

FACU
Universidad Nacional de Mar del Plata

**MORFOLOGÍA, GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA, PATOGENICIDAD
Y PATRONES MOLECULARES DE *Fusarium* spp. AISLADOS
DE AJO Y CEBOLLA**

UNIDAD INTEGRADA BALCARCE EPA - INTA - INTA - UNMDP BIBLIOTECA
YOP: (043) 63 231
INV. 10344

Andrea Eugenia Salvalaggio

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al

Título de *MAGISTER SCIENTIAE* en *PRODUCCIÓN VEGETAL*

Orientación: Fitopatología

Área: Ciencias de las Plantas y Recursos Naturales

Programa de Postgrado en Ciencias Agrarias

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MAR DEL PLATA**

**Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMDP –
Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA**

Balcarce, Argentina

Septiembre de 2009

**MORFOLOGÍA, GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA, PATOGENICIDAD
Y PATRONES MOLECULARES DE *Fusarium* spp. AISLADOS
DE AJO Y CEBOLLA**

Andrea Eugenia Salvalaggio



.....
Dra. Azucena del Carmen Ridao

Directora de Tesis

.....
Ing. Agr. Ricardo Piccolo (M. Sc.)

Asesor

**MORFOLOGÍA, GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA, PATOGENICIDAD
Y PATRONES MOLECULARES DE *Fusarium* spp. AISLADOS
DE AJO Y CEBOLLA**

Andrea Eugenia Salvalaggio

Aprobada por:

.....
Dra. Angélica Arambarri


.....
Ing. Agr. Adalberto di Benedetto


.....
Ing. Agr. Gladys Lori

DEDICATORIA

*a Nahuel
el amor de mi vida*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Azucena Ridaó, mi directora de tesis porque además de formarme como profesional siempre me brindó su cariño, paciencia y contención, que hicieron que esta fuera una experiencia feliz y enriquecedora.

Especialmente agradezco el apoyo de mis padres Juan y Alicia, que me dieron la fuerza y su apoyo para poder realizar la maestría y a mi hermana Graciela por darme su cariño.

Quiero agradecer especialmente a Keren Hernández Guijarro por todos los conocimientos que compartió conmigo y por su valioso tiempo dedicado a este trabajo de tesis y a Sergio Feingold que me permitió desarrollar todo el estudio molecular en su laboratorio y me brindó su conocimiento.

A Ricardo Piccolo, mi director de beca, quien me incentivó a desarrollar el postgrado en la UIB.

También mi agradecimiento a toda la gente que trabaja en Patología Vegetal de la UIB Balcarce Marina Montoya, Carla Maringolo, Gladys Clemente, Carolina Troglia, Facundo Quiroga, Alicia Melegari y Alberto Escande, que me auxiliaron en todo el desarrollo de la tesis. Y especialmente a Oscar Gerpe que siempre me ayudó en todo además de darme su amistad.

A Gabriela Masa, Silvina Divito, Erika Mronginski, Natalia Norero, Mónica Colavita, Patricia Diaz de Ulzurrun y Leandro Barreiro que me dieron su ayuda, tiempo y conocimientos que permitieron lograr mis objetivos.

A mis compañeros de postgrado con los que compartí las tareas de laboratorio (Ceferino Flores, Mariel Lago y Rodrigo Rojo) y generaron un clima de trabajo muy agradable.

Al personal administrativo de la UIB, especialmente a Laura Erquiaga, que resolvió todos mis problemas y a la secretaria del postgrado Sandra Amunao por su calidez humana.

A mis compañeros de posgrado que me dieron su amista y voy a guardarlos siempre en mi corazón con mucho cariño: Anita, Anto, Carina, Mariel, Aníbal, Cefe, Diego, Emiliano, Juan, , Leo, Mariano, Mauricio y Tomás.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. EL HOSPEDANTE.....	3
1.1. Clasificación botánica y características de las especies.....	3
1.2. Importancia del cultivo de cebolla y ajo.....	4
1.3. Enfermedades que afectan a la cebolla y al ajo.....	5
1.3.1. Enfermedad de los almácigos o Damping off causada por <i>Pythium</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. y <i>Rhizoctonia</i> spp.....	5
1.3.2. Raíz rosada en cebolla producida por <i>Phoma/Pyrenochaeta terrestris</i>	6
1.3.3. Podredumbre blanca por <i>Sclerotium cepivorum</i>	6
1.3.4. Podredumbre del cuello de cebolla por <i>Botrytis allii</i>	6
1.3.5. Podredumbre blanda bacteriana por <i>Dickeya</i> <i>chrysanthemi</i> = <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	6
1.3.6. Piel ácida por <i>Burkholderia cepacia</i> = <i>Pseudomonas</i> <i>cepacia</i>	7
1.3.7. Moho negro o carbonilla por <i>Aspergillus niger</i>	7
1.3.8. Moho azul del ajo por <i>Penicillium hirsutum</i> y <i>P. allii</i>	7
1.3.9. Podredumbre basal o del disco ocasionada por <i>Fusarium</i> spp.....	7
2. LA ENFERMEDAD: La podredumbre basal.....	7
2.1. Epidemiología y ciclo de patogénesis.....	8
3. LOS AGENTES CAUSALES: EL COMPLEJO <i>Fusarium</i> spp.....	9
3.1. Taxonomía.....	9
3.2. Grupos de Compatibilidad Vegetativa.....	13
3.2.1. Heterocariosis.....	13
3.2.2. Grupos de Compatibilidad Vegetativa y su base genética.....	13
3.2.3. Análisis de los mutantes <i>nit</i>	14
3.3. Caracterización por Marcadores Moleculares.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
1. Caracterización Morfológica de los agentes causales.....	20
1.1. Aislamiento.....	20
1.2. Identificación.....	22
1.2.1. Crecimiento <i>in vitro</i> y macromorfología.....	23
1.2.2. Micromorfología.....	23
2. Caracterización por Pruebas de Patogenicidad.....	24
2.1. Aislamientos desde cebolla.....	24
2.2. Aislamientos desde ajo.....	25
2.2.1. Pruebas de patogenicidad en planta.....	25
2.2.2. Pruebas de patogenicidad en pos cosecha.....	26
3. Caracterización genética.....	27
3.1. Grupos de Compatibilidad Vegetativa (GCV).....	27
3.1.1. Generación de mutantes <i>nit</i>	27
3.1.2. Determinación de los fenotipos de mutantes <i>nit</i>	27
3.1.3. Pruebas de complementación.....	28
3.2. Caracterización molecular.....	28
3.2.1. Protocolo de extracción de ADN.....	28
3.2.1.1. Determinación de la concentración de ADN.....	29
3.2.1.2. Reacción de ERIC-PCR.....	30

3.2.2.1. Condiciones de la reacción.....	30
3.2.2.2. Visualización y análisis de los productos de la reacción.....	30
RESULTADOS.....	32
1. Caracterización Morfológica de los agentes causales.....	32
1.2. Identificación.....	32
1.2.1. Crecimiento <i>in vitro</i> y macromorfología.....	39
1.2.2. Micromorfología.....	42
2. Caracterización por Pruebas de Patogenicidad.....	43
2.1. Aislamientos desde cebolla.....	43
2.2. Aislamientos desde ajo.....	49
2.2.1. Pruebas de patogenicidad en planta.....	49
2.2.2. Pruebas de patogenicidad en poscosecha.....	52
3. Caracterización genética.....	52
3.1. Grupos de Compatibilidad Vegetativa (GCV).....	55
3.1.1. Generación de mutantes <i>nit</i>	55
3.1.2. Determinación de los fenotipos de mutantes <i>nit</i>	56
3.1.3. Pruebas de complementación.....	57
3.2. Caracterización por marcadores moleculares.....	60
3.2.1. Extracción de ADN.....	60
3.2.2. Reacción de ERIC-PCR.....	60
DISCUSIÓN.....	72
1. Caracterización morfológica e identificación de los agentes causales.....	72
2. Caracterización por patogenicidad.....	74
3. Caracterización de <i>F. oxysporum</i> por GCV.....	76
4. Caracterización molecular por ERIC-PCR.....	77
CONCLUSIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	82
APÉNDICE.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. 81 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. aislados de ajos y cebollas en localidades productoras de las provincias de San Juan, Mendoza, Buenos Aires y Río Negro.....	21
Tabla 2. Escala de evaluación de la patogenicidad, en base al desarrollo de síntomas en plantas de cebollas inoculadas con distintas especies y aislamientos de <i>Fusarium</i> . (Stankovic <i>et al.</i> 2007).....	25
Tabla 3. Escala de evaluación de la patogenicidad en base al desarrollo de la pudrición de poscosecha en ajos inoculados con distintas especies y aislamientos de <i>Fusarium</i>	26
Tabla 4. Identificación de mutantes de <i>Fusarium</i> spp. sin capacidad de utilizar nitrato (<i>nit</i>) por su crecimiento en distintas fuentes de nitrógeno.....	28
Tabla 5. Secuencia de los iniciadores empleados en este estudio identificados por Versalovic <i>et al.</i> 1991.....	30
Tabla 6. Frecuencia parcial y total en porcentaje, de aislamientos de <i>Fusarium</i> , de cebolla y ajo de las localidades productoras muestreadas en las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro.....	38
Tabla 7. Distribución de especies de <i>Fusarium</i> aisladas desde cebolla de las localidades productoras de las provincias de San Juan, Mendoza, Buenos Aires y Río Negro, determinadas por sus caracteres morfológicos.....	39
Tabla 8. Cuadro de análisis de la varianza para la tasa de crecimiento diaria en centímetros al quinto día de todos los aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos desde cebolla y ajo, en medio APD con un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad a 25 °C +/- 2 °C.....	40
Tabla 9. Tasa promedio de crecimiento (TPC) expresada en cm al quinto día de las especies de <i>Fusarium</i> aisladas desde cebolla y ajo en APD bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad a 25 °C +/- 2 °C.....	41
Tabla 10. Tasa de crecimiento medio en cm al 5to día, de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. proliferatum</i> y <i>F. verticillioides</i> , de cebolla y ajo, en medio APD con un fotoperíodo de 12 h de luz y oscuridad a 25 °C +/- 2 °C.....	42
Tabla 11. Índice de severidad de 48 aislamientos de <i>Fusarium</i> en plantas de cebolla bajo condiciones de inoculación artificial con una suspensión de 1×10^7 conidios/mL.....	45
Tabla 12. Índice de severidad en plantas de cebolla cv. Valcatorce INTA bajo inoculación artificial con aislamientos de <i>F. oxysporum</i> procedentes de cebolla.....	47
Tabla 13. Índice de severidad de 21 aislamientos de <i>Fusarium</i> en plantas de ajo bajo condiciones de inoculación artificial con una suspensión de 5×10^6 conidios/mL.....	51
Tabla 14. Grupos de compatibilidad vegetativa y patogenicidad de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> aislados de cebolla y ajo en las localidades productoras de las provincias de Mendoza, San Juan y Buenos Aires.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vía metabólica del NO ₃ y su relación con la generación y clasificación de mutantes <i>nit</i> para las pruebas de GCV. (Extraído de Leslie; Summerell; 2006).....	15
Figura 2. <i>F. oxysporum</i> a)- Pigmentación de la colonia en APD, de los aislamientos LJC 10003 y LJC 10007 ; b)- aspecto del reverso del micelio; c)- microconidios elipsoidales dispuestos en falsas cabezas (40x); d)- sobre conidioforos cortos (100x); e) y f)- macroconidios con célula apical curvada y célula basal pedicelada (40x); g) y h) - clamidosporas en hifas o conidios, solas, de a pares o en cadena (40x) en AHC.....	33
Figura 3. <i>F. proliferatum</i> a)- Pigmentación de colonias de en APD, de los aislamientos LJC 10014 y LJC 10013; b)- aspecto del reverso del micelio; c)- microconidios en cadenas (100x); d)- polifialides (100x). e), f) y g)- macroconidios con célula apical estrecha y microconidios de forma clavada y con base truncada (40x) en AHC.....	34
Figura 4. <i>F. verticillioides</i> a)- Pigmentación de la colonia en APD, de los aislamientos LJC 10174 y LJC 10182; b)- aspecto del reverso del micelio; c) y d)- microconidios cadenas sobre conidioforos monofialídicos (40x); e)- macro y microconidios (40x); f)- hifas con células abultadas de pared engrosada (40x) en AHC.....	35
Figura 5. <i>F. solani</i> a)- Aspecto de la colonia en APD, de los aislamientos LJC 10037 y LJC 10086 y b)- pigmentación del micelio en el reverso de la colonia; c) (40x) y d)- (100x) microconidios producidos en monofialides largas; e) y f)- macroconidios (40x) y g) y h)- clamidosporas (40x) en AHC.....	36
Figura 6. <i>F. compactum</i> a)- Aspecto de la colonia en APD, del aislamiento LJC 10087; b)- pigmentación del micelio en el reverso de la colonia; c)- macroconidio producido en el micelio aéreo (10x) ; d)- macroconidios compactos de 5 septas (40x) en AHC; e)- clamidosporas sobre hifas (40x).....	37
Figura 7. Curva de crecimiento medio en cm/día de cepas de <i>Fusarium</i> aisladas de cebolla y ajo en medio de cultivo APD, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad a 25 °C +/- 2 °C.....	41
Figura 8. Promedio de largo y ancho de los conidios (microconidios con 0 y 1 septo; macroconidios de 3 y 5 septos) de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de cebolla y ajo, en medio AHC.....	43
Figura 9. a)- Plantas de cebolla cv. Valcatorce INTA de 45 días, inoculadas con una suspensión de 1 x 10 ⁷ conidios/mL de <i>Fusarium</i> spp. y ADE. b)- Trasplante en macetas con una mezcla de suelo estéril. c)- Tratamiento control sin síntomas. d)- Raíces flácidas con lesiones semitransparentes. e)- Bulbo con podredumbre blanda.....	44
Figura 10. Patogenicidad de las especies de <i>Fusarium</i> medida a través del índice de severidad promedio en plantas de cebollas inoculadas artificialmente. Letras distintas indican diferencias significativas (p< 0,05). Las líneas muestran el desvío estándar.....	46
Figura 11. Índice de severidad de los aislamientos de <i>F. proliferatum</i> al evaluar la patogenicidad en plantas de cebollas cv. Valcatorce INTA	

	inoculadas artificialmente. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.....	48
Figura 12.	Índice de severidad de los aislamientos de <i>F. verticillioides</i> al evaluar la patogenicidad en plantas de cebollas cv. Valcatorce INTA inoculadas artificialmente. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.....	48
Figura 13.	Índice de severidad de los aislamientos de <i>F. solani</i> al evaluar la patogenicidad en plantas de cebollas cv. Valcatorce INTA inoculadas artificialmente. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.....	49
Figura 14.	a)- Plantas de ajo cv Nieve INTA inoculadas con una suspensión de 5×10^6 conidios/mL de <i>Fusarium</i> spp. y ADE. b)- Tratamiento control sin síntomas. c)- Raíces flácidas con lesiones semitransparentes síntoma ocasionado al inocular el aislamiento LJC 10176. d)- Bulbo con podredumbre blanda provocado por el aislamiento LJC 10168.....	50
Figura 15.	Patogenicidad de las especies de <i>Fusarium</i> medida a través del índice de severidad promedio en plantas de ajo bajo condiciones de inoculación artificial con una suspensión de 5×10^6 conidios/mL. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.....	52
Figura 16.	Volumen de pudrición en mm^3 en ajo cv Nieve INTA inoculados artificialmente con una suspensión de 5×10^6 conidios/mL de <i>Fusarium</i> y ADE, después de 3 semanas de incubación a 22-25° C en oscuridad. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar. Las letras junto al aislamiento indican la especie, Fo, <i>F. oxysporum</i> , Fp, <i>F. proliferatum</i> y Fv, <i>F. verticillioides</i>	53
Figura 17.	Volumen de pudrición en mm^3 generado por las especies de <i>Fusarium</i> inoculadas artificialmente en ajo cv Nieve INTA al cabo de tres semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.....	54
Figura 18.	Relación exponencial entre IS y VP en mm^3 determinado entre los dos métodos de prueba de patogenicidad en ajo con aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. El punto en rojo corresponde al valor de LJC 10188, no considerado en el análisis.....	55
Figura 19.	Crecimiento del aislamiento LJC 10047 en medio MM con 3 % de Clorato de K a los 7 días de incubación a 25 °C. Con marcador rojo se identificaron las áreas con sectores resistentes al clorato.....	56
Figura 20.	Crecimiento de mutante <i>nit</i> del aislamiento LJC 10081 en medio MM a los 4 días de incubación a 25 °C. Se observó un crecimiento tenue y expansivo sin micelio aéreo.....	56
Figura 21.	Crecimiento de mutantes <i>nit</i> en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno. Arriba con Nitrato de K y abajo con Hypoxanthina.....	57
Figura 22.	A)- Formación de un heterocarionte robusto entre los mutantes nitM de LJC10188 y <i>nit1/3</i> de LJC 10045 y de un heterocarionte débil entre los mutantes nitM de LJC 10045 y <i>nit1/3</i> de LJC 10188 en MM. B)- Formación de un heterocarionte robusto entre los mutantes nitM de LJC 10045 y <i>nit1/3</i> de LJC 10186 y ausencia de micelio entre los mutante nitM de LJC 10186 y <i>nit1/3</i> de LJC	59

	10045.....	
Figura 23.	ADN extraído de micelio de <i>Fusarium</i> spp. cultivado en caldo de papa, las muestras se trataron con 10mg/mL de ARNasa para remover el ARN.....	60
Figura 24.	Patrones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC) de 51 aislamientos de <i>F. oxysporum</i> en las calles 2 a la 29 del peine superior y 2 a 24 del peine inferior y LJC 10030 de <i>Fusarium</i> sp. (Fsp.) en la calle 25 del peine inferior y LJC 10087 de <i>F. compactum</i> (Fc) en la calle 26 del peine inferior obtenidos de cebolla (letras blancas) y ajo (letras en color gris). La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H.").....	61
Figura 25.	Patrones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC) de 28 aislamientos de <i>F. oxysporum</i> obtenidos de ajos y cebollas. La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H."). Esta figura muestra el resumen de los patrones polimórficos de la Fig. 24.....	62
Figura 26.	Dendograma que muestra la relación entre 51 aislamientos de <i>F. oxysporum</i> aislados desde ajo y cebolla utilizando el método de UPGMA (o encadenamiento promedio) y el coeficiente Simple Matching (o de concordancia simple). ¹ Indica el hospedero c = cebolla y a = ajo.....	63
Figura 27.	Patrones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC) de 16 aislamientos de <i>F. proliferatum</i> obtenidos de ajo (letras de color gris) y cebolla (letras de color blanco). La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H.").....	64
Figura 28.	. Dendograma que muestra la relación entre 16 aislamientos de <i>F. proliferatum</i> aislados desde ajo y cebolla utilizando el método de UPGMA (o encadenamiento promedio) y el coeficiente Simple Matching (o de concordancia simple). ¹ Indica el hospedero c = cebolla y a = ajo.....	65
Figura 29.	Patrones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC) de 7 aislamientos de <i>F. verticillioides</i> (Fv) en las calles 1 a la 7 y de <i>F. solani</i> (Fs) en las calles 8 a la 12 obtenidos de ajo (letras de color gris) y cebolla (letras de color blanco). La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H.").....	66
Figura 30.	Dendograma de relación entre 7 aislamientos de <i>F. verticillioides</i> utilizando UPGMA y el coeficiente de concordancia simple. ¹ Indica el hospedero c = cebolla y a = ajo.....	67
Figura 31.	Dendograma de relación ente aislamientos de <i>F. solani</i> obtenidos desde cebolla, empleando el método UPGMA y el coeficiente de concordancia simple.....	68
Figura 32.	Patrones de bandas tipo de todos los aislamientos de <i>F.oxysporum</i> (Fo), <i>F. proliferatum</i> (Fp), <i>F. verticillioides</i> (Fv), <i>F. solani</i> (Fs), <i>F. compactum</i> (Fc) y <i>Fusarium</i> sp. (Fsp.), obtenidos de ajos y cebollas generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de	70

- secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC). La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H.").....
- Figura 33. Dendograma que muestra la relación entre aislamientos distintivos de *Fusarium* spp. obtenidos desde ajo y cebolla utilizando el método de UPGMA (o encadenamiento promedio) y el coeficiente Simple Matching (o de concordancia simple).a.- Fo, *F. oxysporum*; Fv, *F. verticillioides*; Fp, *F. proliferatum*; Fs, *F. solani*; Fc, *F. compactum*; F., *Fusarium* sp.).....

Lista de abreviaturas**GCV: Grupos de Compatibilidad Vegetativa*****Foc: Fusarium oxysporum f. sp. cepae******het*: incompatibilidad heterocarionte*****vic*: incompatibilidad vegetativa*****nit*: incapaz de utilizar nitratos*****nit1*: mutación en el locus locus estructural de la nitrato reductasa*****nit3*: mutación en el locus que regula la vía específica de la asimilación del nitrato****NitM: mutación en el loci que afecta la unión del molibdeno****PCR: Reacción en cadena de la polimerasa****RAPD: Polimorfismo del ADN amplificado al azar****AFLP: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados****ERIC: Iniciadores correspondientes a secuencias repetitivas inter génicas
consenso de entero bacterias****REP: Elementos repetitivos palindrómicos extragénicos****APD: Agar Papa Dextrosado****ADE: Agua destilada estéril****AA: Agar Agua****LJC: Laboratorio de Patología José Crnko****AHC: Agar Hoja Clavel****OP: Óxido de Propileno****CPD: Caldo de Papa Dextrosado****IS: Índice de severidad****VP: Volumen de pudrición****PDC: Papa Dextrosa Clorato****MMC: Medio Mínimo Clorato****MM: Medio Mínimo****MN: Medio Nitrato****MB: Medio Básico****MH: Medio Hypoxanthina**

Morfología, grupos de compatibilidad vegetativa, patogenicidad y patrones moleculares de *Fusarium* spp. aislados de ajo y cebolla

RESÚMEN

La podredumbre basal que afecta cebolla y ajo es una enfermedad importante en las zonas productoras de Argentina. *F. oxysporum* f. sp. *cepae* se cita como el principal agente causal pero otras especies de *Fusarium* también producen esta enfermedad.

Ochenta y un aislamientos de *Fusarium* spp. provenientes de localidades productoras de las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro se caracterizaron por macro y micromorfología sobre los medios APD y AHC. Cincuenta y un aislamientos se identificaron como *F. oxysporum*, 16 como *F. proliferatum*, 7 como *F. verticillioides*, 5 como *F. solani*, uno como *F. compactum* y uno como *Fusarium* sp. *F. oxysporum* fue la especie más frecuentemente aislada tanto en cebolla como en ajo. Se determinó que la tasa de crecimiento diario de las colonias en APD fue significativamente diferente entre aislamientos, siendo el promedio de la tasa de los aislamientos de cebolla significativamente mayor que el de los de ajo. Se estableció además, una amplia variabilidad entre aislamientos y entre especies.

Con 48 aislamientos de cebolla se comprobó la patogenicidad a través de la inoculación artificial de raíces de cebolla con suspensiones de 10^7 conidios/mL. Estos ensayos evidenciaron variabilidad significativa entre aislamientos y especies. La patogenicidad de 21 aislamientos de ajo se probó en plantas por inmersión de raíces con suspensiones de 10^7 conidios/mL y en dientes por inoculación en una herida con una suspensión de 5×10^6 conidios/mL. Se halló variabilidad entre aislamientos pero no entre especies y se determinó una asociación significativa entre los dos métodos empleados. *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. compactum* y *Fusarium* sp. resultaron patógenos en cebolla mientras que *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* además lo fueron tanto en plantas como en bulbos de ajo.

