



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CUANTIFICACIÓN Y MONITOREO DE CEPAS DE
Fusarium oxysporum Y *Fusarium solani* EN PLANTA DE
TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ALEJANDRO MORILLO QUEREIGUA

DIRIGIDA POR

Dra. DALIA ELIZABETH MIRANDA CASTILLEJA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



CUANTIFICACIÓN Y MONITOREO DE CEPAS DE
Fusarium oxysporum y *Fusarium solani* EN PLANTA
DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)

por

Alejandro Morillo Quereigua

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQLIN-289606



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CUANTIFICACIÓN Y MONITOREO DE CEPAS DE
Fusarium oxysporum Y *Fusarium solani* EN PLANTA DE
TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

ALEJANDRO MORILLO QUEREIGUA

DIRIGIDA POR

Dra. DALIA ELIZABETH MIRANDA CASTILLEJA

SINODALES

Dra. DALIA ELIZABETH MIRANDA CASTILLEJA
DIRECTOR

Dra. ROCÍO CRYSTABEL LÓPEZ GONZÁLEZ
CODIRECTOR

M. en C. JOSÉ DANIEL GRANADOS ÁLVAREZ
SINODAL

Dra. ANA GABRIELA HERNÁNDEZ PUGA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN.	
2. ANTECEDENTES.	3
2.1. El tomate.	3
2.1.1. El origen del tomate.	3
2.1.2. Taxonomía del tomate.	3
2.1.3. Descripción botánica del tomate.	4
2.1.4. Importancia comercial del tomate.	6
2.1.5. El cultivo de tomate en México.	6
2.2. Producción en ambiente controlado.	6
2.2.1. El cultivo de tomate de invernadero.	7
2.3. Manejo de plagas y enfermedades en invernadero.	8
2.4. Género <i>Fusarium</i> .	9
2.4.1. Generalidades de <i>Fusarium</i> spp. como fitopatógeno.	9
2.4.2. Definición y taxonomía.	10
2.4.3. Morfología macroscópica y microscópica.	10
2.5. La marchitez vascular del tomate.	12
2.5.1. Mecanismo de infección de <i>Fusarium</i> .	13

2.5.2. Métodos microbiológicos de detección de <i>Fusarium</i> .	14
2.6. Técnicas de diagnóstico molecular.	15
2.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.	15
2.6.2. Detección molecular de hongos fitopatógenos.	16
3. OBJETIVOS.	18
3.1. General.	18
3.2. Específicos.	18
4. METODOLOGÍA.	19
4.1. Materiales.	19
4.1.1. Material biológico.	19
4.1.2. Reactivos y medios de cultivo.	19
4.2. Métodos.	19
4.2.1. Preparación y mantenimiento de material vegetal.	19
4.2.2. Diseño del experimento.	20
4.2.3. Muestreo.	20
4.2.4. Producción de inóculo.	20
4.2.5. Inoculación de los tratamientos.	20
4.2.6. Evaluación de patogenicidad en plantas.	20
4.2.6.1. Análisis sintomático.	21
4.2.6.2. Análisis molecular.	21
4.2.6.3. Análisis microbiológico.	21
4.2.6.4. Identificación de <i>Fusarium</i> a nivel de rizósfera y raíz.	22
4.2.7. Análisis de datos.	22
4.2.8. Manejo de residuos y de material biológico.	22

5. RESULTADOS.	24
5.1. Índice de enfermedad.	24
5.2. Análisis molecular.	26
5.3. Análisis microbiológico.	27
5.3. Análisis fisicoquímico.	32
5.3.1. pH.	33
5.3.2. Conductividad eléctrica.	33
5.3.3. Temperatura.	33
5.4. Identificación de <i>Pseudomonas</i> spp.	34
6. DISCUSIÓN.	35
6.1. Monitoreo de infección causada por <i>Fusarium</i> spp.	35
6.2. Manejo de la PCR cuantitativa.	36
6.3. Identificación de <i>Fusarium</i> spp. en muestras de suelo y tejido.	37
6.4. Identificación de <i>Pseudomonas</i> spp.	39
6.5. Aplicación de los métodos de detección.	40
7. CONCLUSIONES.	43
8. REFERENCIAS.	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diferentes especies pertenecientes a <i>Lycopersicum</i> . Miller 1974.	4
2	Observaciones de plantas correspondientes a diferentes niveles del índice de enfermedad en los tratamientos CT, FO y FS. Monitoreo 1.	25
3	Observaciones de plantas correspondientes a diferentes niveles del índice de enfermedad en los tratamientos CT, FO y FS. Monitoreo 2.	25
4	Observaciones de plantas correspondientes a diferentes niveles del índice de enfermedad en los tratamientos CT, FO y FS. Monitoreo 3.	25
5	Valores de cQs obtenidos de las diferentes muestras durante el monitoreo 3.	26
6	pH del suelo de los diferentes tratamientos en diferentes monitoreos.	32
7	Conductividad eléctrica (mS/cm) del suelo de los diferentes tratamientos en diferentes monitoreos.	32
8	Temperatura (°C) del suelo de los diferentes tratamientos en diferentes monitoreos.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Tejidos aéreos de la planta de tomate.	5
2	Estructura radicular del tomate.	5
3	Ciclo fenológico del cultivo de tomate.	7
4	Colonias de diferentes <i>Fusarium</i> cultivados en APD. a) <i>Fusarium equiseti</i> ; b) <i>Fusarium oxysporum</i> ; c) <i>Fusarium graminearum</i> ; d) <i>Fusarium solani</i> ; e) <i>Fusarium comune</i> ; f) <i>Fusarium verticillioides</i> ; g) <i>Fusarium proliferatum</i> ; h) <i>Fusarium fujikuroi</i> ; i) <i>Fusarium avenaceum</i> .	12
5	Morfología de diferentes estructuras de <i>Fusarium solani</i> vistas mediante microscopio óptico	13
6	Marchitez del tomate en campo	14
7	Decoloración y necrosis vascular en tomate causada por <i>F. oxysporum f. sp. Lycopersicii</i>	14
8	Plantas de tomate en diferentes niveles del índice de enfermedad.	24
9	Conteos poblacionales de hongos en muestra de suelo durante los diferentes monitoreos.	28
10	Conteos poblacionales de levaduras en muestra de suelo durante los diferentes monitoreos.	28
11	Conteo de colonias presuntivas de <i>Fusarium</i> spp. de muestras de suelo.	29
12	Conteo de colonias presuntivas de <i>Fusarium</i> spp. en rizosfera y raíz durante el monitoreo 3.	29
13	Colonias asociadas a crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. a) Inóculo de raíz de planta CT-4; b) Inóculo de rizosfera de planta FO-7; c) Inóculo de raíz de planta CT-1; d) Inóculo de raíz de planta FS-5.	30

14	Conteos poblacionales de hongos y levaduras de los tratamientos CT, FO y FS en muestra de rizosfera durante el monitoreo 3.	31
15	Conteos poblacionales de hongos y levaduras de los tratamientos CT, FO y FS en muestra de raíz durante el monitoreo 3.	31
16	Corte transversal del tallo de planta positiva para <i>Pseudomonas</i> spp. en raíz. Se señalan las presuntivas formaciones de raíces adventicias.	34
17	Corte transversal del tallo de tomate mostrando un estadio avanzado de la necrosis vascular causada por <i>Pseudomonas</i> spp.	40

RESUMEN

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es un cultivo muy apreciado tanto a nivel comercial como cultural. En México, este cultivo se constituye como una de las principales exportaciones, posicionado como el cuarto producto agroalimentario. Una de las principales enfermedades de este cultivo es la marchitez vascular, la cual es causada por los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, y cuya exposición está vinculada a enfermedades de pudrición radicular, las cuales causan importantes pérdidas de cultivos de gran valor económico. Actualmente los métodos microbiológicos siguen siendo los más utilizados para la detección de fitopatógenos en planta o suelo, sin embargo, estos son de baja sensibilidad, además de que requieren de la aplicación de muestreos invasivo y/o destructivos, y la necesidad de periodos de cultivo para la confirmación del fitopatógeno, comprometiendo así; la aplicación de tratamiento oportuno. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de métodos de detección sensibles, que permitan la oportuna detección del fitopatógeno para su tratamiento. En este estudio, se validó un método de detección temprana de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* mediante PCR cuantitativa, junto con la cuantificación poblacional mediante técnicas de microbiología tradicional, asociándola con la sintomatología propia de la enfermedad vascular de *L. esculentum*. Para ello, se aplicó métodos de detección tradicionales y moleculares para el fitopatógeno que se correlacionaron con el registro sintomatológico, y físico-químico de suelo, de plantas en diferentes estadios fenológicos y de infección. Los resultados no mostraron correlación estadística entre el cuadro sintomatológico observado en *L. esculentum*, y el material genético asociado a *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Pseudomonas spp.* en muestras de suelo, rizosfera y raíz. Así mismo, no hubo diferencias significativas entre los registros físico-químicos de los tratamientos. Se denota la dificultad del diagnóstico sintomático, y de las técnicas de microbiología tradicional y molecular para atribuir sintomatología a un organismos causal. Se concluye que la PCR cuantitativa muestra potencial en su uso para el estudio de enfermedades vasculares en tomate.

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicum esculentum*) es un cultivo muy apreciado tanto comercialmente como culturalmente, por lo que se cultiva ampliamente en todo el mundo, ya sea en campo abierto o en invernadero. El tomate representa aproximadamente el 70% de la producción bajo condiciones controladas de invernadero del país, esto derivado de la capacidad del sistema de producción de frutos con características atractivas para el consumidor. Por otro lado, aunque el uso de sistemas controlados permite el mantenimiento de condiciones ideales para su cultivo, también crea condiciones adecuadas para la propagación de patógenos e infecciones persistentes.

Entre los patógenos que afectan a la planta de tomate, se encuentran los hongos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, los cuales son organismos asociados a enfermedades vasculares en tomate. La infección por cepas fitopatógenas del género *Fusarium*, son problemáticas y de gran importancia agrícola, ya que se caracterizan por una alta tasa infectiva, mortalidad en cultivos y persistencia en suelo, lo cual trae como consecuencias considerables pérdidas económicas. Entre las medidas de control comunes, están la reducción de la densidad poblacional de huéspedes afines, el cambio a cultivos no relacionados al patógeno, el uso de cultivos con resistencia sistemática, el control químico y el control biológico.

Debido a las características del ciclo infectivo de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, la aparición de sintomatología observable implica un estado de infección avanzado, reduciendo la efectividad de cualquier tratamiento correctivo. Así mismo, los métodos microbiológicos, que tradicionalmente son usados para la detección de patógenos en planta o suelo, requieren de un muestreo invasivo y/o destructivo, que permita el cultivo *in vitro*, aislamiento y el análisis de características morfológicas propias, como son los macroconidios, microconidios y clamidosporas para *Fusarium spp.* Sin embargo, en el presente no existen condiciones de cultivo, que permitan obtener morfologías estables y suficientemente diferenciales entre

especies del género *Fusarium*. Lo que vuelve pertinente, la búsqueda de métodos de detección más rápidos y sensibles, que permitan la oportuna detección del patógeno para su tratamiento.

Uno de los métodos utilizados para identificar y medir material genético, es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés). Se distingue de la PCR tradicional por su capacidad para identificar genes de interés y calcular la cantidad relativa del gen en comparación con un control. Esta modificación hace que la técnica sea muy sensible, brindando datos cuantitativos los cuales permiten la detección de fitopatógenos en estadios latentes, asintomáticos. Adicionalmente, se considera un método confiable para detectar enfermedades causadas por fitopatógenos, ya que se ha usado en múltiples casos para el estudio de las interacciones huésped-patógeno, por su capacidad de establecer correlaciones más complejas entre las variables que afectan al ciclo de vida de la planta.

Debido a las características antes atribuidas a la qPCR, en este trabajo se buscará correlacionar datos de expresión génica relativa de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, con sintomatología asociada a enfermedad vascular por infección de *Fusarium* spp., durante crecimiento vegetativo de *Lycopersicon esculentum*, con el objetivo de validar el uso de la qPCR como método para el diagnóstico temprano del patógeno.

2. ANTECEDENTES

2.1. El tomate

2.1.1. El origen del tomate

El tomate silvestre es una planta nativa del oeste de Sudamérica, de la cual se conocen múltiples variedades y especies endémicas relacionadas. El tomate tiene la capacidad de crecer en múltiples ambientes, desde terrenos cercanos a nivel del mar, terrenos áridos escasos en humedad y precipitaciones, valles en altas altitudes, o incluso en desiertos. Su domesticación se cree que ocurrió en México, a partir de *Lycopersicum esculentum* var. cerasiforme, que crece como mala hierba, la cual fue integrada a diferentes pueblos mesoamericanos, creando diversidad en la especie. Esto se ve fundamentado en evidencia lingüística, que corrobora su expansión por la región. Como consecuencia del colonialismo en América, el fruto fue introducido en Europa, siendo difundido por el comercio al resto del mundo (Matas Arroyo, 2005).

2.1.2. Taxonomía del tomate

Taxonómicamente al tomate se le clasifica en la familia de las solanáceas (*Solanaceae*), subfamilia *Solanoideae*. Históricamente, el tomate se ha clasificado dentro de las solanáceas sin controversia, sin embargo, debido a la variedad de plantas morfológica y fisiológicamente distintas, diferentes autores han planteado su propia agrupación taxonómica para el género. En el presente, una de las clasificaciones aceptadas es la de Miller en 1974, asignando al tomate al género *Lycopersicum*, con 9 especies (Cuadro 1) (Matas Arroyo, 2005; Al-Ghufaili y col., 2023).

