTGACTCGG	GAGACG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTGTC
<i>f. sp. mori</i>	CGGTCGAACC	GCAAAATTTT	TGTGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTGTC
<i>f. sp. piperis</i>	CGGTTGAACC	GCAAAATTTT	TGTGACTTGG	GAGAAG	----	--CGGGTGA GA-GCTTGTC
<i>f. sp. pisi</i>	CGGTCGAACC	GCAAAATTTT	TGGGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTGTC
<i>F. ambrosium</i>	CGGTCGCACC	GCAAAAATTT	TGGGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GC-GCGGATC
<i>N. vasifecta</i>	CGGTCGGACC	GCAAAATTTT	TGGGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTATC
<i>H. haematococca</i>	CGGTCGGACC	GCAAAAATTT	TGTGACTCGG	GAGACG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTGTC
<i>F. striatum</i>	CGGTCGGACC	GCAAAA-TTT	TGGGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTATC
<i>f. sp. batatas</i>	CGGTCGGACC	GCAAAAATTT	TGGGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTATC
<i>f. sp. robiniae</i>	CGGTCGAACC	GCAAATTTT	TGGGACTCGG	GAGAAG	----	--CGGGCGCA GA-GCGTGTC
MR509	CAGTCATATT	GCAAAATTTT	TG-GTCTCGA	GCGGGG	---T	AGCGGGCAGC TT-TCGAGTC

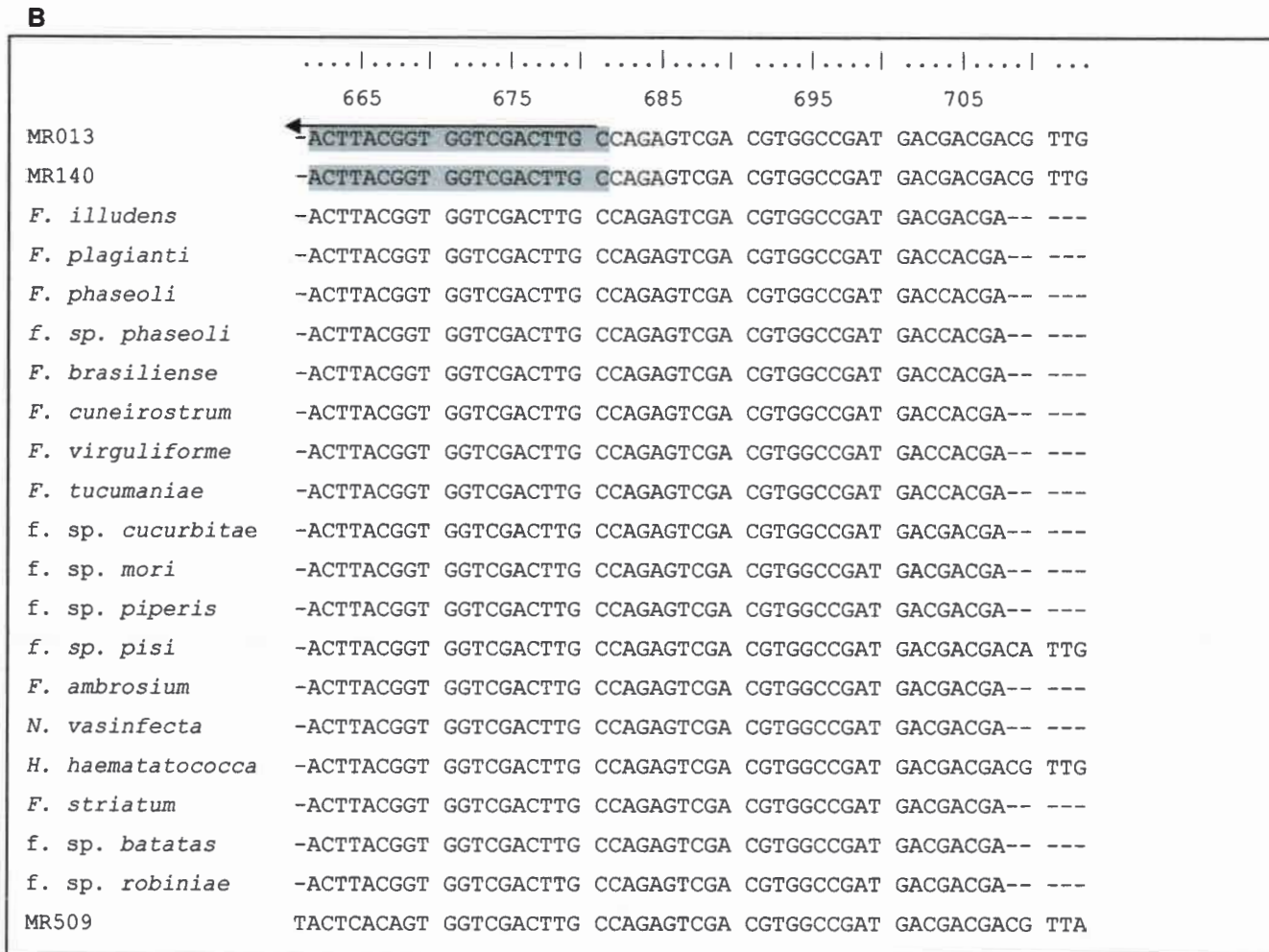


Figura V.10 Alineamiento de la secuencia parcial del factor de elongación (EF-1 α) a partir de las cepas de *Fusarium solani* causante de la podredumbre parda de la raíz de maní (MR013 y MR140) y de otras especies del complejo *F. solani*, con la localización de los sitios específicos: las flechas representan el sitio de las secuencias de los cebadores *forward* (A) y *reverse* (B).

A

	125	135	145	155	165	175	185	195	205	
MR013	ACCTTCAGAC	CGGTCAGTGC	GTAAGT----	ATCGCGACGC	CTATTTGCT	GCGGG--ATGCTCA---TA	ATCGCAGGG	TAACCAAATC		
MR140	ACCTTCAGAC	CGGTCAGTGC	GTAAGT----	ATCGCGTCT	CTCTTTGCT	GCGGG--AT	GCTCA---TA	ACCTGCAGGG	TAACCAAATC	
<i>f. sp. pisi</i>	ACCTTCAGAC	CGGTCAGTGC	GTAAGT----	ATCGCGACGC	CTGTTTAGCT	TGTGGG--AT	GCTCA---TA	ATCGCAGGG	TAACCAAATC	
<i>f. sp. phaseoli</i>	ACCTTCAGAC	CGGTCAGTGC	GTAAGT----	ATCGCGACGC	CTGTTTAGCT	TGTGGG--AT	GCTCA---TA	ATCAAAGGG	TAACCAAATC	
<i>H. haematococca</i>	ACCTTCAGAC	CGGTCAGTGC	GTAAGT----	ATTGCGATGC	CTGTTTCTGCT	GCGGG--AT	GCTCA---TA	ATCCGAGGG	TAACCAAATC	
<i>F. tucumaniae</i>	ACCTTCAGAC	CGGCCAGTGC	GTAAGT----	ATTGTCTCGC	CTTTATCGCT	GCGGG--AT	ACTAAA--TG	ATGCGAGGG	TAACCAAATC	
<i>F. virguliforme</i>	ACCTTCAGAC	CGGCCAGTGC	GTAAGT----	ATTGTCTCGC	CTTTATCGCT	GCGGG--AT	ACTAAA--TG	ATGCGAGGG	TAACCAAATC	
MR509	ACCTTCAGAC	CGGTCAGTGC	GTAAGTGCTC	ATCGCTTCT	CAACGTCGCA	TGCGGGGGAT	GCTCACAATG	TTTATCAGGG	TAACCAAATC	

B

	215	225	235	365	375	385	395	405	415	
MR013	GGTGCTGCTT	TCTGGCAGAC	CATCTCTGGC	ACATCTGTAG	GCTTCTGGTA	ACAAGTACGT	CCCTCGCGCC	GTCCTCGTCG	ATCTTGAGCC	
MR140	GGTGCTGCTT	TCTGGCAGAC	CATCTCTGGC	ACATCTGTAG	GCCTCTGGCA	ACAAGTACGT	CCCCCGCGCC	GTCCTCGTCG	ATCTTGAGCC	
<i>f. sp. pisi</i>	GGTGCTGCTT	TCTGGCAGAC	CATCTCTGGC	ACATTTGTAG	GCCTCTGGCA	ACAAGTACGT	CCCTCGCGCC	GTCCTCGTCG	ATCTTGAGCC	
<i>f. sp. phaseoli</i>	GGTGCTGCTT	TCTGGCAGAC	CATCTCTGGC	ACATTTGTAG	GCCTCTGGCA	ACAAGTACGT	CCCTCGCGCC	GTCCTCGTCG	ATCTTGATCC	
<i>H. haematococca</i>	GGTGCTGCTT	TCTGGCAGAC	CATCTCTGGC	ACATCTGTAG	GCCTCTGGCA	ACAAGTACGT	CCCTCGCGCC	GTCCTCGTCG	ATCTTGAGCC	
<i>F. tucumaniae</i>	GGTGCTGCTT	TCTGGCAGAC	CATCTCTGGC	ACGCCACAG	GCCTCTGGCA	ACAAGTACGT	CCCTCGCGCC	GTCCTCGTCG	ATCTCGAACC	
<i>F. virguliforme</i>	GGTGCTGCTT	TCTGGCAGAC	CATCTCTGGC	ACGCCCGCAG	GCCTCTGGCA	ACAAGTACGT	CCCTCGCGCC	GTCCTCGTCG	ATCTCGAACC	
MR509	GGTGCTGCTT	TCTGGCAAAC	CATCTCTGGC	ACACAAGTAG	GCCTCTGGCA	ACAAGTATGT	TCCCGAGCC	GTCCTCGTCG	ATCTTGAGCC	

Figura V.11 Alineamiento de la secuencia parcial de La región β -tubulina partir de las cepas de *Fusarium solani* causante de la podredumbre parda de la raíz de maní (MR013 y MR140) y de otras especies del complejo *F. solani*, con la localización de los sitios específicos: las flechas representan el sitio de las secuencias de los cebadores *forward* (A) y *reverse* (B)

V.3.3.1 Optimización de la reacción y determinación de la especificidad y sensibilidad de los cebadores diseñados a partir de secuencias conservadas

Empleando los cebadores diseñados a partir del gen de la β -tubulina se observaron productos de amplificación tanto en las cepas de *F. solani* PPRM como en las otras cepas pertenecientes a FSSC. Además se observó más de un producto de amplificación en algunas de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos mostraron una alta frecuencia de falsos positivos, por lo tanto no se continuaron evaluando estos cebadores.

Con respecto a los cebadores diseñados a partir de la región ITS del DNA ribosomal se obtuvo un producto de aproximadamente 200 pb cuando la mezcla de amplificación fue la siguiente: 1x Buffer, 1,25 U de DNA polimerasa; 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM), 1 μ M de cada par de cebador (10 μ M) y 1,5 mM de $MgCl_2$ (50 mM) en un volumen final de 20 μ l. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando el siguiente programa: 1 ciclo de 94° C por 2 min, 30 ciclos de 94° C, 30 s; 58° C, 30 s; 72° C 30 s y un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72° C.

Bajo estas condiciones se observó la presencia de falsos positivos ya que se obtuvieron productos de amplificación para especies del FSSC no asociados a la podredumbre parda de la raíz de maní, tales como, *F. tucumaniae* (patógeno de soja), *F. solani* f. sp. *phaseoli* (patógeno de poroto) y *F. solani* f. sp. *pisi* (patógeno de arveja). Se comprobó la baja especificidad de los cebadores diseñados comparándolos con la base de datos GenBank y usando la herramienta Primer Blast. Se pudo comprobar que los cebadores no sólo se aparean con las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal de *F. solani* PPRM sino también con otras regiones ITS pertenecientes a otras especies filogenéticas del FSSC presentes en la base de datos.

Con respecto a los cebadores diseñados a partir del gen del factor de elongación 1- α , las condiciones óptimas de amplificación fueron las siguientes: 1x Buffer PCR, 1,25 U GoTaq DNA polimerasa; 0,2 mM de cada dNTPs (2 mM); 0,5 μ M de cada par de cebadores (10 μ M), y 1,5 mM de $MgCl_2$ (50 mM) en un volumen final de 20 μ l. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando el siguiente programa: 1 ciclo de desnaturalización de 2 min a 94° C; 30 ciclos de 94° C por 30 s, 59° C por 30 s; 72° C por 30 s y una extensión final de 72° C por 5 min.

Bajo estas condiciones se obtuvo un fragmento de aproximadamente 200 pb, pero dicha banda no sólo se observó en las cepas de *F. solani* PPRM sino también en otras cepas del FSSC tales como, *F. solani* f. sp. *phaseoli* y *F. solani* f. sp. *pisi*. Se

comprobó la baja especificidad de los cebadores diseñados comparándolos con la base de datos GenBank y usando la herramienta Primer Blast. Los resultados obtenidos demuestran que los cebadores no solo se aparean con la secuencia del gen EF-1- α de *F. solani* PPRM sino también con otras especies del FSSC presentes en la base de datos.

Al igual que con los cebadores diseñados a partir la secuencia ITS, con el análisis comparativo de datos en el Genbank, se concluyó que estos cebadores tampoco son adecuados para el desarrollo de un método específico.

La detección de especies fúngicas mediante PCR es rápida, sensible y específica y, es importante elegir adecuadamente la secuencia de DNA diana a partir de la cual se diseñarán los cebadores específicos. Dichas secuencias pueden ser de genes codificadores, como los genes EF-1 α , β -tubulina, calmodulina o secuencias de regiones no codificantes, como los espaciadores IGS e ITS del DNA ribosomal. Los genes codificadores del DNA ribosomal son regiones más conservadas que los espaciadores (regiones ITS) lo que permite realizar estudios entre especies más cercanas. De este modo, se han desarrollado protocolos de detección por PCR para especies de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* basados en genes de la subunidad pequeña del DNA ribosomal y genes codificadores (Bluhm *et al.*, 2002; González-Salgado *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2003; Mulé *et al.*, 2004; Patiño *et al.*, 2005; Perrone *et al.*, 2004; Susca *et al.* 2007). En el presente estudio no se pudieron desarrollar cebadores específicos de *F. solani* PPRM con ningunas de las secuencias diana evaluadas debido a que las especies del FSSC están estrechamente relacionadas y difieren en unos pocos nucleótidos.

V.4 Determinación de la presencia del patógeno en suelo inoculado con *Fusarium solani* patógeno de maní usando cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP

Para los ensayos de detección del patógeno en muestras de suelo inoculadas se eligió la cepa MR386 que fue aislada a partir de raíces de maní con síntomas de podredumbre parda. Dicha cepa fue identificada como *F. solani* por caracteres morfológicos y a través de marcadores moleculares (AFLPs) (Reynoso *et al.*, 2006). Las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal, los genes del factor de elongación 1- α y de la ARN polimerasa II subunidad β (RPB2), se encuentran depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) con los siguientes números de

accesos: JF700533 (RPB2), GQ121888 (región ITS del DNA ribosomal) y GQ121920 (EF 1- α).

Las muestras de suelo inoculadas con una suspensión de esporas de la cepa MR386 mostraron un recuento de $5,4 \times 10^3$ ufc/g de suelo después de los 7 días de incubación en medio Pentacloro Nitro-benzeno (Leslie y Summerell, 2006). Se extrajo DNA a partir de las colonias de *F. solani* aisladas y del suelo inoculado. Ambas muestras se sometieron a reacción de amplificación por PCR.

Cuando se utilizó como templado el DNA extraído a partir de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo, pudo amplificarse un fragmento específico de aproximadamente 200 pb con el cebador FS1/FS2. En cambio, cuando se utilizó como templado DNA extraído a partir de la muestra de suelo inoculado en laboratorio, no se obtuvo el producto específico. Una de las posibles causas de este resultado negativo pudo ser que las muestras de DNA contenían inhibidores. Por lo tanto, se debieron optimizar las condiciones de reacción para la elaboración de un método de detección del patógeno en suelo.

Es conocido que, en la extracción de DNA de este tipo de muestras complejas, generalmente también se extraen distintos compuestos que pueden interferir con la amplificación de fragmentos de DNA mediante técnicas de PCR. Uno de los principales compuestos inhibidores son los ácidos húmicos en muestras de suelo (Wilson, 1997; Zhou *et al.*, 1996) y en muestras vegetales se han descrito varias sustancias, incluyendo polisacáridos y compuestos fenólicos (Wilson, 1997). Los inhibidores de dichas matrices pueden actuar como quelantes del ion Mg^{2+} , cofactor requerido para el funcionamiento de la enzima *Taq* DNA polimerasa, también pueden unirse a la molécula de DNA o a la misma enzima, interfiriendo directamente con la interacción entre el DNA y la enzima polimerasa (Wilson, 1997). Poussier *et al.* (2002) demostraron que la adición de 2% de polivinilpirrolidona (PVP) o polivinilpolipirrolidona (PVPP) al buffer de extracción de DNA aumentaba significativamente la detección de hongos fitopatógenos por PCR, pero la combinación de este procedimiento de extracción más la adición ASB aplicado a la mezcla de reacción, mejoró considerablemente la amplificación. Considerando que hubo inconvenientes en la detección del patógeno en matrices más complejas que los cultivos puros, se decidió atenuar el efecto de compuestos inhibidores que alteran la reacción en cadena de la polimerasa utilizando albúmina sérica bovina (ASB) de acuerdo a lo propuesto por Ma y Michailides (2007). Actualmente, los métodos comerciales de extracción de DNA de matrices complejas, utilizan diversos componentes que ayudan a eliminar los

compuestos inhibidores, pero muchas veces no son separados totalmente. Además, de la incorporación de ASB, se probaron diferentes concentraciones de cebadores específicos y de *Taq* DNA polimerasa en la mezcla de reacción. El agregado de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ASB, $1\text{ U}/\mu\text{l}$ de *Taq* DNA polimerasa y $0,5\ \mu\text{M}/\mu\text{l}$ de cada cebador por reacción mejoró notablemente la reacción obteniendo el producto de amplificación específico en las muestras de suelo donde en un primer momento se habían obtenido resultados negativos (Tabla V.3) (Figura V.12).