Se realizaron pruebas de complementación de mutantes auxotróficos de *F. oxysporum* obtenidos en PDC y MMC. Como resultado de este estudio se determinó que 28 aislamientos pertenecieron a 7 grupos de compatibilidad vegetativa (GCV), el resto fue miembro de un único GCV. Además 5 aislamientos fueron auto-incompatibles. Estos resultados indican que *F. oxysporum* corresponde a la forma

especial *cepae* aunque con gran variabilidad entre aislamientos. No se encontró asociación entre el GCV con el origen, ni con el nivel de patogenicidad del aislamiento.

Por la técnica de ERIC-PCR se generaron patrones de bandas polimórficos en todas las especies de *Fusarium*. Esta técnica detectó variabilidad genética dentro de las especies de manera eficiente, pero no fue útil para diferenciar especies. El alto grado de diversidad observado con ERIC-PCR en *F. oxysporum* coincidió con los resultados obtenidos por la técnica de GCV. *F. verticillioides* exhibió la mayor variabilidad genética en cambio *F. proliferatum* manifestó baja variabilidad. Independientemente del origen tres aislamientos de *F. solani* tuvieron el mismo patrón de bandas.

Este trabajo representa la primer referencia en Argentina, de *F. verticillioides* como agente causal de podredumbre basal de cebolla en San Juan y de ajo en Mendoza. También se cita a *F. compactum* en cebolla, en Río Negro.

Palabras clave: podredumbre basal, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, ERIC-PCR.

Morphology, vegetative compatibility groups, pathogenicity and molecular fingerprinting of *Fusarium* isolate from onion and garlic

ABSTRACT

Basal rot that affect both onion and garlic, is an important disease from different growing areas of Argentina. *F. oxysporum* f. sp. *cepae* was cited like the principal agent causal but other species of *Fusarium* are know producing this disease too.

Eighty one isolations of *Fusarium* coming from Mendoza, San Juan, Buenos Aires and Río Negro, were characterized by macro and micro morphology on PDA and CLA. Fifty one isolates were identified as *F. oxysporum*, 16 as *F. proliferatum*, 7 as *F. verticillioides*, 5 as *F. solani*, one as *F. compactum* and one *Fusarium* sp. *F. oxysporum* was the one most frequently isolated as the causal agent for basal rot in onion and garlic. Diary growth rate were determined on PDA and differences were found among isolates, the average growth rate of isolates from onion was significantly greater than those from garlic. high variability was determined between the isolates and among species.

Pathogenicity was verified trough inoculations of root of onion plant through 48 isolates from that vegetable were soaked in a suspension of 10^7 conidia per milliliter. This test proved variability between isolations and species. The pathogenicity of 21 isolates from garlic was tested by soaked of the root from garlic with a suspension of 10^7 conidia per milliliter and in injured garlic cloves by inoculation with suspension of 5×10^6 conidia per milliliter. Variability was found among isolates but not by species. Furthermore a significant association was determined testing the pathogenicity of the isolates on garlic plants and cloves. *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F.compactum* and *Fusarium* sp. were pathogen on onion whereas *F. oxysporum*, *F. verticillioides* and *F. proliferatum* showed pathogenicity on garlic plants and bulbs.

By means of auxotrophic mutants from *F. oxysporum* obtained on PDC and MMC, complementation test were made. It was determined that 28 isolates belonged to 7 VCG, meanwhile the remaining isolates were single member of a group. Moreover 5 isolates were self-incompatible. These result showed that *F. oxysporum* can belong to a special form *cepae* even though a substantial amount of variations among isolates. Association between VCG by source or by pathogenicity level was not found.

Polymorphic patterns of band from each isolates were generated by ERI-PCR in all *Fusarium* species. This technique was enable to assess variability in the species, but not was helpful among them. A diversity degree was found by ERIC-PCR in *F. oxysporum* the results was the same that were obtain by VCG. *F. verticillioides* showed high genetic variability by ERIC-PCR technique it was opposite with *F. proliferatum* that sowed low variability. Independently about the origin three isolates of *F. solani* from Mendoza, San Juan and Buenos Aires have got the same pattern of bands.

Finally, it was reported at first time in Argentina, that *F. verticillioides* caused basal rot on onion from San Juan and on garlic from Mendoza and too for *F. compactum* on onion from Rio Negro.

Key words: Fusarium basal rot, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, ERIC-PCR

INTRODUCCIÓN

El género de hongos *Fusarium* Link ex Fr. causa podredumbres de color rosadas y amarillas sobre especies hortícolas y ornamentales, especialmente en raíces, tubérculos y bulbos. La contaminación de los órganos ocurre en el campo antes o durante la cosecha. Sin embargo la infección puede desarrollarse en el campo o en el almacenaje (Agrios, 2005). La podredumbre basal de cebolla ocasionada por distintas especies de *Fusarium* se ha convertido en una enfermedad limitante de la producción, en distintas zonas de Cuyo (Valdez *et al.*, 2004) y en el sur de Buenos Aires (Kierhr; Delhey, 2005). En la poscosecha de ajo este género de hongos también afectó los bulbos (Vigliola; Calot, 1982) depreciando la calidad del producto para la exportación.

Fusarium oxysporum Schlecht. ocasiona graves pérdidas económicas en un amplio rango de especies vegetales (Bosland, 1988). Ataca cultivos de aliáceas, produciendo los mayores daños en almácigos de cebolla causando el "damping-off" y la pudrición del disco. Además afecta al ajo en almacenamiento, provocando la mancha herrumbre (Schwartz; Mohan 1995). *F. proliferatum* también ha sido citado por Mohan *et al.* (1997) como agente causal de podredumbre en bulbos de cebolla y de ajo por Dugan *et al.* (2003). En nuestro país la primer cita de *F. proliferatum* como causa de la pudrición basal en cebolla fue hecha por Kiehr y Delhey (2005).

La taxonomía dentro del género *Fusarium* ha sido siempre controvertida (Nelson *et al.*, 1994). *F. oxysporum* ha sido clasificado en distintos taxones de formas especiales, que corresponden a cepas con idénticas características morfológicas pero diferente especificidad o capacidad de infectar a distintos hospederos. También se han identificado razas con relación a la patogenicidad diferencial de los aislamientos. El estado sexual de esta especie no se conoce.

Puhalla (1985) clasificó veintiún aislamientos de *F. oxysporum* en dieciséis grupos de compatibilidad vegetativa (GCVs). Esta prueba determina la similitud alélica en los *loci* por la formación de heterocariontes y se demuestra por complementación entre pares de mutantes que no pueden reducir nitratos (mutantes *nit*). La capacidad de dos cepas de formar heterocariontes subdivide a los aislamientos de *F. oxysporum* en los mismos GCVs (Leslie 1993). Los GCVs se correlacionan con las formas especiales. A partir del trabajo de Puhalla (1985) varios investigadores han caracterizado sus aislamientos por GCVs de *F. oxysporum* (La Mondia; Elmer 1989; Elmer; Stephens 1989; Katan; Di Primo 1999; Di Primo *et al.*, 2002; Swift, 2002 y Pasquali *et al.*, 2004).

El análisis de polimorfismos del ADN es otra manera de establecer la variación genética entre microorganismos. Los métodos moleculares recurren al uso de la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para describir esta variación genética entre aislamientos (Mullis; Faloona, 1987). Iniciadores correspondientes a secuencias repetitivas inter génicas consenso de entero bacterias (ERIC) (Versalovic *et al.*, 1991) han sido usadas para generar, por PCR, patrones en genomas de microorganismos.

Edel *et al.* (1995) evaluó a los iniciadores ERIC con otros marcadores moleculares para caracterizar aislamientos de *F. oxysporum*. Del análisis de los fragmentos de restricción amplificados de la región IGS obtuvo correlación con los patrones generados por el iniciador ERIC. Este último permitió discriminar los aislamientos y fue más eficiente en términos de simplicidad y rapidez (Edel *et al.*, 1995). Esta técnica fue empleada para estudios de diversidad en poblaciones de *F. oxysporum* (Smith-White *et al.*, 2001) y para la diferenciación de aislamientos de la f. sp. *canariensis* (Gunn; Summerell, 2002).

La identificación precisa de los patógenos es necesaria para estudios de distribución espacial y de difusión en diferentes zonas de cultivo (Ouellet; Seifert, 1993), además determinar la diversidad es de gran importancia en la búsqueda de resistencia para el mejoramiento genético (Assigbetse *et al.*, 1994).

Hipótesis:

- i) hay diversidad de especies de *Fusarium* aislados de cebolla y ajo de las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro;
- ii) hay variabilidad intra específica en los aislamientos de *Fusarium* de ajo y de cebolla de las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro, lo que permite distinguir distintas formas especiales.

Objetivos:

- i) identificar por morfología a los aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro;
- ii) determinar la patogenicidad de los mismos;
- iii) identificar la forma especial a la cual pertenece cada aislamiento a través de la técnica de GCVs y
- iv) establecer relaciones inter e intra específicas mediante el empleo de marcadores moleculares.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. EL HOSPEDANTE

1.1. Clasificación botánica y características de las especies

El género *Allium*, de la familia *Alliaceae*, es agronómicamente importante, ya que agrupa especies hortícolas de gran difusión, como el ajo (*Allium sativum* L.), la cebolla (*A. cepae* L.), el puerro (*A. porrum* L.) y el echalote (*A. ampeloprasum* L.). En tumbas construidas en Egipto (3200 A.C.) se encontraron semillas de cebollas (Özer; Köycü, 2004) y existen evidencias de que tanto la cebolla como el ajo eran parte de la alimentación de los egipcios. También han sido citados en la Biblia y el Corán como un importante alimento.

El ajo y la cebolla además, tienen efectos medicinales los que son utilizados para la prevención y la mejora de problemas coronarios. El consumo de estas aliáceas puede disminuir el riesgo de cáncer gastrointestinal. La ingesta diaria de ajo reduce significativamente la incidencia de enfermedades que son causadas por la arteriosclerosis (Maude, 2006). Los extractos de ajo y cebolla se citan como efectivos en la prevención de la diabetes, de enfermedades cardiovasculares y además, poseen otras actividades biológicas como la antimicrobiana, anti oxidante, anti carcinogénica, antimutagénica y pro-biótica (Corzo-Martínez *et al.*, 2007).

Para la mayoría de los botánicos la cebolla no existe en el estado silvestre, por lo que su origen es incierto. Proviene de Asia, de la región que abarca Irán y el oeste de Pakistán (Acosta *et al.*, 1993). La cebolla es una planta monocotiledónea herbácea bienal, que persiste vegetativamente por medio de bulbos (Sarli, 1980). Produce un bulbo tunicado, un tallo modificado formado por numerosas capas gruesas y carnosas que cumplen funciones de reserva. Los bulbos pueden ser de color blanco, amarillo, rojo o violáceo. Las hojas son envainadoras, cilíndricas fistulosas y ensanchadas en la mitad inferior. Las flores blancas o lilas se reúnen en umbelas protegidas por brácteas reflexas. Las semillas son negras y angulosas (Parodi, 1972). Esta aliácea se ha clasificado de acuerdo al largo del día que requiere para la formación del bulbo, en cultivares de día corto (12 horas de día luz), cultivares de día intermedio (13 horas de día luz) y cultivares de día largo (16 horas de día luz) (Acosta *et al.*, 1993). Se propaga a través de semillas y los sistemas de plantación para la producción son la siembra directa y el trasplante.

El ajo es un cultivo ancestral cuyo origen es en Asia Central (Sarli, 1980). Es una hortaliza perenne resistente al frío. Produce un bulbo compuesto de 6 a 12 bulbillos tunicados, llamados dientes, reunidos en su base por medio de una envoltura común

blanquecina. Tiene hojas planas, agudas, de más de 1cm de ancho. Algunas variedades producen tallo floral que portan pequeñas flores y pequeños bulbos vegetativos llamados micro bulbillos (Sims *et al.*, 1976). Las flores son blanquecinas o rosadas, reunidas en la extremidad de un escapo cilíndrico, hojoso, de 50-70 cm de altura, protegidas por dos brácteas espatiformes (Parodi, 1972). Estas no producen semillas, y cuando se forman son tan escasas que no pueden ser utilizadas. La propagación del ajo para el cultivo es agámica, a través de los bulbillos (dientes). Las variedades de ajo que se cultivan en nuestro país son: rosado paraguayo, blanco, chino, y colorado.

1.2. Importancia del cultivo de cebolla y ajo

El ajo y la cebolla son dos especies hortícolas invernales. En función de los volúmenes producidos, la cebolla ocupa el segundo lugar mundial entre las hortalizas, con una superficie implantada que alcanzó un total de 2.6 millones de hectáreas (IDR, 2005a).

Los tres principales países productores mundiales de cebolla son: China que participa con el 33.6 %, India con 10.3 % y EEUU con 5.9 % (SAGPyA, 2006). En Argentina, la cebolla es también una de las hortalizas más cultivada, ya que ocupa el tercer puesto después de la papa y el poroto. Las principales zonas productoras son el sur de Buenos Aires, el valle inferior de Río Negro, la Región de Cuyo (Mendoza y San Juan) y la provincia de Santiago del Estero. En 2003 se implantaron 25.000 ha y se obtuvo un rendimiento promedio de 24,5 t/ha (SAGPyA, 2006). Según la información que brinda la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación (SAGPyA 2006) la provincia de Buenos Aires posee la mayor superficie sembrada, los mejores rendimientos y la mayor producción. La producción nacional durante el año 2004 fue de 645.000 t (SAGPyA 2006).

Respecto al cultivo de ajo, los principales centros mundiales, de acuerdo a la FAO, son cuatro y presentan los siguientes niveles de producción en t: Asia, 83.3 %; Europa, 4.9 %; América del Norte, 2.7 % y América del Sur, 1.6 %. Los países centrales de Sudamérica, conformados por Brasil, Argentina y Chile poseen una participación significativa en el comercio mundial. Brasil es el principal comprador y Argentina el segundo mayor vendedor. Nuestro país abastece a sus socios comerciales del MERCOSUR así como a grandes mercados del Hemisferio Norte (IDR, 2005b).

En el año 2001 según los datos del Censo Nacional Agropecuario (C.N.A.) realizado por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC, 2002), para el

cultivo de ajo se destinó una superficie de 11.561 ha en el país. Las principales provincias productoras son Mendoza, Buenos Aires, Córdoba y San Juan. En cuanto al rendimiento, el promedio nacional es de 9,3 t/ha, encontrándose en el segundo lugar mundial. La provincia de Mendoza es la principal productora, con una participación relativa del 75 % en lo que se refiere a superficie y del 83 % en producción. El país exporta dos terceras partes de su cosecha, en particular en fresco a Brasil principalmente y en menor medida a Francia, EE UU, Bélgica, Países Bajos e Italia. En el año 2003 se exportaron 88.000 t de ajo y los dos principales destinos fueron Brasil e Indonesia (SAGPyA, 2005).

1.3. Enfermedades que afectan a la cebolla y al ajo

La producción de ajo y cebolla está limitada además de los factores abióticos por los factores bióticos que provocan enfermedades en estos cultivos que impactan en el rendimiento. Son atacados por virus, fitoplasmas, bacterias y hongos (Schwartz; Mohan, 1995).

Entre las enfermedades del follaje de relevancia para estos cultivos se citan: mildiu o "peronóspora" causada por *Peronospora destructor* que puede originar bulbos de menor tamaño en cebolla (Crowe *et al.*, 1995; Gatica; Oriolani, 1997; Acosta *et al.*, 1993); el moho de las hojas producido por *Stemphylium* spp. que se comporta como patógeno primario, y secundario en las lesiones provocadas por *P. destructor* (Hill, 1995; Gatica; Oriolani, 1997); oidio (*Oidiopsis taurica*) que ocasiona manchas en las hojas más viejas (Hill, 1995; Gatica; Oriolani, 1997). En las primeras etapas del ciclo vegetativo se observa tizoncillo por *Urocystis colchicici* y *U. cepulae* (Gatica; Oriolani, 1997), y la roya (*Puccinia allii*), que ha adquirido importancia en el cultivo de ajo (Miller; Lacy, 1995; Koike *et al.*, 2001).

Enfermedades de las partes subterráneas producidas por hongos y bacterias, algunas de las cuales se adquieren en el ciclo vegetativo y se manifiestan durante la conservación como la podredumbre basal causada por *Fusarium* spp. se describen a continuación:

1.3.1. Enfermedad de los almácigos o Damping off causada por *Pythium* spp. *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp.

Los síntomas del mal de los almácigos se observan sobre las semillas y en las plantas en pre y/o postemergencia. Las semillas infectadas, cuando comienzan a germinar, presentan un aspecto acuoso, se desarrolla un moho blanquecino y se pudren. Las raíces de cebolla se tornan oscuras, se desintegran y mueren. En las

plántulas afectadas, las hojas manifiestan un amarillamiento progresivo, con detención de crecimiento y muerte (Summer, 1995; Gatica; Oriolani, 1997).

1.3.2. Raíz rosada en cebolla producida por *Phoma/Pyrenochaeta terrestris*

El ataque por *P. terrestris* se localiza en las raíces ocasionando la pérdida de las mismas. Las raíces afectadas adquieren primero una coloración rosada, que con el tiempo cambia hacia el color morado. Estas se acintan, arrugan y finalmente mueren (Gatica; Oriolani, 1997). La apariencia de la planta es afectada, el tamaño y número de hojas se reduce y el follaje puede presentar un amarillamiento generalizado. En los ataques que se producen en el inicio del ciclo vegetativo, el continuo reemplazo de raíces genera un bulbo de menor tamaño (Summer, 1995).

1.3.3. Podredumbre blanca por *Sclerotium cepivorum*

Los bulbos presentan una podredumbre semiacuosa que se cubre con un micelio blanco y algodonoso sobre la lesión. En este micelio se forman pequeños y numerosos esclerocios de color negro. Las hojas más viejas se amarillean y marchitan, y luego todo el follaje muere. Cuando el ataque se produce al final del ciclo vegetativo, la enfermedad puede pasar inadvertida y progresar en la conservación (Acosta *et al.*, 1993; Summer, 1995; Gatica; Oriolani, 1997, Hunger *et al.*, 2002).

1.3.4. Podredumbre del cuello de cebolla por *Botrytis allii*

La infección por *Botrytis allii* se produce en el período próximo a la cosecha, por heridas a través del tejido del cuello. Los síntomas se desarrollan durante la conservación. Los tejidos afectados se ablandan, y adquieren una apariencia de húmedos y cocidos, observándose una separación entre la zona de avance y el tejido sano. La enfermedad progresa en el interior del bulbo y el micelio avanza hacia una nueva catáfila en forma lenta. Las partes más viejas se cubren de fructificaciones grisáceas del hongo. Finalmente se forman esclerocios en las catáfilas exteriores del bulbo (Acosta *et al.*, 1993; Lacy; Lorbeer, 1995; Gatica; Oriolani, 1997).

1.3.5. Podredumbre blanda bacteriana por *Dickeya chrysanthemi* = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Los tejidos de las catáfilas carnosas afectados por *Dickeya chrysanthemi* sufren una pudrición acuosa de color castaño con un típico olor fétido. La enfermedad progresa al interior del bulbo y el cuello se presenta blando si se ejerce presión, se pueden observar los exudados bacterianos. Los síntomas foliares se aprecian como una marchitez y blanqueado de las hojas (Gitaitis, 1995; Gatica; Oriolani, 1997).

1.3.6. Piel ácida por *Burkholderia cepacia* = *Pseudomonas cepacia*

Los primeros síntomas en cebolla se producen en las catáfilas más externas del bulbo. Se produce durante el almacenamiento una podredumbre blanda de color amarillenta, con un suave olor ácido (Mohan, 1995; Gatica; Oriolani, 1997).

1.3.7. Moho negro o carbonilla por *Aspergillus niger*

Los bulbos infectados por *Aspergillus niger* presentan una decoloración negra sobre todo en la zona del cuello. Las catáfilas se tornan quebradizas y se cubren con las fructificaciones del hongo, que se desprenden frotando la superficie. La decoloración usualmente se extiende desde el cuello hasta las catáfilas centrales, y produce un ligero ablandamiento de los tejidos (Hill, 1995; Gatica; Oriolani, 1997).

1.3.8. Moho azul del ajo por *Penicillium hirsutum* y *P. allii*

Los síntomas provocados por *Penicillium hirsutum* y *P. allii* durante el ciclo vegetativo del ajo incluyen marchitez, clorosis y un pobre stand de plantas. El hongo esporula sobre la superficie de los dientes con pudrición seca, produciendo una masa verdosa de espora (Summer, 1995, Valdez *et al.*, 2006).

1.3.9. Podredumbre basal o del disco ocasionada por *Fusarium* spp.

Los bulbos de ajo y de cebolla pueden ser afectados por distintas especies de *Fusarium* en cualquier momento durante el ciclo vegetativo. La enfermedad se manifiesta durante el cultivo y en el almacenaje. Los primeros síntomas son curvado y amarillamiento o necrosis de las hojas, que comienza por las puntas. Las plantas pueden marchitarse y hasta morir. Otros síntomas incluyen una reducción en el tamaño de los bulbos y un pobre desarrollo del sistema radical.

Durante la conservación la enfermedad se manifiesta en el disco. En un corte transversal de la cebolla se nota el avance del micelio que invade las catáfilas carnosas, produciendo una pudrición húmeda de color pardo que avanza hacia arriba. El progreso de la enfermedad ocasiona la destrucción total o parcial del bulbo. Los ajos toman apariencia de esponjosos, con una pudrición seca de color parda. Se puede ver un moho blanquecino, rosa o salmón que cubre los bulbillos o las cavidades internas (Acosta *et al.*, 1993; Summer, 1995; Gatica; Oriolani, 1997).

2. LA ENFERMEDAD: La podredumbre basal

La podredumbre basal causada por *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (*Foc*) representa una de las más serias enfermedades del cultivo de cebolla y de poscosecha de ajo (Schwartz; Mohan, 1995; Cramer, 2000; Swift *et al.*, 2002; Özer *et al.*, 2003 ; Galvan *et al.*, 2008; Rengwalska; Simon, 1986).

2.1. Epidemiología y ciclo de patogénesis

Foc es un hongo necrótrofo habitante del suelo, que sobrevive en forma de micelio en la materia orgánica (de Visser *et al.*, 2006) y de clamidosporas; macroconidios y menos frecuente por microconidios que resisten las bajas temperaturas en el suelo. El suelo infectado y la semilla contaminada representan la principal fuente de inóculo para la enfermedad (Köycü; Özer, 1997). Este hongo puede sobrevivir en el suelo en ausencia del hospedante pero debe competir con otros microorganismos. *Foc* se disemina a gran distancia por cebollas o dientes de ajo infectados, por el agua de riego y a través del trasplante de plantines de cebollas (Cramer, 2000).

La enfermedad se desarrolla en un rango de temperatura del suelo de 15 a 32 °C, con un óptimo entre 28 y 32 °C, siendo raro observarla cuando es inferior a 15° C. El pH para el crecimiento de *Foc* es de 6.6 pero puede crecer en un rango de 2.2 a 8.4 (Walker; Tims, 1924).