Cuadro 1. Diferentes especies pertenecientes a *Lycopersicum*. Miller 1974
(Adaptado de Matas Arroyo, 2005).

Especie	Subespecie	Complejo
<i>L. escelentum</i> Mill.	var. <i>escelentum</i> var. <i>cerasiforme</i> (Dun.) Gray	<i>escelentum</i>
<i>L. pimpinelli</i> (Jusl.) Mill		<i>escelentum</i>
<i>L. cheesmanii</i> Riley	f. <i>cheesmanii</i> f. <i>minor</i> (Hook. F.) Mull	<i>escelentum</i>
<i>L. hirsutum</i> Humb. y Bonpl.	f. <i>hirsutum</i> f. <i>glabratum</i> Mull.	<i>escelentum</i>
<i>L. pennelli</i> (Corr.) D' Arey	var. <i>pennellii</i> var. <i>puberulum</i> (Corr.) D' Arey	<i>escelentum</i>
<i>L. chmielewskii</i> Rick, Kes., Fob y Holle		<i>escelentum</i>
<i>L. parviflorum</i> Rick, Kes., Fob y Holle		<i>escelentum</i>
<i>L. peruvianum</i> (L.) Mill.	var. <i>peruvianum</i> var. <i>humifusum</i>	<i>peruvianum</i>
<i>L. chilense</i>		<i>peruvianum</i>

2.1.3. Descripción botánica del tomate

La planta de tomate es de tipo herbáceo, anual o bianual. Puede desarrollarse de manera rastrera, erecta o semierecta. Cuenta con un sistema de reproducción autógamo. Dependiendo del cultivar, el crecimiento puede ser de tipo indeterminado (ilimitado) o determinado (compacto). En su parte aérea, el tallo puede desarrollarse longitudinalmente sobre los 2 metros para las determinadas, y sobre los 15 metros para las indeterminadas, con diámetros de tallo desde los 2 a 4

cm (Zamora Vargas, 2023). La epidermis mantiene funciones fotosintéticas, y se encuentra cubierta por pubescencias que pueden ser o no ser glandulares. Genera una hoja por yema, estas son compuestas, con folíolos peciolados, de 7 a 9 lóbulos. Puede generar inflorescencias apicales y laterales, de tipo racimoso, con flores que varían de 3 a 10. Las flores tienden a desarrollarse inicialmente en la yema apical (Figura 1). El fruto se clasifica como una baya con 2 o más lóculos, que pesa entre 10 mg a 600g, dependiendo de la especie y variedad. Los frutos se caracterizan por formas y tamaños variables, con un epicardio liso y duro. La pulpa es carnosa y contiene muchas semillas (Agudelo y col., 2019).



Figura 1. Tejidos aéreos de la planta de tomate (Pxfuel, s.f.).

Su sistema radicular es de tipo fibroso, y se constituye por una raíz pivotante, raíces secundarias y adventicias. La raíz principal se diferencia por tener un mayor grosor. En periferia a la raíz principal, crecen las raíces secundarias de menor grosor. Las raíces adventicias no crecen desde la radícula, desarrollándose en tejidos como el tallo (Agudelo y col., 2019).



Figura 2. Estructura radicular del tomate (Adaptado de Sygenta, 2018).

El ciclo fenológico del cultivo está predominantemente determinado por la variedad y las condiciones climáticas. El cultivo de tomate industrial tradicionalmente se hace en semilleros, donde están en una etapa de crecimiento vegetativo, que consiste en la germinación de la semilla en un periodo de 4 a 8 días hasta la formación de 3 a 4 hojas verdaderas. Durante el día 30-35 las plántulas se trasplantan al sustrato definitivo, donde continuará con su crecimiento hasta el inicio de la fase reproductiva, la cual se indica por la aparición de la primera inflorescencia entre los 28 y 35 días después del trasplante. El amarre de los frutos ocurre después de los 10 días de la aparición de la flor y tiene un proceso de maduración que ocurre entre los 85 y 90 días después del trasplante (Figura 3) (Rodríguez y col., 2018).

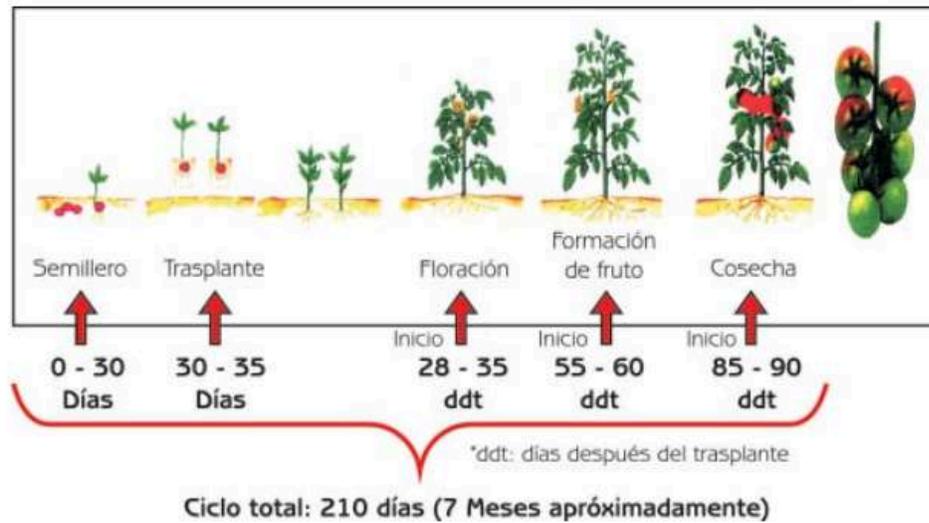


Figura 3. Ciclo fenológico del cultivo de tomate (Rodríguez y col., 2018)

2.1.4. Importancia comercial del tomate

El tomate es un cultivo de alto valor comercial, cultural y alimenticio, por ello, su cultivo se encuentra ampliamente extendido por el mundo, tanto para el consumo en fresco o procesado. Su producción mundial escala a unos 150 millones de toneladas al año, siendo los principales productores, países del hemisferio norte como, Estados Unidos, China, Italia, Turquía e Irán. Un 75% de la producción se destina al consumo fresco, el restante es usado para la preparación de productos de valor como pasta de tomate, jugo de tomate y salsa (Noale, 2016; Gaytán y Alfaro, 2021).

2.1.5. El cultivo de tomate en México

México es un país donde el cultivo de tomate se encuentra altamente practicado, ya sea en campo abierto o bajo condiciones ambientales controladas. Es un producto de gran importancia económica, debido a que constituye una de las principales exportaciones, posicionado como el segundo producto agroalimentario de exportación, con un valor de 7,334 millones de pesos sólo para el mercado de exportación (SIAP, 2022).

De los 3.46 millones de toneladas de tomates producidos anualmente en México, un 40% es producido bajo condiciones de invernadero, siendo el principal cultivo en esta modalidad y con un valor de 13,418 millones de pesos (SIAP, 2022). Alrededor del 80% de la producción de invernadero es dedicada a exportación, gracias a las características del tomate obtenido, las cuales son apreciadas por el consumidor extranjero, lo que permite un aumento en el precio sobre el valor base en el mercado. Asimismo, México ve una tendencia creciente sobre el manejo de prácticas de cultivo de tomate en invernadero, lo que incentiva el desarrollo e investigación sobre el mejoramiento de estos métodos de agricultura intensiva (Morales, 2021).

2.2. Producción en sistemas agrícolas protegidos

El uso de invernaderos tiene como objetivo el control de factores ambientales para la generación de condiciones óptimas para el cultivo. Entre los factores a controlar, se incluyen: la temperatura del aire y suelo, humedad, luz, tipo de sustrato, pH, salinidad y composición del aire, debido a como su manejo nos permite un control sobre la fisiología de las plantas. Otra característica de los sistemas de invernadero, es que brindan la capacidad de automatizar partes del proceso de cultivo, esto se logra mediante la utilización de sensores y efectores, que miden y actúan sobre los factores antes descritos, con el fin de regular y mantener las condiciones óptimas fijadas para el cultivo. Asimismo, esto permite la cuantificación de las entradas, así como su optimización en aplicación, reduciendo el uso de recursos como agua, fertilizantes, sustancias para el control biológico y mano de obra (Martínez y col., 2002; Gullino y col., 2020).

2.2.1. El cultivo de tomate de invernadero

El cultivo de tomate en invernadero, generalmente es practicado mediante el uso de variedades de crecimiento indeterminado. Las condiciones de suelo son poco exigentes, sin embargo, idealmente debe facilitar el drenaje de agua y tener un pH entre 6.0-6.5. Las condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa están entre los 18-30 °C (dependiendo de la variedad), y entre el 60-80%

respectivamente. La planta debe tener fotoperiodos de al menos 6 horas de luz directa por día. El esquema de fertilización se basa en las necesidades nutrimentales de la planta, respecto al estadio fenológico en el que se encuentra. Para ello se realizan análisis de agua y suelo, que permitan calcular la deficiencia de nutrientes esenciales, que deban ser proporcionados por medio de fertilización (Allende y Torres, 2017).

Es común el uso de sistemas hidropónicos en *slabs* de fibra de coco, ya que estos facilitan el manejo agronómico y fitosanitario, tal como la poda, riego y control de enfermedades. Entre sus ventajas está el maximizar el uso de espacio e incidencia de luz, permitiendo el aumento en la densidad de cultivo (Allende y Torres, 2017). Lo anterior se refleja en un aumento de las productividades, debido a la capacidad de producción fuera de temporada y los máximos de cosecha obtenidos por planta. Se reporta que, en promedio los rendimientos en invernadero para el cultivo de tomate, oscilan entre los 5.0-8.0 kilogramos por planta, en contraste, en campo abierto se obtienen 1.5-2.0 kilogramos por planta (Ortega Martínez y col., 2010).

2.3. Manejo de plagas y enfermedades en invernadero

Entre las problemáticas a las que se enfrentan las prácticas de agricultura intensiva, están la creación de condiciones favorables para la rápida propagación de enfermedades aéreas y de suelo. Esto se debe a que en invernaderos se promueven condiciones para las interacciones huésped-patógeno, como lo son el agrupamiento de plantas en altas densidades de superficie, aunado a condiciones nutricionales de sustrato y factores como temperatura y humedad que favorecen el desarrollo de los patógenos, lo que propicia el crecimiento y dispersión de plagas y enfermedades. Esto resulta en pérdidas importantes en la producción de los invernaderos. En respuesta, se suelen tener prácticas preventivas, tales como, el cuidado respecto a la proveniencia de los insumos agrícolas, la inocuidad del agua de riego, la esterilización de suelo, entre otras (Mansour y col., 2014).

Por otro lado, existen métodos de control correctivo, como los basados en insumos químicos, sin embargo, el uso de estos productos está ampliamente relacionados a la generación de resistencia sistémica por parte de plagas y fitopatógenos, esto se ve amplificado en el caso de microorganismos, donde la presión selectiva genera rápidas adaptaciones a las condiciones estresantes del medio. En hongos esto ha causado una reducción sobre la sensibilidad a los compuestos químicos usados, siendo heredable y permaneciendo estable en la población. Algunos individuos tienen la capacidad de sobrevivir y propagarse, requiriendo constantemente el aumento de dosis o el cambio de método de control para la supresión del fitopatógeno. Debido a que el desarrollo de resistencia está ligado a un proceso de adaptación evolutiva, la aplicación de uno o varios métodos, que logren la erradicación completa de la población cuando aún es pequeña, es necesaria para el control epidemiológico (Carmona y Sautua, 2017). Por lo anterior, se hace evidente la importancia de métodos de detección para organismos infecciosos que permitan la oportuna aplicación de métodos alternativos para su eliminación.

2.4. Género *Fusarium*

2.4.1. Generalidades de *Fusarium* spp. como fitopatógeno

Fusarium es un género que se ha asociado históricamente con importantes pérdidas económicas, debido a su capacidad de generar una amplia gama de enfermedades que afectan a multitud de cultivos, como trigo, maíz, plátano, algodón, tomate, cebada entre otros. Adicionalmente, se le asocia con un riesgo alimentario, debido a la contaminación por parte de micotoxinas en grano (Seepe y col., 2021). Las diferentes especies de *Fusarium* cuentan con la capacidad de generar infección en diferentes climas y cultivos, por lo que ha supuesto un problema comercial a nivel global. Entre las medidas de control están cambios en las prácticas agrícolas, tal como la disminución en la densidad poblacional de huéspedes afines, cambio a cultivos no relacionados al patógeno, uso de cultivos

con resistencia sistemática, control químico y control biológico (Leslie y Summerell, 2013).

Fusarium spp. puede generar pudriciones de raíz, tallo, corona y tizón, así como permitir la infección de oportunistas, generando la formación de cancro bacteriano. De las anteriores sintomatologías, las más ampliamente extendidas son el marchitamiento de hojas, y pudriciones de la raíz y base del tallo (FAUBA, 2021). Estas enfermedades vasculares en tomate, son usualmente causadas por *forma specialis* (f. sp.) de *Fusarium* como *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicii*. Los *forma specialis* son grupos de aislados clonales, que han adquirido la capacidad de generar enfermedades en huéspedes específicos mediante evolución convergente, por lo que no pertenecen a un mismo clado (Dongzhen y col., 2020).