Bajo las condiciones de reacción optimizadas (Tabla V.3) se evaluó la sensibilidad de la técnica en muestras de suelo inoculado, siendo la misma de 10^3 conidios de *F. solani* PPRM por gramo de suelo (Figura V.13).

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la capacidad de detectar bajos niveles del patógeno usando los cebadores específicos FS1/FS2..

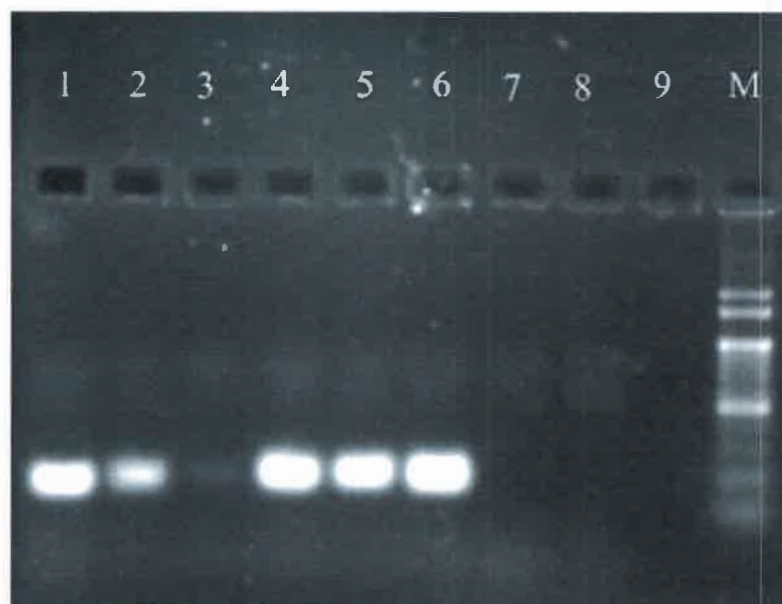


Figura V.12 Productos de amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos FS1/FS2. Línea 1: DNA puro de la cepa MR386 aislada de suelo artificialmente contaminado. Línea 2: DNA total extraído de suelo artificialmente contaminado con la cepa MR386. Línea 3: DNA total extraído de suelo artificialmente contaminado con la cepa MR386 dilución 1:50; Línea 4 – 6: DNA controles positivos, cepa MR319, Cepa MR338, cepa MR313 (respectivamente). Línea 7: DNA total extraído de suelo inoculado con agua estéril (control negativo); Línea 8: Control negativo de reactivos (sin DNA templado). M: Marcador de 100 pb.

Tabla V.3 Condiciones de la reacción de PCR para evaluar la presencia de *F. solani* causante de PPRM en suelo.

Mezcla de reacción		Programa de amplificación	
Buffer PCR	1X	1. 94 °C	2 min
dNTPs (2 mM de c/u)	0,2 mM	2. 94 °C	30 s
Primer FS1 (5 µM)	0,5 µM	3. 55 °C	30 s
Primer FS2 (5 µM)	0,5 µM	4. 72 °C	30 s
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5U/µl)	1 U	5. Ir al paso 2	34 veces
MgCl ₂ (2,5 mM)	0,25 mM	6. 72 °C	5 minutos
ASB (10 µg/µl)	1 µg	7. Final	
DNA templado	10 – 20 ng		
Volumen final	20 µl		

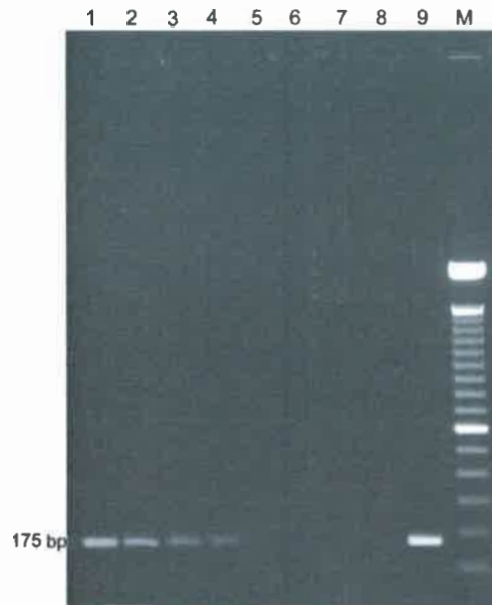


Figura V.13 Productos de amplificación de PCR con los cebadores específicos FS1/FS2 usando suelo inoculado con diferentes concentraciones de conidios. Líneas 1 – 6: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 conidios por gramo de suelo, respectivamente. Línea 7: control negativo (sin DNA templado). Línea 8: control positivo (DNA puro de la cepa J). M: marcador de 100 pb.

V.5 Determinación de la presencia del patógeno en suelo contaminado con *Fusarium solani* patógeno de maní usando cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP

Para evaluar la especificidad y sensibilidad de la técnica basada en PCR desarrollada en el presente estudio, se usaron muestras de suelo con historia de cultivo de maní provenientes de la región de General Cabrera (Córdoba) denominadas "Suelo Infeccionado" (SI) y "Suelo Criadero el Carmen" (SCC) y una muestra sin historia de cultivo de maní (SH) proveniente de la zona de Mataldi (Córdoba).

En dos de las tres muestras de suelos naturalmente contaminados, SCC y SI, se observó un recuento de especies de *Fusarium* en el medio PCNB de aproximadamente 10^3 ufc/g de suelo. Mientras que en la muestra de suelo SH no se detectaron colonias. En la determinación de recuento de *F. solani* se considera que valores de 5×10^2 ufc/g de suelo representa un nivel medio de riesgo de infección para la cosecha (Oddino, comunicación personal).

Luego del recuento, a partir de las placas se seleccionaron las colonias que presentaban características macroscópicas semejantes a *F. solani* y se transfirieron al medio SNA (Leslie y Summerell, 2006) para su posterior identificación morfológica. A las colonias identificadas morfológicamente como *F. solani* se les extrajo el DNA para luego usarlo como templado en las reacciones de amplificación, utilizando los cebadores específicos desarrollados en el laboratorio.

A partir de la muestra SCC se seleccionaron 20 colonias, de las cuales 12 fueron identificadas morfológicamente como *F. solani*. De estas 12 colonias, 10 amplificaron el producto de aproximadamente 200 pb utilizando los cebadores específicos AFLP.

De las 25 colonias seleccionadas de la muestra SI, 14 fueron identificadas morfológicamente como *F. solani* y 11 de estas últimas mostraron reacción positiva por PCR al utilizar los cebadores específicos FS1/FS2. A partir de la muestra de suelo sin historia de maní, las 18 seleccionadas fueron identificadas morfológicamente como *F. solani* y de estas 13 presentaron el fragmento específico (Figura V.14).

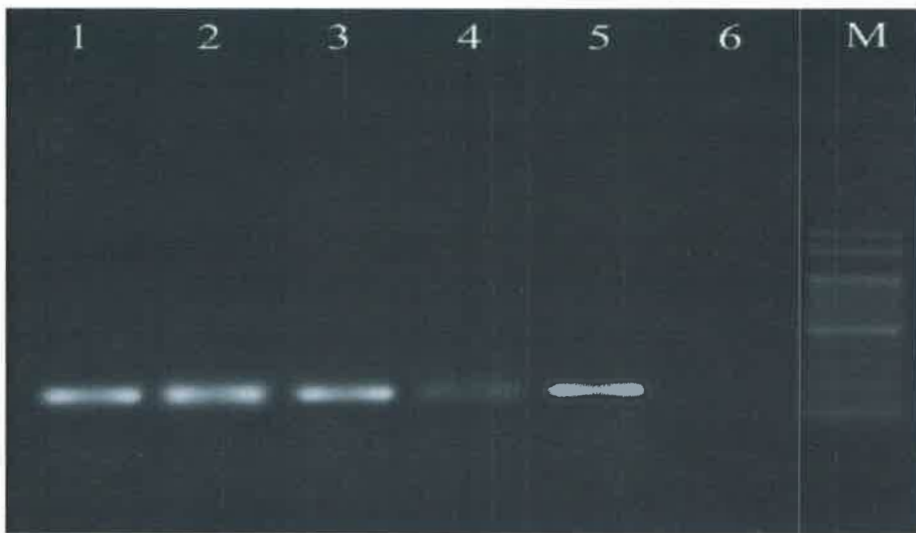


Figura V.14 Producto de amplificación de PCR usando como templado, DNA de las cepas de *F. solani* PPRM aisladas de suelo contaminado. Línea 1 – 2: DNA de cepas aisladas del suelo SCC. Línea 3 – 4: DNA de cepas aisladas del suelo SI. Línea 5: DNA de cepas aisladas del suelo sin historia de maní. Línea 6: Control negativo. M: Marcador de 100 pb.

Cuando se utilizó como templado el DNA total extraído a partir de las muestras de suelo de SCC y SI, se observó la presencia del producto específico de aproximadamente 200pb sólo en la muestra SCC (Figura V.15). En esta reacción se usaron como controles positivos DNA total extraído de muestras de suelo inoculadas con cepas de *F. solani* PPRM y DNA de cultivos puros de la cepa MR386 y cepa J. Cabe aclarar que la patogenicidad de la cepa J ha sido probada tanto en invernadero como a campo por Oddino *et al.* (2005).



Figura V.15 Productos de amplificación por PCR utilizando DNA total extraído a partir de muestras de suelos contaminados. Línea 1: suelo SI (sin diluir). Línea 2: suelo SCC (sin diluir). Línea 3: suelo SI dilución 1:2. Línea 4: suelo SSC dilución 1:2. Línea 5 – 6: controles positivos (suelo artificialmente contaminado). Línea 7 – 8: controles positivos (cepas MR386 y J). Línea 9: control negativo de reactivos. M: Marcador de 100pb.

A partir de la muestra de suelo sin historia de cultivo de maní, no se obtuvo el producto específico (dato no mostrado). Esto podría deberse a que la cantidad de DNA extraído a partir de dichas muestras no fue suficiente y resultó menor al límite de detección del método por fluorometría (0,5ng/μl) o que aún existan inhibidores que interfieran la reacción de amplificación. También puede deberse a que *F. solani* PPRM se encuentra en baja densidad, tal cual lo demuestra el recuento obtenido a partir de este suelo, en comparación con la alta frecuencia de otros microorganismos patógenos o saprófitos que cohabitan en dicha matriz. Cabe aclarar que a partir de todas estas muestras se aislaron cepas que fueron clasificadas morfológicamente como *F. solani* y presentaron amplificación positiva cuando se analizaron por PCR usando los cebadores específicos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran una propiedad muy importante de los cebadores específicos diseñados, que es la de poder detectar al patógeno en una matriz tan compleja como es el suelo. Oddino *et al.* (2005) observaron que la cantidad de inóculo presente en el suelo puede correlacionarse

positivamente con la incidencia de la enfermedad. Actualmente, se identifica y cuantifica por metodología clásica usando el medio PCNB, la incidencia de *F. solani* en suelo de campos destinados al cultivo de maní para decidir el arrendamiento. La obtención de cebadores específicos y de un método eficiente de extracción de DNA total a partir de muestras de suelo es un paso importante para una técnica simple, rápida y efectiva de detección por PCR. Esta etapa es fundamental para el posterior desarrollo de un método estandarizado de PCR cuantitativa que nos permita estimar la densidad de inóculo fúngico. De esta manera se reducirá considerablemente el tiempo de trabajo que insume la metodología clásica (aproximadamente 20 días), comparándola con la molecular (1 ó 2 días).

V.6 Determinación de la presencia del patógeno en muestras de raíces de maní con y sin síntomas de podredumbre parda usando cebadores específicos obtenidos a partir de AFLP

Se determinó la presencia del patógeno en muestras de raíces de plantas de maní con síntomas de podredumbre parda provenientes de la zona de General Cabrera (1A, 2A, 3A, 4A y 5B), en muestras de raíces con síntomas de podredumbre parda obtenidas de un ensayo de patogenicidad anterior realizado en nuestro laboratorio y en muestras de raíces de maní sin síntomas de enfermedad provenientes de la localidad de Los Molles (Córdoba).

En las muestras 1A, 2A, 3A, 4A y 5B se logró aislar e identificar morfológicamente especies de *F. solani*. Las colonias obtenidas fueron procesadas con el fin de realizar amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos. Los aislamientos obtenidos a partir de dichas muestras amplificaron un producto de aproximadamente 200 pb cuando se utilizaron los cebadores FS1/FS2.

El desarrollo de un método simple y rápido basado en PCR para detectar a *F. solani* PPRM en el tejido vegetal es de suma necesidad para conocer el ciclo de la enfermedad, en particular, el momento del ingreso del patógeno y su evolución en la planta. En la optimización de esta metodología, la extracción de DNA de raíces enfermas se realizó mediante la utilización del equipo comercial Qiagen. Los resultados del rendimiento del mismo se muestran en la Tabla V.4.

Cuando se procedió a la detección del patógeno a partir de las muestras de raíces sintomáticas obtenidas de un ensayo de patogenicidad realizado en nuestro laboratorio, usando las condiciones de PCR descriptas en la Tabla V.3, no se

observaron resultados positivos. Por lo tanto, se consideró que el DNA extraído de esta matriz podría tener aún compuestos inhibidores de la PCR, principalmente polisacáridos o compuestos fenólicos (Wilson, 1997). Con el fin de determinar la presencia de inhibidores en la matriz, se realizaron las reacciones de PCR usando como templado diluciones 1/2 a 1/50 del DNA de todas las muestras analizadas y controles de inhibición, los cuales se obtuvieron mezclando 1 μ l de una solución de DNA de *F. solani* PPRM (reacción positiva a la amplificación utilizando cebadores específicos) con 9 μ l de la solución obtenida de la extracción de DNA de material vegetal. En caso de que aún existiesen inhibidores de la reacción de PCR en la matriz, se esperaba que no haya amplificación en la mezcla control. También, se aumentó la temperatura de apareamiento de los cebadores a 57° C con el fin de aumentar la especificidad de la técnica de PCR.

Tabla V.4 Concentración de DNA obtenido a partir de raíz de planta de maní con síntomas de podredumbre parda naturalmente contaminadas (A), y raíz artificialmente contaminadas en ensayos de patogenicidad con cepas de *F. solani* PPRM (B).

A		B	
Muestra	Concentración (ng/ μ l)	Muestra	Concentración (ng/ μ l)
1 ^a	34,2	MR319	125
2 A	52,1	MR436	125
3 A	46,2	MR386	125
4 A	62	MR338	125
5 A	41,7		

Los resultados obtenidos mostraron que, efectivamente la solución de DNA obtenida de las muestras de raíces contenía productos inhibidores de la PCR, ya que cuando se amplificó la mezcla preparada para los controles de inhibición (1 μ l de un control positivo + 9 μ l de la matriz) se obtuvo un resultado negativo. Para solucionar este problema, se diluyó la solución obtenida de la extracción de DNA total del material vegetal, y se sometió a PCR cada una de estas diluciones usando una temperatura de apareamiento de 57° C. Concluyendo, fue necesario diluir, hasta aproximadamente 1/16, aumentar la temperatura de apareamiento y agregar ASB a la muestra de reacción para observar resultados positivos (Figura V.16) (Tabla V.5). Por otro lado, en el presente estudio se demostró que la sensibilidad de la técnica de PCR desarrollada

permite obtener productos de amplificación hasta una concentración mínima de 0,001 ng/ μ l de DNA total del patógeno puro, por cual se esperaba encontrar amplificación en diluciones de las matrices analizadas.

Luego de optimizar las condiciones de reacción, se analizaron mediante los cebadores específicos FS1/FS2 las 5 muestras de raíces de maní con síntomas de enfermedad (1A, 2A, 3A, 4A y 5B). El producto específico de amplificación se observó en todas las muestras excepto en la muestra 2A. Además, no se observaron bandas en los geles de agarosa cuando se usó como templado, DNA extraído a partir de raíces de maní sin signos ni síntomas de la enfermedad (Figura V.17).

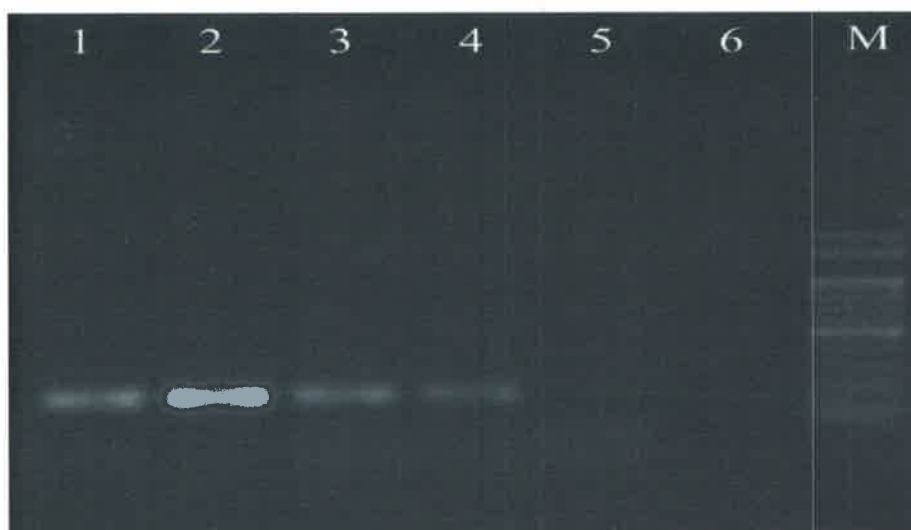


Figura V.16 Productos de amplificación de PCR usando como templado DNA de raíces de maní infectado por *F. solani* causante de la PPRM.