En el suelo los propágulos del hongo (clamidosporas) cerca o sobre las raíces de cebolla germinan y producen un limitado o extenso crecimiento micelial en la superficie de la raíz. La penetración a la raíz se produce directamente a través de la superficie ilesa o vía heridas sin la formación de apresorios (Abawi; Lorbeer, 1971b). El patógeno puede causar pérdidas durante el cultivo o permanecer latente en las plantas y bulbos, y desarrollar la podredumbre basal durante el almacenamiento. La podredumbre del bulbo comienza tan pronto como el patógeno coloniza desde la base del tallo hacia los tejidos de la vaina de la hoja (Abawi; Lorbeer 1971b). La infección en ajo es mayor después de la ocurrencia de períodos lluviosos, antes de la cosecha.

La temperatura del suelo es el factor limitante en la epidemiología de la enfermedad, pero la concentración de inóculo y ciertos factores del suelo también son importantes. En estudios con suelos orgánicos se determinó que el inóculo se encuentra distribuido desigualmente, hallándose desde 300 a 6500 propágulos/g de suelo seco en los primeros 15 cm de profundidad (Abawi; Lorbeer, 1971a).

Abawi y Lorbeer (1972) hallaron una correlación entre la densidad de inóculo de *Foc* y el desarrollo de la enfermedad tomando como medida la emergencia y el stand de plantines de cebolla creciendo en suelos artificialmente infectados.

Las plantas pueden ser infectadas en cualquier etapa de su desarrollo. Durante el almacenaje, el movimiento del patógeno entre bulbos es insignificante (Summer, 1995). Las pérdidas por podredumbre basal en cebolla, observadas durante este periodo, son tan importantes como las registradas durante el cultivo (Cramer, 2000). Los dientes de ajo infectados manifiestan la enfermedad en este período y su peso

disminuye, por lo que usualmente se descartan en el proceso de "desgranado" del bulbo.

3. LOS AGENTES CAUSALES: EL COMPLEJO *Fusarium* spp.

Foc es la especie citada como agente causal de la podredumbre basal. Pero otras especies de *Fusarium* se han aislado sobre bulbos de ajo y cebolla, causando podredumbres. Entre ellas, *F. proliferatum* fue mencionada por primera vez produciendo pudriciones en ajo por Dugan *et al.* (2003) y en cebolla por Mohan *et al.* (1987) y du Toit *et al.* (2003) en América del norte. Kiehr y Delhey (2005) lo registraron como agente causal de la podredumbre basal de la cebolla en Argentina, y en Serbia *F. proliferatum* fue aislado de ajos y cebollas por Stankovic *et al.* (2007). Por su parte Dugan *et al.* (2007) confirmaron la patogenicidad de aislamientos de *F. verticillioides* en ajo.

3.1. Taxonomía

Diferentes conceptos se utilizan en micología para definir una especie fúngica. El clásico concepto morfológico utiliza el criterio de que una especie puede ser reconocida y diferenciada de otra en base a sus características morfológicas (Leslie *et al.*, 2007; Summerell *et al.*, 2003 y Guarro *et al.*, 1999).

El concepto biológico requiere que miembros de la misma especie se reproduzcan y la progenie del cruzamiento también sea fértil y viable. Esto se puede aplicar sólo a hongos con reproducción sexual. Sin embargo en hongos asexuales, el intercambio genético a través de hibridación somática es una posibilidad teórica y se encuentra limitada por la incompatibilidad vegetativa (Guarro *et al.*, 1999; Leslie *et al.*, 2001).

Un concepto relativamente nuevo es el filogenético. En algunas situaciones este puede clarificar las dificultades taxonómicas. Secuencias de ADN se utilizan para generar caracteres que identifican clades y delimitan especies filogenéticas, en la práctica cualquier marcador que es suficientemente informativo, incluyendo los caracteres morfológicos se puede incluir en el proceso filogenético (Leslie *et al.*, 2001 y Summerell *et al.*, 2003). Este concepto enfatiza la divergencia nucleotídica (Giraud *et al.*, 2008).

El concepto del género *Fusarium* fue creado por Link en 1881 a partir de *F. roseum* (Booth, 1971). Los caracteres primarios que representaban a la especie fueron la presencia de conidios fusiformes septados (Leslie; Summerell, 2006) que se

originaban en un estroma. Según Booth (1971) la presencia de macroconidios fusiformes con una célula pie representa el carácter principal del género.

Fusarium pertenece al *phylum Ascomycota*, al orden de los *Hypocreales* y la familia *Hypocreaceae*. Se conoce el estado sexual (teleomorfo) de algunas especies y las más importantes pertenecen a los géneros *Gibberella* y *Nectria*.

La característica general del género *Fusarium* es la producción de tres tipos de esporas denominadas macroconidios, microconidios y clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983). Algunas especies producen los tres tipos de esporas, pero otras solo alguna de ellas. Los macroconidios son producidos en estructuras especializadas llamadas esporodoquios, en las que una masa de esporas es soportada por monofiálides cortas. Los macroconidios pueden también ser producidos en monofiálides o polifiálides en el micelio aéreo. Monofiálide es un conidióforo con una sola abertura o poro a través del cual el endoconidio es expulsado, en tanto que una polifiálide tiene dos o más poros o aberturas (Nelson *et al.*, 1994).

Los microconidios se producen en el micelio aéreo pero no en esporodoquios. Se pueden producir en falsas cabezas solamente o en falsas cabezas y en cadenas sobre monofiálides o polifiálides. La falsa cabeza ocurre cuando una gota de humedad se forma en la punta del conidióforo y encierra a los endoconidios cuando se producen. Los microconidios muestran varias formas y tamaños, y los producidos en cadenas tienen su base truncada.

El tercer tipo de espора es la clamidospора, de paredes gruesas llena de material lipídico que le sirve al hongo para sobrellevar el invierno en el suelo, cuando el hospedero susceptible no se encuentra. Estas pueden formarse solas, de a pares, en grupos o en cadenas, con paredes externas lisas o rugosas.

Los caracteres secundarios que se emplean para la identificación, cuando los aislamientos se hacen crecer en condiciones estándares de luz, temperatura y sustratos (Leslie; Summerell, 2006) son: la pigmentación y la morfología de la colonia, y usualmente se evalúan luego de una semana de incubación (Leslie; Summerell, 2006 y Summerell *et al.*, 2003). También la tasa de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y temperatura en un medio estándar es utilizada por algunos autores (Booth, 1971; Gerlach; Nirenberg, 1982).

Además de los macroconidios, microconidios, clamidosporas y estructuras relacionadas, otros caracteres también son usados para la delimitación de las especies. En algunas especies la presencia de hifas enrolladas es importante como en *F. circinatum*. La presencia de cristales en el medio, producidos por algunas especies,

es también un carácter diagnóstico. La capacidad de producir estructuras como esclerocios, se considera además como un importante carácter de diagnóstico (Leslie; Summerrell, 2006).

Fusarium es un género de hongos filamentosos que se encuentra mundialmente distribuido en el suelo y en sustratos orgánicos, y ha sido aislado en el ártico y en la arena del Sahara (Di Pietro *et al.*, 2003). Muchas especies de *Fusarium* son importantes patógenos de plantas y contaminantes de alimentos a través de las micotoxinas que producen, ocasionando enfermedades a animales y humanos (Nelson *et al.*, 1994).

F. oxysporum Schlecht. es un hongo cosmopolita, de múltiples formas especializadas, parásito de más de cien especies botánicas (Bosland, 1988). La especie ha sido ubicada en la sección *Elegans* y es el miembro más importante. *F. oxysporum* causa enfermedades de marchitez vascular (Di Pietro *et al.*, 2003) o podredumbre de raíces en muchas plantas. Sin embargo, a pesar del amplio rango de hospedantes, la especialización con un huésped se limita a un aislamiento en particular. Los aislamientos con el mismo o similar grupo de hospederos son asignados a una forma especial.

La forma especial corresponde a cepas con iguales características morfológicas pero que difieren en la capacidad de afectar a distintos hospederos (Alves-Santos *et al.*, 1999, Leslie *et al.*, 2007). Se han identificado más de 80 formas especiales. También las formas patogénicas de este hongo pueden clasificarse en razas, en relación a su patogenicidad diferencial basados en la especificidad del cultivar del hospedero afectado (Armstrong; Armstrong, 1981). La base genética de la especificidad de hospedero (*formae speciales*) y de la especificidad del cultivar (raza patogénica) de *F. oxysporum* no se conoce (Baayen *et al.*, 2000). Como especie *F. oxysporum* incluye aislamientos patogénicos y no patogénicos que son morfológicamente indistinguibles unos de otros (Gordon; Martyn, 1997; Lievens *et al.*, 2008).

En un sentido evolutivo, la interpretación resultante de esta suposición, es que las formas especiales son monofiléticas. Se asume que los aislamientos con un único rango de hospederos derivan de un solo genotipo patogénico exitoso (Kistler, 1997). Pero existen evidencias de que algunos de los aislamientos dentro de una forma especial a menudo difieren significativamente en su secuencia de ADN y no necesariamente son de un origen monofilético (Baayen *et al.*, 2000). Esta complejidad es el principal obstáculo para su identificación.

Foc es el responsable de pérdidas significativas durante el cultivo y el almacenaje de la cosecha de bulbos de cebolla en muchas partes del mundo, como en EEUU en Idaho, Oregon (Thornton; Mohan, 1996) y en Colorado (Swift *et al.*, 2002); en Turquía (Özer *et al.*, 2003) y en Italia (Fantino; Schiavi, 1987). También es citado como patogénico sobre ajo en Washington, EEUU (Dugan *et al.*, 2007).

F. proliferatum y *F. verticillioides* referenciados también como agentes patógenos de ajos y cebollas (du Toit *et al.*, 2003, Dugan *et al.*, 2003; Kiehr; Delhey, 2005, Stankovic *et al.*, 2007 y Dugan *et al.*, 2007) son especies anamorfas de la sección *Liseola* definidas de acuerdo a su morfología (Gerlach; Nirenberg, 1982). El estado sexual pertenece al complejo de *Gibberella fujikuroi*, compuesto por diez especies/poblaciones sexuales (Leslie *et al.*, 2007; Stankovic *et al.*, 2007).

La morfología de los macroconidios, carácter comúnmente empleado para distinguir las especies de *Fusarium*, no es suficiente para diferenciar las especies de la sección *Liseola* (Nelson *et al.*, 1983). Algunos taxónomos reconocieron sólo una especie, en esta sección denominada *F. moniliforme* Sheldon. La presencia o ausencia de polifiálides y/o microconidios, dispuestos en largas cadenas, cortas cadenas o falsas cabezas fueron las características que se usaron para distinguir las especies dentro de esta sección. Algunas de ellas varían con los aislamientos y con las condiciones de cultivo (Leslie, 1991). Una posible solución frente a esta dificultad es el uso del estado sexual para diferenciar las especies (Leslie, 1991).

F. proliferatum (*Gibberella intermedia*, mating population D) es un patógeno que afecta a varias plantas de importancia agrícola como el maíz (Chuzle *et al.*, 2000); el espárrago (Elmer, 1991); el ajo y la cebolla (Stankovic *et al.*, 2007) y plantas ornamentales como palmeras (Armengol *et al.*, 2005). Esta especie produce un amplio rango de micotoxinas como beavericina, fumonisinas, ácido fusárico y moniliformina (Leslie; Summerell, 2006; Carrillo, 2003).

F. verticillioides (*Gibberella moniliformis*, mating population A) está ampliamente distribuido en el mundo particularmente asociado con el maíz, ocasionando grandes pérdidas en este cultivo (Chuzle *et al.*, 2000, Leslie; Summerell, 2006). La taxonomía ha generado grandes controversias en este taxón, así algunos autores lo denominaron *F. moniliformis* y otros *F. verticillioides* (Leslie; Summerell, 2006). *F. verticillioides* es muy similar a *F. proliferatum*, pero estas especies se pueden diferenciar por la capacidad de formar cadenas de microconidios en polifiálides de esta última especie (Gerlach; Nirenberg, 1982). Además estas dos especies se encuentran muy

cercanamente relacionadas, basados en la similitud de los *loci* secuenciados (O'Donnell *et al.*, 1998).

3.2. Grupos de Compatibilidad Vegetativa

3.2.1. Heterocariosis

La formación de un heterocarionte entre individuos diferentes es un componente importante de muchos ciclos de vida fúngica y puede servir como el primer paso en el ciclo parasexual y en la transmisión de factores hipovirulentos como ARNs (Leslie 1993, Glass *et al.*, 2000 y Glass; Kaneko, 2003). La heterocariosis también es la manera por la cual un hongo normalmente haploide puede disfrutar de las ventajas de la diploidía funcional como son la complementación o la heterocariosis (Leslie, 1993). La formación del heterocarionte tiene ventajas potenciales del intercambio genético por mitosis (ciclo parasexual) o puede incrementar la biomasa por la contribución de esfuerzos fisiológicos como la explotación de recursos o la reproducción asexual/sexual (Leslie, 1993; Di Primo *et al.*, 2001).

Aunque el formar un heterocarionte sea una ventaja para los hongos filamentosos, existe un mecanismo genético que restringe la formación del heterocarionte entre dos individuos genéticamente diferentes. Si los individuos difieren en la especificidad de uno o más *het loci* (incompatibilidad heterocarionte, llamado también *vic* por incompatibilidad vegetativa), la célula de fusión heterocariótica por lo general es compartimentalizada y muere por un proceso de lisis, fenómeno llamado incompatibilidad vegetativa (Glass *et al.*, 2000). La incompatibilidad vegetativa reduce los riesgos de transmisión de elementos citoplasmáticos infecciosos parecidos a virus como ARNs, y de explotación por genotipos agresivos. Estos mecanismos de auto defensa pueden ser importantes para los hongos filamentosos ya que carecen de compartimentalización celular (Glass *et al.*, 2000; Leslie, 1993).

3.2.2. Grupos de Compatibilidad Vegetativa y su base genética

La compatibilidad vegetativa se encuentra mediada por múltiples *loci* de incompatibilidad denominados genes *vic* o *het* (Leslie, 1993). Cuando dos aislamientos de un hongo son compatibles vegetativamente, sus hifas pueden hacer contacto, fusionarse y formar un heterocarionte, que ocurre generalmente cuando existen alelos idénticos en cada locus *vic* o *het* (Correll, 1991, de Oliveira; da Costa, 2003).

La base genética y molecular de la función de los genes *vic* en *Fusarium*, usualmente se infiere desde lo que se conoce sobre estos *loci*, en otros géneros. Todos los genes *vic* en *Fusarium* son de la forma alélica. En esta interacción, el alelo

vic1 interactúa con otro alelo *vic1*; el alelo *vic2* interactúa con otro alelo *vic2*, pero los alelos *vic1* y *vic2* no interactúan entre sí. El número de *loci vic* en diferentes especies de *Fusarium* ha sido estimada en 10 a 15, aproximadamente el número de cromosomas para varias especies. Cuando dos hifas se fusionan para formar una célula inicial heterocariótica, se produce una contribución mutua por parte de cada núcleo de los alelos *vic* en el otro núcleo. Si ambos núcleos tienen idénticos alelos *vic*, entonces el heterocarionte es estable. Si los alelos de uno (o más) de los *loci vic* son diferentes, entonces el heterocarionte es transitorio e inestable, y la célula inicial heterocariótica es recluida de ambos lados y muere. La velocidad con que esta reacción de neutralización o muerte sucede depende del número de *loci* con diferencias alélicas.

La compatibilidad vegetativa puede ser detectada de varias maneras diferentes. En *Fusarium* la compatibilidad vegetativa, es visualizada por la habilidad de aislamientos auxotróficos de formar un heterocarionte prototrófico. En este tipo de interacción el evento positivo es la formación del heterocarionte. Aislamientos sin la formación de heterocariontes pueden ser debido a la incompatibilidad vegetativa o a la incapacidad física de uno (o ambos) para formar un heterocarionte con cualquier otro aislamiento. Aquellos que pierden la capacidad de formar heterocariontes, entre mutantes del mismo aislamiento se denominan heterocariontes auto-incompatibles.

En ausencia de un estado sexual conocido para *F. oxysporum*, la heterocariosis puede ser utilizada como una medida alternativa para determinar la relación genética entre aislamientos (Katan *et al.*, 1991). Aquellos aislamientos que son capaces de anastomosarse y formar un heterocarionte estable constituyen un grupo de compatibilidad vegetativa (GCV). Los estudios realizados por Puhalla (1985) indican que existe correlación entre compatibilidad vegetativa y forma especial. Este autor indicó que, en *F. oxysporum*, en ausencia de la etapa sexual y de la recombinación meiótica, los *loci* determinantes de la incompatibilidad vegetativa (*loci vic* o *het*) y los factores de virulencia estaban estrechamente ligados (Puhalla; Spieth, 1985). Por lo tanto los GCV en el análisis de poblaciones de *F. oxysporum* son empleados como una poderosa herramienta para diferenciar poblaciones patógenas de las no patógenas sobre el mismo hospedante, determinar razas y evaluar la homogeneidad genética entre poblaciones (Ahn *et al.*, 1998).

3.2.3. Análisis de los mutantes *nit*

Los principios y la técnica de uso de mutantes incapaces de utilizar nitratos (*nit*), fue demostrada por Puhalla en 1985 y desarrollada por Correll *et al.*, en 1987. Algunos de

los mutantes obtenidos del mismo aislamiento parental, son capaces de complementarse con otro y formar un heterocarionte en un medio con nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. La formación del heterocarionte entre mutantes complementarios del mismo aislamiento parental, se observa por el crecimiento de un micelio aéreo denso.

Los fenotipos de los mutantes *nit* de *F. oxysporum* se determinan por la morfología de su colonia en medios de cultivo que contienen una de cinco diferentes fuentes de nitrógeno. Los mutantes *nit* se pueden clasificar en tres clases fenotípicas. Estas clases representan una mutación en el locus estructural de la nitrato reductasa (*nit1*), en el locus que regula la vía específica de la asimilación del nitrato (*nit3*) y el *loci* que afecta la unión del molibdeno, cofactor necesario para la actividad de la nitrato reductasa (NitM).

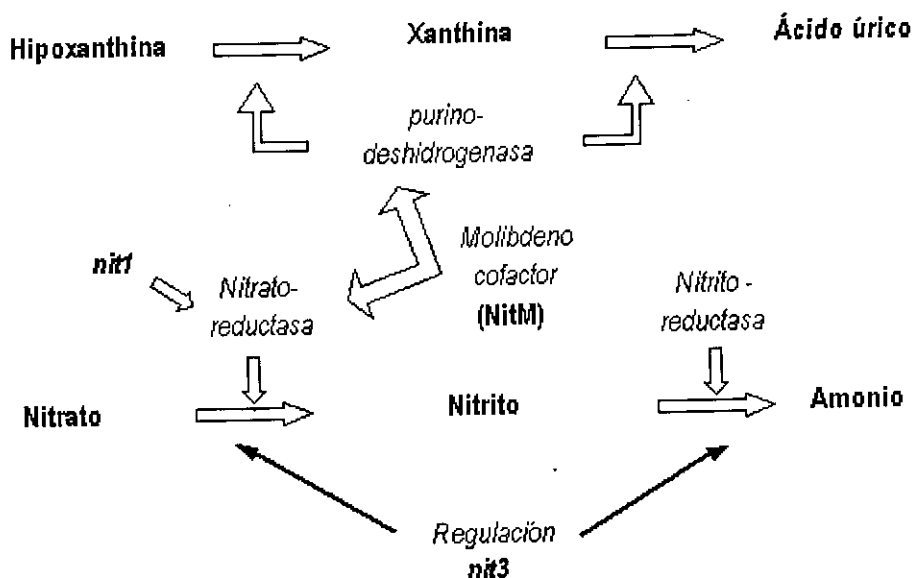


Figura 1. Vía metabólica del NO_3 y su relación con la generación y clasificación de mutantes *nit* para las pruebas de GCV. (Extraído de Leslie; Summerell; 2006).

El NO_3 es reducido a NO_2 por la enzima nitrato reductasa. Esta enzima puede reducir también ClO_3 a ClO_2 , un proceso tóxico. Luego el N_2 es reducido a NH_4 por la nitrito reductasa. La enzima nitrato reductasa es un octámero de un solo polipéptido que es codificado por *nit1*. Los aislamientos que poseen una mutación en *nit1* no pueden usar NO_3 como única fuente de nitrógeno, pero pueden utilizar otros compuestos como fuente nitrogenada. Además la proteína NIT1 posee un cofactor molibdeno que es parte activa de la enzima nitrato reductasa. Existen cinco *loci* que

codifican para cada uno de estos fragmentos de este cofactor (*nit2*, *nit4*, *nit5*, *nit6* y *nit7*), pero la identificación de estos mutantes carece de importancia para la técnica de GCV. En general a estos cinco *loci* se los denomina NitM, ya que todos definen el mismo fenotipo. Este cofactor funciona también como parte de la purina deshidrogenasa. La nitrato reductasa y la purina deshidrogenasa no pierden funcionalidad si uno de los fragmentos del cofactor se ha alterado. Por eso los mutantes NitM no pueden utilizar NO_3 o hypoxantina como fuente de nitrógeno, pero pueden emplear otros compuestos nitrogenados para crecer. Se ha encontrado una proteína reguladora, que está codificada por el locus *nit3* y es una proteína reguladora específica que afecta solo la vía de utilización del NO_3 (Fig. 1).

La formación de un heterocarionte es un proceso complejo que depende de la habilidad de un aislamiento de complementarse fisiológicamente. Conceptualmente existen dos mecanismos que son importantes para la heterocariosis: los responsables por el establecimiento del heterocarionte y los requeridos para su mantenimiento una vez que se ha establecido (Leslie, 1996).

La formación de un heterocarionte entre mutantes *nit* complementarios de un aislamiento o entre dos aislamientos, puede ser de distinto tipo. Se puede formar un heterocarionte robusto (abundante micelio en la zona de contacto); no existir complementación (ausencia de micelio); un heterocarionte de crecimiento lento y discontinuo; heterocariosis micelial como en mechones y reacciones dudosas (Katan *et al.*, 1991). No todos los aislamientos son capaces de formar tal heterocarionte (Leslie; Summerell, 2006). Se ha descubierto que algunos aislamientos de *F. oxysporum* no son compatibles vegetativamente con ellos mismos ni con otros aislamientos (Jacobson; Gordon, 1988). La ausencia de un micelio denso en la zona de contacto entre dos mutantes *nit* de un mismo aislamiento indicaría alelismo, solapamiento u otra manera de mutación (Katan *et al.*, 1994).

3.3. Caracterización por Marcadores Moleculares

El análisis de polimorfismos del ADN es una manera de establecer la variación genética entre microorganismos. Una gran parte de los métodos moleculares recurren al uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) para describir esta variación genética entre aislamientos. Entre estos los RAPD (polimorfismo del ADN amplificado al azar), AFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados), ERIC (secuencias repetitivas ínter génicas consenso de entero

bacterias) y REP (elementos repetitivos palindrómicos extragénicos), se emplearon para caracterizar aislamientos de *Fusarium* spp.

La PCR es un poderoso método con varias aplicaciones en la biología molecular. Esta reacción enzimática *in vitro* permite la amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN y la síntesis de ADN (Mullis, *et al.*, 1986, Mullis; Faloona, 1987). La amplificación se basa en el uso de una ADN polimerasa termoestable, aislada desde *Thermus aquaticus*, llamada *Taq* polimerasa (Saiki *et al.*, 1988). La PCR consiste en tres pasos fundamentales: la desnaturalización de la doble hebra del ADN molde, la hibridación del iniciador a la cadena del ADN desnaturalizado y la extensión de la secuencia de ADN con la síntesis de una nueva cadena de ADN (Edel, 1998).