2.4.2. Definición y taxonomía

El género *Fusarium* fue primeramente descrito en 1809 por Link, donde se agrupaban un tipo de hongos ascomicetos saprofitos, endófitos y en ocasiones patógenos de plantas. Históricamente se han asociado a enfermedades en cultivos, sin embargo, se sabe que la mayoría de las especies son habitantes de suelo no patógenas. La clasificación taxonómica de *Fusarium* en el pasado se encontraba limitada, por la insuficiencia de características diferenciales entre las especies del género. Por lo mismo, su clasificación se ha desarrollado tanto por enfoques morfológicos, biológicos y filogenéticos. Desde un enfoque morfológico para la diferenciación de especies, el tamaño, forma y color de estructuras reproductivas, tales como clamidosporas, micro y macroconidios son las características de estudio. La clasificación biológica se basa en la capacidad de generar estructuras sexuales, siendo la cruzada indicio de pertenencia a la misma especie. En el presente, la secuenciación de uno o varios genes, es la técnica más robusta para el establecimiento de relaciones filogenéticas (Leslie y Summerell, 2013)

En la actualidad una de las clasificaciones aceptadas, constituye al género *Fusarium* como un grupo comprendido por 20 complejos de especies y nueve

linajes monotípicos, entre los que se encuentran el complejo de especies *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* (Van Diepeningen, y col. 2014). Refiriéndose a un complejo de especies, como la agrupación de poblaciones con suficientes características distintivas para ser categorizadas como especies, pero que no cuentan con aislamiento reproductivo entre ellas (Dongzhen y col., 2020).

2.4.3. Morfología macroscópica y microscópica

Fusarium es un hongo filamentoso que crece en forma de micelio. Dependiendo del tipo de medio de cultivo y la especie, las características morfológicas observables pueden cambiar. En agar papa-dextrosa (APD), el micelio crece con forma algodonosa de color blanco. Conforme la maduración y la producción de esporas, sobre el micelio se puede generar un tejido en forma de almohadilla blanca. Dependiendo de la especie, el tamaño y forma de la colonia varía, y puede tener pigmentaciones moradas, rosadas, amarillas, marrones, blancas o rojas (Figura 3). En plantas enfermas, se puede observar en forma de tejido muerto de color marrón o negro, principalmente en heridas en pudrición cerca del tallo, en raíz o mediante un corte transversal del tallo o peciolo (Villalobos Arámbula, 2020).

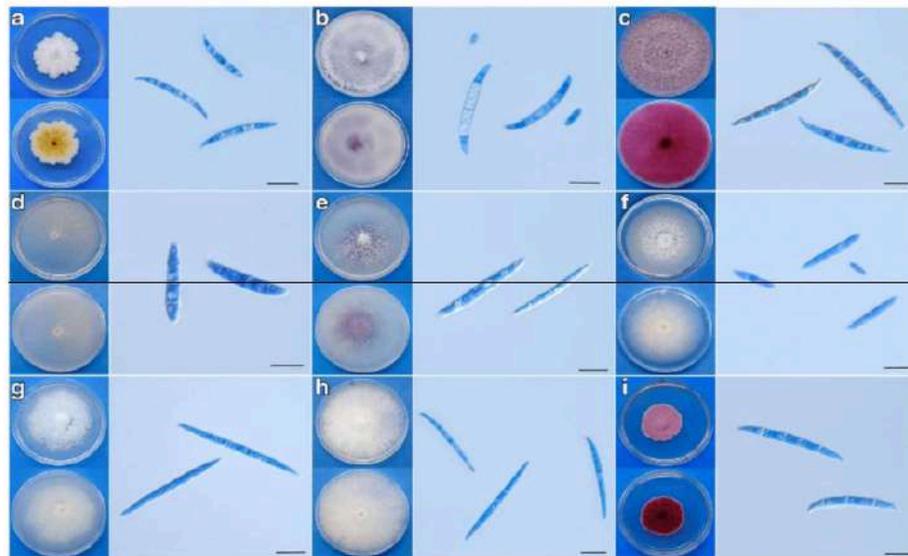


Figura 4. Colonias de diferentes *Fusarium* cultivados en APD. a) *Fusarium equiseti*; b) *Fusarium oxysporum*; c) *Fusarium graminearum*; d) *Fusarium solani*; e) *Fusarium comune*; f) *Fusarium verticillioides*; g) *Fusarium proliferatum*; h) *Fusarium fujikuroi*; i) *Fusarium avenaceum*. (Mokobi, 2020).

Todas las especies de *Fusarium* forman esporodoquios, una estructura asexual de forma ramificada, consistente en la agrupación de conidióforos, cortos, simples o ramificados. En el esporodoquio se desarrollan los macroconidios, un tipo de espora en forma de canoa, cristalina y septada. Bajo ciertas condiciones, muchas de las especies pueden producir un tipo de espora especializada llamada microconidio, de forma ovalada, fusiforme o clavada, que tiende a crecer en cadenas cortas o largas (Figura 4). Bajo condiciones adversas, puede producir clamidosporas, morfológicamente esta cuenta con una pared celular gruesa, que puede ser rugosa o lisa (Villalobos Arámbula, 2020.).

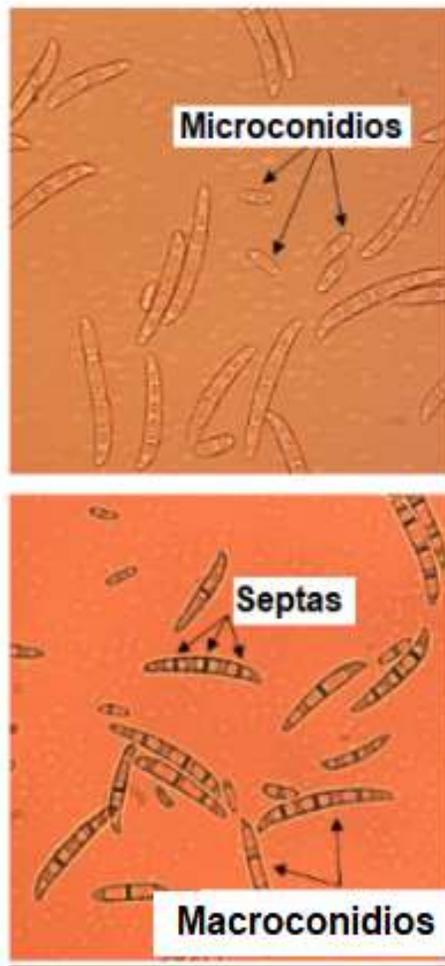


Figura 5. Morfología de diferentes estructuras de *Fusarium solani* vistas mediante microscopio óptico (Adaptado de Porter y col., 2014).

2.5. La marchitez vascular del tomate

La marchitez vascular, junto con la pudrición de raíz y corona, se consideran las enfermedades más relevantes económicamente y, por lo tanto, más estudiadas en el tomate. Las pérdidas que estas enfermedades pueden causar en el cultivo son muy elevadas, desde un 45 hasta un 90% de la cosecha (Bawa, 2016). Se apunta al género *Fusarium* como el principal agente causal de dichas enfermedades, el cual puede permanecer latente en suelos contaminados hasta por más de 6 años. Entre los síntomas asociados a este padecimiento se reporta la hiponastia de las hojas, decoloración de las nervaduras foliares, clorosis en hojas a

nivel de la zona basal, medial y apical del tallo, necrosis del foliolo (Figura 5) (Srinivas y col., 2019). Además, se reportan daños en el ápice meristemal, decoloración vascular del tallo (Figura 6) y el fenómeno de estrangulación vascular, caracterizado por una reducción del grosor del pecíolo a unos pocos centímetros del tallo (Ramírez Cariño y col., 2020).



Figura 6. Marchitez del tomate en campo (Srinivas y col., 2019).



Figura 7. Decoloración y necrosis vascular en tomate causada por *F. oxysporum* f. *sp. Lycopersicii* (Adaptado de Okungbowa y Shittu, 2012).

2.5.1. Mecanismo de infección de *Fusarium* spp.

El género *Fusarium*, empieza su ciclo mediante la germinación de clamidosporas en suelo, dicha germinación está mediada por señales emitidas por raíces de plantas afines, lo que lleva a la colonización de la superficie radicular junto a la penetración de las hifas, empezando la degradación de las barreras físicas, hasta la colonización del xilema. Durante el proceso de infección, existen diferentes adaptaciones por parte del hongo, que incluyen la secreción de

fitotoxinas y otros factores de virulencia. Al encontrarse en el xilema, el hongo sufre cambios fisiológicos para la formación de microconidios, estos son capaces de migrar por el tejido vascular, lo que últimamente lleva a su proliferación y esporulación por los demás tejidos vegetales (Pietro y col., 2003; Chitwood Brown y col., 2021). Adicionalmente se ve un efecto tapón en los vasos adyacentes del parénquima, causado por la acumulación de micelio y esporas, privando a la planta de un sistema circulatorio, lo que termina en la muerte de la planta. Los microconidios y macroconidios son las principales esporas meióticas clonales o recombinantes, que germinan para la generación de micelio (HM). Por su parte, las clamidosporas son esporas con resistencia a condiciones ambientales, lo que les otorga alta permanencia en suelo en condiciones desfavorables, dificultando el uso de suelo para cultivo una vez ha sido contaminado (Vásquez Ramírez y col., 2017).

2.5.2. Métodos microbiológicos de detección de *Fusarium*

Debido a las características sintomatológicas y del ciclo infectivo, la diagnosis de infección ha sido tradicionalmente realizada mediante aislamiento de tejido enfermo y cultivo *in vitro*. La identificación a nivel especie se ha limitado a la diferenciación morfológica de esporas asexuales (microconidios, macroconidios y clamidosporas) o sus estructuras (conidióforos) (Pietro y col., 2003; Wiam y col., 2019). Por estas razones, su identificación es altamente dependiente de condiciones de cultivo que permitan la formación de conidios uniformes y bien definidos. Entre los medios regularmente usados para el crecimiento de *Fusarium* spp., están el agar papa dextrosa (APD), el agar de hoja de clavel, el agar Spezieller Nährstoffarmer, el agar sintético pobre en nutrientes (Synthetic nutrient-poor agar), entre otros; sin embargo, estos no son aptos para la diferenciación entre especies, debido a la formación de conidios no uniformes, de forma variada y de carácter degenerativo en la cepa. Esto ha llevado al desarrollo de medios de cultivo especializados para la formación de conidios de calidad, aun así, su uso se ve limitado a ciertas especies del género (Fisher y col., 1982). La gran diversidad y distribución geográfica de las especies de *Fusarium*, aunado a su comportamiento variable respecto a su medio de cultivo, hacen inviable la práctica

microbiológica para su clasificación taxonómica o pruebas de patogenicidad. Así mismo, el muestreo destructivo necesario para la detección de infección en planta, hacen pertinente el desarrollo de métodos de diagnóstico temprano de mayor rapidez y sensibilidad, que permitan el oportuno tratamiento del patógeno (Moura y col., 2020).

2.6. Técnicas de diagnóstico molecular

El avance de los conocimientos respecto al funcionamiento de las partes y funciones de la maquinaria celular, ha llevado el desarrollo de nuevas técnicas y metodologías para la identificación y clasificación de organismos. Entre ellos, técnicas como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés, ELISA), las variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación Southern y las herramientas de secuenciación masiva, ha demostrado su valor como técnicas de vanguardia por su mayor precisión y rapidez (Martin Souto y col., 2020; Hariharan y Prasannath, 2021)

2.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés) es uno de los métodos usados para la identificación y cuantificación de material genético. Así mismo, es considerada como una técnica robusta para el diagnóstico de enfermedades causadas por fitopatógenos (Benavides López, 2019). Se diferencia de la PCR tradicional, por su capacidad no solo para la identificación de genes de interés, sino también por ser capaz de calcular la cantidad absoluta del gen, mediante la correlación a un control. Estas características se logran mediante la modificación de los nucleósidos trifosfato (NTFs) usados para la reacción de elongación. Dicha modificación consiste en la adición de una sonda fluorescente, que emite sólo cuando los NTFs reaccionan para la formación de una cadena simple o doble. La señal fluorescente es monitoreada durante el proceso de ciclado, para su interpolación en una curva de calibración, generada mediante la medición de señal de un control con una concentración de gen conocida, permitiendo el cálculo de la cantidad absoluta del

gen en muestra (Thornton y Basu, 2015). Esta modificación provee a la técnica de un alto grado de sensibilidad, permitiendo la detección de fitopatógenos en estadios latentes, no sintomáticos.

2.6.2. Detección molecular de hongos fitopatógenos

La identificación molecular de hongos generalmente se hace mediante la secuenciación de los espaciadores transcritos internos (internal transcribed sequence (ITS) de los genes ribosomales nucleares. Sin embargo, en el género *Fusarium* los ITS se encuentran altamente conservados, lo que no permite la identificación a nivel especie. Por lo que para *Fusarium* se ha estandarizado el reconocimiento de las secuencias para el gen del factor de traducción de elongación (TEF-1 α) y de las secuencias para las subunidades 1 y 2 de la ARN polimerasa II (RPB1 and RPB2) (Van Diepeningen y col., 2014).

La técnica de qPCR se ha usado en múltiples casos para el estudio de las interacciones huésped-patógeno, durante el ciclo de vida de la planta. Por ejemplo: Se cuantificó la cantidad de ADN del patógeno, *Verticillium dahliae* en diferentes cultivares de tomate durante el ciclo productivo. En el estudio se encontraron diferencias en la cantidad de patógeno, en distintos niveles de tejido y del estadio del cultivar (Gayoso y col., 2007). Así mismo, en plantas de sandía, también se ha logrado correlacionar la presencia de diferentes cantidades de ADN de *F. oxysporum*, con diferentes grados de sintomatología (Zhong y col., 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. General

Cuantificar y monitorear cepas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en cultivo de *Lycopersicum esculentum*.