Línea 1: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR386 dilución 1:50. Línea 2: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR319 dilución 1:32. Línea 3: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR338 dilución 1:50. Línea 4: muestra de raíz de maní infectado con la cepa MR436 dilución 1:50. Línea 5: muestra de raíz de maní sin síntomas. Línea 6: control negativo. M: Marcador de 100 pb.

Tabla V.5 Condiciones de la reacción de PCR utilizada en matrices de DNA total de raíces de maní con y sin síntomas de podredumbre parda. Modificación de la técnica de PCR citada en la Tabla V.3.

Mezcla de reacción		Programa de amplificación	
dNTPs (2 mM de c/u)	0,2 mM	1. 94° C	2 min
Buffer PCR	1X	2. 94° C	30 s
Primer FS1 (5 µM)	0,5 µM	3. 57° C	30 s
Primer FS2 (5 µM)	0,5 µM	4. 72° C	30 s
Taq DNA polimerasa (5U/µl)	1 U	5. Ir al paso 2	34 veces
Cl ₂ Mg (2,5 mM)	0,25 mM	6. 72° C	5 min
ASB (10 µg/µl)	1 µg	7. Final	
DNA templado	dilución ≥ 1/16		
Volumen final	20 µl		

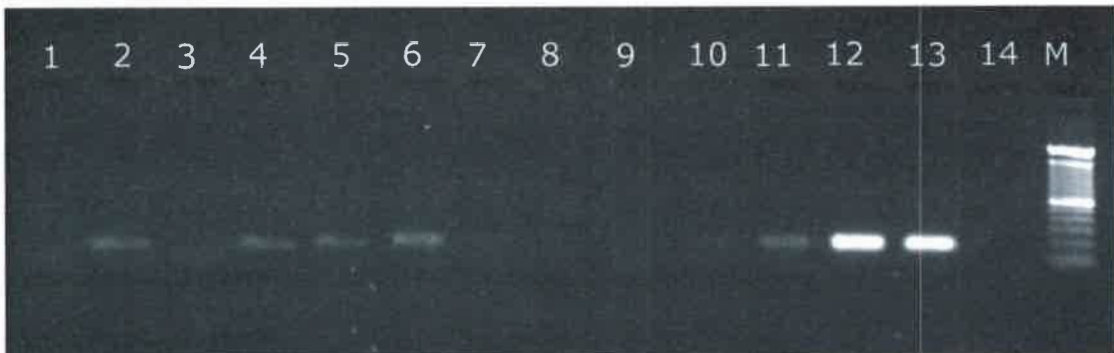


Figura V.17 Productos de amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos FS1/FS2 en muestras de raíces de maní. Línea 1: DNA total extraído de raíz sin síntomas. Línea 2: muestras 1A dilución 1:16. Línea 3: muestra 2A dilución 1:16. Línea 4: muestra 3A dilución 1:16. Línea 5: muestra 4A dilución 1/16. Línea 6: muestra 5B dilución 1:16. Línea 7: muestras 1A dilución 1:32. Línea 8: muestra 2A dilución 1:32. Línea 9: muestra 3A dilución 1:32. Línea 10: muestra 4A dilución 1/32. Línea 11: muestra 5B dilución 1:32. Línea 12 – 13: controles positivos (cepas MR386 y J). Línea 14: control negativo, M: Marcador de 100 pb.

Un aspecto importante del presente trabajo, es que se pudo demostrar que los cebadores específicos FS1/FS2 diseñados a partir de los marcadores AFLP pueden detectar la presencia de *F. solani* PPRM en matrices complejas como el suelo y material vegetal infectado, ya sea en el laboratorio (artificialmente contaminado) como en casos de enfermedad en campo (naturalmente contaminado). Las modificaciones llevadas a cabo en los protocolos de amplificación permitieron disminuir el efecto de sustancias inhibidoras presentes en las muestras de DNA.

Dichas modificaciones mejoraron la extracción y purificación del DNA significativamente con respecto al protocolo establecido por los fabricantes, tal como ha sido demostrado por Ma y Michailides (2007).

Para cada tipo de matriz se debe diseñar y estandarizar un protocolo de amplificación particular que se adapte a los fines deseados. Es más eficiente mejorar la reacción de PCR tratando de disminuir los efectos de las sustancias inhibidoras, que intentar eliminar a partir de las muestras dichas sustancias (Kreader, 1996). El agregado de ASB a las mezclas de reacción resultó una excelente alternativa para la disminución en la inhibición de amplificación en las muestras analizadas en este trabajo. En cuanto a las muestras de suelo, las mayores complicaciones surgieron a partir de las muestras de suelo naturalmente contaminadas. Por otro lado, para las muestras de DNA provenientes de material vegetal, fue necesario diluir la matriz obtenida y además aumentar la temperatura de apareamiento de 55° C a 57° C. Una buena estrategia para eliminar el efecto de los compuestos inhibidores sería realizar diluciones del DNA extraído, que permitirían disminuir la concentración de los mismos (García-Pedrajas *et al.*, 1999). También, se podría aumentar el volumen final de la mezcla de reacción y la concentración de reactivos. De esta manera, se estarían diluyendo los compuestos inhibidores.

La persistencia de los hongos fitopatógenos en el suelo debido a sus estructuras de resistencia, hace importante su detección antes de iniciar un cultivo y así determinar las estrategias de labranza y aplicación de fungicidas. El ensayo de PCR descrito en el presente trabajo representa una gran ventaja en términos de rapidez y especificidad, en comparación con métodos convencionales de identificación, y los demás métodos bioquímicos, marcadores moleculares y/o pruebas de patogenicidad descritos hasta el momento para especies pertenecientes al FSSC. Los métodos tradicionales de diagnóstico para la detección e identificación de *F. solani* a partir de cultivos puros o en los suelos o material vegetal infectados se basan principalmente en las características macro y micromorfológicas, los cuales insumen demasiado tiempo,

requieren de experiencia taxonómica ya que generalmente, puede resultar difícil distinguir entre especies estrechamente relacionadas, y también es importante destacar que no es posible distinguir entre cepas patógenas y saprofitas.

El diseño de cebadores a través de marcadores moleculares es una herramienta útil para elaborar técnicas de detección rápida y específica de hongos fitopatógenos basadas en PCR (Cipriani *et al.*, 2009; Pelegrineli-Fungaro *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2003, 2004). El uso de cebadores específicos FS1/FS2 permitió procesar pequeñas cantidades de muestras de DNA y detectar el patógeno en pocas horas, en comparación con los métodos tradicionales o las pruebas de patogenicidad que puede llevar días o semanas. El tiempo necesario para el diagnóstico de *F. solani* PPRM a partir de suelo y material vegetal se redujo de veinte días con el protocolo tradicional a sólo dos utilizando la técnica de PCR descrita. Una gran variedad de métodos basados en PCR han sido utilizado para distinguir diferentes especies pertenecientes a complejos filogenéticos involucradas en enfermedades del suelo, tales como el tizón de la vaina del arroz (Johanson *et al.*, 1998), la podredumbre marrón de la soja (Chen *et al.*, 1999), los subgrupos de *Rhizoctonia solani* (Salazar *et al.*, 2000) y especies de *Alternaria* patógenos de zanahoria (Konstantinova *et al.*, 2002), entre otros.

Como se mencionó anteriormente, la identificación precisa de los miembros del FSSC es dificultosa hasta para taxónomos expertos, por esto, considerando los análisis actuales de detección de *F. solani* causante de PPRM en los que la clasificación se hace hasta el nivel de especie, existe el riesgo de estar informando falsos positivos, debido a que en el suelo co-habitan varias especies de dicho complejo. Bajo este concepto es de importancia el desarrollo de una herramienta molecular, que permita diferenciar rápidamente a los miembros del FSSC. Por destacamos la utilización de los cebadores específicos FS1/FS2 para la detección de *F. solani* causante de PPRM.

Podemos concluir que la especificidad y el alto grado de sensibilidad de los ensayos de PCR llevados a cabo para *F. solani* causante de podredumbre parda de la raíz de maní, proporcionan una buena herramienta para la detección temprana de dicho patógeno en muestras de suelo que serán destinadas al cultivo de esta oleaginosa, permitiendo de esta manera diseñar estrategias para prevenir la enfermedad, así como asegurar un apropiado manejo de la misma, reduciendo la aplicación de fungicidas, además de ser de gran utilidad para la investigación básica en epidemiología y genética de poblaciones de hongos (Schilling *et al.*, 1996).

V.7 Análisis filogenético molecular

El FSCC es altamente diverso e incluye aproximadamente 50 especies filogenéticas que se pueden aislar de suelo, animales, plantas y restos vegetales, además comprende patógenos tanto de plantas como de humanos (Nalim *et al.*, 2012). Por lo tanto, uno de los objetivos del presente trabajo fue estudiar las relaciones filogenéticas de las cepas de *F. solani* PPRM a fin de determinar su identidad y dilucidar si pertenecen a algunas de las especies filogenéticas descritas hasta el momento.

Las estrategias de identificación en base a secuencias, solo pueden ser significativas si se cuenta con una base de datos robusta y confiable, en la cual se depositen datos de secuencias de cepas tipo o de referencia (cuando es posible), que han sido rigurosamente validadas en términos de su nomenclatura e incluyen secuencias diana de una amplia variedad. La base de datos más ampliamente usada es el GenBank, que contiene un gran número de secuencias aunque se ha encontrado que los errores en dicha base de datos supera al 20% en las especies fúngicas (Nilsson *et al.*, 2006). Por otra parte, las bases de datos más pequeñas, a menudo son inadecuadas debido a que se omiten muchas especies, generalmente importantes y contienen pocos representantes de la misma especie (Hall *et al.*, 2004). Para superar estos problemas, las bases de datos de secuencias específicas para grupos particulares de hongos, basado en secuencias de calidad controlada, se han creado principalmente para patógenos de plantas, de importancia industrial y ascomicetes ectomicorrízicos y basidiomicetes, por ejemplo, *Fusarium* spp. (*Fusarium-ID* v 1.0 [Geiser *et al.*, 2004]; <http://fusarium.cbio.psu.edu>), *Trichoderma* spp. (<http://www.isth.info/morphology.php>), *Phaeoacremonium* spp. (<http://www.cbs.knaw.nl/phaeoacremonium/biolomics.aspx>), y hongos (micorrizas UNITE; <http://unite.ut.ee/>). Actualmente, la base de datos FUSARIUM-ID v. 1.0 contiene un número limitado de secuencias, aunque están representadas aquellas correspondientes a patógenos de plantas, animales y humanos, particularmente, las pertenecientes a los complejos *F. oxysporum*, *F. solani*, y *Gibberella fujikuroi* (Geiser *et al.*, 2004). Al respecto, O'Donnell *et al.* (2010a) recomiendan usar en primer lugar las secuencias de los genes EF-1 α , RPB1 o RPB2 debido principalmente a que dicha base de datos contiene todos los alineamientos de las secuencias utilizados en la mayoría publicaciones (O'Donnell 2000; O'Donnell *et al.*, 1998a, 1998b, 2000, 2004, 2007, 2008, 2009a, 2009b, 2010b; Schroers *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006).

Para caracterizar molecularmente de las cepas de *F. solani* PPRM evaluadas en el presente estudio se procedió a realizar un análisis de secuencias mediante alineamientos básicos locales (BLAST). Se analizaron las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal y los genes del factor de elongación (EF-1 α), β -tubulina y RNA polimerasa II (RPB2) de un total de 17 cepas de *F. solani* PPRM y, se las comparó con las secuencias disponibles en las bases de datos GenBank(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) incluyendo cepas patógenas de plantas y humanos y probables saprófitas, incluidas en los clados 1, 2 y 3 definidos por O'Donnell *et al.* (2008) y las recientemente descritas por Nalim *et al.* (2012) (Tabla VIII.1 y VIII.2).

Cabe aclarar que, debido a que la mayoría de las especies pertenecientes al FSSC son morfológicamente crípticas, y carecen de un nombre binomial formal, Chang *et al.* (2006) desarrollaron un sistema de nomenclatura estandarizado en el cual se identifica a la especie del complejo con letras mayúsculas (FSSC), seguido por números Árabigos para distinguir cada especie filogenética (FSSC 1), y letras minúsculas para identificar cada haplotipo (FSSC 1-a).

Usando la base de datos FUSARIUM-ID y GenBank, el análisis mediante un alineamiento básico local de la secuencia del gen EF-1 α de las 17 cepas de *F. solani* PPRM evaluadas con este gen, dio como resultado un valor E= 0.0 (es decir, que la probabilidad de que dicho alineamiento haya ocurrido por azar, es muy baja) y un porcentaje de identidad entre 99% y 100% con secuencias pertenecientes a FSSC 5 (9 cepas) y FSSC 3+4, *F. falciforme* (6 cepas) (Tabla V.6). En cambio, el uso de la secuencia del gen PBR2 de las 9 cepas de *F. solani* PPRM mediante un alineamiento básico local dio como resultado que las mismas pertenecían a FSSC 5 (8 cepas) y FSSC 3+4, *F. falciforme* (1 cepa) (Tabla V.6). Es necesario aclarar que la cepa MR319 mostró un 99% de identidad con una cepa FSSC 3+4 cuando se analizó la secuencia del gen EF-1 α y, un 100% de identidad con una cepa FSSC 5 cuando se analizó el gen de la PBR2 en ambas bases de datos.

Tabla V.6 Análisis del alineamiento básico local de las secuencias de los genes para el factor de elongación (EF-1 α) y RNA polimerasa subunidad dos beta (RPB2) de cepas de *F. solani* causante de PPRM.

Cepa	BASE DE DATOS			
	FUSARIUM-ID		GenBank	
	EF-1 α	PBR2	EF-1 α	PBR2
MR010	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	Nd	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	nd
MR013	NRRL 32727 FSSC 3+4 FD_01493 (99,82%)	NRRL 32743 FSSC 3+4 FD_01499 (100%)	NRRL 32727 FSSC 3+4 DQ247047 (99%)	NRRL 46688 FSSC 3+4 EU329646 (100%)
MR016	NRRL 32727 FSSC 3+4 FD_01493 (99,82%)	Nd	NRRL 32727 FSSC 3+4 DQ247047 (99%)	nd
MR114	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	NRRL 46598 FSSC 5 GU170593 (100%)
MR116	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (99,82%)	Nd	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	nd
MR133	Nd	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (99,88%)	nd	NRRL 46598 FSSC 5 GU170593 (100%)
MR140	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	NRRL 46643 FSSC 5 GU250729 (100%)
MR313	NRRL 32727 FSSC 3+4 FD_01493 (99,82%)	Nd	NRRL 32727 FSSC 3+4 DQ247047 (99%)	nd
MR319	NRRL 32727 FSSC 3+4 FD_01493 (99,46%)	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 32727 FSSC 3+4 DQ247047 (99%)	NRRL 46598 FSSC 5 GU170593 (100%)

MR338	NRRL 32727 FSSC 3+4 FD_01493 (99,28%)	Nd	NRRL 32727 FSSC 3+4 DQ247047 (99%)	nd
MR386	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (99,82%)	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	NRRL 46598 FSSC 5 GU170593 (100%)
MR403	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	Nd	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	nd
MR415	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	NRRL 46598 FSSC 5 GU170593 (100%)
MR436	NRRL 32727 FSSC 3+4 FD_01493 (99,82%)	Nd	NRRL 32727 FSSC 3+4 DQ247047 (99%)	nd
MR514	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	Nd	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	nd
MR528	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 43681 FSSC 5 FD_01519 (100%)	NRRL 52798 FSSC 5 JF740866 (100%)	NRRL 46598 FSSC 5 GU170593 (100%)
J	Nd	NRRL 32741 FSSC 5 FD_01532 (99,88%)	nd	NRRL 46699 FSSC 5 EU329657 (100%)

nd: no determinado

Por otro lado, el análisis de la secuencia de la región ITS del DNA ribosomal, cuando se usó la base de datos FUSARIUM-ID no mostró alineamiento con ninguna secuencia. Esto puede ser debido a que en dicha base solo se han incorporado secuencias pertenecientes a *F. incarnatum*-*F. equiseti*, *F. chlamyosporum* y algunas de las especies pertenecientes al FSSC (O'Donnell *et al.*, 2010). Por lo tanto, las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal de las cepas de *F. solani* PPRM fueron comparadas solo con aquéllas publicadas en la base de datos GenBank, obteniéndose resultados pocos claros o ambiguos por lo cual se decidió analizar esta secuencia a través de un análisis de máxima parsimonia. Cabe señalar que, en comparación con las secuencias de los genes EF-1 α , RPB1 y RPB2, la región ITS del DNA ribosomal brinda relativamente poca información filogenética dentro del género *Fusarium* (Balajee *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2007). A pesar de esto, aún existen esquemas de identificación que incluyen esta región además de los genes EF-1 α , RPB1 y RPB2 dentro del género *Fusarium*. Por otro lado, O'Donnell *et al.* (2010a) aseguran que, si se analizan las secuencias EF-1 α , RPB1 o RPB2 y se encuentra una coincidencia exacta con alguna de las especies presentes en la base de datos FUSARIUM-ID generalmente se puede interpretar como la identificación definitiva a nivel de especie.