El método RAPD se basa en la amplificación por PCR del ADN genómico con un iniciador corto, con una secuencia arbitraria de nucleótidos que permite detectar polimorfismos (Ouellet y Seifert, 1993; Assigbetse *et al.*, 1994). Este método al emplear bajas temperatura de pegado del iniciador, hace que la reacción sea inespecífica (Edel, 1998) y no reproducible. Assigbetse *et al.*, 1994 emplearon este marcador genético que les permitió diferenciar aislamientos patogénicos de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. En aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* Migheli *et al.* (1998), no encontraron correlación entre RAPD y origen geográfico.

Otro método empleado es la técnica de AFLP que se fundamenta en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN (Vos *et al.*, 1995 y Abdel-Satar *et al.*, 2003). Las desventajas de los AFLP (si bien los iniciadores son inespecíficos y la técnica es reproducible) son que dependen de las enzimas empleadas y de los nucleótidos elegidos en el diseño del primer (Edel, 1998). Abdel-Satar *et al.* (2003) empleó esta técnica para establecer relaciones filogenéticas de aislamientos de *Fusarium* spp. En otro estudio en *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* este marcador determinó la variación genética y la estructura de esta población en regiones de Australia (Wang *et al.*, 2006). Chulze *et al.* (2000) determinaron la variabilidad genética de aislamientos de la sección *Liseola* con AFLP.

También se conoce un método de PCR que es intermedio entre PCR al azar (RAPD y AFLP) y amplificaciones dirigidas. Los patrones de bandas generados por este tipo de PCR se basan en la amplificación con iniciadores definidos de acuerdo a elementos o/ secuencias repetitivas conocidos. Los iniciadores pueden ser dirigidos contra microsatélites o minisatélites, que son motivos de secuencias cortas de ADN repetidas en tándem de 2 a 10 pb, o 15 a 30 pb respectivamente (Geistlinger *et al.*, 1997, Edel, 1998). Por ejemplo los iniciadores correspondientes a secuencias repetitivas íter

génicas consenso de entero bacterias (ERIC) y elementos repetitivos palindrómicos extragénicos (REP) (Versalovic *et al.*, 1991) pueden ser empleados para generar patrones del genoma de microorganismos.

Los elementos REP consisten en una secuencia de repetición invertida de 33 pb sumamente conservada, exhibiéndose en aproximadamente 500 copias dispersas alrededor de los cromosomas de *Escherichia coli* y *Salmonella thiphimurium* (Hulton *et al.*, 1991). Múltiples funciones se han descrito para los elementos REP que incluyen funciones en la terminación de la trascrición, estabilidad del ARN mensajero y organización del dominio cromosómico *in vivo* (Versalovic *et al.*, 1991). Una segunda familia de secuencias conservadas presente en el genoma de enterobacterias ERIC ha sido citada (Hulton *et al.*, 1991). La secuencia ERIC posee una longitud de 126 pb y no tiene ninguna semejanza con las secuencias REP.

Versalovic *et al.* (1991), demostraron que las secuencias REP y ERIC están presentes en el genoma de diversas especies de eubacterias; y que estas secuencias pueden ser utilizadas como eficientes iniciadores en la PCR para producir patrones de diferentes genomas bacterianos. Edel *et al.* (1995) evaluaron el uso de los iniciadores derivados de las secuencias ERIC con otros marcadores moleculares para caracterizar aislamientos de *F. oxysporum*, y obtuvieron como resultado que el análisis de los fragmentos de restricción amplificados de la región de los espaciadores intergénicos ribosomales (IGS) se correlacionó con los patrones obtenidos por los iniciadores derivados de las secuencias ERIC y de los elementos REP. Los patrones generados por la PCR de ERIC o REP permitieron discriminar los aislamientos y además fueron procedimientos más eficientes en términos de simplicidad y rapidez (Edel *et al.*, 1995). Los iniciadores ERIC se probaron en bacterias, bacteriófagos, invertebrados, hongos y plantas, y mostraron que el modelo es fácilmente producido en todos los organismos (Gillings; Holley, 1997).

Los patrones generados por ERIC-PCR resultaron ser la técnica más apropiada para estudios de diversidad en poblaciones de *F. oxysporum* (Smith-White *et al.*, 2001). Tanto esta metodología y como los GCV se emplearon para la diferenciación de aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis* con buenos resultados (Gunn; Summerell, 2002).

Además de los métodos descritos existen otras herramientas moleculares que han sido empleadas en estudios de *Fusarium* spp. Se evaluó la diversidad genética mediante el análisis de los fragmentos de restricción de los IGS amplificados por PCR

en *F. verticillioides* (Mirete *et al.*, 2004), en poblaciones de *F. oxysporum* (Edel *et al.*, 2001) y en f. sp. *dianthi* (Lori *et al.*, 2004), en la f. sp. *spinaciae* (Kawabe *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización Morfológica de los agentes causales

1.1. Aislamiento

Los 81 aislamientos de *Fusarium* spp. provinieron de repiques, aislados de plantas de cebolla con síntomas y de bulbos enfermos de ajo y cebolla durante su almacenamiento. El muestreo se realizó en las localidades productoras de las provincias de Mendoza, San Juan, Río Negro y sur de Buenos Aires y los aislamientos se obtuvieron como lo describieron Valdez *et al.* (2004).

De estos aislamientos se obtuvieron cultivos monospóricos. Los aislamientos se hicieron crecer en Agar Papa Dextrosado (APD), a 22-25° C, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad, a 35 cm de dos tubos Philips TLT 40 W/54 RS luz día.

Después de 10-12 días de cultivo, los conidios se recolectaron por barrido superficial de la colonia en 10 ml de agua destilada estéril (ADE). Se volcaron gotas de esta suspensión en una placa de petri con Agar Agua (AA) y se dispersaron uniformemente. Las cajas se dejaron a temperatura de laboratorio (22-25° C), durante toda la noche para que los conidios germinaran.

Un solo conidio germinado se seleccionó con un micro sacabocado que reemplaza a un objetivo del revólver del microscopio, parafocal del objetivo 10x. El trozo de agar seccionado se transfirió a una caja que contenía APD, representando un cultivo monospórico.

Cada cultivo monospórico, se preservó como una suspensión de conidios muy concentrada en ADE por duplicado. La conservación se realizó a temperatura ambiente. Estos aislamientos pertenecen a Laboratorio de Patología José Crnko (LJC) de la Estación Experimental INTA La Consulta.

Tabla 1. 81 aislamientos de *Fusarium* spp. aislados de ajos y cebollas en localidades productoras de las provincias de San Juan, Mendoza, Buenos Aires y Río Negro.

Aislamiento	Provincia	Departamento/Localidad	Huésped/Sustrato/cv.
LJC 10001	San Juan	Chimbas	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10002	San Juan	Chimbas	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10003	San Juan	Chimbas	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10005	San Juan	Rawson, Médano de Oro	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10006	San Juan	Rawson, Médano de Oro	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10007	San Juan	Rawson, Médano de Oro	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10009	San Juan	Pocito, Villa Aberastain	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10010	San Juan	Pocito, Villa Aberastain	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10011	San Juan	Pocito, Villa Aberastain	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10012	San Juan	Pocito, Villa Aberastain	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10013*	San Juan	Pocito	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10014	San Juan	Pocito	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10015	San Juan	Pocito	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10017*	San Juan	Pocito, Villa Aberastain	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10019	San Juan	Rivadavia	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10021	San Juan	Pocito	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10023*	San Juan	Pocito, INTA	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10026	Mendoza	Lavalle	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10027	Mendoza	Lavalle, El Paramillo	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10029	Mendoza	Maipú, Colonia Bombal	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10030	Mendoza	Maipú, Colonia Bombal	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10031	Mendoza	Maipú, Colonia Bombal	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10033	Mendoza	Maipú, Colonia Bombal	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10035	Mendoza	Guaymallén, La Primavera	Cebolla. cv:Valencianita
LJC 10037*	Mendoza	Luján, Perdriel	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10039*	Mendoza	Luján	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10041	Mendoza	Luján, Agrelo	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10043*	Mendoza	Luján, Agrelo	Cebolla. cv:Valcatorce
LJC 10045	Mendoza	Maipú	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10046*	Mendoza	Maipú	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10047	Mendoza	Lavalle	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10048	Mendoza	Lavalle	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10049	Mendoza	San Carlos, Calise	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10050	Mendoza	San Carlos, Calise	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10051	Mendoza	San Carlos, Casas Viejas	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10053	Mendoza	San Carlos	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10054*	Mendoza	Tupungato, Cordón del Plata	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10056	Mendoza	San Carlos, La Consulta	Cebolla. cv:Otra
LJC 10058	San Juan	Jachal, Bella Vista	Cebolla. cv:Valcatorce
LJC 10060	San Juan	Jachal, Pampa Vieja	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10061	San Juan	Jachal, Pampa Vieja	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10062	San Juan	Jachal, Pampa del Chañar	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10063	San Juan	Jachal, Pampa del Chañar	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10064	San Juan	Jachal, Médano	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10067	San Juan	Jachal, Otra banda	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10068	San Juan	Jachal, Otra banda	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10069	San Juan	Jachal, Alto Huaco	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10070	San Juan	Jachal, Fical	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10072	San Juan	Jachal, Niquivil	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10074*	San Juan	Pocito	Cebolla. cv:Valenciana

LJC 10076*	San Juan	Pocito	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10077	San Juan	...	Cebolla. cv:Valenciana
LJC 10078	San Juan	...	Cebolla. Cv:Valenciana
LJC 10079	Buenos Aires	Villalonga	Cebolla. cv:Valcatorce
LJC 10081	Buenos Aires	...	Cebolla. cv:Otra
LJC 10083*	Río Negro	...	Cebolla. cv:Valcatorce
LJC 10085*	Buenos Aires	Pedro Luro	Cebolla. cv:Valcatorce
LJC 10086	Buenos Aires	Pedro Luro	Cebolla. cv:Valcatorce
LJC 10087	Río Negro	...	Cebolla. Cv:Valcatorce
LJC 10088*	Buenos Aires	Ascasubi	Cebolla. cv:Otra
LJC 10166	Mendoza	...	Ajo
LJC 10167	Mendoza	...	Ajo
LJC 10168	Mendoza	...	Ajo
LJC 10170	Mendoza	...	Ajo
LJC 10171	Mendoza	...	Ajo
LJC 10172	Mendoza	...	Ajo
LJC 10173	Mendoza	...	Ajo
LJC 10174	Mendoza	...	Ajo
LJC 10175	Mendoza	...	Ajo
LJC 10176	Mendoza	...	Ajo
LJC 10178	Mendoza	...	Ajo
LJC 10180	Mendoza	...	Ajo
LJC 10181	Mendoza	...	Ajo
LJC 10182	Mendoza	...	Ajo
LJC 10183	Mendoza	...	Ajo
LJC 10185	Mendoza	...	Ajo
LJC 10186	Mendoza	...	Ajo
LJC 10187	Mendoza	...	Ajo
LJC 10188	Mendoza	...	Ajo
LJC 10189	Mendoza	...	Ajo
LJC 10190	Mendoza	...	Ajo

* Aislamientos identificados morfológicamente por la Dra. Azucena Ridao y el Dr. Ulf Thrane (Valdez *et al.*, 2005).

1.2. Identificación

Basados en los caracteres morfológicos, las identificaciones se realizaron de acuerdo a lo descrito por Gerlach y Nirenberg (1982). Los sustratos utilizados para la identificación fueron APD (Difco), cuyo pH se ajustó a 6.5-7 y Agar Hoja Clavel (AHC).

Se cosecharon hojas jóvenes de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en activo crecimiento, y sin residuos de agroquímicos. Las hojas se cortaron en trocitos de aproximadamente 5 mm² y se secaron en estufa a 50 °C durante dos horas, quedando las hojas verdes y crespas. Los trocitos de hojas se colocaron en un frasco de vidrio con tapa y se esterilizaron con Óxido de Propileno (OP). Se colocó 1 mL de OP por cada cuarto de envase que ocuparon las hojas (Fisher *et al.*, 1982).

El medio AHC se preparó colocando algunos trocitos de hojas de clavel en cajas de petri con AA a temperatura de 45 °C. Este medio se utilizó luego de dejarlo cuatro días

a temperatura de laboratorio, para controlar el crecimiento de posibles contaminantes en los trocitos de hojas de clavel (Nelson *et al.*, 1983)

Los cultivos se iniciaron colocándolos a 25 °C bajo tubos fluorescente de luz de día con una secuencia de 12 horas de luz y oscuridad, durante 4 días (Booth, 1971). De cada aislamiento estos se cortaron del borde de la colonia, discos de micelio de 5 mm de diámetro que transfirieron a placas de petri de 9 cm de diámetro con APD (Difco). Las placas se incubaron durante 10 días, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad, bajo dos tubos fluorescentes (Philips TLT 40 W/54 RS luz día) con una intensidad lumínica de 7000 lux, a 25 °C.

1.2.1. Crecimiento *in vitro* y macromorfología

Se registraron las características macroscópicas de las colonias como presencia o ausencia y color del micelio aéreo, luego de 10 días de crecimiento en medio APD (Difco). También se evaluó el color del reverso de la colonia. Para estas evaluaciones se empleó una escala de color de pinturas (Sherwin Williams).

Para valorar la tasa de crecimiento diaria se marcaron en el reverso de cada caja, una línea que incluía el centro del disco de 5 mm de cada aislamiento. Todos los días a la misma hora, se marcó con un color diferente por día, el crecimiento logrado. Al final de los 10 días se realizaron las mediciones del crecimiento diario en mm. La tasa de crecimiento de cada aislamiento resultó del promedio de las tres repeticiones del crecimiento diario de cada aislamiento.

Las evaluaciones se realizaron en una cámara de cría que tenía tres estanterías, cada una representó un bloque, con igual temperatura. También se utilizó el medio de cultivo APD (Difco) para estos ensayos.

Se realizó el análisis de la varianza de la tasa de crecimiento en centímetros utilizando el procedimiento GLM incluido en las rutinas del programa Statical Analysis System (SAS Institute, 1996). Cuando la diferencia entre aislamientos fue significativa se empleó la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de 0,05 (SAS Institute, 1996). Además se calculó el coeficiente de variación del ensayo propuesto.

1.2.2. Micromorfología

Para observar las características de los conidióforos y microconidios, y su presencia o ausencia, se utilizó la técnica de microcultivo descrita por Booth (1977) pero con modificaciones. La técnica consistió en colocar un trozo de APD de 3 mm de espesor y 10 mm de largo, en el centro de un porta objeto estéril. El medio de cultivo se inoculó en cada una de sus esquinas con una pequeña cantidad de inóculo. Luego se puso un cubreobjeto y se colocaron en una cámara húmeda. Se incubaron en estufa a 25° C

hasta el desarrollo del micelio durante 24 a 36 horas según el caso. La cámara húmeda se realizó colocando en una caja de petri estéril una mota de algodón embebida en ADE. Un portaobjeto estéril se empleó de soporte para el otro portaobjeto que contenía el medio de cultivo. Con un microscopio óptico Leitz se observaron las características de los conidióforos, si eran monofialides o polifialides y la disposición de los conidios sobre estos en cadenas o falsas cabezas.

La morfología de los microconidios, macroconidios y clamidosporas, se registró a partir de tres repeticiones (bloque) de los aislamientos que se hicieron crecer con un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad, bajo dos tubos de luz negra (Alic 18 W/T8) y uno de luz blanca (Philips TLT 40 W/54 RS luz día), en el medio de cultivo AHC a 25 °C. Con estas condiciones se estimuló la esporulación y la formación de macroconidios y clamidosporas. Los caracteres de los conidios que se evaluaron fueron: para macroconidios, presencia o ausencia, forma, tamaño (largo y ancho) y número de septas; para microconidios, presencia o ausencia, abundancia en el micelio, y para clamidosporas forma, presencia o ausencia y disposición (en cadena, en grupos, intercalares, terminales, simples o de a pares).

Se realizó el análisis de la varianza del largo y ancho de los macro y microconidios, utilizando el procedimiento GLM incluido en las rutinas del programa Statical Analysis System (SAS Institute, 1996). Cuando la diferencia entre aislamientos fue significativa se empleó es la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de 0,05 (SAS Institute, 1996). Además se calculó el coeficiente de variación del ensayo propuesto.

2. Caracterización por Pruebas de Patogenicidad

2.1. Aislamientos desde cebolla

Los aislamientos de *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. compactum* se hicieron crecer en Caldo de Papa Dextrosado (CPD) a temperatura de laboratorio 22-25 °C, en agitador LAB-LINE a 120 rpm, durante 7 días. Luego se filtró a través de tela de voile para eliminar las hifas. La concentración de esporas se ajustó con un hematocímetro a aproximadamente 10^7 conidios/mL.

Las pruebas se realizaron sobre el cultivar Valcatorce INTA de susceptibilidad probada (Prioletta *et al.*, 2005) Se utilizaron plantines sanos de cebolla, de 45 días, obtenidos a partir de semillas esterilizadas (en alcohol 70 % durante 30 segundos y lavandina comercial (55g Cl/L) al 1 % (durante 5 minutos), sembradas en invernáculo, en almácigos con suelo estéril autoclavado (dos días consecutivos durante 2 horas). Una vez extraídos los plantines se lavaron con ADE y se colocaron en la suspensión

de conidios durante 2 horas. El tratamiento testigo se realizó colocando los plantines en agua estéril. Luego se transplantaron a macetas plásticas de 11, 5 x 11 cm con una mezcla de suelo y arena estériles en partes iguales (v/v). Se colocaron 5 plantines de cebolla en cada una de las tres macetas plásticas que correspondieron a la repetición de cada aislamiento, y se regaron con agua estéril. Las macetas se colocaron en invernadero y se regaron con agua estéril.

Tres semanas después de la inoculación se evaluaron los síntomas. Tanto en los bulbos como en las raíces se reconocieron cinco niveles de enfermedad de acuerdo con lo que se describe en la Tabla 2 (Stankovic *et al.*, 2007). Un índice de severidad (IS) de la enfermedad se calculó a partir de la media de las cinco plantas y las tres repeticiones.

Tabla 2. Escala de evaluación de la patogenicidad, en base al desarrollo de síntomas en plantas de cebollas inoculadas con distintas especies y aislamientos de *Fusarium*. (Stankovic *et al.*, 2007)

Clase	Síntomas
1	Sin síntomas;
2	<10 % de raíces podridas;
3	10-50 % de raíces podridas;
4	>50 % de raíces podridas y leves síntomas en bulbos;
5	raíces completamente podridas y síntomas severos en bulbos;

Se realizó el análisis de la varianza del IS, utilizando el procedimiento GLM incluido en las rutinas del programa Statical Analysis System (SAS Institute, 1996). Cuando la diferencia entre tratamientos fue significativa se empleó es la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de 0,05 (SAS Institute, 1996). Además se calculó el coeficiente de variación (%) del ensayo propuesto.

2.2. Aislamientos desde ajo

2.2.1. Pruebas de patogenicidad en planta

Las plantas de ajo se obtuvieron de dientes desinfectados con lavandina comercial al 1 % (55 g Cl/L) durante 5 minutos, enjuagados con agua estéril tres veces y sembrados en macetas con suelo estéril. A los 20 días las plantas de ajo se inocularon por inmersión de sus raíces durante 2 horas, en una suspensión con una concentración de 5×10^6 conidios/mL. El tratamiento testigo se realizó sumergiendo las raíces de las plantas en ADE. Se transplantaron tres plantas de ajo en macetas de 11, 5 x 11 cm con una mezcla partes iguales de suelo y arena (v/v), autoclavado durante 2

horas en 2 días consecutivos y aireado. Durante los 30 días siguientes se registró la aparición de síntomas que se evaluó con la escala descrita en las pruebas de patogenicidad para aislamientos desde cebolla.

2.2.2. Pruebas de patogenicidad en poscosecha

Los aislamientos se hicieron crecer en condiciones similares a las mencionadas para las pruebas en cebolla. La concentración de la suspensión se ajustó a 5×10^6 conidios/mL. Para el tratamiento control se utilizó ADE.

Los dientes de ajo Nieve INTA se esterilizaron superficialmente, sumergiéndolos en lavandina comercial al 1 % (55 g Cl/L) durante 5 minutos. La inoculación consistió en realizar una herida de 4.5 mm de profundidad y 2 mm de diámetro. En la herida se colocó una gota de 50 μ L de la suspensión de conidios que se cubrió con una gota de parafina. Los dientes de ajo, 10 por tratamiento, se colocaron en bandejas herméticamente cerradas, a 22-25 °C y oscuridad, durante 3 a 5 semanas para permitir el desarrollo de síntomas (Dugan *et al.*, 2007).

Transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro de la lesión, se seccionó el bulbo longitudinalmente a través del punto de infección y se registró la profundidad de la necrosis en mm. Se calculó luego el volumen de pudrición utilizando las fórmulas propuestas por Sorenson y Sparks (1980) según:

1. Cuando la profundidad fue mayor que la mitad del diámetro:

$$VP = \pi * d^2 * (p - 0.1 * d) / 4$$

2. Cuando la profundidad fue menor que la mitad del diámetro:

$$VP = \pi * p * (p^2 + 0.75 * d^2) / 5 \text{ y}$$

3. Cuando la profundidad fue igual a la mitad del diámetro, se utilizó una u otra fórmula.

Donde: VP = volumen de pudrición, d = diámetro de la pudrición y p = profundidad de la pudrición.

De acuerdo al volumen de daño desarrollado, los aislamientos se clasificaron en cinco grupos (Tabla 3).

Tabla 3. Escala de evaluación de la patogenicidad en base al desarrollo de la pudrición de poscosecha en ajos inoculados con distintas especies y aislamientos de *Fusarium*.

Patogenicidad	Volumen de pudrición en mm ³
Altamente patógeno	Más de 120
Patógeno	de 101 a 120
Moderadamente patógeno	de 76 a 100
Levemente patógeno	de 45 a 75
No patógeno	menos de 45

Se realizó el análisis de la varianza del volumen de pudrición (VP) en mm³ utilizando el procedimiento GLM incluido en las rutinas del programa Statal Analysis System (SAS Institute, 1996). Cuando la diferencia entre tratamientos fue significativa se empleó es la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de 0,05 (SAS Institute, 1996). Se calculó el coeficiente de variación del ensayo propuesto. Además se calculó el coeficiente de correlación entre las pruebas de patogenicidad en planta y en poscosecha utilizando el procedimiento PROC CORR y PROC REG incluido en las rutinas del programa Statal Analysis System (SAS Institute, 1996).

3. Caracterización genética

3.1. Grupos de Compatibilidad Vegetativa (GCV)

La generación de mutantes, la determinación del fenotipo y las pruebas de complementación se realizaron de acuerdo a los procedimientos propuestos por Correll *et al.*, 1987.

3.1.1. Generación de mutantes *nit*

Para generar mutantes, cada aislamiento se hizo crecer en APD por 3 a 4 días a temperatura de laboratorio (22/25 °C). Pequeños trozos de micelio de 2 mm³ se incubaron en los medios clorados: Papa Dextrosa Clorato (PDC) y Medio Mínimo Clorato (MMC) con 1.5 % de Clorato de K. En los aislamientos en los que falló la generación de mutantes, la concentración de Clorato de K se incrementó a 3 %. Las placas se incubaron en estufa a 22° C y se examinaron periódicamente para observar sectores de rápido crecimiento de una colonia inicialmente restringida. Todos los sectores se transfirieron a Medio Mínimo (MM). Los sectores que presentaron un crecimiento tenue y expansivo, sin micelio aéreo se consideraron mutantes *nit*.