3.2. Específicos

- Cuantificar la concentración poblacional de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en suelo, en diferentes estadios fenológicos de *Lycopersicum esculentum*, mediante métodos moleculares y tradicionales.
- Correlacionar la presencia de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* con cambios en la temperatura, pH y conductividad del suelo.
- Correlacionar sintomatología relacionada a enfermedad vascular del tomate, con tamaño poblacional de cepas infectivas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en suelo.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

4.1.1. Material biológico

Las cepas que se usaron fueron *Fusarium Oxysporum* y *Fusarium Solani*. Las mismas fueron facilitadas por un invernadero particular ubicado en México. Donde fueron identificadas y aisladas debido a su capacidad infectiva y asociación con pérdida de cultivos en *Lycopersicum esculentum* Mill.

4.1.2. Reactivos y medios de cultivo

Medio PDA (BD Bioxon).

Semillas de *Lycopersicum esculentum* Mill (Vita).

Suelo proveniente del invernadero donde fueron aisladas las cepas (Tierra negra mezclada con vermiculita).

Tween 20 al 10%.

Etanol al 70 %.

Hipoclorito de sodio al 1 %.

Peptona de caseína 1%.

Rifampicina (Rifadin).

Fertilizante comercial para hortalizas (Root Base vademecúm).

4.2. Métodos

4.2.1. Preparación y mantenimiento de material vegetal

Se prepararon plántulas mediante la germinación de semilla comercial de *Lycopersicum esculentum* Mill en semilleros de charola. Las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 4 pulgadas con suelo agrícola como sustrato, donde fueron inoculadas a la cuarta semana después del trasplante. El lugar donde se

realizó el experimento fue en el sombreadero del laboratorio de fermentados y fisiología de frutas y hortalizas, de la facultad de química, en el Centro Universitario de la Universidad Autónoma de Querétaro.

El esquema de riego se hizo conforme fuera necesario, manteniendo la humedad del suelo sobre el 90%, mediante un tensiómetro IRROMETER LT. El esquema de fertilización se hizo con Root Base vademecúm, semanalmente, aplicado a nivel de suelo y a una concentración de 0.25 mL de producto/L de agua de riego.

4.2.2. Diseño del experimento

Se prepararon 30 plantas en macetas (unidades experimentales). Se tuvieron tres tratamientos conformados por 10 plantas en cada uno. Los tratamientos correspondieron a: control (CT) (sin inóculo), *Fusarium oxysporum* (FO) y *Fusarium solani* (FS). Se usó un diseño de bloques completamente al azar, con tomas de 5 muestras para los ensayos de evaluación de patogenicidad en plantas.

4.2.3. Muestreo

El muestreo consistió en la toma de 10 g de suelo por réplica. Estos se tomaron mediante el uso de una barrena agrícola, a 5 cm del tallo y hasta el fondo de la maceta, por lo que la muestra incluyó suelo y raíz de la planta.

El esquema de muestreo consistió en toma de suelo cercano a raíz a partir de la tercera semana del trasplante. A partir de la primera toma, un segundo muestreo se realizó cuatro semanas después, posteriormente se realizaron tomas de muestra en intervalos de tres semanas.

4.2.4. Producción de inóculo

Para la preparación de inóculo se activaron las cepas *Fusarium Oxysporum* y *Fusarium Solani*, mediante el sembrado de un disco de agar del cultivo madre, de 1 cm de diámetro. El sembrado se hizo en placas de Petri con APD. El cultivo se

dejó por 6 días a 25°C, o hasta esporular. El punto de esporulación se tomó, conforme se apreció un torno del color del micelio, de blanco a púrpura. Posteriormente, se realizó un raspado con una asa bacteriológica y 10 mL de una solución de tween 20 al 10%. La suspensión después se filtró con papel filtro para la eliminación de restos micelares. Se contó la concentración de esporas mediante el uso de una cámara Neubauer, y se prepararon soluciones de 10³ esporas por mL (Tapia y Amaro, 2014).

4.2.5. Inoculación de los tratamientos

La inoculación de los tratamientos se hizo inmediatamente después de tomada la primera muestra, la misma consistió en una aplicación de 10 mL a nivel raíz, de la solución de esporas correspondiente. La inoculación se realizó dentro de un hoyo formado mediante una barrena desinfectada con etanol 70%, a unos 10 cm de profundidad, y donde se haya realizado lesión de la raíz por la penetración de la barrena.

4.2.6. Evaluación de patogenicidad en plantas

4.2.6.1. Análisis sintomático

Para el análisis sintomático asociado al género *Fusarium*, se consideraron hiponastia de las hojas, decoloración de las nervaduras, clorosis en hojas a nivel de la zona basal, medial y apical del tallo, y necrosis del foliolo (Di Pietro y col., 2003), adicionalmente daño del ápice meristemal, estrangulación vascular y decoloración vascular del tallo (Ramírez Cariño y col., 2020). Para el uso estadístico de los datos, se generó un índice de severidad de la enfermedad, la escala consistió en 4 niveles elegidos respecto al número de sintomatología observable. Un nivel 0 sin síntomas, un nivel 1 de 1-3 síntomas, un nivel 2 de 3-6 síntomas, un nivel 3 de más de 6 síntomas o muerte de la planta (Rep y col., 2004).

Conforme al esquema de muestreo, se realizó la documentación fotográfica de 5 plantas aleatorias. Las tomas se hicieron teniendo como objetivo la planta

completa, zona basal, medial y apical. Asegurando que se capturarán las características botánicas propias de las hojas.

4.2.6.2 Análisis molecular

Se pesaron 9 g de suelo por muestra, los cuales se colocaron en tubos de Falcon estériles de 50 mL, y se congelaron hasta su posterior tratamiento. Las muestras fueron sometidas a extracción de ADN mediante el kit Zymo Research (Quick-DN Fungal/Bacterial Miniprep Kit), posteriormente se verificó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los cebadores usados para la amplificación de las muestras FO y FS, fueron los de una proteína no caracterizada y Tef-1 respectivamente, los cuales fueron diseñados y optimizados por una empresa particular. Como control positivo se usó 2.5 uL (50ng/uL) de ADN, directo de un crecimiento en APD de las cepas.

4.2.6.3. Análisis microbiológico

Por muestra se suspendió 1 g de suelo en 9 mL de solución de peptona de caseína 1%, y se realizaron tres diluciones decimales seriadas (10^{-3}) que se usaron para cultivo en placa de Petri. El medio de cultivo consistió en APD con 50 ppm de rifampicina, donde se inoculó con 0.1 mL, se dispersaron por placa mediante la adición de perlas de vidrio estériles, y se agitaron por 5 minutos. Posteriormente siendo cultivadas por cuatro días a 25°C.

Por cada placa se realizó un conteo de hongos y levaduras. El criterio de identificación para hongos fue de formación de colonias rizomorfas sin o con formación de esporas (Granados Montero, 2018). Para levaduras se consideraron colonias aisladas, cremosas, sin formación de esporas (Mendoza, 2005).

4.2.6.4. Identificación de *Fusarium* a nivel de rizósfera y raíz

Se tomaron muestras a nivel de raíz y rizosfera para la identificación espacial de *Fusarium* en plantas. Para la preparación de la muestra de rizosfera, se procedió

a una colecta destructiva de la planta, donde se arrancó del suelo y se tomó suelo cercano a la raíz, mediante un ligero sacudimiento. El procedimiento para plaqueo fue el mismo que en la sección Identificación morfológica y conteo de muestra.

Para la cuantificación en raíz, se sometió la raíz a lavado bajo flujo de agua hasta eliminar el suelo adherido. Después, las muestras se lavaron por 1 minuto en solución de hipoclorito de sodio 1%, para un posterior enjuague en agua destilada estéril. En bolsas de polietileno estériles, se pesó 1 g de raíz por muestra, se les añadió 9 mL de solución de peptona de caseína 1%, y se les agitó y raspó durante 1 minuto en la bolsa de polietileno. De la solución madre se prepararon diluciones seriadas 10^{-1} y 10^{-3} , y se sembró según el procedimiento antes descrito.

4.2.6.5. Medición de variables fisicoquímicas

La medición de pH, temperatura y conductividad eléctrica, se hizo bajo el mismo esquema cronológico que el de toma de muestra. Se usó la sonda de pH y temperatura HI981030 GroLine Soil pH Tester, y el conductímetro CE SOIL TEST GROLINE HI98331, ambos de Hanna instruments.

4.2.7. Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se usó el software Minitab 21 (Minitab, 2021). Los datos cuantitativos se procesaron con un análisis ANOVA de una vía, seguido del método de Tukey. Esto permitió establecer si existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. El valor para la tasa de error (P) fue $P < 0.05$. Los datos categoricos se procesaron mediante la prueba χ^2 , tomando igualmente un valor para la tasa de error $P < 0.05$ (Niño Sánchez y col., 2016).

4.2.8. Manejo de residuos y de material biológico

Los residuos generados, correspondientes al suelo agrícola, tejido vegetal muerto y los cultivos microbianos, fueron esterilizados mediante tratamiento térmico en autoclave, a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ (15 psi) por 1 hora (Ochieno, 2022).

5. RESULTADOS

5.1. Índice de enfermedad

Los monitoreos se realizaron hasta la acumulación de 6 síntomas o la muerte de la planta (nivel 3 del índice de enfermedad), lo cual culminó para todos los tratamientos en el monitoreo 3, debido a que todas las plantas del experimento cumplieron dicha condición (Figura 8).

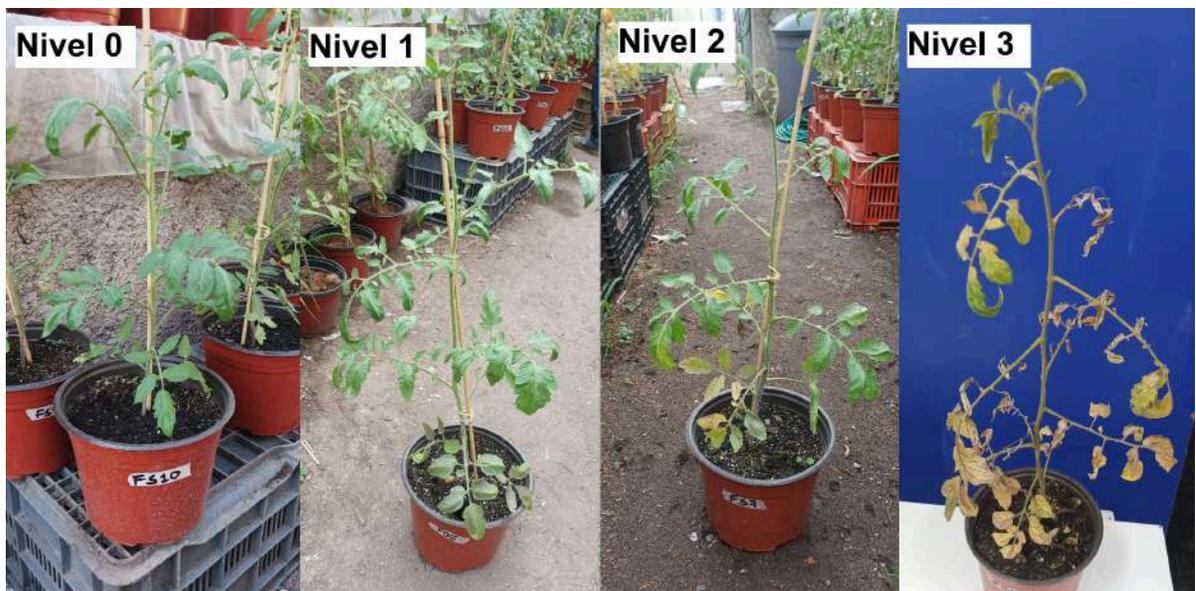


Figura 8. Plantas de tomate en diferentes niveles del índice de enfermedad.

En los cuadros 2, 3 y 4, se muestran los conteos observacionales del índice de enfermedad, correspondientes a las plantas muestra de los tratamientos CT, FO y FS, en los monitoreos 1, 2 y 3.

Cuadro 2. Observaciones de plantas correspondientes a diferentes niveles del índice de enfermedad en los tratamientos CT, FO y FS. Monitoreo 1.

Tratamiento	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
CT	4	1	0	0
FO	1	4	0	0
FS	2	3	0	0

Cuadro 3. Observaciones de plantas correspondientes a diferentes niveles del índice de enfermedad en los tratamientos CT, FO y FS. Monitoreo 2.

Tratamiento	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
CT	5	0	0	0
FO	0	1	3	1
FS	0	1	1	3

Cuadro 4. Observaciones de plantas correspondientes a diferentes niveles del índice de enfermedad en los tratamientos CT, FO y FS. Monitoreo 3.

Tratamiento	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
CT	0	0	0	5
FO	0	0	0	5
FS	0	0	0	5

La pruebas χ^2 arrojó para el monitoreo 1 y 3, que el nivel de enfermedad observado era independiente del tratamiento. En la misma prueba, para el monitoreo 2 si se aprobó la dependencia del cuadro sintomático observable al tratamiento aplicado.

Para la diferenciación entre tratamientos, la prueba Tukey arrojó para el monitoreo 2, una diferencia significativa entre la media del tratamiento CT, a la las medias del tratamiento FO y FS, teniendo FO y FS no diferenciación entre ellos.

5.2. Análisis molecular

Para el monitoreo 1, previo a inoculación de los tratamientos, no se realizó qPCR de las muestras recolectadas. Para el monitoreo 2, la qPCR no tuvo amplificación para los cebadores de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en los tratamientos FO y FS. Para el tratamiento CT hubo una amplificación con los cebadores de *Fusarium solani* para la planta CT-8, con $cQ= 35.21$ y $e=0.80$.