El gen del factor de elongación (EF-1 α) que codifica una parte esencial de la maquinaria de traducción de proteínas, es muy útil para estudios filogenéticos ya que (i) es altamente informativo a nivel de especie en el género *Fusarium*, ii) no se han detectado copias de genes ortólogos en el género y, iii) se han diseñado cebadores universales. Dichos cebadores, EF-1 y EF-2, se pueden utilizar para identificar una amplia variedad de Ascomycetes filamentosos y amplifican una región de ~700 pb en todas las especies de *Fusarium* conocidas. Este gen parece estar como copia única en dichas especies y muestra un alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas, incluso en comparación con otras secuencias de genes ricos en intrones que codifican proteínas, tales como, calmodulina, β -tubulina e histona H3. Por esta razón, la secuencia del gen EF-1 α se ha convertido en el marcador de elección al momento de identificar una especie de *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.* 2010a).

Actualmente, los micólogos debaten sobre cuál es la secuencia más apropiada para definir una especie fúngica. Diversos estudios han demostrado que la secuencia de la región ITS (ITS1, 5.8S rRNA, y ITS2) podría ser útil para identificar a las especies de *Aspergillus* (Hinrikson *et al.*, 2005) y la mayoría de los Mucorales (Schwarz *et al.*, 2006), así como para la identificación de algunas especies dentro de

diferentes complejos de especies de *Fusarium* (Nalim *et al.*, 2012; O'Donnell *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). La región ITS satisface la mayor parte de los requisitos que debe reunir una secuencia de DNA diana, ya que puede ser amplificada en la mayoría de los hongos, está conservada, está presente como múltiples copias en el genoma de hongos, produce una suficiente resolución taxonómica en la mayoría de los hongos, y tiene la ventaja adicional de que las bases de datos de secuencias, tales como, el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), y DNA Data Bank de Japón (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) contienen un gran número de secuencias de este locus, lo que permite una fácil comparación de la secuencia de un aislamiento desconocido.

Existe un amplio consenso en cuanto al uso de la secuenciación de la región ITS como el paso inicial en la identificación de especies fúngicas. La Subcomisión Internacional de Secuencias "Marcadores" de Hongos (International Subcommittee Fungal Barcoding) ha propuesto la región ITS como la principal secuencia "marcador" en hongos o por defecto, la región utilizada para la identificación de especies fúngicas (<http://www.allfungi.com/its-barcode.php>). Sin embargo, la secuencia de la región ITS presenta ciertas desventajas: (i) insuficiente hipervariabilidad para distinguir las distintas especies en las secciones del género *Aspergillus* y en los complejos de especies del género *Fusarium* (incluido el FSSC), (ii) su incapacidad para distinguir entre especies estrechamente relacionadas (especies hermanas) a causa de las escasas diferencias de nucleótidos, y (iii) problemas con la fidelidad de las secuencias ITS depositadas en las bases de datos de referencia (por ejemplo, GenBank / EMBL / DDBJ) (Nilsson *et al.*, 2006).

Diversos estudios moleculares que emplean secuencias de múltiples loci, tales como el factor de elongación 1 (EF-1), β -tubulina (β -TUB), calmodulina (CaM), y la ARN polimerasa II subunidad mayor (RPB2), y posteriores análisis filogenéticos de especies de *Fusarium*, han revelado la presencia de múltiples especies crípticas dentro de cada "morfoespecie". Por ejemplo, *F. solani* representa en realidad un complejo de especies filogenéticamente definido con más de 50 especies distintas de las cuales al menos 20 están asociadas con infecciones humanas (Nalim *et al.*, 2012; O'Donnell *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). Los datos disponibles demuestran claramente que las secuencias de la región ITS del DNA está altamente conservada en algunas de las especies del género *Fusarium* por lo que puede emplearse para la definición de una especie (Nalim *et al.*, 2012; O'Donnell *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). Aunque algunos autores no están de acuerdo con este criterio (Ferrer *et al.*,

2005; Hennequin *et al.*, 1999). Como consecuencia de esto, es recomendable usar la secuencia de más de un gen para definir una especie en el género *Fusarium* (incluida la secuencia del gen EF-1 α , PBR1, PBR2 y la región ITS), aunque no hay un número exacto establecido de secuencias para establecer el límite de especie ni sobre los valores de identidad de corte que se deben aplicar para la identidad de la misma (Balajee *et al.*, 2009).

Debido a los resultados obtenidos por medio de los alineamientos básicos locales fue necesario realizar un análisis de máxima parsimonia para establecer las relaciones evolutivas de las cepas de *F. solani* PPRM con respecto a los diferentes miembros del FSSC.

El alineamiento parcial de la región ITS del DNA ribosomal y las porciones de los genes EF-1 α , PBR2 y β -tubulina consistieron en 581, 748, 1839 y 712 caracteres, respectivamente, los cuales fueron sometidos a análisis de parsimonia por separado. Debido a que se ha informado recientemente que el gen de la β -tubulina contiene alelos parálogos (derivan de un evento de duplicación y son miembros de una familia multigénica) o alelos divergentes duplicados y no es aconsejable su uso en estudios moleculares en el género *Fusarium* (Balajee *et al.*, 2009), no se utilizó dicho gen en el análisis combinado. Por lo tanto, en la evaluación de parsimonia se analizó un total de 3168 pb de secuencias de DNA alineadas por cepa.

El resumen de las secuencias y la estadística del análisis de parsimonia para los datos combinados e individuales se muestran en la Tabla V.7. En general, el gen EF-1 α fue el más informativo (28%), mientras que, la región ITS del DNA ribosomal y el gen de la PBR2 fueron los menos informativos (23% y 22%, respectivamente).

En todos los análisis filogenéticos, las especies pertenecientes al FSSC se agruparon en 3 clados los cuales fueron soportados por altos valores de *bootstrap*. El clado 1 comprendió solo las dos especies aisladas de Nueva Zelanda, mientras que en el clado 2 se agruparon los patógenos de plantas de interés agronómico que causan principalmente podredumbre de raíz en leguminosas, incluyendo varias especies estrechamente relacionadas que inducen la muerte súbita en soja o podredumbre de la raíz en especies de *Phaseolus* (Aoki *et al.*, 2003; 2005) y las especies recientemente descritas por Nalim *et al.* (2012) (Figuras V.21 – V.25). En el clado 3 se agruparon las especies filogenéticamente asociadas con infecciones micóticas en humanos y otros animales, y aquellas asociadas con suelo y diversas plantas. Dentro de dicho clado, se encuentra las 3 de las 20 especies clínicamente más relevantes: *F. lichenicola* (FSSC 16), *Neocosmospora vasinfecta* (FSSC 8) y *F. falciforme* (FSSC

3+4), una única especie filogenética que combina los grupos 3 y 4 identificados por Zhang *et al.* (2006) pero no resuelto como grupo monofilético en el presente estudio ni en otros (O'Donnell *et al.*, 2008). Es de destacar que sólo dos especies dentro de la FSSC han demostrado ser patógenas para los seres humanos y plantas, y estos incluyen FSSC 1 (informalmente conocido como *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raza 2) y FSSC 8 (*Neocosmospora vasinfecta*).

Tabla V.7 Resumen de las secuencias y estadística de árboles generados por máxima parsimonia (datos individuales y combinados).

Locus	pb	CIP ^a	CIP/pb	AUT ^b	Longitud MPT ^c	CI ^d	RI ^e
ITS rDNA	581	132	0,23	41	442	0,476	0,897
EF-1 α	748	209	0,28	98	711	0,478	0,882
RPB2	1839	405	0,22	106	1441	0,374	0,825
β -tubulina	703	48	0,07	23	83	0,844	0,981
ITS rDNA x EF-1 α x RPB2	3166	705	0,22	253	1441	0,374	0,825

^a CIP: caracteres informativos de parsimonia

^b AUT: autopomorfía (e.d. caracteres no informativos de parsimonia)

^c MPT: árbol más parsimonioso

^d CI: índice de consistencia

^e RI: índice de retención

V.7.1 Análisis del gen del factor de elongación 1- α

El alineamiento de las 15 secuencias del gen EF-1 α pertenecientes a las cepas de *F. solani* PPRM (Tabla IV.3) junto con las secuencias del FSSC disponibles en el GenBank (201 secuencias, Tabla VIII.1) contenía 748 caracteres, de los cuales 209 fueron informativos de parsimonia (28%) y 98 fueron variables (12%) por lo que se los excluyó del análisis de parsimonia. Dicho análisis generó 461 árboles de 711 pasos de longitud (CI = 0,478; RI = 0,882) usando los caracteres informativos (Tabla V.7).

Las 15 cepas de *F. solani* PPRM analizadas en el presente estudio fueron incluidas dentro del Clado 3 del FSCC y, de acuerdo al sistema de nomenclatura propuesto por Chang *et al.* (2006), 9 de ellas fueron identificadas como FSSC 5 (MR010, MR114, MR166, MR140, MR386, MR403, MR415, MR514 y MR518) (valor de *bootstrap* 88%) y 6 con las cepas FSSC 3+4, *F. falciforme* (MR013, MR016, MR313, MR319, MR338 y MR436) (valor de *bootstrap* 52%) (Figura V.18).

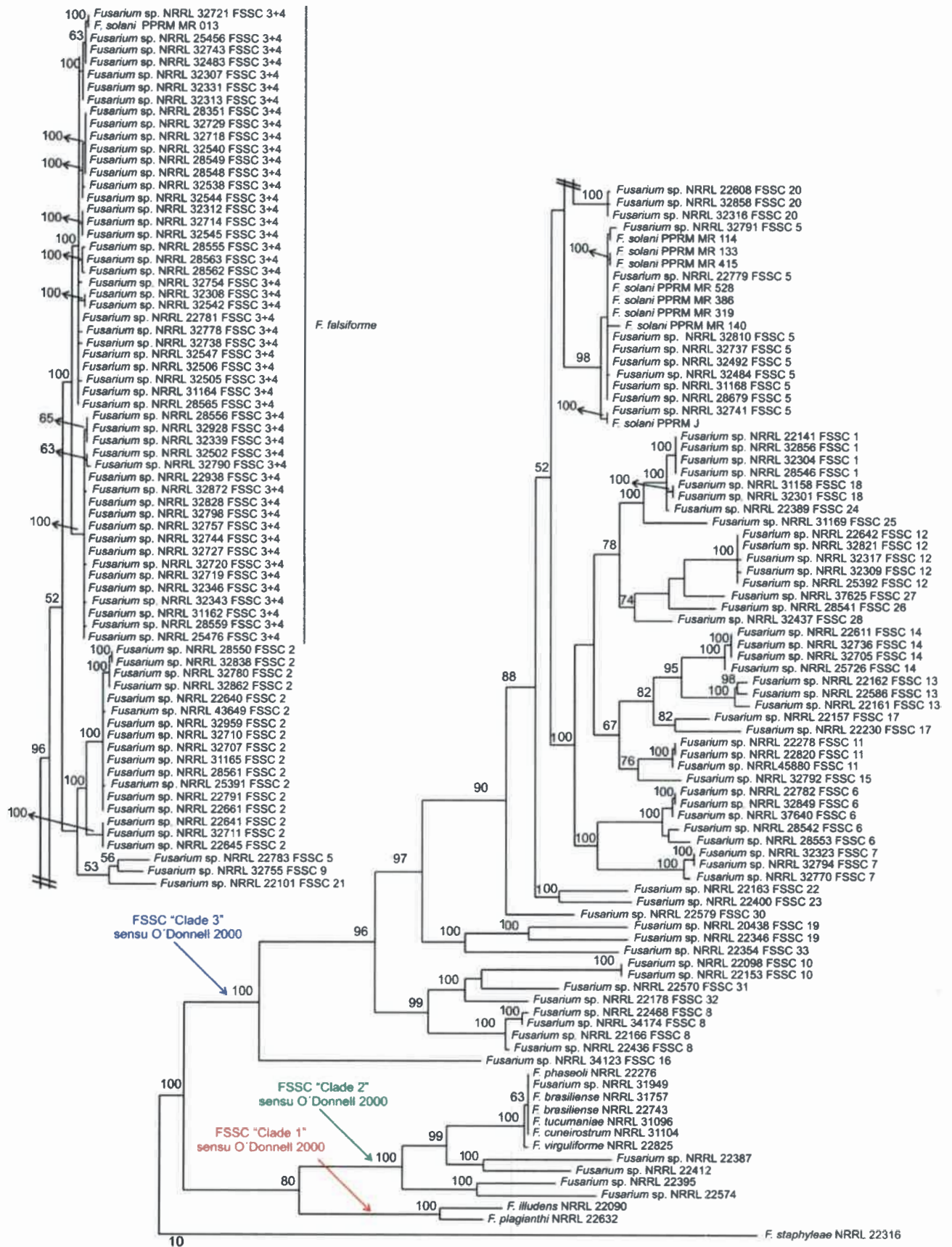
Figura V.18 Uno de los 461 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de las secuencias del gen EF-1 α de las cepas de *F. solani* PPRM y de las 202 secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. staphyleae* (NRRL 22316) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

V.7.3 Análisis del gen de la RNA polimerasa II

El alineamiento de las secuencias del gen de la RNA polimerasa II (PBR2) se realizó usando sólo 9 secuencias pertenecientes a las cepas de *F. solani* PPRM (Tabla IV.3) junto con 152 secuencias del FSSC disponibles en el GenBank (Tabla VIII.1). Cabe aclarar que en este análisis no se incluyeron todas las cepas descritas por Nalim *et al.* (2012) puesto que en dicho trabajo no se realizó la secuenciación de este gen.

Se analizaron un total de 1839 caracteres, de los cuales 405 fueron informativos de parsimonia (22%) y 106 fueron variables (5,7%) por lo que fueron excluidos del análisis. El análisis de parsimonia usando los caracteres informativos construyó 12 árboles de 1441 pasos de longitud (CI = 0,374; RI = 0,825) (Tabla V.7). Ocho cepas de *F. solani* PPRM evaluadas con este gen fueron identificadas como FSSC 5 incluidas la cepa MR319 identificada como FSSC 3+4, *F. falciforme*, usando la secuencia del gen EF-1 α (Figura V.19).

Figura V.19 Uno de los 12 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de la secuencia del gen de la RPB2 de las cepas de *F. solani* PPRM y de las 152 secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. staphyleae* (NRRL 22316) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.



V.7.1 Análisis de la región ITS del DNA ribosomal

Para el análisis de máxima parsimonia de la región ITS del DNA ribosomal se utilizaron las 15 secuencias de *F. solani* PPRM (Tabla IV.3) y las 201 secuencias del FSSC disponibles en el GenBank (Tabla VIII.1) incluyendo cepas de los 3 clados definidos por O'Donnel *et al.* (2008) y las cepas recientemente descritas por Nalim *et al.* (2012). Se analizaron un total de 581 caracteres de los cuales 132 fueron informativos de parsimonia (22,7%) y 41 fueron variables (7%). Excluyendo los caracteres no informativos, el análisis generó 20 árboles parsimoniosos de 442 pasos de longitud (CI= 0,476, RI= 0,897) (Tabla V.7).

Las 15 cepas de *F. solani* PPRM analizadas en el presente estudio fueron incluidas dentro del Clado 3 del FSSC y, de acuerdo al sistema de nomenclatura propuesto por Chang *et al.* (2006), 8 de ellas se agruparon con las cepas FSSC 5 (MR010, MR114, MR116, MR140, MR403, MR415, MR514 y MR518) (valor de *bootstrap* 98%) y 7 con las cepas FSSC 3+4, *F. falciforme* (MR 013, MR016, MR313, MR319, MR338, MR386 y MR436) (valor de *bootstrap* 98%) (Figura V.20).

Figura V.20 Uno de los 20 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal de las cepas de *F. solani* PPRM y de las 202 secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. staphyleae* (NRRL 22316) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

V.7.4 Análisis del gen de la β -tubulina

A pesar que, recientemente se ha informado que el gen de la β -tubulina contiene alelos parálogos o alelos divergentes duplicados y no es aconsejable su uso en estudios moleculares en el género *Fusarium* (Balajee *et al.*, 2009), se procedió a comparar las secuencias de las cepas de *F. solani* PPRM con las pocas publicadas en la base de datos del GenBank, principalmente aquellas determinadas por Bogale *et al.* (2010) quienes analizaron cepas de *F. solani* aisladas de suelos de Etiopía y hoy se sabe que pertenecen a FSSC 3+4 y FSSC 5 (Balmas *et al.*, 2010) (Tabla VIII.2).

El alineamiento de las 15 secuencias del gen de la β -tubulina perteneciente a las cepas de *F. solani* PPRM junto con las secuencias disponibles en GenBank (Tabla IV.3) dieron como resultado 703 caracteres, de los cuales sólo 23 (2,3%) fueron informativos de parsimonia y 48 (6,8%) fueron variables. El análisis de parsimonia usando los caracteres informativos construyó 13 árboles de 83 pasos de longitud (CI = 0,844; RI = 0,981) (Tabla V.7). Las cepas de *F. solani* PPRM se separaron en los linajes 1 (FSSC 3+4, *F. falciforme*) (valor de *bootstrap* 95%) y 4 (FSSC 5) (valor de *bootstrap* 73%) definidos por Bogale *et al.* (2009) (Figura V.21). Tal como ocurrió usando la secuencia del gen EF-1 α , la cepa MR319 fue identificada como FSSC 3+4, *F. falciforme*.



Figura V.21 Uno de los 13 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos de la secuencia del gen de la β -tubulina de las cepas de *F. solani* PPRM y de las secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (CBS 491.97) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.