3.1.2. Determinación de los fenotipos de mutantes *nit*

Los mutantes *nit* fueron clasificados como *nit1/3* y NitM de acuerdo a su crecimiento en cada uno de los siguientes medios que contenían distintas fuentes de nitrógeno; Medio Nitrato (MN): Medio Básico (MB) más 2 g/L de NaNO₃ y Medio Hypoxanthina (MH): MB más 0.2 g/L de hypoxanthina (Tabla 4). Para identificar a los distintos fenotipos se transfirió un trozo de micelio de 2 mm³, desde MMC o PDC a estos medios descriptos y se observó la morfología de la colonia luego de crecer 3 a 4 días a 22 °C en estufa a oscuridad. En casos especiales, donde no se logró obtener mutantes con el fenotipo NitM, se identificó el fenotipo en *nit1* o *nit3* en medio Nitrito: MB más 0.5 g/l NaNO₂. Los mutantes *nit* se preservaron en tubos de pico de flauta con MM. La conservación se realizó a temperatura de 5-8 °C, en heladera.

Tabla 4. Identificación de mutantes de *Fusarium* spp. sin capacidad de utilizar nitrato (*nit*) por su crecimiento en distintas fuentes de nitrógeno.

Mutación	Tipo de mutante	Crecimiento en distintas fuentes de nitrógeno		
		Nitrato	Nitrito	Hypoxanthina
Ninguna	Tipo silvestre	+	+	+
Locus estructural de la nitrato reductasa	<i>nit1</i>	-	+	+
Locus regulador específico de la vía	<i>nit3</i>	-	-	+
Loci del cofactor Molibdeno	NitM	-	-	-

3.1.3. Pruebas de complementación

Dos mutantes complementarios de cada aislamiento (usualmente un NitM y un *nit1/3*) fueron apareados con sus recíprocos complementarios, en MM, en todas las posibles combinaciones. En los casos especiales donde no se logró obtener el fenotipo mutante NitM se emplearon los fenotipos *nit1* y *nit3*. Los apareamientos se realizaron colocando cada mutante *nit* separado a 3 cm en un patrón rectangular; se incubaron durante 7 a 14 días como se describió anteriormente y se evaluó. La formación de heterocariontes se evidenció por el crecimiento denso de micelio aéreo en la zona de contacto entre dos mutantes.

La auto-incompatibilidad vegetativa, alélismo, solapamiento u algún tipo de mutación de incompatibilidad, se manifestó por la ausencia de crecimiento en la zona de contacto entre dos mutantes del mismo aislamiento (Katan *et al.*, 1994). Ausencia de crecimiento entre la zona de contacto de mutantes *nit* de diferentes aislamientos, indicó no complementariedad o incapacidad para formar heterocariontes debido a la falta de compatibilidad vegetativa.

3.2. Caracterización molecular

3.2.1. Protocolo de extracción de ADN

Basados en los protocolos de Edel *et al.* (1995) y Saghai-Marroof *et al.* (1984) se realizaron algunas modificaciones y se elaboró el protocolo de extracción de ADN para todos los aislamientos de *Fusarium* spp. que se describe a continuación. Se cultivaron los aislamientos a temperatura de laboratorio (25 °C \pm 2 °C), durante 4 días, en un agitador (LAB-LINE) a 150 rpm en 80 mL de CPD, inoculado con una suspensión de esporas. Se recolectó el micelio, por filtración a través de una tela de voile estéril y se

liofilizó (Chriss Mesinznicher Apparatabe 336, Osterode, Solling). Un microtubo de 1.5 mL se llenó hasta la mitad de la porción cónica con el micelio liofilizado y se rompió con la punta de un tip estéril. Luego se agregaron 500 μ L de buffer de extracción (0.1M Tris [pH 7.5], 1% CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilanomio), 0.7M NaCl, 10mM EDTA, 1 % 2-mercaptoethanol y proteinasa K 0.3 mg/mL de concentración final. Se incubó a 65 °C por 30 minutos en baño maría. Se dejó enfriar y se añadió igual volumen (500 μ L) de Cloroformo:isoamilalcohol en una proporción de 24:1. Se mezcló y se centrifugó (Hettich Zentrifugen Mikro 22, Tuttlingen) durante 10 minutos a 16434 g a temperatura ambiente. El sobrenadante acuoso se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó igual volumen de isopropanol / etanol-acetato para que el ADN de alto peso molecular floculara. El flóculo se centrifugó por 10 minutos a 16434 g, se formó un pellet de ADN y se descartó el líquido sobrenadante lentamente. El precipitado se lavó con 70 % etanol. Los ADN de las muestras se secaron dejando los tubos invertidos durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente estos se resuspendieron durante toda la noche a 4 °C en 100 μ L de solución TE (10mM Tris pH 8 y 1mM EDTA) que contenía ARNasa (10mg/mL) durante 1 hora a 37 °C. El ADN se preservó a -20 °C hasta su posterior utilización.

3.2.1.1. Determinación de la concentración de ADN

La calidad del ADN extraído se examinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % TBE 1X (0.045M Tris Base; 0.045M Ácido Bórico y 2mM EDTA (pH 8.0)) teñido con 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio, sembrando 5 μ L de muestra de ADN y 3 μ L de buffer de carga A (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA, 30 % Glicerol y 2mg/L Azul de Bromo Fenol). La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 1 hora en una cuba horizontal (Apparatus GNA-200 Pharmacia, Sweden) y se fotografió con un procesador digital de imagen Image QuantTM 400 versión 1.0.0 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Se cuantificó la concentración de ADN con el espectrofotómetro SmartSpec 3000 BIO-RAD (California, USA) Se realizaron diluciones 1:20 de las muestras en ADE. Se estableció la concentración de ADN en función de la absorbancia a 260 nm (OD260) en base a la fórmula:

$$\text{Concentración de ADN (ng/}\mu\text{L)} = \text{OD260} * \text{factor de dilución} * 50 \text{ ng/}\mu\text{L}.$$

La pureza del ADN se estimó de la relación entre las lecturas de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Se consideró de buena calidad aquellas muestras que presentaron valores comprendidos entre 1,8 y 2,2. La concentración de ADN de trabajo se ajustó a 10 ng/ μ L con ADE y se conservó a -20 °C hasta su uso posterior.

3.2.1.2. Reacción de ERIC-PCR

La reacción se realizó siguiendo el protocolo de Godoy *et al.* (2004), con modificaciones. Para la misma se empleó un volumen de 25 μ L, que contenía las siguientes concentraciones por reacción: 2 mM de $MgCl_2$, 1X PCR Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl), 0.2 mM de cada nucleótido, 0.5 μ M de los iniciadores ERIC: ERIC-1 y ERIC-2 (Tabla 5) (Versalovic *et al.*, 1991), 50 ng de ADN genómico y 1 U de Platinum DNA *Taq* polimerasa (InvitrogenTM, Brasil).

Tabla 5. Secuencia de los iniciadores empleados en este estudio identificados por Versalovic *et al.*, 1991.

Identificación del primer	Secuencia 5'- 3'
ERIC-1	GTGAATCCCCAGGAGCTTACAT
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

3.2.2.1. Condiciones de la reacción

Las siguientes condiciones de amplificación del ADN se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100TM MJ Research (Watertown, MS, USA) programado con: una desnaturalización inicial de 7 minutos a 35 °C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, apareamiento de 1 minuto a 52 °C y extensión de 8 minutos a 65 °C y una extensión final de 16 minutos a 65 °C.

3.2.2.2. Visualización y análisis de los productos de la reacción

Alícuotas (5 μ L) de cada producto de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % TBE 1X (0,45M Tris Base; 0,45M Ácido Bórico y 2mM EDTA [pH 8.0]) teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g/mL. Las muestras fueron corridas con 3 μ L de buffer de carga A (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA, 30 % Glicerol y 2mg/L Azul de Bromo Fenol) a un voltaje constante de 100W en una cuba horizontal (Apparatus GNA-200 Pharmacia, Sweden) hasta que el frente de corrida estuvo en la parte inferior del gel. Los geles fueron fotografiados bajo transiluminador 302-nm UV por un procesador digital de imagen Image QuantTM 400 versión 1.0.0 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Las reacciones se repitieron 2 a 3 veces para confirmar su reproducibilidad.

El análisis de los geles se realizó por observación directa. Se generó una matriz de datos binarios donde se le otorgó el valor 1 a la presencia de banda y 0 a la ausencia de banda de cada aislamiento. La combinación de los datos de los aislamientos se analizó por el coeficiente de concordancia simple o (simple matching) y la metodología del promedio encadenado o UPGMA (siglas del inglés) para construir un dendograma

con el módulo de Análisis de conglomerados del programa estadístico InfoStat versión 1.1 (InfoStat, 2002). Primero se realizó un análisis de los datos por especie, tanto de los aislamientos de cebolla y los de ajo. En segunda instancia se elaboró un análisis integral con los aislamientos que representaban a los patrones distintivos de cada especie.

RESULTADOS

1. Caracterización Morfológica de los agentes causales

1.2. Identificación

F. oxysporum Schlecht. fue la especie más frecuentemente aislada (63 %, Tabla 6) e identificada por sus caracteres macro y micro morfológicos. De acuerdo a la frecuencia de distribución por especie se lo encontró en un 66,7 % en aislamientos provenientes de cebolla (40 aislamientos, Tabla 6), y en un 52,4 % de los obtenidos a partir de ajo (11 aislamientos, Tabla 6).

Las colonias se caracterizaron por presentar un aspecto variable en APD, diferencias que dependieron del aislamiento. En general, presentaron una pigmentación durazno, violeta a color vinoso. Al comienzo el micelio aéreo resultó abundante, en algunos aislamientos disperso y aracnoide, liso, primero de color blanco y luego cambiando a distintos tonos como blanquecino, durazno, con matices morados o violáceos. Los microconidios unicelulares cilíndricos, elipsoidales o reniformes, se formaron desde monofiálides cortas y dispuestos en falsas cabezas. Los macroconidios fueron moderadamente curvados, sub-cilíndricos, predominando los de tres septas y luego los de cinco septas, en algunos casos con la célula apical levemente curvada y la célula basal pedicelada. Las clamidósporas se encontraron en las hifas o los conidios, terminales o intercalares, solas o de a pares, de forma globosa a sub-globosa (Fig. 2).

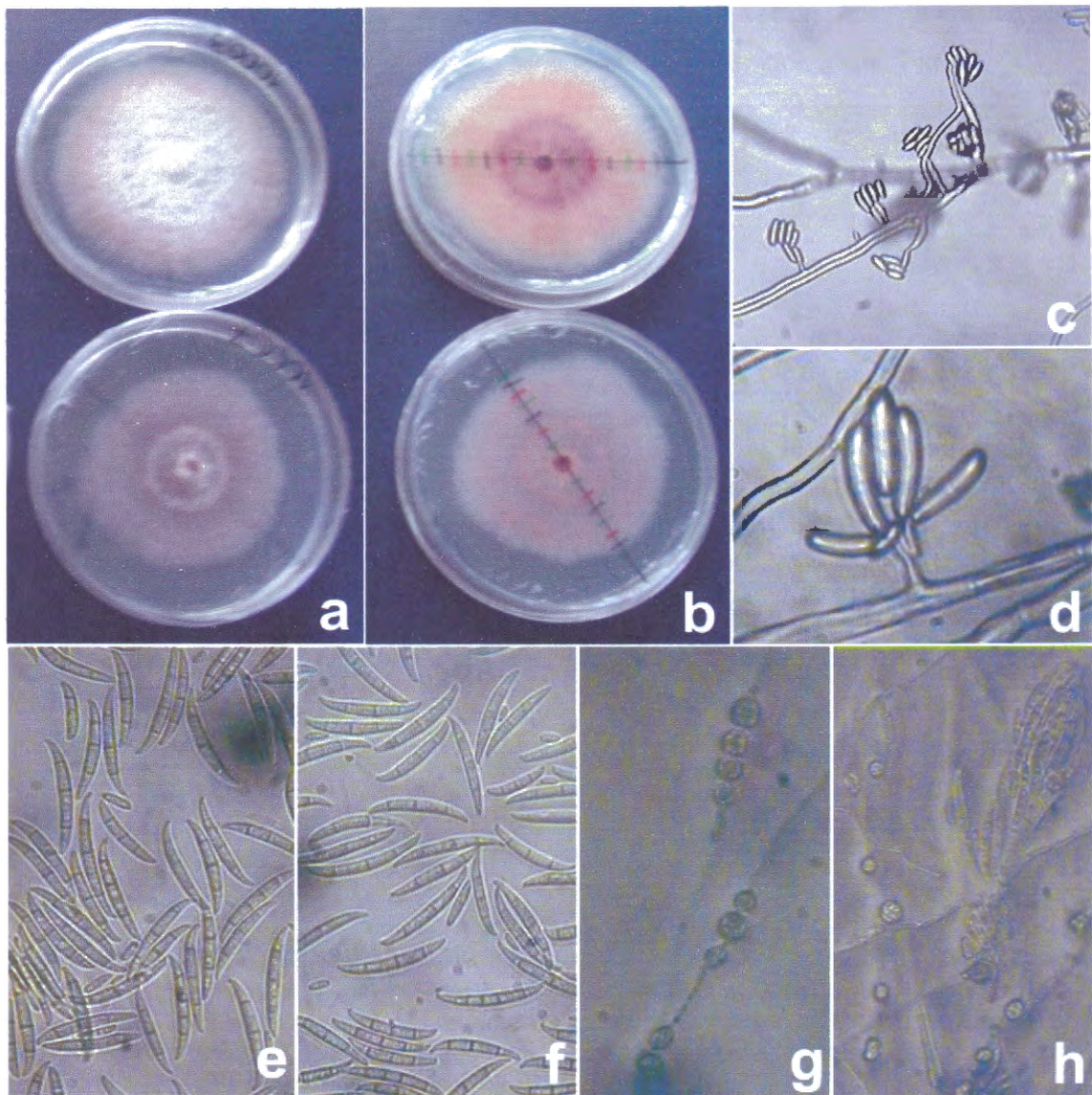


Figura 2. *F. oxysporum* a)- Pigmentación de la colonia en APD, de los aislamientos LJC 10003 y LJC 10007 ; b)- aspecto del reverso del micelio; c)- microconidios elipsoidales dispuestos en falsas cabezas (40x); d)- sobre conidioforos cortos (100x); e) y f)- macroconidios con célula apical curvada y célula basal pedicelada (40x); g) y h) - clamidosporas en hifas o conidios, solas, de a pares o en cadena (40x) en AHC.

Se encontró que el 15 %, 9 aislamientos desde cebolla, y el 33,3 %, 7 aislamientos de ajo, correspondieron a la especie *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg var. *minus* Nirenberg (19,8 %, Tabla 6). Las colonias de este hongo sobre el medio APD presentaron, en general, una pigmentación parda liliácea, violeta a vinosa, salmón o ladrillo. El micelio aéreo fue abundante, panoso, blanco a rosado a un color vinoso oscuro. Se observaron largas cadenas de microconidios de forma clavada, con la base truncada, producidos sobre polifialides. La producción de macroconidios fue escasa y

se formaron solo bajo luz UV, predominando los de 3 septas, con la célula apical estrecha, y la célula basal diferente. No se observaron clamidosporas (Fig. 3).

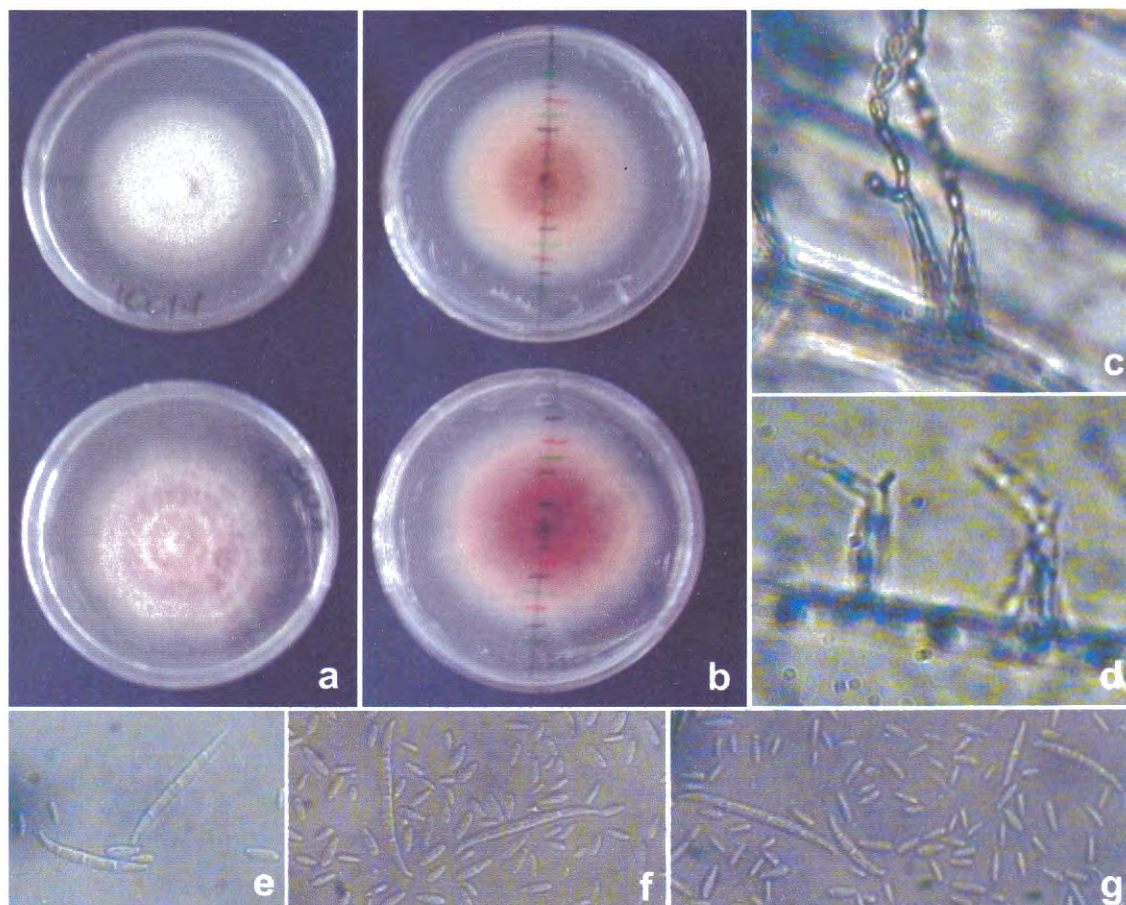


Figura 3. *F. proliferatum* a)- Pigmentación de colonias de en APD, de los aislamientos LJC 10014 y LJC 10013; b)- aspecto del reverso del micelio; c)- microconidios en cadenas (100x); d)- polifialides (100x). e), f) y g)- macroconidios con célula apical estrecha y microconidios de forma clavada y con base truncada (40x) en AHC.

Cuatro aislamientos desde cebolla (6,7 %) y 3 desde ajo (14,3 %) se identificaron como *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (8,6 %, Tabla 6). Estos aislamientos sobre APD mostraron una pigmentación vinosa y violácea. El micelio aéreo fue generalmente abundante, de color blanco a vináceo. La formación de los microconidios de forma clavada con la base aplanada se produjo sobre conidióforos monofiálides, que se dispusieron en largas cadenas y a veces en falsas cabezas. Los macroconidios que se observaron presentaron comúnmente de 3 a 5 septas, delgados, falcados pero algo rectos, ensanchados justo debajo de la célula apical (estrecha y curvada), con una célula basal característica. Si bien no hubo formación de clamidosporas, a veces se observaron en las hifas células abultadas con las paredes engrosadas (Fig. 4).

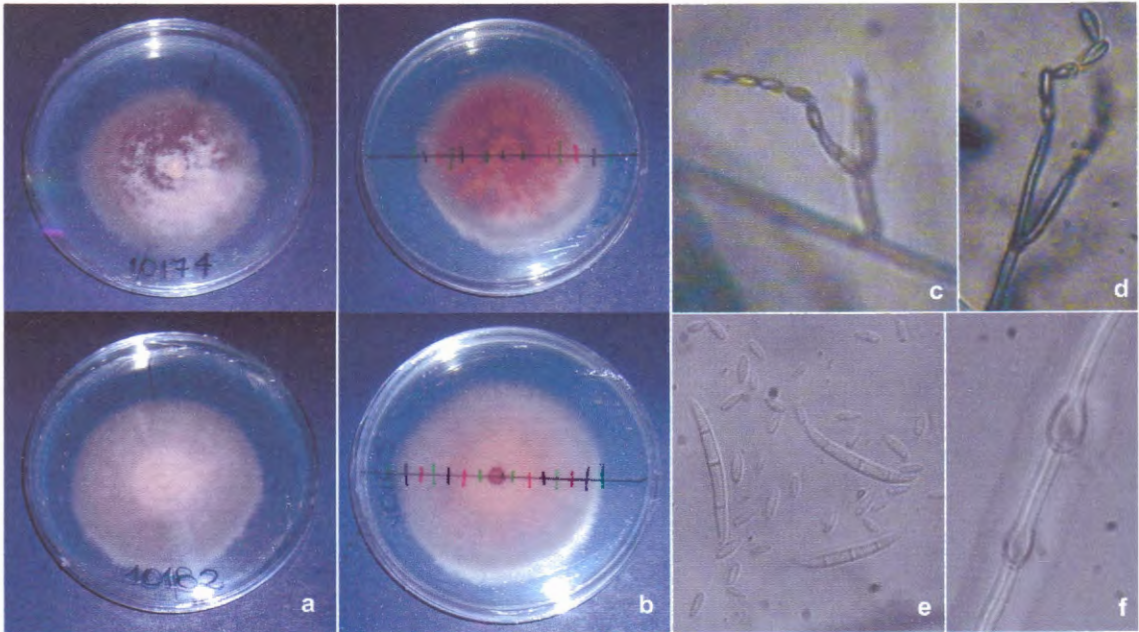


Figura 4. *F. verticillioides* a)- Pigmentación de la colonia en APD, de los aislamientos LJC 10174 y LJC 10182; b)- aspecto del reverso del micelio; c) y d)- microconidios cadenas sobre conidióforos monofialídicos (40x); e)- macro y microconidios (40x); f)- hifas con células abultadas de pared engrosada (40x) en AHC.

F. solani (Mart.) Appel & Wollenw. Emend. Snyder & Hansen se presentó en 6,2 % de los aislamientos y sólo desde cebolla (8,3 %, Tabla 6). Las colonias presentaron una pigmentación color crema. El micelio aéreo se observó con un aspecto de fieltro o terciopelo, algunas veces zonado dependiendo del aislamiento. Todos los aislamientos exhibieron microconidios de forma oval, elipsoidal a sub-cilíndricos dispuestos en falsas cabezas en monofialides largas y delgadas, bien características. Los macroconidios cortos, sub-cilíndricos, con las paredes gruesas, con una corta célula apical y la célula basal pedicelada; predominando generalmente los de 3 septas y menos frecuentemente los que presentaron 4 o 5 septas. Las clamidosporas se dispusieron en forma terminal o intercalar en hifas y conidios, con paredes lisas o rugosas dependiendo del aislamiento, solas, de a pares, en cadenas o en grupos (Fig. 5).