Para el monitoreo 3, hubo amplificaciones en todos los tratamientos. Los mismos se desglosan en el cuadro 5, así mismo, se incluyen los resultados obtenidos para los diferentes tipos de muestras analizados. Para el control positivo de los cebadores de *Fusarium oxysporum* se obtuvieron valores máximos de $cq= 19.3$, $e= 0.86$ y $r^2=0.998$. Para el control positivo de los cebadores de *Fusarium solani* se obtuvieron valores de $cq= 18$, $e=1.01$ y $r^2=0.996$.

De los datos obtenidos del monitoreo 3, el método Tukey no arrojó significancia estadística para una diferencia entre las medias de los ciclos de amplificación de los tratamientos, y entre amplificaciones dependientes del tipo de muestra.

Cuadro 5. Valores de cQs obtenidos de las diferentes muestras durante el monitoreo 3.

Cebadores	Muestra	cQ (Raíz + suelo)	cQ (Rizosfera)	cQ (Raíz)	cQ (Suelo)
<i>F. oxysporum</i>	CT1	35.47	36.32	0	0
<i>F. oxysporum</i>	CT10	0	0	0	0
<i>F. oxysporum</i>	CT5	0	0	0	0
<i>F. oxysporum</i>	F03	0	0	0	0
<i>F. oxysporum</i>	F05	0	0	0	0
<i>F. oxysporum</i>	F07	32.53	0	0	0
<i>F. oxysporum</i>	FS4	0	0	33.67	0
<i>F. oxysporum</i>	FS7	35.93	0	0	0
<i>F. oxysporum</i>	FS8	0	0	32.39	0
<i>F. solani</i>	CT1	34.22	0	0	0
<i>F. solani</i>	CT10	36.5	34.28	0	0
<i>F. solani</i>	CT5	0	35.45	0	0
<i>F. solani</i>	F03	0	0	0	0
<i>F. solani</i>	F05	0	0	35.01	0
<i>F. solani</i>	F07	34.41	0	0	0
<i>F. solani</i>	FS4	0	0	0	0
<i>F. solani</i>	FS7	35.05	0	0	0
<i>F. solani</i>	FS8	0	0	0	0

5.3. Análisis microbiológico

Se muestran los resultados correspondientes al conteo en placa de Petri de las muestras de suelo en los diferentes monitoreos (Figura 9, 10 y 11). Se realizó el conteo para poblaciones de hongos y levaduras, además del conteo de colonias presuntivas de *Fusarium* spp. Las colonias asociadas a *Fusarium*, se consideraron como aquellas que en el agar PDA con rifampicina formaban un micelio blanco

algodonoso, seccionado en halos y en ocasiones con ligera coloración rosada (Figura 7).

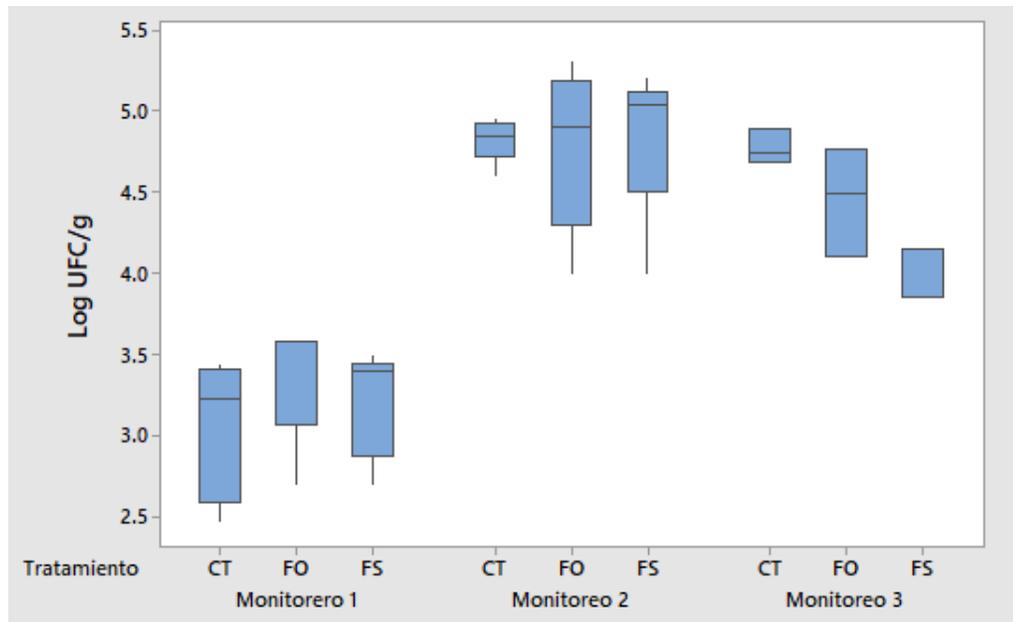


Figura 9. Conteos poblacionales de hongos en muestra de suelo durante los diferentes monitoreos.

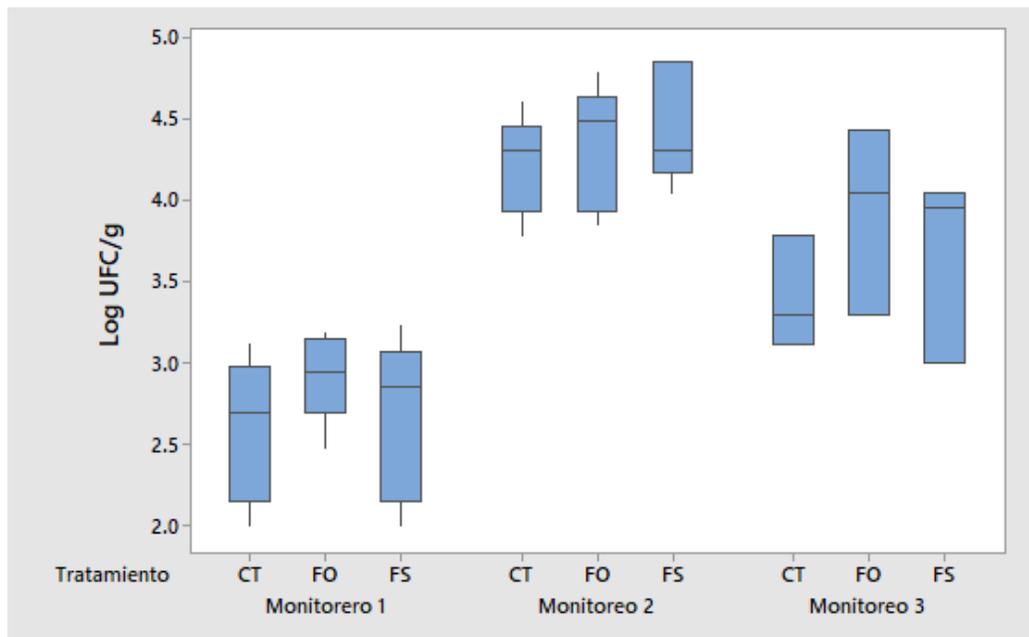


Figura 10. Conteos poblacionales de levaduras en muestra de suelo durante los diferentes monitoreos.

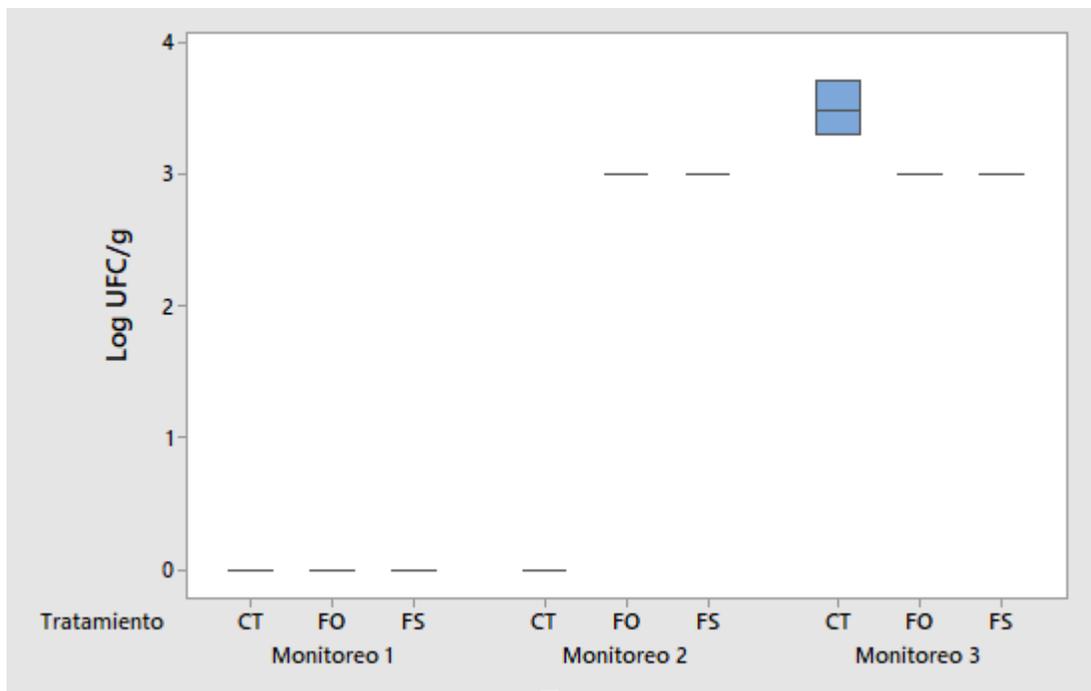


Figura 11. Conteo de colonias presuntivas de *Fusarium* spp. de muestras de suelo

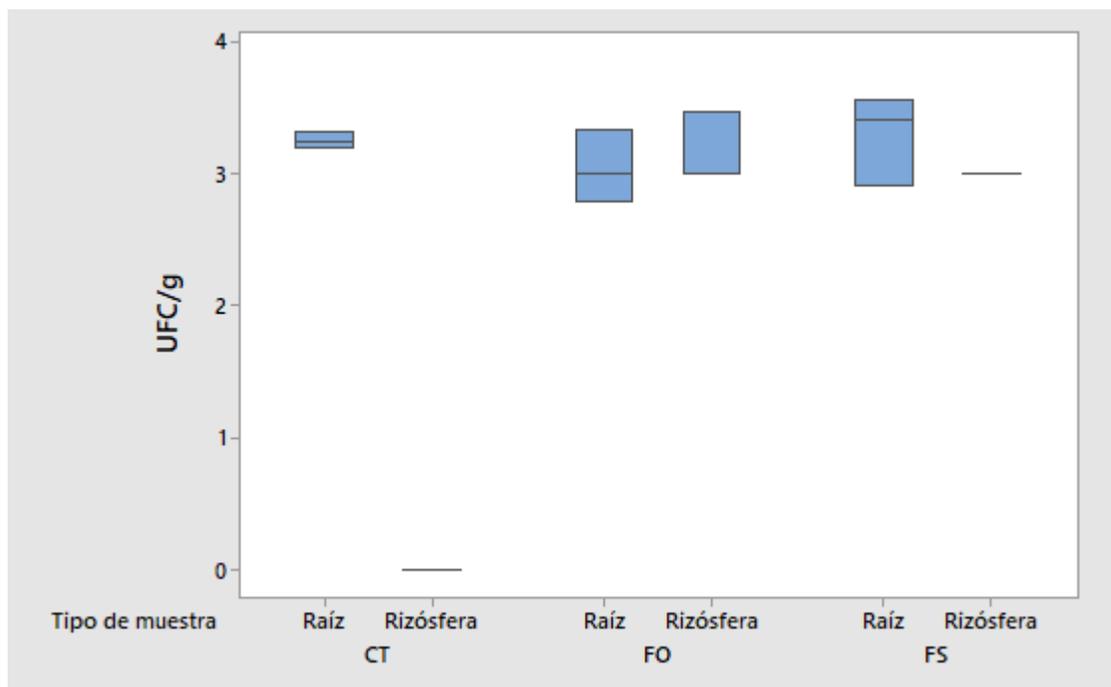


Figura 12. Conteo de colonias presuntivas de *Fusarium* spp. en rizosfera y raíz durante el monitoreo 3.