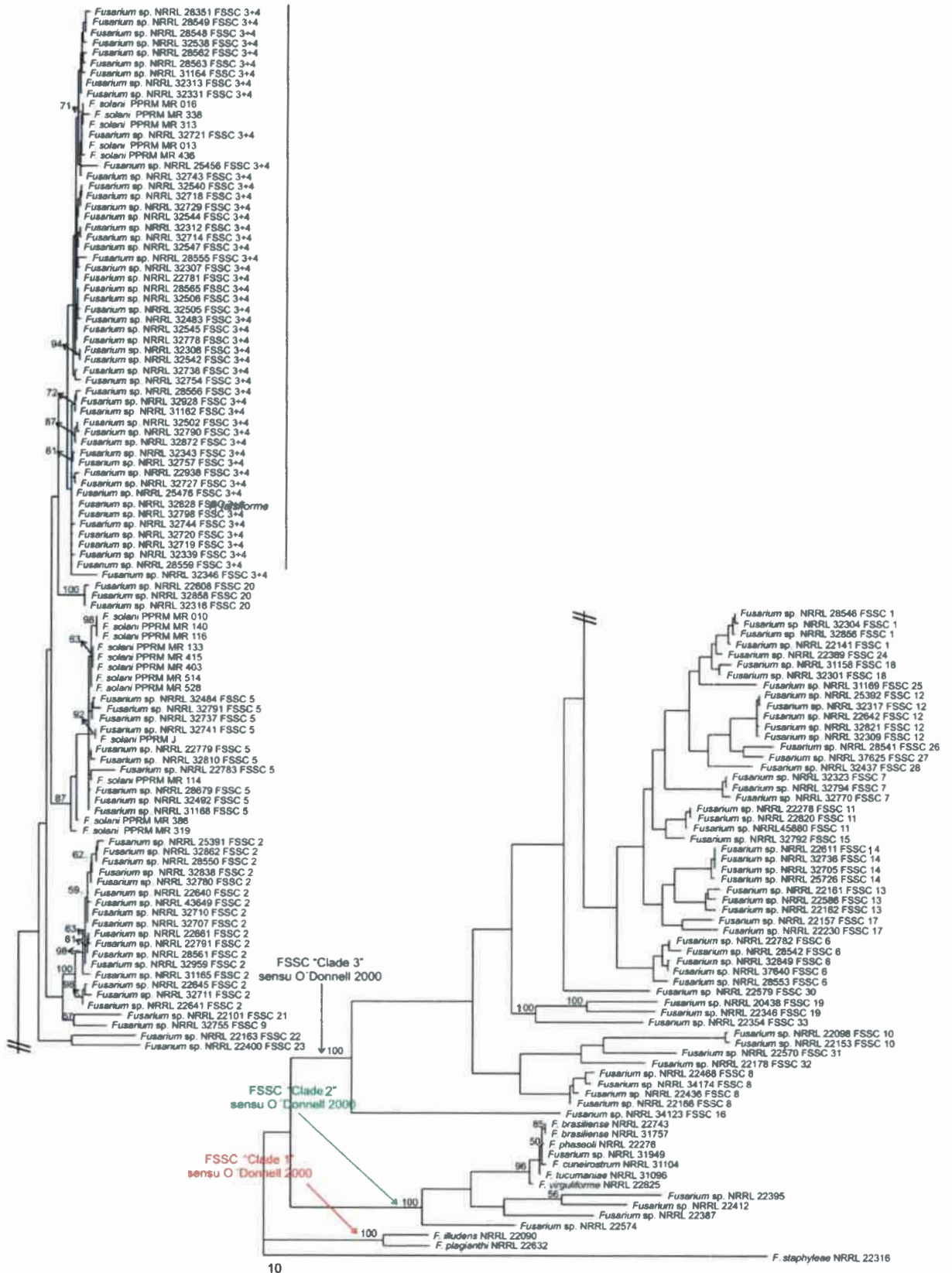
V.7.5 Análisis filogenético combinado

En el análisis de parsimonia de los datos combinados (ITS del DNA ribosomal y de los genes EF-1 α y PBR2) se incluyeron las 16 secuencias de las cepas *F. solani* PPRM (Tabla IV.3), la cepa J que fue aislada originalmente de raíces con síntomas de podredumbre parda en la orientación de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC, cuya patogenicidad ha sido evaluada tanto en invernadero como a campo (Oddino *et al.*, 2005) y utilizada para el estudio de biocontroladores en nuestro laboratorio (Rojo *et al.*, 2007), 149 secuencias disponibles en el GenBank (O'Donnell *et al.*, 2008; Tabla VIII.1).

Se analizaron un total de 3166 caracteres, de los cuales 705 (22,3%) fueron informativos de parsimonia y 253 (8%) no lo fueron por lo que se excluyeron del análisis. El análisis de parsimonia usando los caracteres informativos construyó 25 árboles de 1441 pasos de longitud (CI = 0,374; RI = 0,825) (Tabla V.7). Los resultados obtenidos a partir de dicho análisis demuestran que todas las cepas de *F. solani* PPRM están incluidas dentro del Clado 3 definido por O'Donnell *et al.* (2008). Doce cepas fueron identificadas como FSSC 5 incluidas la MR386 y MR319 (valor de *bootstrap* 87%), las cinco restantes fueron identificadas como FSSC 3+4, *F. falciforme* (valor de *bootstrap* 82%)(Figura V.25).

Es de destacar la ubicación de las cepas fue diferente dependiendo del gen utilizados en el análisis filogenético. De este modo, la cepa MR319 fue identificada como FSSC 5 cuando se utilizó la secuencia del gen de la PBR2, mientras que fue identificada como FSSC 3+4 con la secuencia de la región ITS y del gen EF-1 α . Similarmente, la cepa MR386 fue identificada como FSSC 5 con las secuencias de los genes PBR2 y EF-1 α , mientras que fue identificada como FSSC 3+4 con la secuencia de la región ITS (Figuras V.21 y V.22). En el análisis filogenético de los datos de las secuencias combinadas, ambas cepas fueron identificadas como FSSC 5 (Figura V.22).

Figura V.22 Uno de los 25 árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados (secuencias de los genes EF-1 α , PBR2 y la región ITS del DNA ribosomal) de las cepas de *F. solani* PPRM y de las secuencias disponibles en el GenBank del FSSC. La cepa *F. staphyleae* (NRRL 22316) se usó como grupo externo. Los valores de *bootstrap* mayores al 50% se muestran en la parte superior de las ramas.



Los resultados del presente estudio revelan que, en base a las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal, y los genes EF-1 α y PBR2, las cepas de *F. solani* causantes de la podredumbre parda de la raíz de maní se ubican claramente dentro del Clado 3 del FSSC (O'Donnell *et al.*, 2008). Los miembros del Clado 3 son frecuentemente aislados a partir de suelo y como saprófitos en otros ambientes. La velocidad de crecimiento dichas cepas es más rápida que las del Clado 2, y producen mayor cantidad de microconidios (Aoki *et al.*, 2003), lo cual podría contribuir a su mayor agresividad y facilitar su entrada y dispersión dentro del huésped. Las cepas de *F. solani* PPRM fueron identificadas como dos especies filogenéticas diferentes, llamadas FSSC 5 (12 cepas) y FSSC 3+4, *F. falciforme* (5 cepas) según la nomenclatura propuesta por Chang *et al.* (2006) (Figura V.25).

Dichos resultados son sorprendentes si se tiene en cuenta que la mayoría de las cepas aisladas de suelo pertenecen a la especie filogenética FSSC 3+4, *F. falciforme* (Bogale *et al.*, 2009; Nalim *et al.*, 2012; O'Donnell *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). Estudios realizados en Etiopía revelaron que 18 de las 43 cepas aisladas de suelo pertenecían a la especie filogenética FSSC 3+4, *F. falciforme* (llamado linaje 1 por los autores), mientras que otra 13 cepas fueron identificadas como FSSC 5 e base a la secuencia del gen EF-1 α (llamado linaje 4 por los autores) (Bogale *et al.*, 2009). Recientemente, Nalim *et al.* (2012) evaluaron cepas de suelo aisladas de Sri Lanka y encontraron que forman parte del linaje FSSC 3+4, *F. falciforme*. Por otro lado, las cepas del FSSC aisladas de diferentes suelos de Cerdeña pertenecieron a las especies FSSC 5 y FSSC 9 (Balmas *et al.*, 2010).

Los miembros del FSSC 5 son especies cosmopolitas que comúnmente se las aísla de una amplia variedad de plantas (papa, maíz, café, trigo, etc.) y han sido asociadas con infecciones en humanos, principalmente infecciones profundas invasivas y subcutáneas e infecciones de córnea (O'Donnell *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). Hasta el momento se desconoce si dichas especies están específicamente adaptadas para infectar a los seres humanos en comparación con otros miembros de FSSC o si su mayor asociación con las infecciones humanas se debe a que son especies oportunistas. Tales infecciones probablemente son causadas por haplotipos de *Fusarium* que son comunes en el ambiente interior o exterior del paciente (Chang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

Por otro lado, las especies FSSC 3+4 (*F. falciforme*) están comúnmente asociadas con infecciones en humanos y se ha inferido que tienen una asociación particular con infecciones del ojo, reflejando tal vez que el suelo y los residuos de

plantas serían la causa más común de infecciones oculares por especies de *Fusarium* (Zhang *et al.*, 2006).

Debido a que varias especies de *Fusarium* que son capaces de causar infecciones en humanos son comunes en diferentes ambientes, la presencia de las especies filogenéticas FSSC 5 y FSSC 3+4 (*F. falciforme*) en suelos donde se cultiva maní no debería causar alarma puesto que es común encontrarlas en estos ambientes.

VI. Conclusiones

- El análisis filogenético usando las secuencias de la región ITS del DNA ribosomal, y los genes EF-1 α y PBR2, realizado a un total de 17 cepas de *F. solani* aisladas de raíces de maní con síntomas de podredumbre, confirma que el agente etiológico de dicha enfermedad pertenece a dos especies filogenéticas del FSSC, llamadas FSSC 5 y FSSC 3+4 ubicadas dentro del Clado 3 del FSSC.
- En los ensayos de patogenicidad se encontró variabilidad en la agresividad de las cepas, siendo MR313 (FSSC 3+4, *F. falciforme*) y MR386 (FSSC 5), las que reprodujeron la enfermedad con los síntomas externos e internos característicos. A partir de plantas enfermas se obtuvo un alto porcentaje de re-aislamiento del patógeno, con lo cual se cumple con los postulados de Koch.
- La presencia de apresorios y la formación de agregados hifales que reciben el nombre de cojines de infección en las raíces de las plantas enfermas confirma que el agente causal de la podredumbre parda puede penetrar la raíz de maní.
- Todas las cepas mostraron diferentes niveles de actividad poligalacturonasa, sin embargo la cepa más patogénica fue aquella que mostró un aumento en la actividad desde el tercer al sexto día post-inoculación y fue capaz de producir una isoforma que no se repitió en ninguna de las demás cepas evaluadas. Por lo tanto podemos concluir que la patogenicidad podría estar relacionada con la actividad enzimática sostenida en el tiempo, más que con los niveles de enzima; o con una isoforma particular de PG.
- A partir de las secuencias diana (región ITS del DNA ribosomal, y los genes EF-1 α y β -tubulina) no se pudieron desarrollar cebadores específicos de *F. solani* PPRM debido a que las especies del FSSC están estrechamente relacionadas y difieren en unos pocos nucleótidos.
- Los cebadores específicos diseñados a partir de marcadores moleculares (AFLPs), FS1 y FS2, permitieron la detección de las dos especies filogenéticas, FSSC 5 y FSSC 3+4 (*F. falciforme*) causantes de la podredumbre de la raíz de maní en muestras de suelo artificial y naturalmente contaminado, como así también en raíces enfermas.

- A través del uso de estos cebadores y el desarrollo de un protocolo de extracción de DNA a partir de suelo y raíces de maní, se logró desarrollar una técnica basada en PCR que resulta simple, rápida y eficiente para la detección específica de *F. solani* (FFSC 5 y FSSC 3+4) causante de PPRM en muestras naturalmente y artificialmente contaminadas con dicho patógeno.
- La especificidad y el alto grado de sensibilidad de los ensayos de PCR llevados a cabo para detectar la presencia de *F. solani* causante de podredumbre parda de la raíz de maní, proporcionan una adecuada herramienta para la detección temprana de dicho patógeno en muestras de suelo que serán destinadas al cultivo de esta oleaginosa, permitiendo de esta manera diseñar estrategias para prevenir la enfermedad y asegurar un apropiado manejo de la misma, además de ser de gran utilidad para la investigación básica en epidemiología y genética de poblaciones de hongos.

Odino *et al.* (2004) determinaron que la cantidad de inóculo presente en el suelo puede correlacionarse positivamente con la incidencia de la enfermedad. Es por esto que los cebadores van a ser probados en sistemas de diagnóstico moleculares cuantitativos como PCR en tiempo real para estimar el nivel de riesgo de un lote previo a la siembra.

VII. Bibliografía

- Achenbach L.A., Patrick J., Gray L. (1996) Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. ***Plant Disease* 80**: 1228–1232.
- Ackermann B. (2008) Historia del clúster manisero argentino. Cámara Argentina del Maní. Córdoba, Argentina. Gacetilla.
- Ahmed S., Zaman N., Khan S.N. (2012) Evaluation of manuring practices on root rot disease and agronomic characters of *Arachis hypogaeae* L. ***African Journal of Biotechnology* 11**: 1119-1122.
- Alaña A., Alkorta I., Dominguez J., B, Llama M.J., Serra J., (1990) Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. ***Applied and Environmental Microbiology* 56**: 3755 – 3759.
- Alaña A., Maria J.L., Serra J.L. (1991) Purification and some properties of pectin lyase from *Penicillium italicum*. ***Federation of European Biochemical Society Journal* 280**: 335-340.
- Aoki T., O'Donnell K., Homma Y., Lattanzi A.R. (2003) Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex – *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. ***Mycologia* 95**: 660–684.
- Aoki T., O'Donnell K., Scandiani M.M. (2005) Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. ***Mycoscience* 46**:162–183.
- Armentrout V.N., Downer A.J. (1987) Infection cushion development by *Rhizoctonia solani* on cotton. ***Phytopathology* 77**: 619-623.
- Avisé J.C., Ball R.M. Jr. (1990) Principles of genealogical concordance in species concept and biological taxonomy. En *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* (D. Futuyma y J. Antonovics, Eds.), Vol. 7, pp. 45-67. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Balajee S.A., Borman A.M., Brandt M.E., Cano J., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Guarro J., Haase G., Kibbler C.C., Meyer W., O'Donnell K., Petti C.A., Rodriguez-Tudela J.L., Sutton D., Velegriaki A., Wickes B.L. (2009) Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and Mucorales species in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? ***Journal of Applied Microbiology* 47**: 877-884.
- Balmas V., Migheli Q., Scherm B., Garau P., O'Donnell K., Ceccherelli G., Kang S., Geiser D.M. (2010) Multilocus phylogenetics show high levels of endemic fusaria inhabiting Sardinian soils (Tyrrhenian Islands). ***Mycologia* 102**: 803–812.
- Barros G.G., Chiotta M.L., Reynoso M.M., Torres A.M., Chulze S.N. (2007) Molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina using AFLPs. ***Journal of Applied Microbiology* 103**: 900-909.
- Bateman D.F. (1996) Hydrolytic and transeliminative degradation of pectic substances by extracellular enzyme of *Fusarium solani* f. *phaseoli*. ***Phytopathology* 36**: 230-244

- Bishop J.G. (2005). Directed mutagenesis confirms the functional importance of positively selected sites in polygalacturonase inhibitor protein (PGIP). *Molecular Biology and Evolution* 22: 1531–1534.
- Bluhm B.H., Flaherty J.E., Cousin M.A., Woloshuk C.P. (2002) Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection* 65: 1955-1961.
- Bockus W.W., Shroyer J.P. (1998) The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 36: 485-500.
- Boenisch M., Schäfer W. (2011) *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology* 11: 110-122
- Bogale M., Steenkamp E.T., Wingfield M.J., Wingfield B.D. (2009) Diverse *Fusarium solani* isolates colonise agricultural environments in Ethiopia. *European Journal of Plant Pathology* 124: 369-378.
- Boogerd F., van Rossum D. (1997) Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *Microbiology Review* 21: 5-12.
- Boote K.J., Stansell J.R., Schubert A.M., Stone J.F. (1982) Irrigation, water use and water relations. In: Peanut science and technology. Pattee H.E. and Young C.T. (eds.). American Peanut Research and Education Society, Yoakum, Texas, pp. 164-205.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Burgess L.W., Liddell C.M., Summerell B.A. (1988) Laboratory manual for *Fusarium* research, 2nd edn. Fusarium Research Laboratory, University of Sidney, Sidney
- Busso G., Civitaresi M., Geymonat A., Roig R. (2004) Análisis de la situación productiva de la cadena agroalimentaria del maní en las últimas décadas. In: Situación Socioeconómica de la Producción de Maní y Derivados en la Región Centro-Sur de Córdoba. Diagnósticos y Propuestas de Políticas para el Fortalecimiento de la Cadena. UNRC-Fundación Maní Argentino (Eds.). Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. pp. 21-40.
- Cámara Argentina de Maní (2007). Sitio de internet <http://www.camaradelmani.com.ar>
- Cámara Argentina de Maní (2012). Sitio de internet <http://www.camaradelmani.com.ar>
- Caprari C., Bergmann C., Migheli Q., Salvi G., Albersheim P., Darvill A., Cervone F., De Lorenzo G. (1993) *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 453-462.
- Carpita N., McCann M. (2000) The cell wall. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants, B.B. Buchanan, G. Wilhelm, and R.L. Jones, eds (Rockville, IL: American Society of Plant Physiologists), pp. 52–108.
- Carpita N.C., Gibeaut D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1–30.