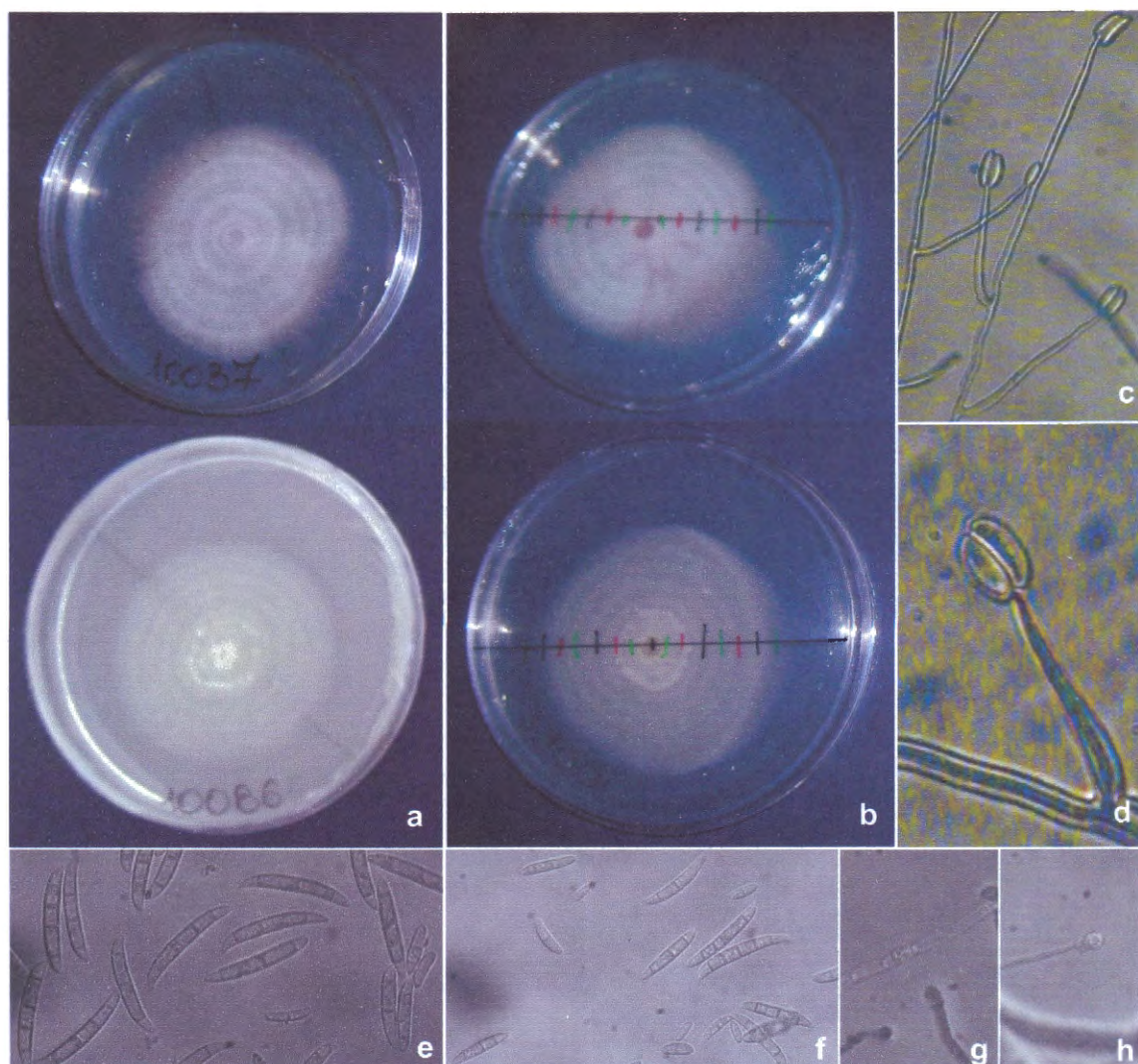


Figura 5. *F. solani* a)- Aspecto de la colonia en APD, de los aislamientos LJC 10037 y LJC 10086 y b)- pigmentación del micelio en el reverso de la colonia; c) (40x) y d)- (100x) microconidios producidos en monofiálides largas; e) y f)- macroconidios (40x) y g) y h)- clamidosporas (40x) en AHC.

Solamente un aislamiento desde cebolla, que pertenecía a una zona productora de la provincia de Río Negro se identificó como *F. compactum* (Wollenweber) Gordon. La colonia se caracterizó por una pigmentación rosa que fue palideciendo y virando al ocre. El aislamiento en APD, presentó un micelio aéreo veloso y apretado en principio de color blanquecino a rosa, y más tarde viró a un color ocre. Produjo solamente macroconidios sobre monofiálides muy compactas, cortas y robustas. Los macroconidios presentaron forma compacta y predominaron los de 5 septas. La formación de clamidosporas fue abundante, predominando sobre las hifas, la mayoría dispuestas de forma intercalar, solitarias, de a pares y frecuentemente en cadenas o grupos (Fig. 6).

Otro aislamiento desde cebolla no pudo ser clasificado, por lo que se lo identificó como *Fusarium* sp. (1,2 %, Tabla 6).

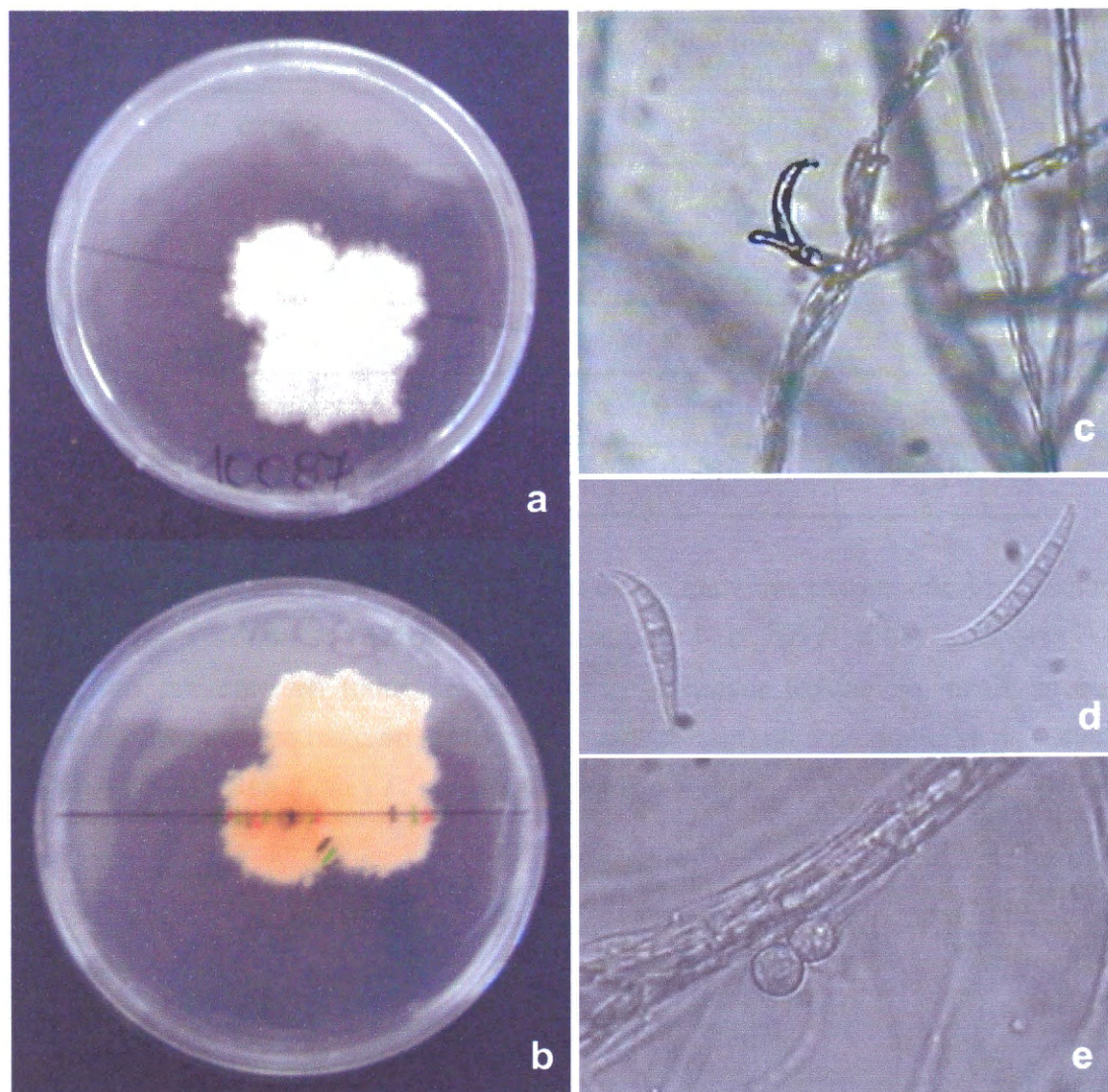


Figura 6. *F. compactum* a)- Aspecto de la colonia en APD, del aislamiento LJC 10087; b)- pigmentación del micelio en el reverso de la colonia; c)- macroconidio producido en el micelio aéreo (10x); d)- macroconidios compactos de 5 septas (40x) en AHC; e)- clamidosporas sobre hifas (40x).

Tabla 6. Frecuencia parcial y total en porcentaje, de aislamientos de *Fusarium*, de cebolla y ajo de las localidades productoras muestreadas en las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro.

Especie	Hospedero	Frecuencia parcial en %	Frecuencia total en %
<i>F. oxysporum</i>	Cebolla	66,7	63
	Ajo	52,4	
<i>F. proliferatum</i>	Cebolla	15	19,8
	Ajo	33,3	
<i>F. verticillioides</i>	Cebolla	6,7	8,6
	Ajo	14,3	
<i>F. solani</i>	Cebolla	8,3	6,2
	Ajo	0	
<i>F. compactum</i>	Cebolla	1,7	1,2
	Ajo	0	
<i>Fusarium</i> sp.	Cebolla	1,7	1,2
	Ajo	0	

En la Tabla 7 se muestra la distribución de las especies por provincia productora de cebolla y ajo, donde se realizaron los muestreos. *F. oxysporum* fue la especie que se encontró presente en todas las zonas con la mayor frecuencia, mientras que *F. verticillioides* sólo se halló en las localidades/departamentos productores de cebolla de la provincia de San Juan y *F. compactum* en Río Negro.

Tabla 7. Distribución de especies de *Fusarium* aisladas desde cebolla de las localidades productoras de las provincias de San Juan, Mendoza, Buenos Aires y Río Negro, determinadas por sus caracteres morfológicos.

Origen/Provincia	Especie	Nº de aislamientos (Frecuencia %)
San Juan	<i>F. oxysporum</i>	21 (65,6 %)
	<i>F. proliferatum</i>	5 (15,6 %)
	<i>F. verticillioides</i>	4 (12,5 %)
	<i>F. solani</i>	2 (6,3 %)
Mendoza	<i>F. oxysporum</i>	15 (71,4 %)
	<i>F. proliferatum</i>	3 (14,3 %)
	<i>F. solani</i>	2 (9,5 %)
	<i>Fusarium</i> sp.	1 (4,8 %)
Buenos Aires	<i>F. oxysporum</i>	4 (80 %)
	<i>F. solani</i>	1 (20 %)
Río Negro	<i>F. compactum</i>	1 (50 %)
	<i>F. solani</i>	1 (50 %)

1.2.1. Crecimiento *in vitro* y macromorfología

El análisis de la tasa de crecimiento diaria expresada en cm al quinto día de incubación demostró que existen diferencias significativas entre los distintos aislamientos ($p < 0,0001$, Tabla 8). Sólo se muestra la tabla de análisis de la varianza para la tasa de crecimiento del quinto día (CV 12,46 %, R^2 0,84). El aislamiento de mayor tasa de crecimiento al quinto día que difirió significativamente del resto fue LJC 10056, y LJC 10087 mostró la menor tasa de crecimiento al quinto día.

Tabla 8. Cuadro de análisis de la varianza para la tasa de crecimiento diaria en cm al quinto día de todos los aislamientos de *Fusarium* obtenidos desde cebolla y ajo, en medio APD con un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad a 25 °C +/- 2 °C.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11,30	82	0,14	10,32	<0,0001
Aislamiento	11,15	80	0,14	10,43	<0,0001
Bloque	0,16	2	0,08	5,85	0,0035
Error	2,14	160	0,01		
Total	13,44	242			

Al analizar la tasa de crecimiento promedio, discriminando los aislamientos obtenidos desde ajo, se observó que existían diferencias significativas ($p < 0,001$, CV 3,95 %) entre ellos. El grupo formado por LJC 10170 y LJC 10171 mostró la mayor tasa promedio de crecimiento. El aislamiento LJC 10183 exhibió la menor tasa promedio de crecimiento que fue significativamente diferente del resto. En el caso de los aislamientos obtenidos desde cebolla, también se observaron diferencias significativas entre ellos al analizar la tasa de crecimiento promedio ($p < 0,001$ y CV 4,29 %). Los que presentaron la mayor y menor tasa de crecimiento promedio que difirió significativamente del resto fueron LJC 10056 y LCJ 10087 respectivamente.

En la Tabla 9 se observan las diferencias en las tasas de crecimiento diario de todas las especies hasta el quinto día de evaluación. En el primer día *F. compactum* mostró una menor tasa, durante el segundo día *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides* no mostraron una tasa de crecimiento significativamente diferente. Durante el tercer día no existieron diferencias significativas en la tasa promedio de crecimiento entre las especies. A partir del cuarto día se comenzó a observar diferencias en la tasa promedio de crecimiento entre las distintas especies. La especie de menor tasa al quinto día en medio de cultivo APD en las condiciones establecidas en el ensayo fue *F. compactum* y la que presentó mayor tasa de crecimiento diaria fue *F. verticillioides* (Tabla 9).

Tabla 9. Tasa promedio de crecimiento (TPC) expresada en cm al quinto día de las especies de *Fusarium* aisladas desde cebolla y ajo en APD bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad a 25 °C +/- 2 °C.

Especie	TPC día1	TPC día2	TPC día3	TPC día4	TPC día5
<i>F. compactum</i>	0,30 b	0,47 b	1,00 a	0,50 c	0,27 d
<i>Fusarium sp.</i>	0,67 a	1,07 a	0,80 a	0,93 ab	0,83 c
<i>F. solani</i>	0,61 a	0,69 b	0,92 a	0,82 b	0,84 c
<i>F. oxysporum</i>	0,80 a	1,11 a	0,95 a	1,02 ab	0,97 bc
<i>F. proliferatum</i>	0,67 a	1,09 a	1,02 a	1,05 a	1,01 ab
<i>F. verticillioides</i>	0,74 a	1,13 a	0,99 a	1,05 a	1,06 a

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para la prueba de medias por el método de Tukey.

En la Figura 7 se muestran las curvas de crecimiento diario expresado en cm hasta el décimo día para cada especie, se observa que las especies de mayor crecimiento fueron *Fusarium sp.*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum*. *F. compactum* presentó el menor crecimiento, mientras que *F. solani* mostró un comportamiento intermedio de crecimiento con respecto al resto.

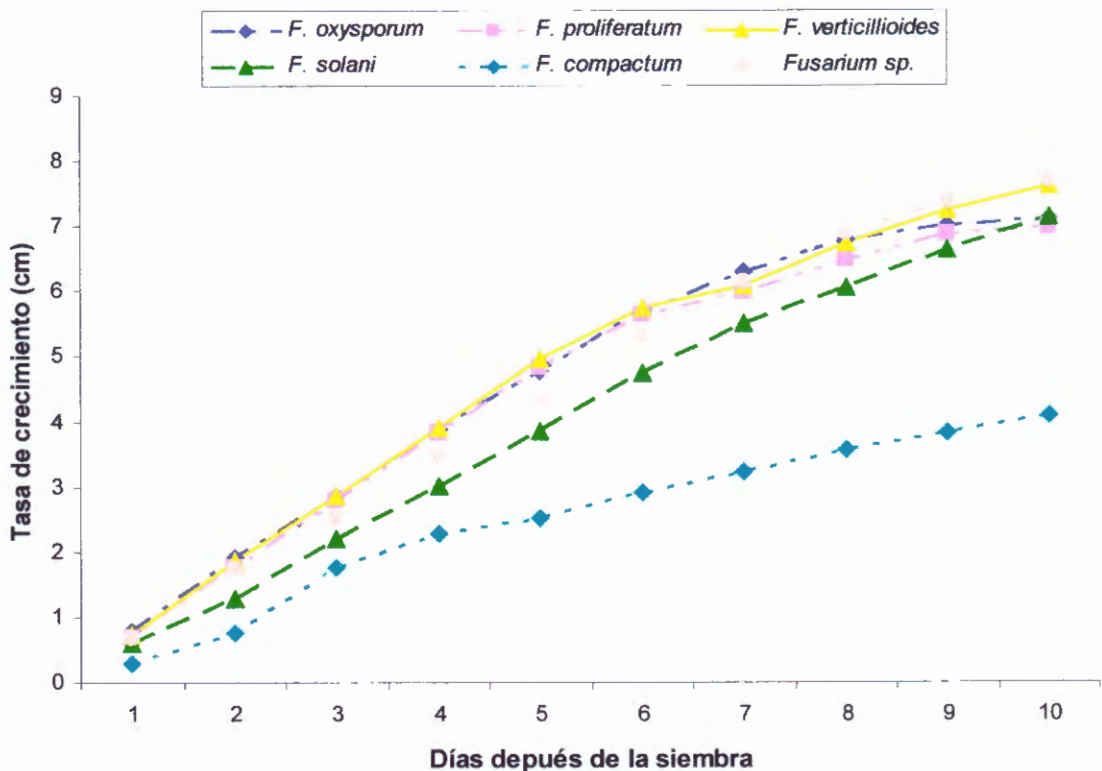


Figura 7. Curva de crecimiento medio en cm/día de cepas de *Fusarium* aisladas de cebolla y ajo en medio de cultivo APD, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y oscuridad a 25 °C +/- 2 °C.

Entre las especies *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, se hallaron diferencias significativas ($p < 0,0001$, CV 16,25 %) al analizar la tasa de crecimiento en cm del 5to día de acuerdo a la procedencia (ajo o cebolla) de los aislamientos. En *F. oxysporum* se encontraron diferencias significativas entre aislamientos ($p < 0,005$, CV 14,9 %), los obtenidos de cebolla exhibieron la mayor tasa de crecimiento en cm al día 5 que los de ajo. Este comportamiento se observó también en *F. proliferatum* ($p < 0,0001$, CV 18,25 %) y en *F. verticillioides* ($p < 0,0001$, CV 11,89 %) con diferencias significativas entre los aislamientos, y presentando los de cebolla una mayor tasa de crecimiento en cm al 5to que los de ajo (Tabla 10).

Tabla 10. Tasa de crecimiento medio en cm al 5to día, de los aislamientos de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, de cebolla y ajo, en medio APD con un fotoperiodo de 12 h de luz y oscuridad a 25 °C +/- 2 °C.

Especie	Tasa de crecimiento en cm al 5to día	
	Ajo	Cebolla
<i>F. oxysporum</i>	4,39 b	4,89 a
<i>F. proliferatum</i>	3,88 b	5,59 a
<i>F. verticillioides</i>	3,97 b	5,71 a

Letras distintas indican diferencias significativas en el sentido de las filas.

1.2.2. Micromorfología

En la Figura 8 se pudo observar el valor promedio en micrones del largo y ancho de microconidios (0 y 1 septa) y macroconidios (3 y 5 septas) para cada especie en medio de cultivo AHC. Las características de cada aislamiento se registraron en el Apéndice 1.

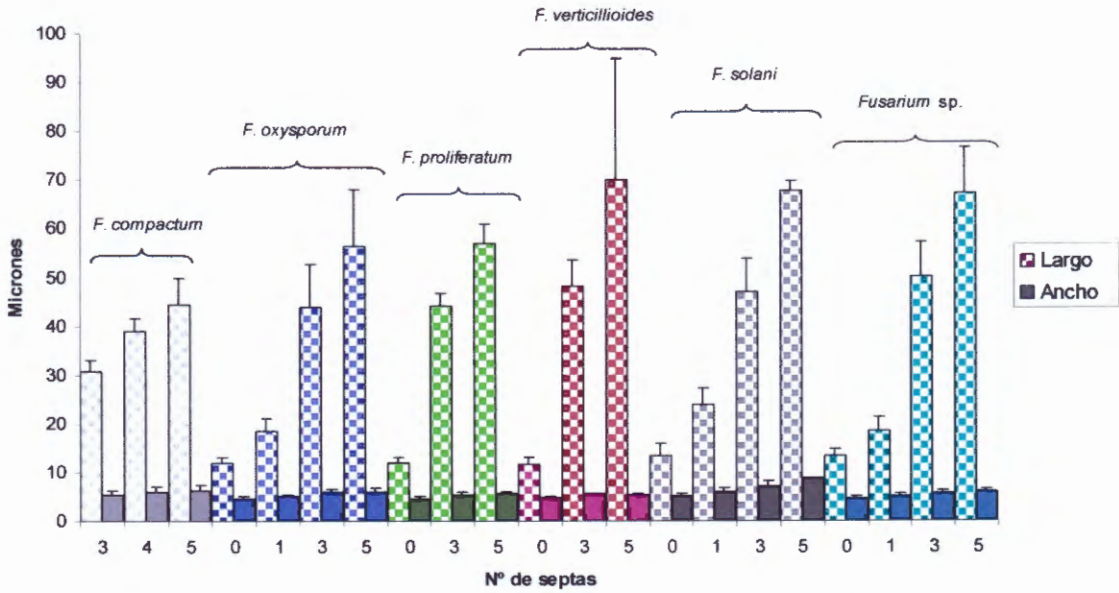


Figura 8. Promedio de largo y ancho de los conidios (microconidios con 0 y 1 septo, macroconidios con 3 y 5 septos) de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de cebolla y ajo, en medio AHC.

2. Caracterización por Pruebas de Patogenicidad

2.1. Aislamientos desde cebolla

Se probó la patogenicidad de los aislamientos sobre plantas sanas de cebolla del cultivar Valcatorce INTA de 45 días de edad. Estas se inocularon con una suspensión de 1×10^7 conidios/mL y al término de 3 semanas se evaluaron los síntomas de la enfermedad en raíces y bulbos. Los síntomas variaron en intensidad, observándose raíces flácidas, con lesiones semitransparentes, con podredumbres acuosas o completamente desintegradas. En los bulbos se presentaron lesiones o podredumbres blandas en los casos en que el desarrollo de la enfermedad fue más severo (Fig. 9).