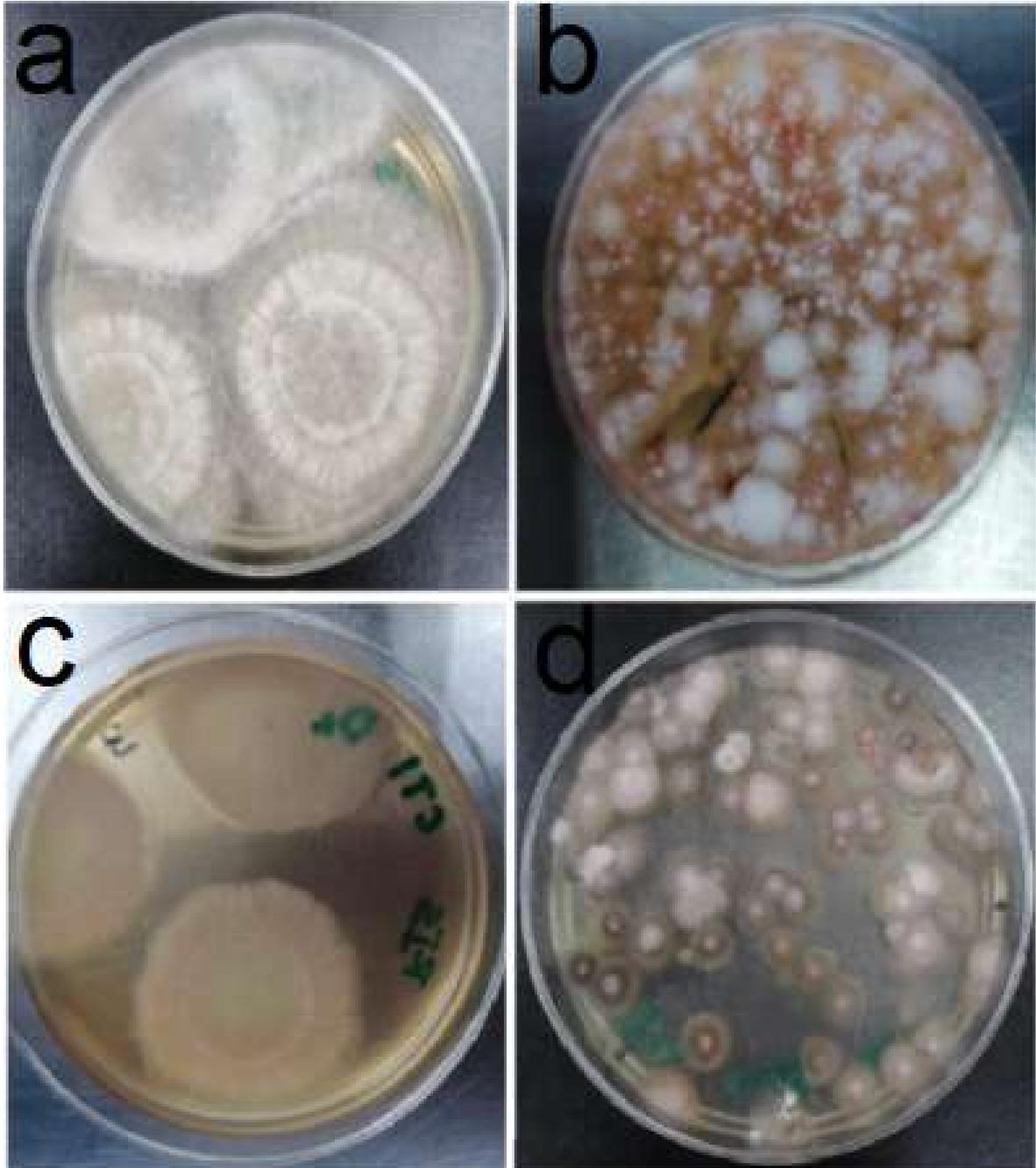


Figura 13. Colonias asociadas a crecimiento de *Fusarium* spp. a) Inóculo de raíz de planta CT-4; b) Inóculo de rizosfera de planta FO-7; c) Inóculo de raíz de planta CT-1; d) Inoculo de raíz de planta FS-5.

En las figuras 14 y 15, se muestran los resultados obtenidos de los conteos poblacionales de cultivos de muestras de rizósfera y raíces.

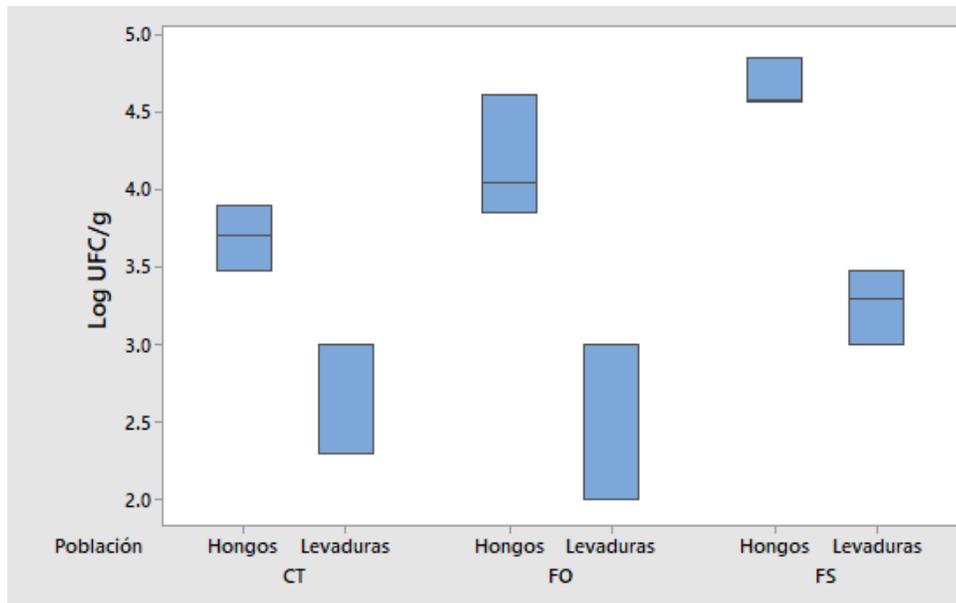


Figura 14. Conteos poblacionales de hongos y levaduras de los tratamientos CT, FO y FS en muestra de rizosfera durante el monitoreo 3.

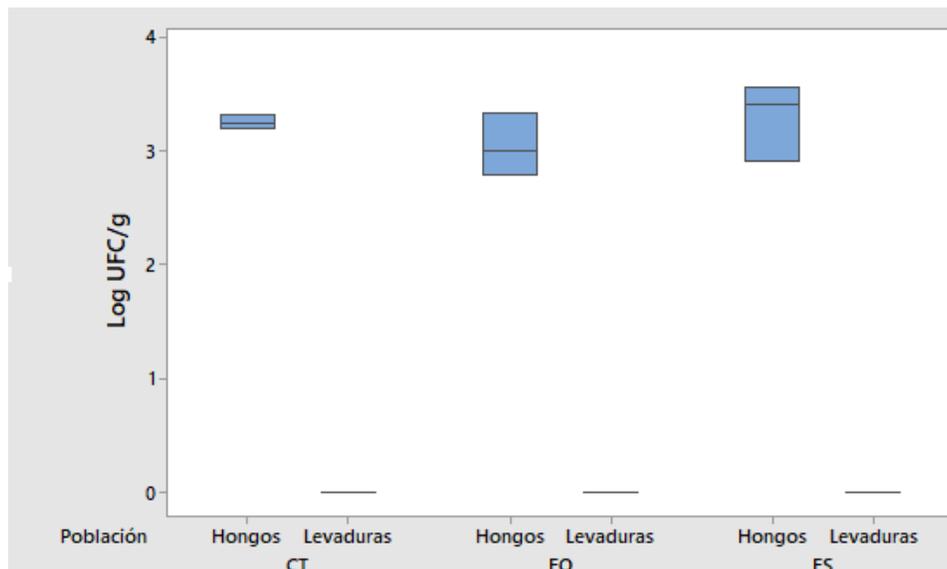


Figura 15. Conteos poblacionales de hongos y levaduras de los tratamientos CT, FO y FS en muestra de raíz durante el monitoreo 3.

Para el conteo de UFC de hongos, se encontró una diferencia significativa entre las medias CT-FS en el monitoreo 3 en muestras de suelo y de rizosfera. Exceptuando lo anterior, no se encontraron diferencias significativas para los conteos de UFC de hongos y levaduras, para el monitoreo 1 y 2, y entre tratamientos CT-FO y FO-FS en el monitoreo 3.

5.4. Análisis fisicoquímico

Se muestran los resultados correspondientes al análisis de las variables fisicoquímicas durante los diferentes monitoreos (Cuadro 11, 12 y 13).

Cuadro 6. pH del suelo de los diferentes tratamientos en diferentes monitoreos.

Tratamiento	Monitoreo 1	Monitoreo 2	Monitoreo 3
CT	6.4 ± 0.143^a	6.7 ± 0.14^a	6.6 ± 0.17^a
FO	6.3 ± 0.16^a	6.6 ± 0.41^a	6.5 ± 0.40^a
FS	6.4 ± 0.18^a	6.6 ± 0.36^a	6.3 ± 0.07^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Se muestran valores de la media con desviación estándar.

Cuadro 7. Conductividad eléctrica (mS/cm) del suelo de los diferentes tratamientos en diferentes monitoreos.

Tratamiento	Monitoreo 1	Monitoreo 2	Monitoreo 3
CT	0.11 ± 0.04^a	0.12 ± 0.08^a	0.03 ± 0.02^a
FO	0.07 ± 0.08^a	0.12 ± 0.04^a	0.12 ± 0.04^a
FS	0.05 ± 0.03^a	0.21 ± 0.05^a	0.10 ± 0.06^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Se muestran valores de la media con desviación estándar.

Cuadro 8. Temperatura (°C) del suelo de los diferentes tratamientos en diferentes monitoreos.

Tratamiento	Monitoreo 1	Monitoreo 2	Monitoreo 3
CT	27.94 ± 1.09 ^a	20.1 ± 1.16 ^a	28.1 ± 1.14 ^a
FO	26.08 ± 1.29 ^a	21.3 ± 0.58 ^a	27.3 ± 0.67 ^a
FS	26.36 ± 0.67 ^b	21.0 ± 0.24 ^a	27.2 ± 0.68 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Se muestran valores de la media con desviación estándar.

5.4.1. pH

Los valores p calculados fueron 0.344, 0.730 y 0.383 , para el monitoreo 1, 2 y 3 respectivamente. El análisis Tukey con parámetros ajustados para grados de libertad= 0.05, categorizó a todos los tratamientos en todos los muestreos, en el mismo grupo. Determinando que no hay asociación significativa entre el pH y un tratamiento dado.

5.4.2.. Conductividad eléctrica

Los valores p calculados fueron 0.225, 0.05, 0.119 para el monitoreo 1, 2 y 3. Bajo el mismo criterio estadístico se determinó que no hay asociación significativa entre la conductividad eléctrica y un tratamiento dado.

5.4.3. Temperatura

Los valores p calculados fueron 0.033, 0.054 , 0.448 para el monitoreo 1, 2 y 3. La prueba Tukey arrojó para el muestreo 1, una diferencia significativa entre las medias de las temperaturas del tratamiento CT y FO, sin embargo, sin diferenciación entre las medias de tratamientos CT-FS, y FS-FO. En los monitoreos 2 y 3, no hubo asociación entre la temperatura y ningún tratamiento dado.

5.4. Identificación de *Pseudomonas* spp.

Debido a la presencia de sintomatología presuntiva del género *Pseudomonas*, en plantas de diferentes tratamientos durante el monitoreo 2 y 3, se realizó una qPCR para la identificación de *Pseudomonas* spp. y *Pseudomonas corrugata*. Los resultados de qPCR, arrojaron para ambos monitoreos, presencia de *Pseudomonas* spp. en todas las plantas. No hubo amplificación en ninguna muestra para *Pseudomonas corrugata*. En el monitoreo 3, mediante una prueba Tukey se encontró una diferencia significativa en los cQs de muestras de raíz, respecto a los demás tipos de muestra. Adicionalmente se realizaron cortes transversales del tallo de plantas con formación de raíces adventicias, con el objetivo de confirmar la presencia de síntomas de presencia bacteriana asociados a necrosis vascular (Figura 17). Sin embargo, el tejido interno no mostró síntomas asociados a un estado de infección avanzado de *Pseudomonas* spp. (Figura 16).

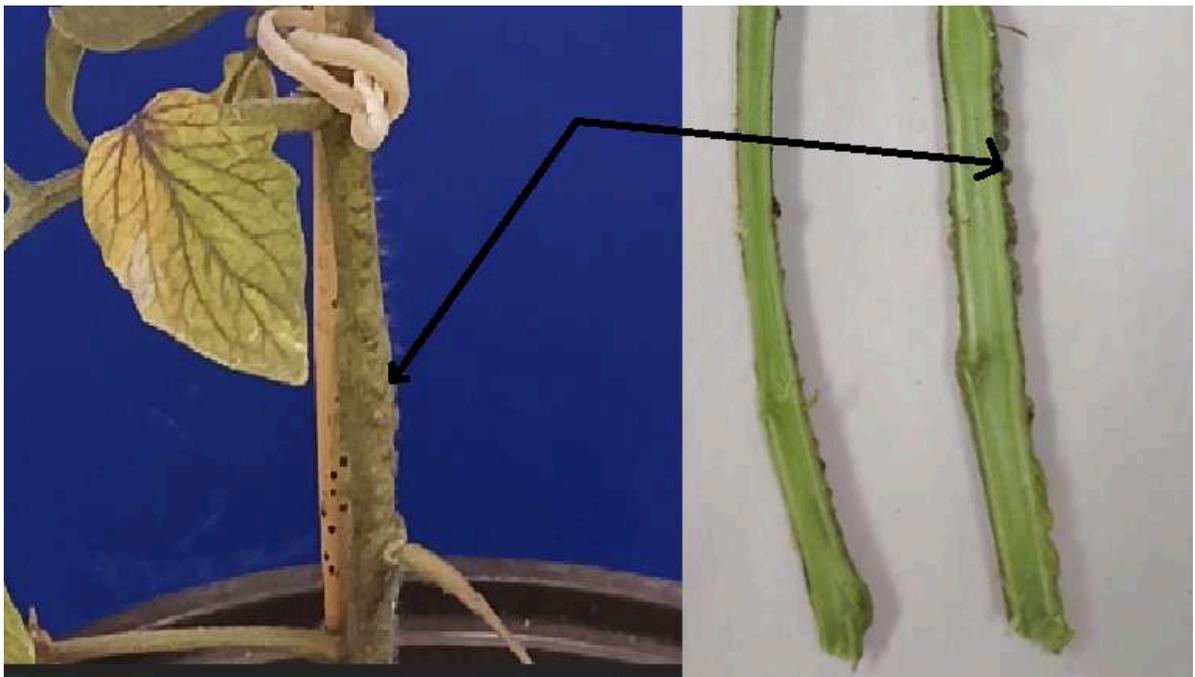


Figura 16. Corte transversal del tallo de planta positiva para *Pseudomonas* spp. en raíz. Se señalan las presuntivas formaciones de raíces adventicias.