- Cervone F., Hahn M.G., De Lorenzo G., Darvill A., Albersheim P. (1989) Host-Pathogen Interactions: XXXIII. A Plant Protein Converts a Fungal Pathogenesis Factor into an Elicitor of Plant Defense Responses. *Plant Physiology* **90**: 542-548.
- Chang D.C., Grant G.B., O'Donnell K., Wannemuehler K.A., NobleWang J., Rao C.Y., Jacobson L.M., Crowell C.S., Sneed R.S., Lewis F.M.T., Schaffzin J.K., Kainer M.A., Genese C.A., Alfonso E.C., Jones D.B., Srinivasan A., Fridkin S.K., Park B.J. (2006) A multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA* **296**: 953-963.
- Chen W., Gray L.E., Kurle J.E., Grau C.R. (1999) Specific detection of *Phialophora gregata* and *Plectosporium tabacinum* in infected soybean plants using polymerase chain reaction. *Molecular Ecology* **8**: 871-877.
- Cho J.H., Rupe J.C., Cumming M.S., Gbur E.E. Jr. (2001) Isolation and identification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from soil on modified Nash and Snyder's medium. *Plant Disease* **85**: 256-260
- Chulze S.N., Ramirez M.L., Torres A.M., Leslie J.F. (2000) Genetic variation in *Fusarium* Section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5312-5315.
- Cipriani M., Stea G., Moretti A., Altamore C., Mulé G., Vurro, M. (2009) Development of a PCR-based assay for the detection of *Fusarium oxysporum* strain FT2, a potential mycoherbicide for Orobanche ramosa. *Biological Control* **50**: 78-84
- Collmer A., Keen N.T. (1986) The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **24**: 383-409.
- Cooper R.M. (1983) The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In: Callow JA, ed. *Biochemical Plant Pathology*. New York: John Wiley & Sons Inc., pp. 101-119.
- Cowling E.B. (1978) Agricultural and forest practices that favor epidemics. In: *Plant Disease, an advanced treatise*, vol. II: How disease develops in populations (J.G. Horsfall, and E.B. Cowling, eds.). Academic Press, N.Y. pp. 361-381.
- Crawford M.S., Kolattukudy P.E. (1987) Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **258**: 196-205.
- Cunningham C.W. (1997) Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Molecular Biology and Evolution* **14**:733-740
- D'Ovidio R., Raiola A., Capodicasa, C.; Devoto A., Pontiggia D., Roberti S., Galletti R., Conti E., O' Sullivan D., De Lorenzo G. (2004) Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonasa-inhibiting proteins reveals sub-functionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiology* **135**: 2424-2435.

- Davis K.R., Lyon G.D., Darvill A.G., Albersheim P. (1984) Host pathogen interactions: XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiology* **74**: 52-60.
- De Lorenzo G., Castoria R., Bellicampi D., Cervone F. (1997) Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: *The Mycota. Plant Relationships, Part B*, pp. 61-83. Edited by Carroll, G. C. and Tudzinsky, P. Berlin: Springer-Verlag.
- Di Pietro A., Roncero M.I.G. (1996) Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Purification, characterization, and production during infection of tomato plants. *Phytopathology* **86**: 1324-1330.
- Donaldson G.C., Ball L.A., Axelrod P.E., Glass N.L. (1995) Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes are useful in differentiating *Fusarium* species associated with conifers. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1331-1340.
- El-Samra I.A., El-Faham Y.M., Kamara A.M. (1981) Selective induction of infection cushions by *Rhizoctonia solani* in relation to host responses. *Phytopathology Z* **102**: 122-126.
- Elsayed Abdalla M., Abdel-Fattah G.M. (2000) Influence of the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the development of peanut pod rot disease in Egypt. *Mycorrhiza* **10**: 29-35.
- Emmett R.W., Parbery D.G. (1975) Appressoria. *Annual Review of Phytopathology* **13**: 147-165.
- Esquerre-Tugaye M., Boudart G., Dumas B. (2000) Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 157-163.
- Ferrer C., Alio J., Rodriguez A., Andreu M., Colom F. (2005) Endophthalmitis caused by *Fusarium proliferatum*. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 5372-5375.
- Fuhlbohmer M.F., Tatnell J.R., Ryley M.J. (2007) *Neocosmospora vasinfecta* is pathogenic on peanut in Queensland. *Australasian Plant Disease Notes* **2**: 3-4.
- García-Maceira F.I., Di Pietro A., Huertas-Gonzalez M.D., Ruiz-Roldan M.C., Roncero M.I. (2001) Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2191-2196.
- García-Maceira F.I., Di Pietro A., Roncero M.I. (2000) Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in plant expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 359-365.
- García-Pedrajas M.D., Bainbridge B.W., Heale J.B., Pérez-Artés E., Jiménez-Díaz R.M. (1999) A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in artificial and natural soils. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 251-259.

- Geiser D.M., Jimenez-Gasco M.D., Kang S.C., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A., O'Donnell K. (2004) FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. ***European Journal of Plant Pathology* 110**: 473–479.
- González-Salgado A., González-Jaéna T., Vázquez C., Patiño B. (2008) Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. ***Food Additives and Contaminants* 25**: 758-764.
- Gray L.E., Achenbach L.A. (1996) Severity of foliar symptoms and root and crown rot of soybean inoculated with various isolates and inoculum rates of *Fusarium solani*. ***Plant Disease* 80**: 1197–1199.
- Guevara M.A., Estévez P., González-Jaén M.T. (1997). Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. ***Canadian Journal of Microbiology* 43**: 245-253.
- Hall L., Wohlfiel S., Roberts G.D. (2004) Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. ***Journal of Clinical Microbiology* 42**: 622–626.
- Hancock, J.G. (1968) Degradation of pectic substances during pathogenesis by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*. ***Phytopathologia* 58**: 62-69.
- Hennequin C., Abachin E., Symoens F., Lavarde V., Reboux G., Nolard N., Berche P. (1999) Identification of *Fusarium* species involved in human infections by 28S rRNA gene sequencing. ***Journal of Clinical Microbiology* 37**: 3586–3589.
- Hinrikson H.P., Hurst S.F., Lott T.J., Warnock D.W., Morrison C.J. (2005) Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. ***Journal of Clinical Microbiology* 43**: 2092–2103.
- Hofman T.W., Jongebloed P.H.J. (1988) Infection process of *Rhizoctonia solani* on *Solanum tuberosum* and effects of granular nematicides. ***European Journal of Plant Pathology* 94**: 243-252.
- Horbach R., Navarro-Quesada A.R., Knogge W., Deising H.B. (2011) When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. ***Journal of Plant Physiology* 168**: 51-62.
- Huang H.C., Kokko E.G., Erickson R.S. (1999) Infection of alfalfa pollen by *Botrytis cinerea*. ***Botanical Bulletin of Academia Sinica* 40**:101-106.
- Huang L., Buchenauer H., Han Q., Zhang X., Kang Z. (2008) Ultrastructural and cytochemical studies on the infection process of *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. ***Journal of Plant Diseases and Protection* 115**: 9-16.
- Huang H. Y., Hartman G. L. (1996) A semi selective medium for detecting *Fusarium solani*, the causal organism of soybean sudden death syndrome. ***Phytopathology*. 86**: S12
- Idnurm A., Howlett B.J. (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. ***Molecular Plant Pathology* 2**: 241–255.

- ILACO (1985). Agricultural compendium for rural development in the tropics and subtropics. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands pp. 737.
- INTA (1998) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Manual del Maní. Tercera Edición.
- INTA (2008) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Maní Guía Práctica para su Cultivo. Boletín de Divulgación Técnica 2.
- INTA (2010, 2011). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Sitio de internet: www.inta.gov.ar.
- Johansson A., Turner H.C., McKay G.J. Brown A.E. (1998) A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheathblight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. **FEMS Microbiology Letters** **162**: 289–294.
- Jurado M., Covadonga V., Sonia M., Vicente S., Gonzalez-Jaen M.T. (2006) PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. **Systematic and Applied Microbiology** **29**: 681-689.
- Kikot G.E., Hours R.A., Alconada T.M. (2009) Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. **Journal of Basic Microbiology** **49**: 231–241.
- Konstantinova P., Bonants P.J.M., van Gent-Pelzer M.P.E., van der Zouwen P., van den Bulk R. (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research** **106**:23–33.
- Krapovickas A., Gregory W.C. (1994) Taxonomía del género *Arachis* (*Leguminosae*). **Bomplandia** **8**: 1-186.
- Kreader C.A. (1996) Relief of amplification inhibition of PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. **Applied and Environmental Microbiology** **62**: 1102-1106
- Lang C., Dörmenburg H. (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology** **53**: 366-375.
- Leslie J. F., Summerell B. A., (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell
- Li S., Hartman G.L. (2003) Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots and soil. **Plant Pathology** **52**: 74–83.
- Liu J.Y., Whelen S., Hall B.J. (1999) Phylogenetic relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. **Molecular Biology and Evolution** **16**: 1799-1808.
- Lu H., Higgins V.J. (1993) Partial characterization of a non-proteinaceous suppressor of non-specific elicitors from *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). **Physiological and Molecular Plant Pathology** **42**: 427-439.
- Ma Z., Michailides T.J. (2007) Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. **Crop Protection** **26**: 145-161.
- MAGyP (2010) Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Sitio de internet: www.minagri.gob.ar

- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B.G., Vos, P. and Oliver, R.P. (1996) The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. ***Mycological Research* 100**: 1107–1111.
- March G., Marinelli A. (1998) Manual del maní (Tercera Edición), EEA Manfredi, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, p.24.
- March G., Marinelli A. (2005) Enfermedades del Maní en Argentina (Primera Edición), Fundación Maní Argentino, INTA p 59.
- March G., Oddino C., Marinelli A. (2004) Podredumbre parda de la raíz. En: Enfermedades del maní en Argentina. March, G y Marinelli, D. (Eds.) Fundación Maní Argentino. Pp.67-71.
- Marinelli A., March G.J., Rago A., Giuggia J. (1996) Enfermedades causadas por hongos patógenos presentes en el suelo. Campañas agrícolas 1994/95 y 1995/96. In: Resúmenes XII Jornada Nacional del Maní. Gral. Cabrera, Córdoba. pp. 4-5.
- Marinelli, A., March, G.J, Rago, A., Giuggia, J. (1997). Enfermedades causadas por hongos patógenos presentes en el suelo. Campañas agrícolas 1996/97. In: Resúmenes XII Jornada Nacional del Maní. Gral. Cabrera, Córdoba. pp. 10-11.
- Marques M.R., Buckeridge M.S., Braga M.R., Dietrich S.M.C. (2006). Characterization of an extracellular endopolygalacturonase from the saprobe *Mucor ramosissimus* Samutsevitsch and its action as trigger of defensive response in tropical plants. ***Mycopathologia* 162**: 337–346.
- Marshall D.S., Rush M.C. (1980) Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. ***Phytopathology* 70**: 947-950.
- Martinez M. J., Alconada T. M., Guillen F., Vazquez C., Reyes F. (1991). Pectic activities from *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* during colonisation of maize. ***International Journal of Food Microbiology* 42**. 185-194.
- Matuo T., Snyder W.C. (1973) Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. ***Phytopathology* 63**: 562-565.
- Mishra P.K., Roland T.V., Fox A.C. (2003) Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. ***FEMS Microbiology Letters* 218**: 329-332
- Mule 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 Microbiology Letters* 230**: 235-240
- Nalim F.A., Samuels G.J., Wijesundera R.L., Geiser D.M. (2012) New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. ***Mycologia* 103**: 1302-1330.
- Nelson N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. ***The Journal of Biological Chemistry* 153**: 378-380.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA.

- Nilsson R.H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Larsson K. H., Koljalg U. (2006) Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One* 1:e59.
- Nirenberg H.I. (1990) Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Studies in Mycology* 32: 91–101.
- Niture S.K. (2008) Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia* 63: 1-19.
- Nixon K.C., Wheeler Q.D. (1990) An amplification of the phylogenetics species concept. *Cladistics* 6: 211-233.
- O'Donnell K. (1996) Progress towards a phylogenetics classification of *Fusarium*. *Sydowia* 48: 50-57. Review
- O'Donnell K. (2000) Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919–938.
- O'Donnell K., Cigelnik E. (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103-116.
- O'Donnell K., Cigelnik E., Nirenberg H. (1998) Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465–493.
- O'Donnell K., Gueidan C., Sink S., Johnston P.R., Crous P.W., Glenn A., Riley R., Zitomer N.C., Colyer P., Waalwijk C., Lee T., Moretti A., Kang S., Kim H.S., Geiser D.M., Juba J.H., Baayen R.P., Cromey M.G., Bithell S., Sutton D.A., Skovgaard K., Ploetz R., Corby Kistler H., Elliott M., Davis M., Sarver B.A. (2009b) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 46: 936–948.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Cigelnik E., Ploetz R.C. (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 95: 2044–2049.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K., Casper H.H. (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 97: 7905–7910.
- O'Donnell K., Sarver B.A.J., Brandt M., Chang D.C., Noble-Wang J., Park B.J., Sutton D. A., Benjamin L., Lindsley M., Padhye A., Geiser D.M., Ward T. (2007) Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2235–2248.
- O'Donnell K., Sink S., Scandiani M.M., Luque A., Colletto A., Biasoli M., Lenzi M.L., Salas G., González V., Ploper L.D., Formento N., Pioli R.N., Aoki T., Yang X.B., Sarver B.A.J.

- (2010b) Soybean sudden death syndrome species diversity within North and South America revealed by multilocus genotyping. *Phytopathology* **100**: 58–71.
- O'Donnell K., Sutton D.A., Fothergill A., McCarthy D., Rinaldi M.G., Brandt M.E., Zhang N., Geiser D.M. (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology* **46**: 2477–2490.
- O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Gueidan C., Crous P.W., Geiser D.M. (2009a) Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 3851–3861.
- O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Magnon K.C., Cox P.A., Revankar S.G., Sanche S., Geiser D.M., Juba J.H., van Burik J.-A.H., Padhye A., Anaissie E.J., Francesconi A., Walsh T.J., Robinson J.S. (2004) Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5109–5120.
- O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D.M., Kistler H.C., Aoki T. (2004) Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 600–623.
- O'Donnell K., Sutton D., Rinaldi M.G., Sarver B.A.J., Balajee S.A., Schroers H.J., Summerbell R.C., Robert V.A.R.G., Crous P.W., Zhang N., Aoki T., Jung K., Park J., Lee Y.-H., Kang S., Park B., Geiser D.M. (2010A) Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying Fusaria from Human and Animal Infections. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 3708–3718.
- Oddino C. (2007) Biología y epidemiología de la podredumbre parda de la raíz del maní. Tesis Maestría en Producción Agrícola, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Oddino C., Marinelli A., Zuza M., March G., Kearney M. (2005) Patogenicidad de *F. solani* aislado de maní sobre maní, soja y poroto. In: Resúmenes, XX Jornada Nacional del Maní, Gral. Cabrera, Córdoba. Pp. 37-38.
- Oddino C., Marinelli A., Zuza M., March G.J. (2008) Influence of crop rotation and tillage on incidence of brown root rot of peanut caused by *Fusarium solani* in Argentina. *Canadian Journal of Plant Pathology* **30**: 575-580.
- Oddino C., Zuza M., March G., Marinelli A. (2004) Potencial inóculo de *F. solani* e incidencia de la "podredumbre parda de la raíz del maní". In: Resúmenes XIX Jornada Nacional del Maní. Gral. Cabrera, Córdoba. Pp. 29-30.
- Pannecouque J., Hofte M. (2009) Interactions between cauliflower and *Rhizoctonia* anastomosis groups with different levels of aggressiveness. *BMC Plant Biology* **9**: 95.

- Patiño B., González-Salgado A., González-Jaén M.T., Vázquez C. (2005) PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology* **104**: 207–214.
- Pedelini R., Casini C. (1998) Manual de Maní. 3ra. Ed. EEA Manfredi, INTA. p. 79.
- Pelegrielli-Fungaro M.H., Vissotto P.C., Sartori D., Vilas-Boas L.A., Furlaneto M.C., Taniwaki M.H. (2004) A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. *Current Microbiology* **49**: 123–127.
- Perrone G., Susca A., Stea G., Mule G. (2004) PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 641–649.
- Pilnik W., Voragen A.G. (1991) The significance of endogenous and exogenous pectic enzyme in fruit and vegetable processing. In: Fox P.F. (ed.) Food Enzymology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 330–336.
- Polizeli M.L., Jorge J.A., Terenzi H.F. (1991) Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal of General Microbiology* **137**: 1815–1823.
- Poussier S., Cheron J.J., Couteau A., Luisetti J., (2002) Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of Microbiological Methods* **51**: 349–359.
- Priest M.J., Letham D.B. (1996) Vascular wilt of *Phoenix canariensis* in New South Wales caused by *Fusarium oxysporum*. *Australasian Plant Pathology* **25**: 110–113.
- Raiola A., Sella L., Castiglioni C., Balmas V., Favaron F. (2008) A single amino acid substitution in highly similar endo-PGs from *Fusarium verticillioides* and related *Fusarium* species affects PGIP inhibition. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 776–789.
- Ranveer S.J., Shivalika S., Reena G. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* **40**: 2931–2944.
- Reignault P., Valette-Collet O., Boccara M. (2008) The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology* **120**: 1–11.
- Reynoso M.M., Palazzini J.M., Torres A.M., Chulze S. (2006) Genetic diversity of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot in Argentina. European Fusarium Seminar (EFS9), Wageningen, Holanda.
- Reynoso M.M., Chulze S.N., Zeller K.A., Torres A.M., Leslie J.F. (2009) Genetic structure of *Fusarium verticillioides* (*Gibberella moniliformis*) populations isolated from maize in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* **123**: 207–215.
- Rojo F., Reynoso M.M., Ferez M., Chulze S., Torres A. (2007) Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection* **26**: 549–555.