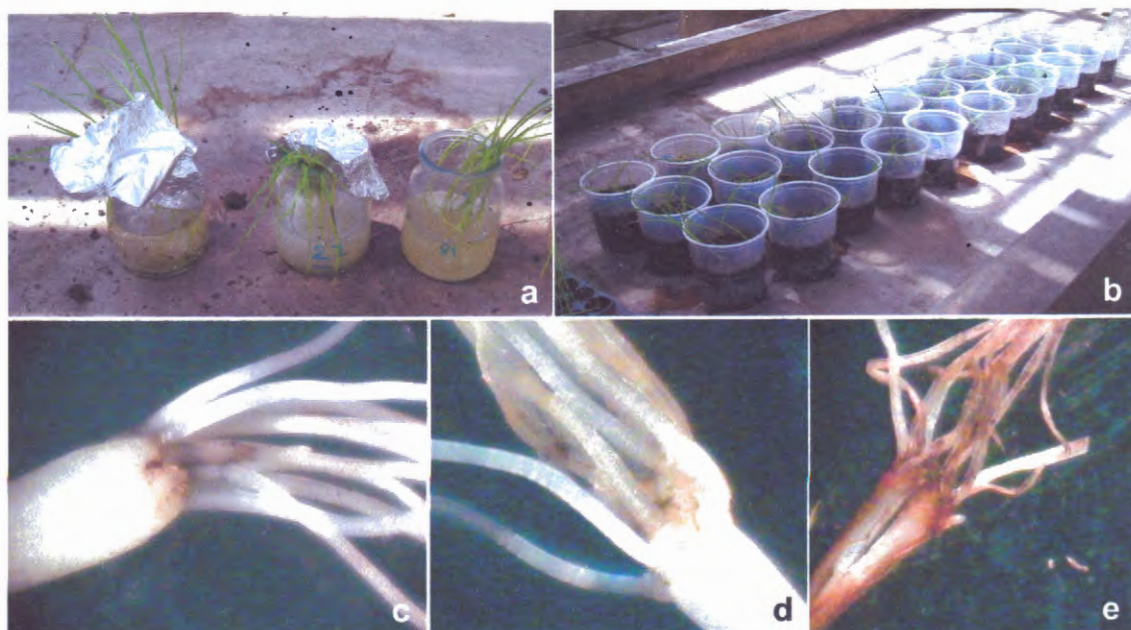


Figura 9. a)- Plantas de cebolla cv. Valcatorce INTA de 45 días, inoculadas con una suspensión de 1×10^7 conidios/mL de *Fusarium* spp. y ADE. b)- Transplante en macetas con una mezcla de suelo estéril. c)- Tratamiento control sin síntomas. d)- Raíces flácidas con lesiones semitransparentes. e)- Bulbo con podredumbre blanda.

Todos los aislamientos produjeron síntomas en las plantas de cebollas inoculadas. Los resultados mostraron diferencias significativas en la patogenicidad entre los aislamientos ($p < 0,0001$) con respecto al control cuando el IS fue mayor a 3,33 (Tabla 11, sobre 48 aislamientos evaluados). LJC 10051 originó muy pocos síntomas en las raíces, revelando un comportamiento no patogénico en las condiciones del ensayo. Los aislamientos LJC 10081, LJC 10046, LJC 10031 y LJC 10030 produjeron síntomas severos en los bulbos y pudrieron completamente las raíces ubicándose en la clase 5 de la escala de evaluación, conformando el grupo más patógeno. LJC 10037 y LJC 10026 también produjeron síntomas en bulbos y provocaron la pudrición total de las raíces, no difiriendo significativamente del grupo más patógeno. Otro grupo compuesto por 19 aislamientos, constituido por 3 subgrupos sin diferencias significativas entre ellos para un $\alpha = 0,05$, evidenciaron leves síntomas en bulbos y síntomas con más del 50 % de pudrición en las raíces, lo que puede verse en la tabla 11. El resto de los aislamientos manifestaron en los plantines de cebolla entre 50 y 10 % de raíces afectadas, siendo consideradas de menor patogenicidad.

Tabla 11. Índice de severidad de 48 aislamientos de *Fusarium* en plantas de cebolla bajo condiciones de inoculación artificial con una suspensión de 1×10^7 conidios/mL.

Tratamiento ¹	Índice de severidad ²
LJC 10081 Fo	5,00 a
LJC 10031 Fp	5,00 a
LJC 10030 F.	5,00 a
LJC 10046 Fo	5,00 a
LJC 10037 Fs	4,67 ab
LJC 10026 Fo	4,67 ab
LJC 10023 Fp	4,33 abc
LJC 10021 Fo	4,33 abc
LJC 10029 Fo	4,33 abc
LJC 10043 Fo	4,33 abc
LJC 10017 Fo	4,33 abc
LJC 10009 Fo	4,00 abcd
LJC 10033 Fo	4,00 abcd
LJC 10061 Fo	4,00 abcd
LJC 10069 Fv	4,00 abcd
LJC 10035 Fo	4,00 abcd
LJC 10072 Fo	4,00 abcd
LJC 10056 Fp	4,00 abcd
LJC 10007 Fo	4,00 abcd
LJC 10058 Fp	3,67 abcde
LJC 10013 Fp	3,67 abcde
LJC 10077 Fv	3,67 abcde
LJC 10067 Fs	3,67 abcde
LJC 10039 Fo	3,67 abcde
LJC 10062 Fo	3,67 abcde
LJC 10085 Fo	3,33 abcdef
LJC 10014 Fp	3,33 abcdef
LJC 10019 Fo	3,00 abcdef
LJC 10001 Fo	3,00 abcdef
LJC 10087 Fc	3,00 abcdef
LJC 10045 Fo	3,00 abcdef
LJC 10054 Fp	3,00 abcdef
LJC 10060 Fo	3,00 abcdef
LJC 10015 Fo	3,00 abcdef
LJC 10002 Fv	3,00 abcdef
LJC 10012 Fo	3,00 abcdef
LJC 10086 Fs	3,00 abcdef
LJC 10041 Fo	2,67 bcdef
LJC 10006 Fo	2,67 bcdef
LJC 10005 Fo	2,67 bcdef
LJC 10003 Fo	2,33 cdef
LJC 10011 Fo	2,33 cdef
LJC 10088 Fo	2,33 cdef
LJC 10064 Fo	2,00 def
LJC 10053 Fo	2,00 def
LJC 10027 Fo	2,00 def
LJC 10010 Fs	2,00 def
LJC 10051 Fo	1,33 ef
Control	1,00 f

¹ Indica la especie Fo, *F. oxysporum*; Fp, *F. proliferatum*; Fv, *F. verticillioides*; Fs, *F. solani*; Fc, *F. compactum*, F., *Fusarium* sp.

² Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El análisis del IS promedio por especie mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,001$, CV 3,38 %). El tratamiento control difirió significativamente de las inoculaciones con todas las especies de *Fusarium* (Fig.10) en plantas de cebolla. El mayor IS, significativamente diferente del resto, fue el del aislamiento que se identificó como *Fusarium* sp. *F. compactum* con un IS de 3, fue la especie menos agresiva y significativamente diferente de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides*. Estas tres especies no difirieron significativamente en severidad y evidenciaron un comportamiento de patogenicidad moderada. Si bien *F. verticillioides* se ubicó en este grupo de patogenicidad moderada no difirió significativamente de *F. proliferatum*, que tuvo un IS cercano a 4, considerado patógeno.

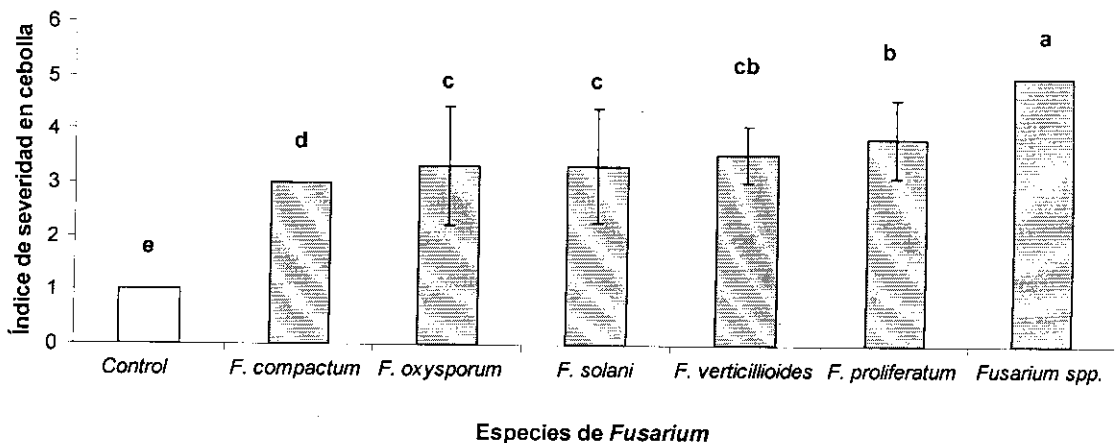


Figura 10. Patogenicidad de las especies de *Fusarium* medida a través del índice de severidad promedio en plantas de cebollas inoculadas artificialmente. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.

Al comparar el IS se observó que existen diferencias entre especies para los 32 aislamientos de *F. oxysporum* ($p < 0,0001$, CV 18,99 %). No se revelaron diferencias significativa entre el tratamiento control y 16 aislamientos con IS menor o igual a 3, pero si para los que superan un IS mayor a 3 (Tabla 12).

Tabla 12. Índice de severidad en plantas de cebolla cv. Valcatorce INTA bajo inoculación artificial con aislamientos de *F. oxysporum* procedentes de cebolla.

Tratamiento	Índice de severidad
LJC 10081	5,00 a
LJC 10046	5,00 a
LJC 10026	4,67 ab
LJC 10021	4,33 abc
LJC 10017	4,33 abc
LJC 10029	4,33 abc
LJC 10043	4,33 abc
LJC 10007	4,00 abcd
LJC 10035	4,00 abcd
LJC 10033	4,00 abcd
LJC 10072	4,00 abcd
LJC 10061	4,00 abcd
LJC 10009	4,00 abcd
LJC 10062	3,67 abcd
LJC 10039	3,67 abcd
LJC 10085	3,33 abcde
LJC 10012	3,00 abcdef
LJC 10060	3,00 abcdef
LJC 10001	3,00 abcdef
LJC 10045	3,00 abcdef
LJC 10019	3,00 abcdef
LJC 10015	3,00 abcdef
LJC 10005	2,67 bcdef
LJC 10041	2,67 bcdef
LJC 10006	2,67 bcdef
LJC 10003	2,33 cdef
LJC 10088	2,33 cdef
LJC 10011	2,33 cdef
LJC 10027	2,00 def
LJC 10064	2,00 def
LJC 10053	2,00 def
LJC 10051	1,33 ef
Control	1,00 f

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el análisis de la especie *F. proliferatum* se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$; CV 12,47 %). El tratamiento control difirió significativamente de las inoculaciones con los distintos aislamientos del hongo. LJC 10031 fue el más agresivo, presentó un IS de 5, exhibiendo diferencias significativas cuando se lo comparó a los aislamientos que tuvieron un IS menor a 3,67 (Fig. 11).

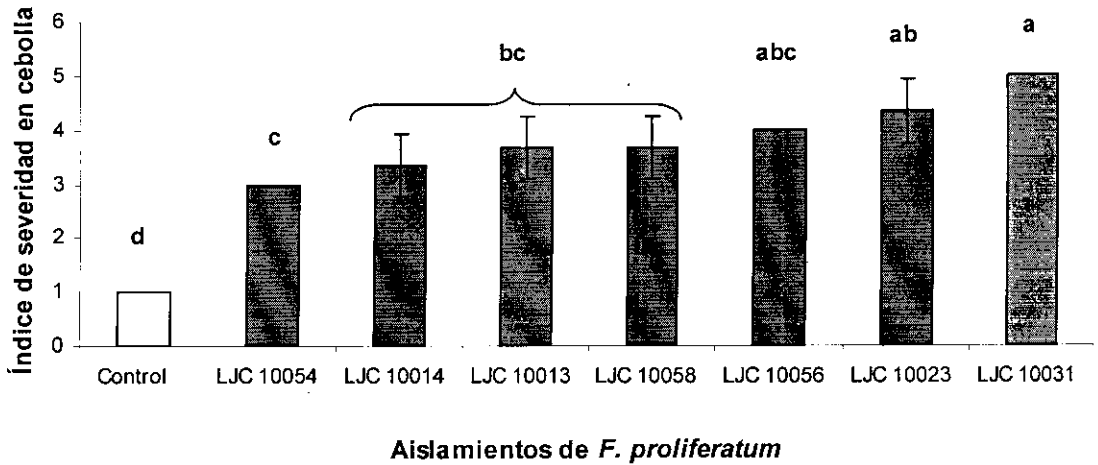


Figura 11. Índice de severidad de los aislamientos de *F. proliferatum* al evaluar la patogenicidad en plantas de cebollas cv. Valcatorce INTA inoculadas artificialmente. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.

Los resultados de IS observados en los aislamientos de *F. verticillioides* mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$, CV 9,89 %). La inoculación con ADE difirió de la realizada con la suspensión de conidios de manera significativa (Fig. 12). Los aislamientos LJC 10069 y LJC 10077 no mostraron diferencias significativas entre en cuanto a la patogenicidad.

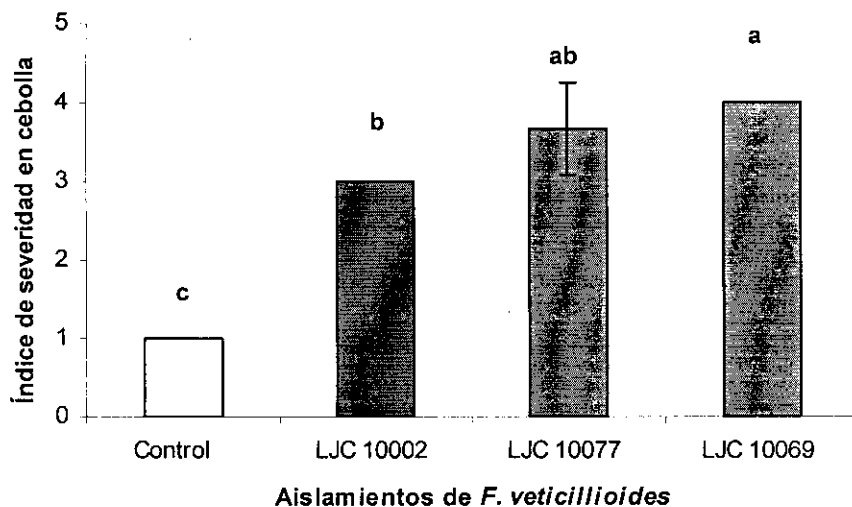


Figura 12. Índice de severidad de los aislamientos de *F. verticillioides* al evaluar la patogenicidad en plantas de cebollas cv. Valcatorce INTA inoculadas artificialmente. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.

Los resultados de los aislamientos de *F. solani* indican que existen diferencias significativas en el IS entre tratamientos al inocular artificialmente plantas de cebolla ($p < 0,0001$, CV 13,51 %). El tratamiento con ADE difirió significativamente de los

aislamientos excepto del LJC 10010 cuyo IS fue de 2 (Fig. 13). El aislamiento de mayor patogenicidad fue el LJC 10037 que difirió significativamente de LJC 10086 y LJC 10010, pero no de LJC 10067.

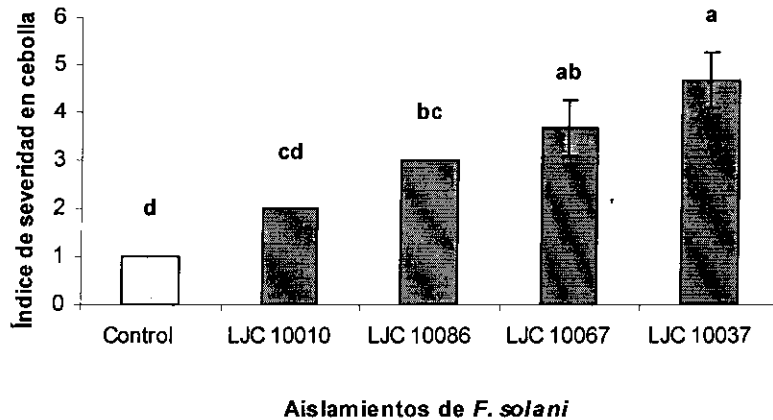


Figura 13. Índice de severidad de los aislamientos de *F. solani* al evaluar la patogenicidad en plantas de cebollas cv. Valcatorce INTA inoculadas artificialmente. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.

2.2. Aislamientos desde ajo

2.2.1. Pruebas de patogenicidad en planta

En las plantas de ajo inoculadas con los distintos aislamientos se observó el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Las raíces se exhibieron flácidas, con lesiones acuosas, podredumbres de color pardo y pudrición total en los casos más severos. Los bulbos manifestaron lesiones acuosas y podredumbres leves a severas (Fig. 14).

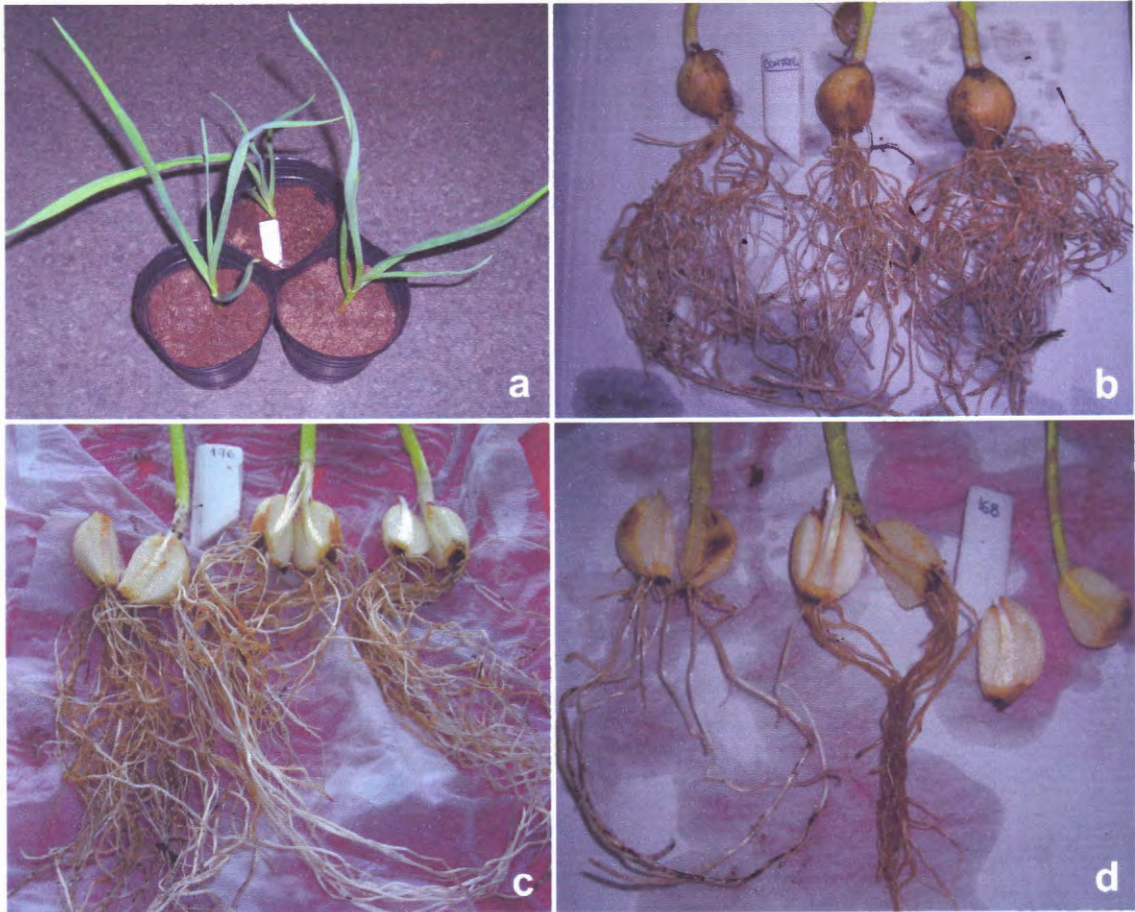


Figura 14. a)- Plantas de ajo cv Nieve INTA inoculadas con una suspensión de conidios de 5×10^6 conidios/mL *Fusarium* spp. y ADE. b)- Tratamiento control sin síntomas. c)- Raíces flácidas con lesiones semitransparentes síntoma ocasionado al inocular el aislamiento LJC 10176. d)- Bulbo con podredumbre blanda provocado por el aislamiento LJC 10168.

Todos los aislamientos provocaron síntomas en las plantas de ajo, con excepción del LJC 10188, difiriendo significativamente del tratamiento control con ADE (Tabla 13). Se hallaron diferencias significativas entre aislamientos ($p < 0,001$) para este ensayo (CV 11,25 %). El aislamiento LJC 10188 que mostró un comportamiento poco agresivo, generó menos del 10 % de lesiones en las raíces de las plantas inoculadas. El grupo conformado por los aislamientos LJC 10170, LJC 10168 y LJC 10182 se presentó como fuertemente patógeno, produciendo la podredumbre completa del sistema radical y severos síntomas en los bulbos. El aislamiento LJC 10166 ocasionó podredumbre en las raíces, entre un 10 y 50 %, siendo levemente patógeno y significativamente diferente del tratamiento control.

Tabla 13. Índice de severidad de 21 aislamientos de *Fusarium* en plantas de ajo bajo condiciones de inoculación artificial con una suspensión de 5×10^6 conidios/mL.

Tratamiento ¹	Índice de severidad
LJC 10170 ^{Fo}	5,00 a
LJC 10168 ^{Fo}	5,00 a
LJC 10182 ^{Fv}	5,00 a
LJC 10183 ^{Fp}	4,67 ab
LJC 10180 ^{Fp}	4,67 ab
LJC 10171 ^{Fo}	4,67 ab
LJC 10189 ^{Fo}	4,33 abc
LJC 10167 ^{Fo}	4,00 abc
LJC 10176 ^{Fp}	4,00 abc
LJC 10186 ^{Fo}	4,00 abc
LJC 10174 ^{Fv}	4,00 abc
LJC 10178 ^{Fo}	4,00 abc
LJC 10172 ^{Fo}	3,67 abc
LJC 10181 ^{Fp}	3,67 abc
LJC 10185 ^{Fp}	3,67 abc
LJC 10173 ^{Fo}	3,67 abc
LJC 10175 ^{Fp}	3,67 abc
LJC 10187 ^{Fo}	3,33 bcd
LJC 10190 ^{Fp}	3,33 bcd
LJC 10166 ^{Fv}	3,00 cd
LJC 10188 ^{Fo}	2,00 de
Control	1,33 e

¹ Indica la especie Fo, *F. oxysporum*; Fp, *F. proliferatum*; Fv, *F. verticillioides*
 Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En este experimento, al analizar los resultados por especie, se pudo observar (Fig.15) que el control difirió significativamente de los tratamientos de inoculación con la suspensión de conidios de las tres especies de *Fusarium* aunque no se encontraron diferencias significativas entre las especies.

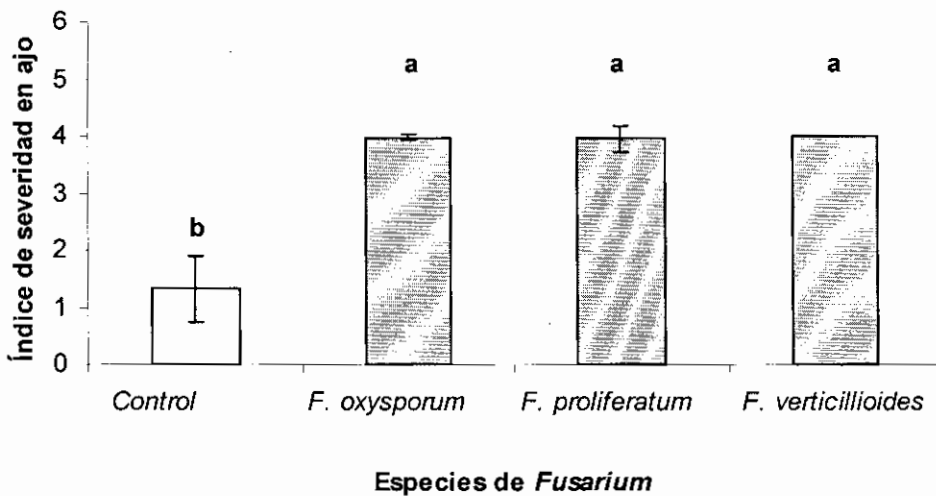


Figura 15. Patogenicidad de las especies de *Fusarium* medida a través del índice de severidad promedio en plantas de ajo bajo condiciones de inoculación artificial con una suspensión de 5×10^6 conidios/mL. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.