6. Discusión

6.1. Monitoreo de infección causada por *Fusarium* spp.

Hasta la semana 7 después del trasplante (monitoreo 2), no se apreciaron cuadros sintomáticos que indicaran infección por presencia de *Fusarium* spp. u otro patógeno. Todas las plantas se encontraban en un índice de enfermedad 0 u 1, por la observación de ligeros amarillamientos en los folíolos basales, o por epinastia en las hojas superiores de la planta. Por lo que los síntomas en esa etapa bien podrían interpretarse como comportamientos fisiológicos de plantas no enfermas, asociados a muda de hojas senescentes para el amarillamiento, o bien pérdida de turgencia o espinescencia asociada a exceso de incidencia solar (Vila, H. 2011). Así mismo, la manifestación de estos síntomas, se pudo haber debido al esquema de fertilización, el cual pudo ser insuficiente debido a la solución nutritiva escogida. El Root Base (vademecúm) es una solución nutritiva a base de algas, por su formulación la concentración de nutrientes resulta inferior a la usada en otras soluciones nutritivas comúnmente utilizadas para el cultivo de tomate, tales como la solución Steiner o la solución Hoagner (Martín Hernández, y col. 2012).

La manifestación de la enfermedad, fue evidente a partir del tercer mes para los tratamientos FO y FS. Es durante este periodo, donde el comportamiento de los tratamientos es acorde al cuadro sintomatológico esperado, es decir, mantenimiento o no aparición de síntomas para el tratamiento no inoculado (CT), y manifestación de síntomas marcados y atribuibles a patógenos para los inoculados. Para los tratamientos FO y FS, los amarillamientos eran más intensos, y estaban situados en zona basal y medial, la espinescencia de folíolos se observaba agravada, y la aparición de síntomas como la reducción del peciolo en hojas necrosadas, indicaba un evento de taponamiento vascular. Así mismo, aparecieron síntomas poco registrados en la literatura relacionada, tales como la formación de abultamientos en el tallo (interpretados como raíces adventicias), y descoloramiento

de las nervaduras a un tono morado, asociado a falta de fósforo (Srinivas y col., 2019; McGovern, 2015; Ajilogba y Babalola, 2013). El cambio en el color de las nervaduras puede ser explicado por la deficiencia nutrimental antes mencionada, sin embargo, la aparición de síntomas no asociados a *Fusarium* spp. parecía indicar la presencia de otro patógeno.

En la semana 8 después del trasplante, el agravamiento de los síntomas y diseminación de la enfermedad se observó acelerado. La mayoría de las plantas en todos los tratamientos acumularon más de 5 síntomas durante este periodo, por lo que para el monitoreo 3 (semana 10 después del trasplante), todas las plantas del experimento contaban con un nivel 4 del índice de enfermedad, teniendo un cuadro sintomático terminal o consideradas como muertas. Es durante este periodo donde más del 70% de las plantas en todos los tratamientos presentan inflorescencias, las plantas responden a los patógenos ya sea mediante la inversión de recursos para generar inmunidad, o bien enfocándose en generar estructuras reproductivas antes de sucumbir a la enfermedad (Lyons., y col., 2015). Así mismo, es conocido como los síntomas por infección de *Fusarium* spp. tienden a aparecer durante el florecimiento (Maurya., y col., 2019). Por lo que esto se plantea como una posible explicación al rápido deterioro de las plantas después del monitoreo 2.

6.2. Manejo de la PCR cuantitativa

Las amplificaciones de los controles positivos en el monitoreo 2 para los cebadores de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, tuvieron eficiencias de reacción del 0.70 y 0.81 respectivamente. En el monitoreo 3, siendo 0.86 y 1.01 de la misma manera. Para R^2 , en todos los ensayos se obtuvieron valores superiores a 0.99. Los valores de eficiencia y R^2 son usados convencionalmente como indicadores para confirmar la presencia de posibles errores sistemáticos. Entre los errores sistemáticos comúnmente encontrados en PCR, están la presencia de inhibidores de la polimerasa, el uso de cebadores no optimizados y errores técnicos asociados al pipeteo o a los reactivos. La presencia de inhibidores y de cebadores con formación de estructuras secundarias se relaciona con la pérdida de eficiencia,

esto debido a que se reduce el número de copias producidas por ciclo de la polimerasa, obteniéndose valores de luminiscencia no correspondientes a la cantidad de material genético inicial. Por otro lado, valores de R² superiores a 0.99 indican un ajuste lineal propio de la realización de diluciones correctas (Taylor, S. C., y col. 2019).

Las condiciones de ciclado fueron las mismas para los distintos muestreos, por lo que para los cebadores de *Fusarium solani*, ya que se pudieron obtener eficiencias del 100%, se descarta la posibilidad de formación de estructuras secundarias o de condiciones físicas no favorables. En los casos donde hubo eficiencias menores al 0.090 para *Fusarium solani*, se atribuye esta pérdida de eficiencia a la presencia de inhibidores, que pudieron haber estado presentes por contaminaciones. Para los cebadores de *Fusarium oxysporum* no se descarta la posibilidad de una baja eficiencia debido a la formación de estructuras secundarias, el uso de temperaturas de alineación no óptimas o la presencia de inhibidores, ya que en ninguno de los ensayos se superó el 0.90 de eficiencia.

Respecto a la obtención de ADN, no hubo diferencias significativas para el número de ciclos de una señal positiva para diferentes tipos de muestras (suelo, rizósfera y raíces). Esto indica que la cantidad de material genético relacionado a las cepas *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* se encontraba homogéneamente distribuida en las diferentes zonas de suelo, o bien, la muestra a cual se le extrajo el ADN, contenía más de 25 µg de material genético, siendo este el límite de elución especificado por el fabricante.

6.3. Identificación de *Fusarium* spp. en muestras de suelo y tejido

La identificación de las cepas de *Fusarium* mediante qPCR durante el monitoreo 2, no correspondió con lo observado en el análisis sintomático de los tratamientos, debido a la falta de amplificación en los tratamientos inoculados, y la amplificación de una sola planta de tratamiento CT para *Fusarium solani* de la muestras de suelo. Por otro lado, el análisis microbiológico sí mostró presencia de colonias de morfologías asociadas a *Fusarium* spp. pero sin el establecimiento de

la correlación estadística buscada, es decir, la presencia de las colonias observadas asociadas al fitopatógeno eran independientes al tratamiento. Asimismo, no hubo diferencia en la relación poblacional de hongos y levaduras para ninguno de los tratamientos. Por lo anterior, se estableció que los tratamientos sintomatológicamente positivos, no eran correlacionables a los análisis moleculares y microbiológicos, fallando en identificar la presencia de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en la semana 7 del cultivo después del trasplante.

Los datos obtenidos durante el monitoreo 2, plantean posibles explicaciones a lo observado, la amplificación de *Fusarium solani* en el tratamiento CT, no es inesperada debido a su condición de hongo saprófito comúnmente encontrado en suelo. En estudios filogenéticos relacionados al complejo de especies *Fusarium*, ya se ha mencionado la dificultad del uso de la región TEF1- α para la diferenciación de cepas de un especie, debido a la alta conservación de esta región entre aislados de invernadero patógenos y poblaciones naturales no patógenas, lo que no permite atribuir el material genético a una fuente con certeza (Adhikari, y col., 2020). En este caso, la amplificación puede ser explicada por la variedad de microorganismos que inicialmente se encontraban en sustrato, y que no necesariamente fueron el factor causal de la infección. Por otro lado, ya se ha relacionado la presencia de insectos, tales como hormigas, escarabajos y polillas, como vectores de gran importancia en el ciclo epidemiológico de especies fitopatógenas de *Fusarium* (Berasategui, A., y col. 2023). Por lo que un evento de contaminación cruzada entre tratamientos, pudo ser posible.

Por otro lado, la aparición de síntomas no asociados a *Fusarium* spp. y la discordancia del análisis sintomático con los análisis moleculares de los tratamientos FO y FS, plantearon la posibilidad de que los síntomas fueran causados por un organismo patógeno distinto.

El monitoreo 3, arrojó resultados positivos para la presencia de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en todos los tratamientos. Esto se corroboró en los cultivos microbiológicos, donde se demostró una diferencia significativa en la

presencia de colonias asociadas a *Fusarium* spp., respecto al muestreo previo. Esta diferencia al monitoreo 2, parece explicarse por el comportamiento oportunista de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, y las observaciones que aparentemente indican la diseminación del patógeno en el sitio de cultivo, y un patógeno diferente como iniciador de la infección.

Respecto a las condiciones fisicoquímicas analizadas, no hubo significancia para la asociación entre el pH y la conductividad eléctrica, y ninguno de los tratamientos, indicando que no hubo alteración en la disponibilidad de los nutrientes del suelo. Para la temperatura, se encontró una diferencia en las medias del tratamiento CT y FO, respecto a FS durante el monitoreo 1 (Cuadro 8). Se cree que por su localización espacial en el invernadero, recibieron más tiempo de luz directa, sin embargo, no se logró establecer ninguna correlación con las otras variables estudiadas, debido a que no tuvo un efecto aparente en la fisiología de las plantas.

6.4. Identificación de *Pseudomonas* spp.

Durante la semana 5 después del trasplante, se observaron en plantas de todos los tratamientos, la formación de abultamientos alrededor del tallo (Figura 7). Dichos abultamientos se identificaron como la formación inicial de raíces adventicias, respuesta fisiológica observada en tomate, causada por una interferencia del flujo de nutrientes en el floema (Buddenhagen, I., y Kelman, A. 1964). Dicho síntoma, está asociado a lo que se conoce como necrosis de la médula del tomate, una enfermedad bacteriana causada por diferentes bacterias del género *Pseudomonas*.

El cuadro sintomático reportado para esta enfermedad, es similar al causado por otros fitopatógenos vasculares como *Fusarium* spp. Por lo que su identificación plantearía que los cuadros sintomatológicos observados, pudieran estar causados por dicho género. Por esa razón, se realizó una qPCR para la región 16S de *Pseudomonas* spp. , además se realizó el corte transversal de los tallos de plantas enfermas, con el objetivo de identificar síntomas diferenciadores, tales como la

aparición de huecos en el tallo y secreciones bacterianas de aspecto lechoso. (Figura 9) (Catara, V. 2007).



Figura 17. Corte transversal del tallo de tomate mostrando un estadio avanzado de la necrosis vascular causada por *Pseudomonas* spp.(Catara, V. 2007).

Los cortes transversales de plantas enfermas, no mostraron ninguno de los síntomas asociados a necrosis avascular (Figura 16), sin embargo, los datos de qPCR arrojaron positivo para todas las plantas. El género *Pseudomonas* es encontrado comúnmente en el suelo, por lo que una respuesta positiva a su presencia en las muestras, no implica un estadio de infección en la planta. Sin embargo, la diferencia significativa entre los cQs de las muestras de raíz, a las de rizosfera y suelo, parecen indicar un estadio de infección temprano, debido a su presencia en tejido vascular, pero en un etapa de desarrollo donde no se observan daños en tejido del tallo, o crecimiento bacteriano en tejidos superiores. Esto sería una posible explicación sobre la no concordancia de los síntomas observados y las pruebas moleculares para FO y FS en el monitoreo 2.

6.5. Aplicación de los métodos de detección

Las pruebas moleculares indican que *Pseudomonas* spp. fue el organismo causante del cuadro sintomático durante el monitoreo 2, por lo que la infección posterior pudo haber tenido a *Fusarium* spp. como patógeno oportunista. Dicha infección, estando facilitada por el estado inmunocomprometido de la plantas, y la acción de agentes externos, tales como errores en el manejo del cultivo que permitieron contaminaciones cruzadas, o bien por insectos actuando como vectores (Berasategui, A., y col. 2023).

La similitud de los síntomas asociados a marchitez vascular con los reportados sobre la necrosis medular bacteriana, hacen evidente que los métodos de identificación cualitativos no solo son inoportunos, por su incapacidad de prevenir la infección, sino también tienen la incapacidad de atribuir con certeza lo observado a un organismo causal. Los métodos microbiológicos de la misma forma, se plantean útiles como análisis post confirmatorios, ya que aunque se observa la presencia de colonias identificadas como *Fusarium* spp, no se logró obtener una correlación estadística que atribuyera a un organismo, el cuadro sintomatológico observado.

En lo que respecta a la técnica de qPCR, se adjudican las bajas eficiencias de los cebadores para FO y FS, a posibles errores cometidos durante el diseño de los cebadores, la extracción de ADN o la aplicación de la técnica. Debido a que no se cuenta con las secuencias de los cebadores, y la técnica fue realizada por un tercero, no es posible confirmar a cual de los factores se debió la baja precisión y eficiencia, sin embargo, se denota la importancia de validar estos aspectos, con el fin de limitar posibles errores durante el monitoreo. Sin embargo, la qPCR aún con errores sistemáticos identificados, fue el método que arrojó datos con mayor capacidad de explicar lo observado.

Respecto al manejo del cultivo, se hace evidente la importancia de estandarizar las condiciones ambientales y de aumentar el número de monitoreos. El aseguramiento de un control que permita hacer un contraste efectivo, es necesario para el establecimiento de correlaciones efectivas entre los tratamientos,

es por ello, que es necesario una estandarización más rigurosa de los bloques iniciales. Entre las prácticas que se recomiendan, están la esterilización del sustrato, el análisis periódico del agua de riego, y un mejor aislamiento de los bloques, que dificulte posibles contaminaciones cruzadas por errores del operador o insectos. Por otro lado, los periodos de monitoreo demostraron ser insuficientes, debido a la rápida progresión de la enfermedad, siendo necesario aumentar el número de monitoreos a razón de tener un mejor ajuste de los datos. Esta aproximación implicaría un aumento en el costo económico del experimento, y debido a que la evaluación de dos cepas no planteó un acercamiento más profundo al problema, se escogería una cepa que cuente con regiones génicas, para el diseño de cebadores que diferencien entre *formae speciales* de la especie.