- Rombouts F.M., Pilnik W.L. (1980) Pectic enzymes. In: Economic microbiology: microbial enzymes and bioconversions, A. H. Rose, (Ed.), Vol.5, pp. 227-282. Academic Press, ISBN: 0125965559, London, England
- Roncero M.I., Hera C., Ruiz-Rubio M., García Maceira, F.I., Madrid M.P., Caracuel Z., Calero F., Delgado-Jarana J., Roldán-Rodríguez R., Martínez-Rocha A.L., Velasco C., Roa J., Martín-Urdiroz M., Córdoba D.C., Di Pietro A. (2003) *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. ***Physiological and Molecular Plant Pathology* 62** pp 87–98.
- Rossmann A.Y. (1999) Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes)., Amy Y, Rossmann GS, Clark T, Rogerson, Rosalind, Lowen, eds., Baarn/Delft, the Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 238 p.
- Roy K.W. (1997) *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. ***Plant Disease* 81**: 259–266.
- Rupe J.C., Correll J.C., Guerber J.C., Becton C.M., Gbur E.E., Cummings M.S., Yount P.A. (2001) Differentiation of the sudden death syndrome pathogen of soybean, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, from other isolates of *F. solani* based on cultural morphology, pathogenicity, and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. ***Canadian Journal of Botany* 79**: 829–835.
- SAGPyA (2007). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Estimaciones Agrícolas Mensuales. Cifras Oficiales al 16/05/07. Campaña Agrícola 2006/07. Disponible: www.sagpya.mecon.gov.ar.
- Salazar O., Julian M.C.A., Rubio V. (2000) Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. ***Mycological Research* 104**: 281–285.
- Saleh O.I. (1997) Wilt, root rot and seed diseases of groundnut in El-Minia Governorate, Egypt. ***Egyptian Journal of Phytopathology* 25**: 1-18.
- Schilling A.G., Möller E.M., Geiger H.H. (1996) Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. ***Phytopathology* 86**: 515–523.
- Schmidt H, Ehrmann M, Vogel RF, Taniwaki MH, Niessen L (2003). Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. ***Systematic of Applied Microbiology* 26**: 138–146.
- Schmidt H., Taniwaki M.H., Vogel R.F., Niessen L. (2004) Utilization of AFLP marker for PCR-based method of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. ***Journal of Applied Microbiology* 97**: 899 – 909.
- Schroers H.-J., O'Donnell K., Lamprecht S.C., Kammeyer P.L., Johnson S., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Geiser D.M., Summerbell R.C. (2009) Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. ***Mycologia* 101**: 44–70.

- Schwarz P., Bretagne S., Gantier J.C., Garcia-Hermoso D., Lortholary O., Dromer F., Dannaoui E. (2006) Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 340–349.
- Semangun H. (1993). Food Crop Diseases in Indonesia (in Indonesian). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Showalter A.M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**: 9- 23.
- Snyder W.C., Hansen H.N. (1941) The species concept in *Fusarium* with reference to section *Mortiella*. *American Journal of Botany* **28**: 738-742.
- Somogyi M. (1952). Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry* **195**:19-23.
- Stratilova E., Mislovicova D., Kacurakova M., Machova E., Kolarova N., Markovic O. Jorvall H. (1998) The glycoprotein character of multiple forms of *Aspergillus* polygalacturonase. *Journal of Protein Chemistry* **17**: 173-179.
- Susca A., Stea G., Mulè G., Perrone G. (2007) Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Additives and Contaminants* **24**: 1154–1160.
- Swofford D.L. (1999) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods), version 4.0*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Taylor J., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., Fisher M.C. (2000) Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 21–32.
- Taylor J.W., Geiser D.M., Burt A., Koufopanou V. (1999) The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 126–146.
- Ten Have A., Tenberge K., Benen J.A.E., Tudzynski P., Visser J., van Kan J.A.L. (2002) The Contribution of Cell Wall Degrading Enzymes to Pathogenesis of Fungal Plant Pathogens. Chapter 17. *The Mycota XI. Agricultural application*. Ed. Kempken.
- Tenberge K.B. (2004) Infection sites and infection structures. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edited by: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 74-84.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.
- USDA (2010) United States Department of Agriculture. Sitio de internet: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>.
- Vargas Gil S., Pedelini R., Oddino C., Zuza M., Marinelli A., March G.J. (2008) The role of potential biocontrol agents in the management of peanut root rot in Argentina. *Journal of Plant Pathology* **90**: 35-41.

- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. ***Nucleic Acids Research* 23**: 4407-4414.
- Waksman G (1991). Purification and characterization of two endo-1-4- β -D-glucanases from *Sclerotinia sclerotium*. ***Biochemical et Biophysica Acta* 1073**: 49-55.
- Walton, J., D. (1994). Deconstructing the cell wall. ***Plant Physiology* 104**: 1113-1118.
- Weihold A.R., Sinclair J.B., (1996) *Rizoctonia solani*: Penetration, Colonization and Host Response. In *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Edited by: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 163-175.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J (Ed) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, pp. 315-322.
- Widodo and Tati Budiarti (2009) Suppression of *Fusarium* root rot and southern blight on peanut by soil solarization. ***J. ISSAAS* 15**: 118-125.
- Wilson I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. ***Applied and Environmental Microbiology* 63**: 3741-3751.
- Windels C. (1992) *Fusarium*. In: Singleton LL, Mihail JD, Rusel CM (eds) Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press, St. Paul, MN, pp 115-128.
- Zaman N., Ahmed, S. (2012) Survey of root rot of groundnut in rainfed areas of Punjab, Pakistan. ***African Journal of Biotechnology* 11**: 4791-4794.
- Zeller K.A., Bowden R.L., Leslie J.F. (2003) Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quadrats in Kansas and North Dakota. ***Phytopathology* 93**: 874-880.
- Zeller K.A., Bowden R.L., Leslie J.F. (2004) Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from United States. ***Molecular Ecology* 13**: 563-571.
- Zeller K.A., Jurgenson J.A., El-Assiuty E.M., Leslie J.F. (2000) Isozyme and amplified fragment length polymorphism (AFLPs) from *Cephalosporium maydis* in Egypt. ***Phytoparasitica* 28**: 121-130.
- Zhang J., Bruton B.D., Biles C.L. (1999) *Fusarium solani* endo-polygalacturonase from decayed muskmelon fruit: purification and characterization. ***Physiological and Molecular Plant Pathology* 54**: 171-186.
- Zhang N., O'Donnell K, Sutton D.A., Nalim F.A., Summerbell R.C., Padhye A.A., Geiser D.M. (2006) Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. ***Journal of Clinical Microbiology* 44**: 2186-2190.
- Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. ***Applied and Environmental Microbiology* 62**: 316-322.

Zuza, M. (2003). Rol de la semilla de maní como fuente de inóculo primario en la "podredumbre parda de la raíz". Trabajo Final de Grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba. Argentina.

VIII. Anexos

Tabla VII.1 Cepas del complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC) incluidas en el análisis filogenético molecular (secuencias de los genes PBR2, EF-1 α y región ITS del DNA ribosomal)

Cultivo ^a	FSSC ^b	<i>Fusarium</i>	Número en GenBank			Huésped/Sustrato	Origen
			PBR2 ^b	EF-1 α ^b	ITS ^b		
NRRL 22141	FSSC 1b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329491	AF178329	DQ094307	Cucúrbita	California EE.UU
NRRL 28546	FSSC 1a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329544	DQ246887	DQ094361	Humanos (ojos)	Massachusetts EE.UU
NRRL 32304	FSSC 1d	<i>Fusarium</i> sp.	EU329568	DQ246932	DQ094402	Humanos	Colorado EE.UU
NRRL 32856	FSSC 1e	<i>Fusarium</i> sp.	EU329629	DQ247161	EU329683	Yeso de techo	Ohio EE.UU
NRRL 22640	FSSC 2i	<i>Fusarium</i> sp.	EU329520	DQ246842	DQ094327	Humanos (ojos)	Argentina
NRRL 22641	FSSC 2c	<i>Fusarium</i> sp.	EU329521	DQ246843	DQ094328	Humanos (ojos)	Nigeria
NRRL 22645	FSSC 2m	<i>Fusarium</i> sp.	EU329523	DQ246845	DQ094330	Camarón	Hawaii
NRRL 22661	FSSC 2d	<i>Fusarium</i> sp.	EU329524	DQ246846	DQ094331	Humanos (ojos)	Japón
NRRL 22791	FSSC 2h	<i>Fusarium</i> sp.	EU329530	DQ246853	DQ094337	Iguana	Inglaterra
NRRL 25391	FSSC 2p	<i>Fusarium</i> sp.	EU329536	DQ246860	DQ094343	Camarón	California EE.UU
NRRL 28550	FSSC 2q	<i>Fusarium</i> sp.	EU329547	DQ246891	DQ094365	Humanos	Wisconsin EE.UU
NRRL 28561	FSSC 2f	<i>Fusarium</i> sp.	EU329552	DQ246902	DQ094375	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 31165	FSSC 2k	<i>Fusarium</i> sp.	EU329562	DQ246921	DQ094394	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32707	FSSC 2s	<i>Fusarium</i> sp.	EU329595	DQ247027	DQ094490	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32710	FSSC 2t	<i>Fusarium</i> sp.	EU329596	DQ247030	DQ094492	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32711	FSSC 2n	<i>Fusarium</i> sp.	EU329597	DQ247031	DQ094493	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32780	FSSC 2u	<i>Fusarium</i> sp.	EU329617	DQ247090	DQ094551	Tortuga de mar	Texas EE.UU
NRRL 32838	FSSC 2v	<i>Fusarium</i> sp.	EU329627	DQ247144	EU329681	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32862	FSSC 2r	<i>Fusarium</i> sp.	EU329631	DQ247167	DQ094621	Humanos	Texas EE.UU

Tabla VII.1 Continuación

NRRL 32959	FSSC 2l	<i>Fusarium sp.</i>	EU329634	DQ247178	DQ094632	Humanos	Florida EE.UU
NRRL 43649	FSSC 2j	<i>Fusarium sp.</i>	EU329639	EF452980	EU329687	Humanos (ojos)	Nevada EE.UU
NRRL 22781	FSSC 3+4 f	<i>F. falciforme</i>	EU329527	DQ246849	DQ094334	Humanos (ojos)	Venezuela
NRRL 22938	FSSC 3+4g	<i>F. falciforme</i>	EU329534	DQ246855	DQ094338	Humanos (ojos)	Indonesia
NRRL 25456	FSSC 3+4h	<i>F. falciforme</i>	EU329538	DQ246862	DQ094344	Humanos (ojos)	EE.UU
NRRL 25746	FSSC 3+4 i	<i>F. falciforme</i>	EU329540	DQ246864	DQ094346	Humanos	Florida EE.UU
NRRL 28351	FSSC 3+4 j	<i>F. falciforme</i>	EU329541	DQ246881	DQ094358	Humanos	México
NRRL 28548	FSSC 3+4 k	<i>F. falciforme</i>	EU329545	DQ246889	DQ094363	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 28549	FSSC 3+4 l	<i>F. falciforme</i>	EU329546	DQ246890	DQ094364	Humanos (ojos)	Arizona EE.UU
NRRL 28555	FSSC 3+4m	<i>F. falciforme</i>	EU329549	DQ246896	DQ094369	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 28556	FSSC 3+4 n	<i>F. falciforme</i>	EU329550	DQ246897	DQ094370	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 28559	FSSC 3+4 o	<i>F. falciforme</i>	EU329551	DQ246900	DQ094373	Humanos (ojos)	Luisiana EE.UU
NRRL 28562	FSSC 3+4 m	<i>F. falciforme</i>	EU329553	DQ246903	DQ094376	Humanos	California EE.UU
NRRL 28563	FSSC 3+4 q	<i>F. falciforme</i>	EU329554	DQ246904	DQ094377	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 28565	FSSC 3+4 r	<i>F. falciforme</i>	EU329555	DQ246906	DQ094379	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 31162	FSSC 3+4 s	<i>F. falciforme</i>	EU329560	DQ246919	DQ094392	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 31164	FSSC 3+4 t	<i>F. falciforme</i>	EU329561	DQ246920	DQ094393	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32307	FSSC 3+4 u	<i>F. falciforme</i>	EU329569	DQ246935	DQ094405	Humanos (ojos)	Texas EE.UU
NRRL 32308	FSSC 3+4v	<i>F. falciforme</i>	EU329570	DQ246936	DQ094406	Humanos	Arabia Saudita
NRRL 32312	FSSC 3+4 w	<i>F. falciforme</i>	EU329572	DQ246940	DQ094410	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32313	FSSC 3+4 x	<i>F. falciforme</i>	EU329573	DQ246941	EU329678	Humanos (ojos)	Texas EE.UU
NRRL 32331	FSSC 3+4 y	<i>F. falciforme</i>	EU329577	DQ246959	DQ094428	Humanos	Texas EE.UU

Tabla VII.1 Continuación

NRRL 32339	FSSC 3+4 z	<i>F. falciforme</i>	EU329578	DQ246967	DQ094436	Humanos	Florida EE.UU
NRRL 32343	FSSC 3+4 aa	<i>F. falciforme</i>	EU329579	DQ246971	DQ094439	Humanos	Montana EE.UU
NRRL 32346	FSSC 3+4 bb	<i>F. falciforme</i>	EU329580	DQ246974	DQ094441	Humanos	Florida EE.UU
NRRL 32483	FSSC 3+4cc	<i>F. falciforme</i>	EU329582	DQ246981	DQ094448	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32502	FSSC 3+4 dd	<i>F. falciforme</i>	EU329585	DQ246999	DQ094465	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32505	FSSC 3+4 ee	<i>F. falciforme</i>	EU329586	DQ247002	DQ094467	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32506	FSSC 3+4 ff	<i>F. falciforme</i>	EU329587	DQ247003	DQ094468	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32538	FSSC 3+4 gg	<i>F. falciforme</i>	EU329588	DQ247004	DQ094469	Humanos (ojos)	India
NRRL 32540	FSSC 3+4 hh	<i>F. falciforme</i>	EU329589	DQ247006	DQ094471	Humanos (ojos)	India
NRRL 32542	FSSC 3+4 ii	<i>F. falciforme</i>	EU329590	DQ247008	DQ094473	Humanos (ojos)	India
NRRL 32544	FSSC 3+4 jj	<i>F. falciforme</i>	EU329591	DQ247010	DQ094475	Humanos (ojos)	India
NRRL 32545	FSSC 3+4 kk	<i>F. falciforme</i>	EU329592	DQ247011	DQ094476	Humanos (ojos)	India
NRRL 32547	FSSC 3+4 ll	<i>F. falciforme</i>	EU329593	DQ247012	EU329680	Humanos (ojos)	India
NRRL 32714	FSSC 3+4 nn	<i>F. falciforme</i>	EU329598	DQ247034	DQ094496	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32718	FSSC 3+4 nn	<i>F. falciforme</i>	EU329599	DQ247038	DQ094500	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32719	FSSC 3+4 oo	<i>F. falciforme</i>	EU329600	DQ247039	DQ094501	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32720	FSSC 3+4 pp	<i>F. falciforme</i>	EU329601	DQ247040	DQ094502	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32721	FSSC 3+4 qq	<i>F. falciforme</i>	EU329602	DQ247041	DQ094503	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32727	FSSC 3+4 rr	<i>F. falciforme</i>	EU329603	DQ247047	DQ094508	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32729	FSSC 3+4 ss	<i>F. falciforme</i>	EU329604	DQ247049	DQ094510	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32738	FSSC 3+4 tt	<i>F. falciforme</i>	EU329607	DQ247058	DQ094519	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32743	FSSC 3+4 uu	<i>F. falciforme</i>	EU329609	DQ247062	DQ094523	Humanos (ojos)	Florida EE.UU

Tabla VII.1 Continuación

NRRL 32744	FSSC 3+4 vv	<i>F. falciforme</i>	EU329610	DQ247063	DQ094524	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32754	FSSC 3+4 ww	<i>F. falciforme</i>	EU329612	DQ247072	DQ094533	Tortuga	Florida EE.UU
NRRL 32757	FSSC 3+4 xx	<i>F. falciforme</i>	EU329614	DQ247075	DQ094536	Arena	Florida EE.UU
NRRL 32778	FSSC 3+4 yy	<i>F. falciforme</i>	EU329616	DQ247088	DQ094549	Caballo (ojos)	Kentucky EE.UU
NRRL 32790	FSSC 3+4 zz	<i>F. falciforme</i>	EU329619	DQ247099	DQ094559	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32798	FSSC 3+4 aaa	<i>F. falciforme</i>	EU329623	DQ247107	DQ094567	Humanos	Nueva York EE.UU
NRRL 32828	FSSC 3+4 bbb	<i>F. falciforme</i>	EU329626	DQ247135	DQ094594	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32872	FSSC 3+4 eee	<i>F. falciforme</i>	EU329632	DQ247169	DQ094623	Perro	Japón
NRRL 32928	FSSC 3+4 fff	<i>F. falciforme</i>	EU329633	DQ247176	DQ094630	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 22779	FSSC 5e	<i>Fusarium sp.</i>	EU329526	DQ246848	DQ094333	Humanos	Nueva Zelanda
NRRL 22783	FSSC 5f	<i>Fusarium sp.</i>	EU329529	DQ246851	DQ094335	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 28679	FSSC 5h	<i>Fusarium sp.</i>	EU329556	DQ246912	DQ094383	Humanos	Cuba
NRRL 31168	FSSC 5i	<i>Fusarium sp.</i>	EU329563	DQ246922	DQ094395	Humanos	EE.UU
NRRL 32484	FSSC 5j	<i>Fusarium sp.</i>	EU329583	DQ246982	DQ094449	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32492	FSSC 5c	<i>Fusarium sp.</i>	EU329584	DQ246990	EU329679	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32737	FSSC 5k	<i>Fusarium sp.</i>	EU329606	DQ247057	DQ094518	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32741	FSSC 5n	<i>Fusarium sp.</i>	EU329608	DQ247061	DQ094522	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32791	FSSC 5l	<i>Fusarium sp.</i>	EU329620	DQ247100	DQ094560	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32810	FSSC 5m	<i>Fusarium sp.</i>	EU329624	DQ247118	DQ094577	Humanos (ojos)	Nebraska EE.UU
NRRL 22782	FSSC 6b	<i>Fusarium sp.</i>	EU329528	DQ246850	EU329670	Humanos (ojos)	España
NRRL 28542	FSSC 6h	<i>Fusarium sp.</i>	EU329543	DQ246883	EU329675	Humanos	Connecticut EE.UU
NRRL 28553	FSSC 6i	<i>Fusarium sp.</i>	EU329548	DQ246894	EU329676	Humanos	Texas EE.UU

Tabla VII.1 Continuación

NRRL 32849	FSSC 6e	<i>Fusarium</i> sp.	EU329628	DQ247155	EU329682	Humanos (ojos)	Texas EE.UU
NRRL 37640	FSSC 6f	<i>Fusarium</i> sp.	EU329638	FJ240355	EU329685	Humanos	Turquía
NRRL 32323	FSSC 7b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329576	DQ246951	DQ094420	Humanos	Pensilvania EE.UU
NRRL 32770	FSSC 7d	<i>Fusarium</i> sp.	EU329615	DQ247083	DQ094544	Humanos (ojos)	Tennessee EE.UU
NRRL 32794	FSSC 7c	<i>Fusarium</i> sp.	EU329622	DQ247103	DQ094563	Humidifier coolant	Nueva York
NRRL 22436	FSSC 8b	<i>N. vasinfecta</i>	EU329511	AF178348	DQ094317	Suelo	Sudáfrica
NRRL 22166	FSSC 8e	<i>N. vasinfecta</i>	EU329497	AF178350	DQ094319	<i>Heterodera glycines</i>	Illinois EE.UU
NRRL 22468	FSSC 8c	<i>N. vasinfecta</i>	EU329512	AF178349	DQ094318	<i>Arachis hypogaea</i>	Guyana
NRRL 34174	FSSC 8d	<i>N. vasinfecta</i>	EU329636	AY381145	AY381139	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32755	FSSC 9a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329613	DQ247073	DQ094534	Tortuga	Florida EE.UU
NRRL 22153	FSSC 10a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329492	AF178346	DQ094302	Cucúrbita	EE.UU
NRRL 22098	FSSC 10b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329489	AF178327	-	Cucúrbita	EE.UU
NRRL 22278	FSSC 11a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329501	AF178337	-	<i>Pisum sativum</i>	EE.UU
NRRL 22820	FSSC 11b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329532	AF178355	DQ094310	<i>Glycine max</i>	Indiana EE.UU
NRRL 45880	FSSC 11c	<i>Fusarium</i> sp.	EU329640	FJ240352	EU329689	<i>Pisum sativum</i>	EE.UU
NRRL 22642	FSSC 12a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329522	DQ246844	DQ094329	Camarones	Japón
NRRL 25392	FSSC 12b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329537	DQ246861	EU329672	Langosta	Nueva York EE.UU
NRRL 32309	FSSC 12d	<i>Fusarium</i> sp.	EU329571	DQ246937	DQ094407	Humanos	Massachusetts EE.UU
NRRL 32317	FSSC 12c	<i>Fusarium</i> sp.	EU329575	DQ246945	DQ094414	-	Texas EE.UU
NRRL 32821	FSSC 12e	<i>Fusarium</i> sp.	EU329625	DQ247128	DQ094587	Huevos de tortuga	Texas EE.UU
NRRL 22161	FSSC 13a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329494	AF178330	DQ094311	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Japón
NRRL 22162	FSSC 13c	<i>Fusarium</i> sp.	EU329495	DQ247561	EU329667	<i>Robinea pseudoacacia</i>	Japón

Tabla VII.1 Continuación

NRRL 22586	FSSC 13b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329516	AF178353	DQ094312	<i>Robinea pseudoacacia</i>	Virginia EE.UU
NRRL 22611	FSSC 14a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329518	DQ246841	DQ094326	Humanos (ojos)	Michigan EE.UU
NRRL 25726	FSSC 14d	<i>Fusarium</i> sp.	EU329539	DQ246863	DQ094345	Humanos	Alemania
NRRL 32705	FSSC 14b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329594	DQ247025	DQ094488	Humanos	Florida EE.UU
NRRL 32736	FSSC 14c	<i>Fusarium</i> sp.	EU329605	DQ247056	DQ094517	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32792	FSSC 15b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329621	DQ247101	DQ094561	Humanos	Japón
NRRL 34123	FSSC 16c	<i>F. lichenicola</i>	EU329635	DQ247192	DQ094645	Humanos (ojos)	India
NRRL 22157	FSSC 17a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329493	AF178359	DQ094306	<i>Morus alba</i>	Japón
NRRL 22230	FSSC 17b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329499	AF178358	DQ094305	<i>Morus alba</i>	Japón
NRRL 31158	FSSC 18a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329559	DQ246916	DQ094389	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 32301	FSSC 18b	<i>Fusarium</i> sp.	EU329567	DQ246929	EU329677	Humanos (ojos)	Pennsylvania EE.UU
NRRL 20438	FSSC 19a	<i>F. ambrosium</i>	EU329487	AF178332	DQ094315	<i>Camellia sinensis</i>	India
NRRL 22346	FSSC 19b	<i>F. ambrosium</i>	EU329503	FJ240350		<i>Camellia sinensis</i>	India
NRRL 22608	FSSC 20a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329517	DQ246838	DQ094323	Humanos	Massachusetts
NRRL 32316	FSSC 20c	<i>Fusarium</i> sp.	EU329574	DQ246944	DQ094413	Humanos (ojos)	Florida EE.UU
NRRL 32858	FSSC 20d	<i>Fusarium</i> sp.	EU329630	DQ247163	DQ094617	Humanos	Luisiana EE.UU
NRRL 22101	FSSC 21a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329490	AF178333	DQ094301	Tela de algodón	Panamá
NRRL 22163	FSSC 22a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329496	AF178328	AF178394	<i>Xanthoxylum piperitum</i>	Japón
NRRL 22400	FSSC 23a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329509	AF178343	DQ094303	<i>Ipomoea batatas</i>	Carolina del Norte
NRRL 22389	FSSC 24a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329506	AF178340	DQ094314	<i>Liriodendron tulipifera</i>	Maryland EE.UU
NRRL 31169	FSSC 25a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329564	DQ246923	DQ094396	Humanos	Texas EE.UU
NRRL 28541	FSSC 26a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329542	DQ246882	EU329674	Humanos	Connecticut EE.UU

Tabla VII.1 Continuación

NRRL 37625	FSSC 27a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329637	FJ240353	EU329684	Humanos	Holanda
NRRL 32437	FSSC 28a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329581	DQ246979	DQ094446	Humanos	Suiza
NRRL 22579	FSSC 30a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329515	AF178352	AF178415	Corteza	Indonesia
NRRL 22570	FSSC 31a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329513	AF178360	AF178422	<i>Piper nigrum</i>	Brasil
NRRL 22178	FSSC 32a	<i>Fusarium</i> sp.	EU329498	AF178334	DQ094313	Árbol	Venezuela
NRRL 22354	FSSC 33a	<i>F. ambrosium</i>	EU329504	AF178338	-	Corteza	Guayana Francesa
NRRL 22387	Clade 2	<i>Fusarium</i> sp.	EU329505	AF178339	AF178403	Corteza	Guayana Francesa
NRRL 22276	Clade 2	<i>F. phaseoli</i>	EU329500	AY220186	EF408520	<i>Phaseolus vulgaris</i>	EE.UU
NRRL 22395	Clade 2	<i>Fusarium</i> sp.	EU329507	AF178341	AF178405	Corteza	Venezuela
NRRL 22412	Clade 2	<i>Fusarium</i> sp.	EU329510	AF178351	AF178414	Corteza	Guayana Francesa
NRRL 22574	Clade 2	<i>Fusarium</i> sp.	EU329514	AF178345	AF178409	<i>Coffea arabica</i>	Guatemala
NRRL 22743	Clade 2	<i>F. brasiliense</i>	EU329525	AY320145	AY320181	<i>Glycine max</i> (SDS)	Brasil
NRRL 22825	Clade 2	<i>F. virguliforme</i>	EU329533	AF178357	AF178419	<i>Glycine max</i> (SDS)	Indiana EE.UU
NRRL 31096	Clade 2	<i>F. tucumaniae</i>	EU329557	GU170636	GU170656	<i>Glycine max</i> (SDS)	Tucumán Argentina
NRRL 31104	Clade 2	<i>F. cuneirostrum</i>	EU329558	AY320159	AY320195	<i>Glycine max</i> (SDS)	Japón
NRRL 31757	Clade 2	<i>F. brasiliense</i>	EU329565	AY320148	AY320184	<i>Glycine max</i>	Brasil
NRRL 31949	Clade 2	<i>Fusarium</i> sp.	EU329566	AY320161	AY320197	<i>Glycine max</i>	Brasil
NRRL 22090	Clade 1	<i>Nectria illudens</i>	EU329488	AF178326	AF178393	<i>Beilschmiedia tawa</i>	Nueva Zelanda
NRRL 22632	Clade 1	<i>F. plagianthi</i>	EU329519	AF178354	AF178417	<i>Hoheria glabrata</i>	Nueva Zelanda
NRRL 22316	Grupo externo	<i>Nectria atrofusca</i>	EU329502	AF178361	AF178423	<i>Staphylea trifolia</i>	Massachusetts EE.UU
FRC-S1754	FSSC 38	<i>Fusarium</i> sp.	-	DQ247532	JF433030	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1760	FSSC 20	<i>Fusarium</i> sp.	-	DQ247531	JF433031	Suelo	Sri Lanka

Tabla VII.1 Continuación

FRC-S1763	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	JF433025	JF433032	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1831	-	<i>F. rectiphorus</i>	-	DQ247509	JF433034	Árbol muerto	Sri Lanka
FRC-S1834	FSSC 33	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247512	JF433037	Corteza de árbol	Sri Lanka
FRC-S1835	-	<i>F. kelerajum</i>	-	DQ247514	JF433038	Tronco de árbol	Sri Lanka
FRC-S1836	-	<i>F. kelerajum</i>	-	DQ247515	JF433039	Hanging dead branch	Sri Lanka
FRC-S1837	-	<i>F. kelerajum</i>	-	DQ247516	JF433040	Rama de árbol	Sri Lanka
FRC-S1839	-	<i>F. kelerajum</i>	-	DQ247518	JF433041	Tronco de árbol	Sri Lanka
FRC-S1840	-	<i>F. mahasenii</i>	-	DQ247520	JF433042	Madera podrida	Sri Lanka
FRC-S1842	-	<i>F. rectiphorus</i>	-	JF433026	JF433043	Rama de árbol	Sri Lanka
FRC-S1843	-	<i>F. rectiphorus</i>	-	JF433027	JF433044	Rama de árbol	Sri Lanka
FRC-S1845	-	<i>F. mahasenii</i>	-	DQ247513	JF433045	Rama de árbol	Sri Lanka
FRC-S1846	-	<i>F. mahasenii</i>	-	DQ247519	JF433046	Madera podrida	Sri Lanka
FRC-S1847	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	JF433028	JF433047	Rama de árbol	Sri Lanka
FRC-S1925	FSSC 28	<i>Fusarium sp.</i>	-	-	JF433048	Fruta	Australia
FRC-S1933	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	-	JF433050	Flores descompuestas	Australia
FRC-S1940	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	-	JF433052	Fruta	Australia
FRC-S1945	FSSC 38	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247502	JF433053	Suelo	Australia
FRC-S1947	FSSC 38	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247504	JF433055	Suelo	Australia
FRC-S1950	FSSC 38	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247507	JF433058	Suelo	Australia
FRC-S1952	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247487	JF433060	Suelo	Australia
FRC-S1956	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247489	JF433062	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1959	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247482	JF433065	Suelo	Sri Lanka

Tabla VII.1 Continuación

FRC-S1960	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247483	JF433066	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1961	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247484	JF433067	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1964	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	JF433029	JF433068	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1967	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247492	JF433071	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1973	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247494	JF433073	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1975	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247496	JF433075	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1977	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247498	JF433077	Suelo	Sri Lanka
FRC-S1978	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	-	DQ247499	JF433078	Suelo	Sri Lanka
NRRL 20545	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246836	DQ094321	Cucúrbita	-
NRRL 22237	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246837	DQ094322	Camarón	EE.UU
NRRL 22610	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246840	DQ094325	Humanos (sangre)	EE.UU
NRRL 22789	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246852	DQ094336	Humanos (ojos)	EE.UU
NRRL 22939	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246856	DQ094339	Humanos	Alemania
NRRL 25374	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246857	DQ094340	Humanos (piel)	Canadá
NRRL 28033	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246878	DQ094356	Paciente con leucemia	Italia
NRRL 28034	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246879	DQ094357	Humanos (córnea)	Costa Rica
NRRL 28543	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246884	DQ094359	Humanos (piel)	EE.UU
NRRL 28554	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246895	DQ094368	Ambiental	EE.UU
NRRL 28558	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246899	DQ094372	Humanos	Brasil
NRRL 28564	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246905	DQ094378	Humanos (pierna)	EE.UU
NRRL 28579	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246910	DQ094383	Humanos (uña)	Cuba
NRRL 29132	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246915	DQ094388	Humanos	Alemania

Tabla VII.1 Continuación

NRRL 32320	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ246948	DQ094417	Humanos	EE.UU
NRRL 32795	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247104	DQ094564	Humanos	EE.UU
NRRL 32824	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247131	DQ094590	Humanos (piel)	EE.UU
NRRL 32829	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247136	DQ094595	Paciente con cáncer	EE.UU
NRRL 34104	-	<i>Fusarium sp.</i>	-	DQ247186	DQ094639	Desagüe de fregadero	Texas EE.UU

^a Número de cultivo de referencia. FRC: Fusarium Research Center (Pennsylvania State University Pennsylvania); NRRL: The Agriculture Research Service Culture Collection National Center for Agricultural Utilization Research USDA/ARS Peoria IL USA.

^b Números de especies filogenéticas (por ejemplo, "FSSC 1") siguiendo la nomenclatura propuesta por Chang *et al.* (2006) y O'Donnell *et al.* (2008)

^c Número de acceso de las secuencias disponibles en el GenBank (Nafim *et al.* 2012; O'Donnell *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2006).

Tabla VIII.2 Cepas del complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC) incluidas en el análisis filogenético molecular (secuencia del gen β -tubulina).

Cultivo ^a	FSSC ^b	<i>Fusarium</i>	Número en GenBank	Huésped/Sustrato	Origen
FCC3776	FSSC 2	<i>Fusarium</i> sp.	DQ220225	Suelo	Shoa, Etiopia
FCC3809	FSSC 2	<i>Fusarium</i> sp.	DQ220227	Raíz de banano	Arbaminch, Etiopia
FCC3814	FSSC 2	<i>Fusarium</i> sp.	DQ220226	Suelo (maíz)	Wollo, Etiopia
FCC4635	FSSC 2	<i>Fusarium</i> sp.	DQ220224	Suelo (trigo)	Wollega, Etiopia
FCC2934	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220222	Suelo	West Shoa, Etiopia
FCC3612	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220214	Suelo	Gondar, Etiopia
FCC3613	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220228	Suelo	Sidamo, Etiopia
FCC3631	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220217	Raíz de banano	Arbaminch, Etiopia
FCC3632	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220219	Suelo	Gojjam, Etiopia
FCC3649	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220220	Suelo (sorgo)	Wollo, Etiopia
FCC3723	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220216	Suelo	Bale, Etiopia
FCC3727	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220209	Suelo	East Shoa, Etiopia
FCC3735	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220218	Suelo (cebada)	Gondar, Etiopia
FCC3736	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220212	Suelo	Wollo, Etiopia
FCC3748	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220208	Suelo	East Shoa, Etiopia
FCC3749	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220213	Tallo de cebada	North Shoa, Etiopia
FCC3789	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220215	Raíz de banano	Arbaminch, Etiopia
FCC3810	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220229	Suelo (cebada)	Sidamo, Etiopia
FCC3816	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220211	Suelo	East Shoa, Etiopia
FCC4631	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220207	Suelo	Wollega, Etiopia

Tabla VIII.2 Continuación

FCC3695	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220230	Suelo (maíz)	East Shoa, Etiopia
FCC4632	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220210	Raíz de banano	Arbaminch, Etiopia
FCC4633	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220221	Suelo (maíz)	Zeway, Etiopia
FCC4634	FSSC 3+4	<i>F. falciforme</i>	DQ220223	Suelo (sorgo)	Gondar, Etiopia
FCC2926	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220241	Suelo	Bale, Etiopia
FCC3623	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220243	Suelo	East Shoa, Etiopia
FCC3625	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220231	Suelo (trigo)	Bale, Etiopia
FCC3639	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220232	Suelo	Bale, Etiopia
FCC3650	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220237	Suelo (sorgo)	Wollo, Etiopia
FCC3661	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220239	Suelo	Gondar, Etiopia
FCC3670	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220238	Suelo (trigo)	North Shoa, Etiopia
FCC3681	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220233	Raíz de banano	Arbaminch, Etiopia
FCC3686	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220240	Suelo	Gojjam, Etiopia
FCC3689	FSSC 5	<i>Fusarium sp.</i>	DQ220234	Suelo	Gondar, Etiopia

^a Número de cultivo de referencia. FCC: Fusarium Culture Collection del Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), Universidad de Pretoria, Pretoria, Sudáfrica.

^b Números de especies filogenéticas (por ejemplo, "FSSC 1") siguiendo la nomenclatura propuesta por Chang *et al.* (2006) y O'Donnell *et al.* (2008)

^c Número de acceso de las secuencias disponibles en el GenBank (Bogale *et al.*, 2009).



72659

U.N.R.C
Biblioteca Central



72659