En el apartado microbiológico, se hizo evidente la necesidad de realizar pruebas de inóculo, ya que se desconoce si la solución de esporas inicial fue la causante de la infección confirmada durante el muestreo 3. Asimismo, es necesario validar el uso de las diferentes muestras usadas (suelo, rizosfera, raíz y tejido vascular del tallo), como inóculo microbiano o para la extracción de ADN, ya que no hubo certeza respecto a la presencia o cantidad de los patógenos en los diferentes tejidos usados.

7. CONCLUSIONES

- Es necesario la aplicación de controles más rigurosos para la estandarización y mantenimiento de los bloques, de forma que se puedan establecer contrastes efectivos para una correlación estadística entre bloques.
- El diagnóstico sintomático y microbiológico no mostró ser suficiente para establecer una correlación efectiva entre cuadro sintomático y patógeno responsable.
- El método de qPCR muestra dificultad en atribuir el cuadro sintomático a un organismo patógeno o a efectos sinérgicos entre ellos.
- El método de qPCR muestra potencial en su uso para dilucidar aspectos de la interacción huésped/patógeno de *Fusarium oxysporum*/*Fusarium solani* y *Lycopersicum esculentum*. Por lo que se recomienda repetir el experimento con modificaciones, con el fin de validarlo.

6. REFERENCIAS

Adhikari, T. B., Gao, A., Ingram, T., y Louws, F. J. (2020). Pathogenomics characterization of an emerging fungal pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in greenhouse tomato production systems. *Frontiers in microbiology*, 11, 1995.

Ajilogba, C. F., y Babalola, O. O. (2013). Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. *Biocontrol science*, 18(3), 117-127.

Allende, M., Salinas, L., y Torres, A. (2017). Manual de cultivo del tomate bajo invernadero. Instituto de Desarrollo Agropecuario - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. *BOLETÍN INIA*, 377.

Agudelo, D. A., y Puerta, M. F. P. (2019). Evaluación del bioestimulante foliar (bioagro triple a) en la producción de tomate tipo chonto (*lycopersicum sculentum* mill) en dos ambientes de cultivo. *Agricolae y Habitat*, 2(2).

Alagona, P. S. (2016). Species complex: classification and conservation in American environmental history. *Isis*, 107(4), 738-761.

Al Ghufaili, M. K., Al Musawi, B. H., Al Tamimi, A. J., y Hassan, S. F. (2023). Molecular Assessment of Some Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) Genotypes Revealed by SCoT Markers. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1158, No. 6, p. 062009). IOP Publishing.

Bawa, I. (2016). Management strategies of *Fusarium* wilt disease of tomato incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(Sacc.) A Review. *Int. J. Adv. Acad. Res*, 2(5).

Benavides López, L. F. (2019). Cuantificación temprana de *Pseudocercospora fijiensis* por medio de qPCR en modelos predictivos de Sigatoka negra en plantas de banano (*Musa AAA*).

Berasategui, A., Jagdale, S., y Salem, H. (2023). *Fusarium* phytopathogens as insect mutualists. *PLoS Pathogens*, 19(7), e1011497.

Buddenhagen, I., y Kelman, A. (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of phytopathology, 2(1), 203-230.

Burgess, L. W., y Bryden, W. L. (2012). Fusarium: A ubiquitous fungus of global significance. Microbiology Australia, 33(1), 22-25.

Catara, V. (2007). *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource?. Molecular plant pathology, 8(3), 233-244.

Carmona, M., y Sautua, F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. Agronomía y Ambiente, 37(1).

Chitwood Brown, J., Vallad, G. E., Lee, T. G., y Hutton, S. F. (2021). Breeding for resistance to Fusarium wilt of tomato: A review. Genes, 12(11), 1673.

Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., y Roncero, M. I. G. (2003). Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Molecular Plant Pathology, 4(5), 315–325.
<https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>

Dongzhen, F., Xilin, L., Xiaorong, C., Wenwu, Y., Yunlu, H., Yi, C. y Chunsheng, G. (2020). Fusarium species and Fusarium oxysporum species complex genotypes associated with yam wilt in South-Central China. Frontiers in microbiology, 11, 1964.

FAO. (2020). Cultivos y productos de ganadería. Tomate. FAOSTAT.
<https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>

Fisher, N. L., Burgess, L. W., Toussoun, T. A., y Nelson, P. E. (1982). Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of Fusarium species. Phytopathology, 72(1), 151-153.

Gayoso, C., de Ilárduya, O. M., Pomar, F., y Merino de Cáceres, F. (2007). Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. European Journal of Plant Pathology, 118, 199-209.

Gaytán, G. M., y Alfaro, E. D. G. (2021). La competitividad del tomate mexicano en el mercado mundial, 2001-2016. *Revista Divulgación Económica*, 1(2).

Granados Montero, M. D. M. (2018). Identificación morfológica de hongos fitopatógenos: taller básico 2018.

Gullino, M. L., Albajes, R., y Nicot, P. C. (2020). Integrated pest and disease management in greenhouse crops (Vol. 9). New York, NY, USA:: Springer International Publishing.

Hariharan, G., y Prasannath, K. (2021). Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 600234.

FAUBA. (2021). Marchitamiento o fusariosis del tomate (*Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*). Herbario Virtual de Fitopatología. https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=14362

Juárez Maldonado, A., de Alba Romenus, K., Zermeño González, A., Ramírez, H., y Benavides Mendoza, A. (2015). Análisis de crecimiento del cultivo de tomate en invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 943-954.

Leslie, J. F., y Summerell, B. A. (2013). An overview of *Fusarium*. *Fusarium*, 1-11.

Lyons, R., Rusu, A., Stiller, J., Powell, J., Manners, J. M., y Kazan, K. (2015). Investigating the association between flowering time and defense in the *Arabidopsis thaliana*-*Fusarium oxysporum* interaction. *PloS one*, 10(6), e0127699.

Syngenta. (2018). Manejo integrado de nematodos para un adecuado establecimiento del cultivo de tomate y una abundante cosecha de calidad. Syngenta. <https://www.syngenta.com.pa/news/noticias/manejo-integrado-de-nematodos-para-un-adecuado-establecimiento-del-cultivo-de-tomate-y>

Matas Arroyo, A. J. (2005). Estudio de los factores incidentes en el agrietado del fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tipo cereza: el papel de la cutícula del fruto. Universidad de Málaga, Servicio de Publicaciones.

Martín Hernández, S., Ordaz Chaparro, V. M., Sánchez-García, P., Beryl Colinas-Leon, M. T., y Borges Gómez, L. (2012). Calidad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido en hidroponía con diferentes granulometrías de tezontle. *Agrociencia*, 46(3), 243-254.

Martin Souto, L., Buldain, I., Areitio, M., Aparicio-Fernandez, L., Antoran, A., Bouchara, J. P., ... y Ramirez-Garcia, A. (2020). ELISA test for the serological detection of *Scenedosporium/Lomentospora* in Cystic Fibrosis patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 734.

Martínez, P. F., Roca, D., Suay, R., Martínez, M., Blasco, X., Herrero, J. M., y Ramos, C. (2002). Avances en el control de los factores del clima para el cultivo en invernadero. *Comunitat Valenciana Agrària-Revista d'Informació Tècnica*, 20, 29-47.

Mansour, A., Al-Banna, L., y Alsmairat, N. (2014). Disease management of organic tomato under greenhouse conditions in the Jordan Valley. *Crop Protection*, 60, 48-55.

Maurya, S., Dubey, S., Kumari, R., y Verma, R. (2019). Management tactics for fusarium wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.): A review. *Management*, 4(5), 1-7.

McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 73, 78-92.

Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15-23.

Minitab, LLC. (2021). Minitab Statistical Software. Minitab. Recuperado el 29 de septiembre de 2023 de <https://www.minitab.com>

Misawa, T., y Kuninaga, S. (2010). The first report of tomato foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-3 PT and AG-2-Nt and its host range and molecular characterization. *Journal of General Plant Pathology*, 76, 310-319

Mokobi, Faith. (2021). Fusarium spp- An overview.
<https://microbenotes.com/fusarium-spp/>

Morales, R. (2021). México va en el 2021 por nuevo récord en exportación de tomates. El Economista.
<https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Mexico-va-en-el-2021-por-nuevo-record-en-exportacion-de-tomates-20210622-0024.html>

Moura, R. D., de Castro, L. A. M., Culik, M. P., Fernandes, A. A. R., Fernandes, P. M. B., y Ventura, J. A. (2020). Culture medium for improved production of conidia for identification and systematic studies of Fusarium pathogens. Journal of microbiological methods, 173, 105915.

Niño Sánchez, J., Casado Del Castillo, V., Tello, V., De Vega-Bartol, J. J., Ramos, B., Sukno, S. A., y Díaz Mínguez, J. M. (2016). The FTF gene family regulates virulence and expression of SIX effectors in Fusarium oxysporum. Molecular plant pathology, 17(7), 1124-1139.

Noale, H. N. (2016). Tomate para industria: revisión bibliográfica y selección de variedades en el valle medio de río negro.

Pietro, A. D., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado Jarana, J., y Roncero, M. I. (2003). Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular plant pathology*, 4(5), 315-325.

Porter, L. D., Pasche, J. S., Chen, W., y Harveson, R. M. (2014). Isolation, Identification, Storage, Pathogenicity Tests, Hosts, and Geographic Range of Fusarium solani f. sp. pisi Causing Fusarium Root Rot of Pea. Plant Health Progress, 16(3), 136–145. <https://doi.org/10.1094/php-dg-15-0013>

Pxfuel. (s.f.). Solanum lycopersicum, tomate, planta, vegetal, flora, botánica, inflorescencia, floración, flor, macro. Pxfuel. Recuperado el 29 de septiembre de 2023 de <https://www.pxfuel.com/es/free-photo-xjmif>

Ramírez Cariño, H. F., Guadarrama Mendoza, P. C., Sánchez López, V., Cuervo Parra, J. A., Ramírez Reyes, T., Dunlap, C. A., y Valadez Blanco, R. (2020). Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(9), 1247-1261.

Rep, M., Van Der Does, H. C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., ... y Cornelissen, B. J. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular microbiology*, 53(5), 1373-1383.

Rodríguez, V. P., Gúzman, A., Zapata, M. A., & Jaramillo Noreña, P. J. (2018). El cultivo de tomate bajo invernadero (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.

Seepe, H. A., Nxumalo, W., y Amoo, S. O. (2021). Natural products from medicinal plants against phytopathogenic *Fusarium* species: Current research endeavours, challenges and prospects. *Molecules*, 26(21), 6539.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2022). NACIONAL. Tomate rojo (jitomate). Infografía agroalimentaria 2022. México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

Srinivas, C., Devi, D., Murthy, K. N., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T., Singh, B. P., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., Tabassum, B., y Nayaka, S. C. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315–1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>

Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., y Fenrich, J. (2019). The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in biotechnology*, 37(7), 761-774.

Thornton, B., y Basu, C. (2015). Rapid and simple method of qPCR primer design. *PCR primer design*, 173-179.

Tapia, C., y Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. Revista chilena de infectología, 31(1), 85-86.

Ochieno, D. M. (2022). Soil sterilization eliminates beneficial microbes that provide natural pest suppression ecosystem services against *Radopholus similis* and *Fusarium Oxysporum V5w2* in the endosphere and rhizosphere of tissue culture banana plants. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 688194.

Okungbowa, F. I., y Shittu, H. O. (2012). *Fusarium* wilts: An overview. *Environ. Res. J*, 6(2), 83-102.

Ortega Martínez, L. D., Sánchez-Olarte, J., Ocampo-Mendoza, J., Sandoval-Castro, E., Salcido Ramos, B. A., y Manzo Ramos, F. (2010). Efecto de diferentes sustratos en crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) bajo condiciones de invernadero. *Ra Ximhai*, 6(3), 339-346.

Van Diepeningen, A. D., Al Hatmi, A. M., Brankovics, B., y de Hoog, G. S. (2014). Taxonomy and clinical spectra of *Fusarium* species: where do we stand in 2014?. *Current Clinical Microbiology Reports*, 1, 10-18.

Vásquez Ramírez, L. M., y Castaño Zapata, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) WC SNYDER y HN HANSEN]: una revisión. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 20(2), 363-374.

Vila, H. (2011). Regulación de la hidratación y la turgencia foliares por mecanismos evitadores del estrés, y resistencia a déficit hídrico en vid Modelo vs. experimentos. Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Médicas. Dirección URL del informe: <http://bdigital.uncu.edu.ar/4367> (Verificado: julio 2013).

Villalobos Arámbula, V. (2020). *Fusarium* spp. (Hypocreales: Nectriaceae). Podredumbre de raíces. Dirección General de Sanidad Vegetal y Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium_spp_ma_z_2020.pdf

Wiam, B., Wassima, L., Abderrahmene, D., y Omar, G. (2019). Experimental approach for easy identify Fusarium wilt of tomato. *World*, 8(2), 44-48.

Zamora Vargas, D. D. (2023). Manejo integrado de Phytophthora infestans en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) en Ecuador. Tesis de Licenciatura. BABAHOYO: UTB.

Zhong, X., Yang, Y., Zhao, J., Gong, B., Li, J., Wu, X., y Lü, G. (2022). Detection and Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* Race 1 in Plants and Soil by Real-time PCR. *The Plant Pathology Journal*, 38(3), 229.