2.2.2. Pruebas de patogenicidad en poscosecha

Todos los tratamientos generaron síntomas en los bulbos de ajo cv Nieve INTA, originando podredumbre seca de color parda alrededor de la herida de inoculación. Se reaisló al hongo de todos los tratamientos, para confirmar que los síntomas de los bulbos infectados fueron ocasionados por el patógeno inoculado. Una excepción fue el tratamiento con LJC 10188 del que se reaislaron bacterias además del hongo. A partir del tratamiento control no se aisló ningún patógeno, por lo que se puede afirmar que la coloración parda que se observó se debió a la oxidación de los tejidos lesionados y a su cicatrización. La prueba no incluyó al aislamiento LJC 10186 porque el inóculo se contaminó con bacterias. En este ensayo existieron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,001$). Al comparar las medias de todos los tratamientos, el control no mostró diferencias significativas con LJC 10173, pero si lo hizo con los aislamientos que tuvieron un volumen de pudrición mayor a 99 mm^3 (Fig.16). El grupo de patogenicidad leve se conformó con los aislamientos LJC 10190, LJC 10167, LJC 10185, LJC 10166, LJC 10178, LJC 10168, LJC 10187, LJC 10188, LJC 10189 y LJC 10172, estos produjeron un volumen de pudrición de 45 a 75 mm^3 . El grupo de aislamientos moderadamente patógeno con volúmenes de pudrición de 76 a 100 mm^3 , manifestaron diferencias con el grupo anterior, y correspondió a LJC 10181, LJC 10174, LJC 10176, LJC 10182, LJC 10183 y LJC 10180. Los aislamientos LJC 10175 y LJC 10170 generaron un volumen de pudrición de 100 a 120 mm^3 , y fueron clasificados como patógenos. LJC 10171 fue altamente patógeno provocando un

volumen promedio de pudrición en los ajos inoculados de más de 120 mm³. En todos los casos se aisló la misma especie lo que confirmó que los síntomas en los dientes de ajo fueron causados por los aislamientos inoculados de *Fusarium* spp.

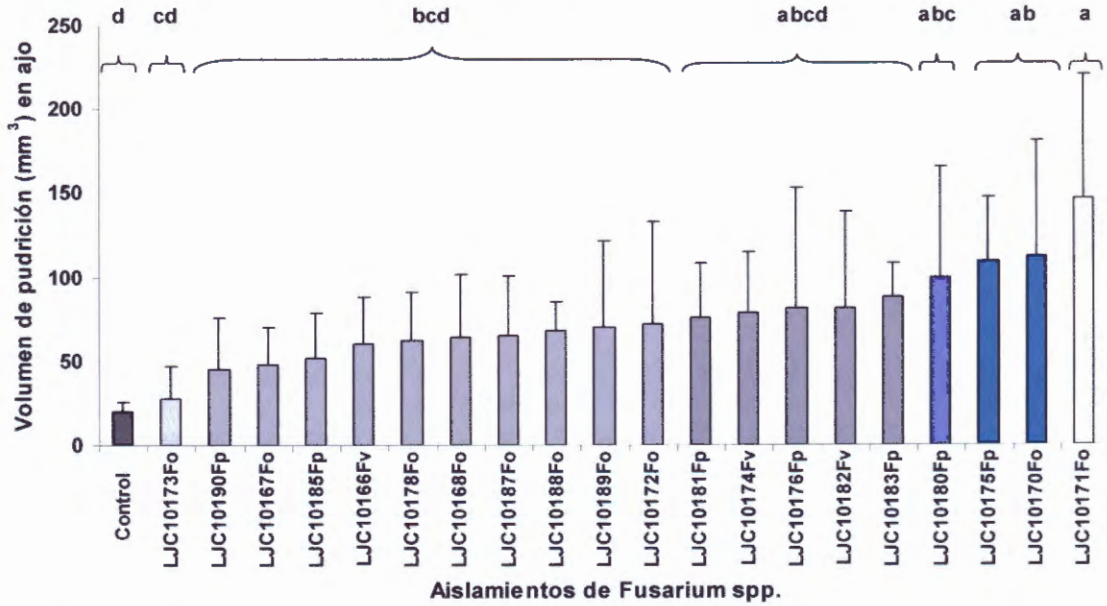


Figura 16. Volumen de pudrición en mm³ en ajo cv Nieve INTA inoculados artificialmente con una suspensión de 5×10^6 conidios/mL de *Fusarium* y ADE, después de 3 semanas de incubación a 22-25 °C en oscuridad. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar. Las letras junto al aislamiento indican la especie, Fo, *F. oxysporum*, Fp, *F. proliferatum* y Fv, *F. verticillioides*.

Se encontraron diferencias significativas en el volumen de pudrición promedio, al analizar los resultados por especie ($p < 0,001$, CV 11,96 %). La inoculación con las distintas especies difirió significativamente del tratamiento control (ver Fig.17). *F. proliferatum* generó el mayor volumen de pudrición para las condiciones de inoculación ensayadas, difiriendo significativamente del valor medio de *F. verticillioides*. Este último generó el menor volumen de pudrición de 68,16 mm³ bajo las condiciones de incubación, siendo el valor promedio de la especie significativamente diferente del control (Fig.17).

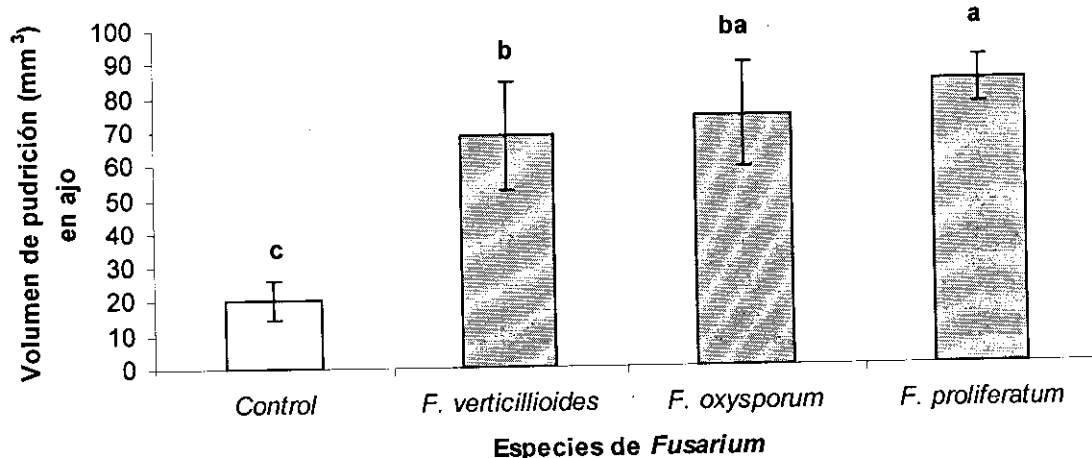


Figura 17. Volumen de pudrición en mm³ generado por las especies de *Fusarium* inoculadas artificialmente en ajo cv Nieve INTA al cabo de tres semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas muestran el desvío estándar.

En ajo, se determinó una asociación significativa entre los métodos empleados para probar patogenicidad (Fig. 18). Se observó que por cada unidad de severidad obtenida para un aislamiento determinado en el invernáculo, el VP aumentó de manera exponencial en la prueba de poscosecha. Para el análisis no fue considerado el aislamiento LJC 10186 debido a la falta de información sobre el VP. Además, no se incluyó a LJC 10188 porque en la prueba de poscosecha las heridas de algunos de los dientes presentaron una coloración violácea, y a su vez de estos se aisló no sólo el hongo inoculado sino también bacterias.

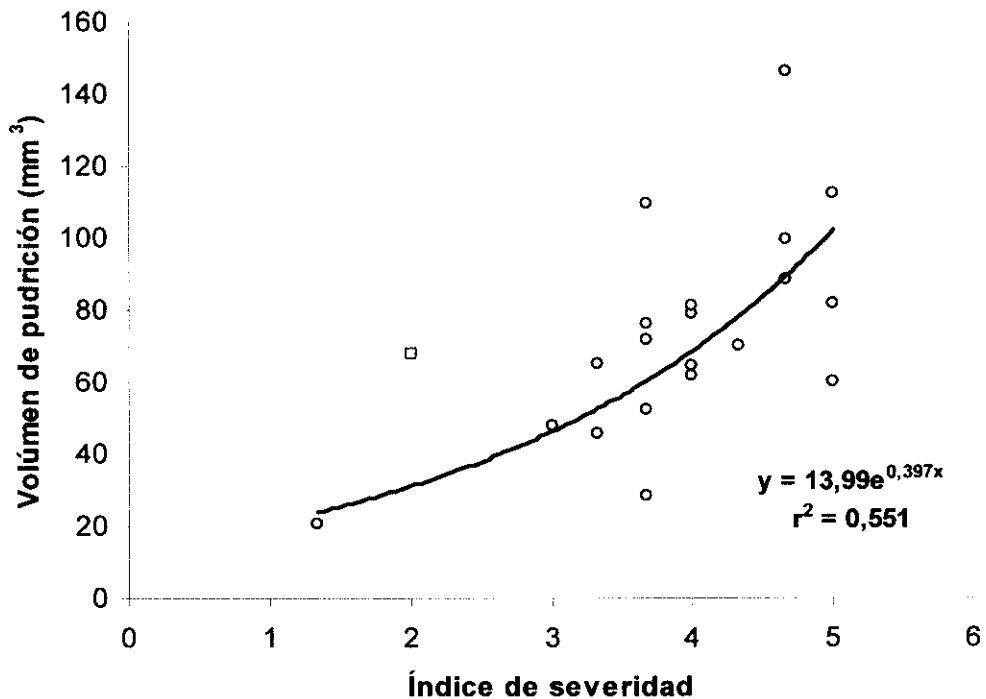


Figura 18. Relación exponencial entre IS y VP en mm³ determinado entre los dos métodos de prueba de patogenicidad en ajo con aislamientos de *Fusarium* spp. El punto en rojo corresponde al valor de LJC 10188, no considerado en el análisis.

3. Caracterización genética

3.1. Grupos de Compatibilidad Vegetativa (GCV)

Para los aislamientos de la especie *F. oxysporum* se obtuvieron los resultados que se describen a continuación.

3.1.1. Generación de mutantes *nit*

Los sectores mutantes resistentes al clorato se lograron generar de manera exitosa para todos los aislamientos, en los medios clorados PDC y MMC, con concentraciones de 1,5 % y 3 % de clorato de K. La mayoría de los sectores recuperados, resistentes al clorato, de crecimiento rápido, fueron capaces de utilizar al nitrato como única fuente de nitrógeno (Fig.19); consecuentemente presentaron un crecimiento sin micelio aéreo en MM (Fig.20). Estos sectores se denominaron mutantes *nit*.

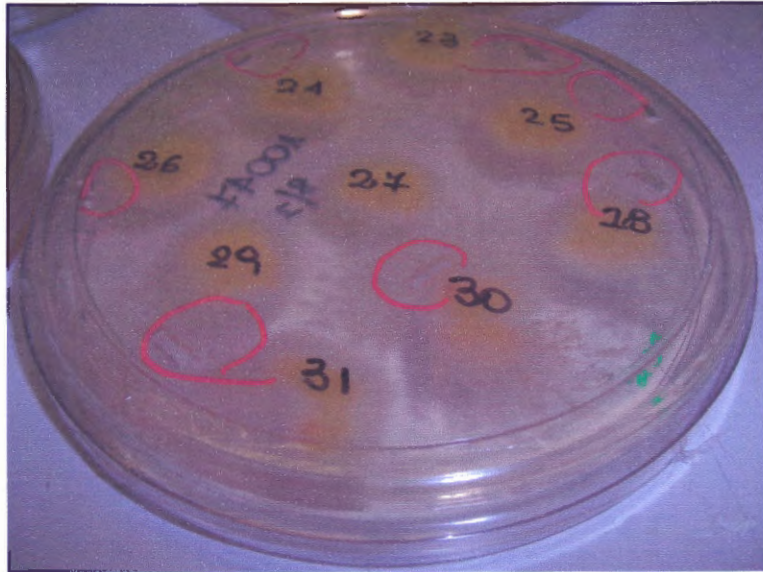


Figura 19. Crecimiento del aislamiento LJC 10047 en medio MM con 3 % de Clorato de K a los 7 días de incubación a 25 °C. Con marcador rojo se identificaron las áreas con sectores resistentes al clorato.

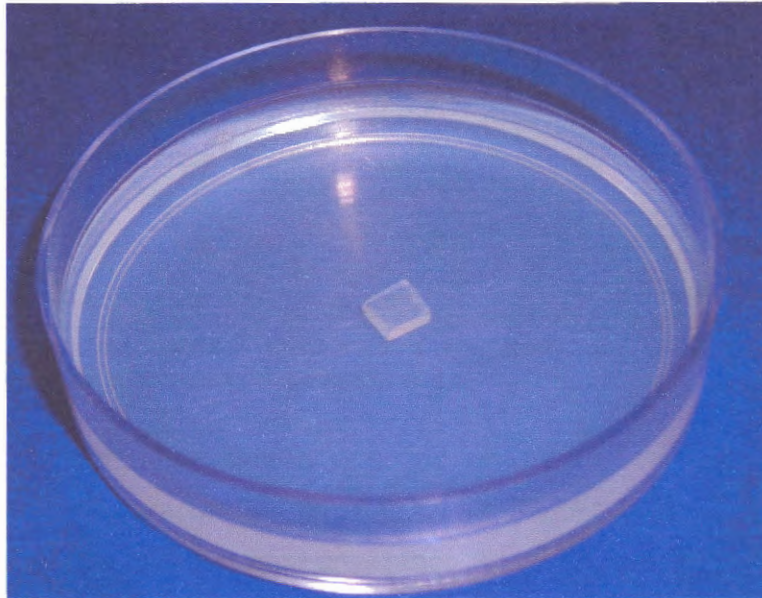


Figura 20. Crecimiento de mutante *nit* del aislamiento LJC 10081 en medio MM a los 4 días de incubación a 25 °C. Se observó un crecimiento tenue y expansivo sin micelio aéreo.

3.1.2. Determinación de los fenotipos de mutantes *nit*

La determinación de los fenotipos de mutantes *nit* de *F. oxysporum* fue establecida de acuerdo a la morfología de la colonia en medios que contenían nitrato e hypoxanthina como única fuente de nitrógeno (Fig.21). Los mutantes *nit* se identificaron de acuerdo a su fenotipo en *nit1/3* y *nitM* como se muestra en la Tabla 14.

De los 51 aislamientos de *F. oxysporum* obtenidos a partir de ajo y cebolla, se recuperaron 862 sectores mutantes. Se obtuvieron 686 mutantes *nit1/3* y 174 de

fenotipo *nitM*, esto indicó que las clases fenotípicas de los mutantes recuperados no tuvieron la misma frecuencia. La mayoría correspondió a la clase *nit1/3* independientemente del medio que se utilizó, y la frecuencia de la ocurrencia de cada tipo de mutante varió según el aislamiento. En el medio PDC se recuperó una mayor frecuencia de mutantes resistentes al clorato que en el medio MMC.

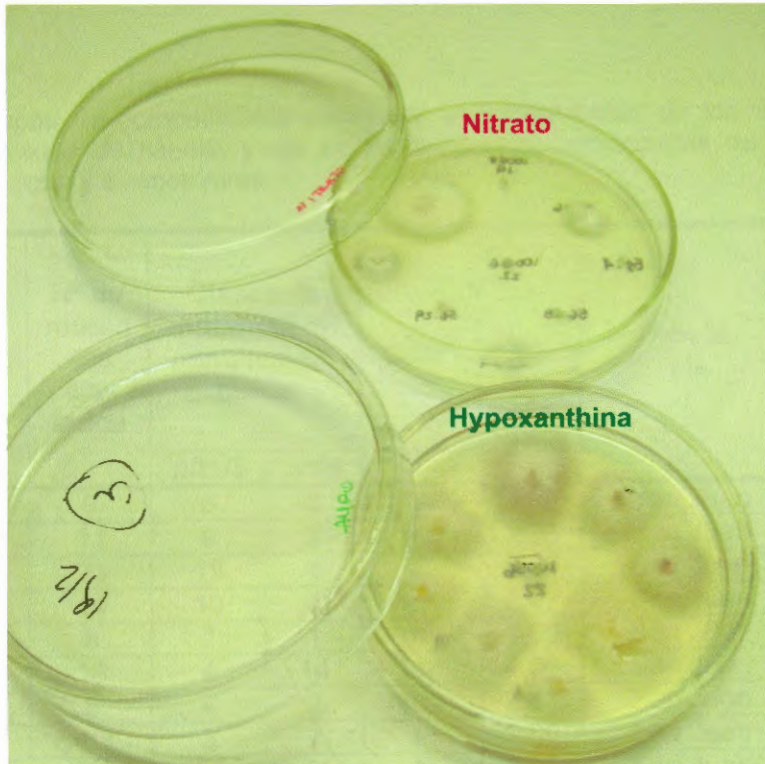


Figura 21. Crecimiento de mutantes *nit* en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno. Arriba con Nitrato de Na y abajo con Hypoxantina.

3.1.3. Pruebas de complementación

Los resultados fueron resumidos en la Tabla 14. Se obtuvieron 7 GCV (A-G) entre los 51 aislamientos de *F. oxysporum* analizados. El grupo predominante denominado A se integró con 10 aislamientos el segundo, tercer y cuarto grupo, B, C y D con 4 aislamientos; y los siguientes grupos E, F y G comprendieron 2 aislamientos cada uno. Cada uno de los aislamientos restantes se consideró miembro único de un GCV. Mientras que los aislamientos LJC 10006, LJC 10009, LJC 10019, LJC 10076 y LJC 10088 fueron auto-incompatibles. Los aislamientos que formaron el GCV A fueron colectados en las localidades de las provincias de Buenos Aires, Mendoza y San Juan tanto de ajo como de cebolla. LJC 10035 y LJC 10167 obtenidos desde cebolla y ajo respectivamente, formaron el mismo GCV, esto demostró que aislamientos de distinto hospederos de aliáceas pueden pertenecer al mismo GCV. Al grupo de compatibilidad B pertenecieron aislamientos de cebolla de Mendoza y San Juan. Todos los miembros

del grupo C se aislaron en San Juan y manifestaron un IS promedio de 4 en las pruebas de patogenicidad. Los aislamientos del grupo D pertenecieron a la zona productora de San Juan, a las localidades de Jachal y Pocito. La diversidad total de los GCV fue del 59 % deducida al dividir el número de grupos individuales de GCV por el número total de aislamientos, según la fórmula propuesta por Smith-White *et al.* en 2001.

Tabla 14. Grupos de compatibilidad vegetativa y patogenicidad de los aislamientos de *F. oxysporum* aislados de cebolla y ajo en las localidades productoras de las provincias de Mendoza, San Juan y Buenos Aires.

Aislamiento	N° de mutantes aislados	Clases de mutantes <i>nit</i> complementarios		GCV ^b	IS	Provincia	Loc./ Dpto.
		<i>nit</i> 1/3	<i>nit</i> M				
LJC10001 ^c	9	6	3	A	3,00	San Juan	Chimbas
LJC10003 ^c	11	9	2	mu	2,33	San Juan	Chimbas
LJC10005 ^c	23	19	4	C	2,67	San Juan	Rawson
LJC10006 ^c	14	10	4	mu	2,67	San Juan	Rawson
LJC10007 ^c	8	7	1	mu	4,00	San Juan	Rawson
LJC10009 ^c	18	4	14	mu	4,00	San Juan	Pocito
LJC10011 ^c	6	4	2	mu	2,33	San Juan	Pocito
LJC10012 ^c	10	3	7	E	3,00	San Juan	Pocito
LJC10015 ^c	13	11	2	B	3,00	San Juan	Pocito
LJC10017 ^c	26	23	3	C	4,33	San Juan	Pocito
LJC10019 ^c	10	6	4	mu	3,00	San Juan	Rivadavia
LJC10021 ^c	14	11	3	D	4,33	San Juan	Pocito
LJC10026 ^c	6	3	3	mu	4,67	Mendoza	Lavalle
LJC10027 ^c	6	5	1	mu	2,00	Mendoza	Lavalle
LJC10029 ^c	18	16	2	mu	4,33	Mendoza	Maipú
LJC10033 ^c	9	7	2	B	4,00	Mendoza	Maipú
LJC10035 ^c	31	30	1	G	4,00	Mendoza	Guaymallén
LJC10039 ^c	11	10	1	A	4,67	Mendoza	Luján
LJC10041 ^c	11	5	6	B	2,67	Mendoza	Luján
LJC10043 ^c	27	24	3	B	4,33	Mendoza	Luján
LJC10045 ^c	12	8	4	A	3,00	Mendoza	Maipú
LJC10046 ^c	18	14	4	mu	5,00	Mendoza	Maipú
LJC10047 ^c	22	18	4	E	*	Mendoza	Lavalle
LJC10048 ^c	9	8	1	F	*	Mendoza	Lavalle
LJC10049 ^c	10	6	4	F	*	Mendoza	San Carlos
LJC10051 ^c	13	11	2	mu	1,33	Mendoza	San Carlos
LJC10053 ^c	6	4	2	mu	2,00	Mendoza	San Carlos
LJC10060 ^c	28	23	5	A	3,00	San Juan	Jachal
LJC10061 ^c	14	13	1	D	4,00	San Juan	Jachal
LJC10062 ^c	15	12	3	D	3,67	San Juan	Jachal
LJC10063 ^c	23	22	1	C	*	San Juan	Jachal

LJC10064 ^c	19	18	1	D	2,00	San Juan	Jachal
LJC10070 ^c	10	9	1	mu	*	San Juan	Jachal
LJC10072 ^c	15	12	3	C	4	San Juan	Jachal
LJC10074 ^c	20	18	2	mu	*	San Juan	Pocito
LJC10076 ^c	12	7	5	mu	*	San Juan	Pocito
LJC10079 ^c	39	35	4	mu	*	Buenos Aires	Villalonga
LJC10081 ^c	15	13	2	mu	5,00	Buenos Aires	...
LJC10085 ^c	27	22	5	A	3,33	Buenos Aires	Pedro Luro
LJC10088 ^c	29	26	3	mu	2,33	Buenos Aires	Ascasubi
LJC10167 ^a	15	14	1	G	4,00	Mendoza	...
LJC10168 ^a	21	16	5	mu	5,00	Mendoza	...
LJC10170 ^a	17	14	3	mu	5,00	Mendoza	...
LJC10171 ^a	27	25	2	mu	4,67	Mendoza	...
LJC10172 ^a	17	12	5	A	3,67	Mendoza	...
LJC10173 ^a	33	23	8	A	3,67	Mendoza	...
LJC10178 ^a	21	10	11	mu	4,00	Mendoza	...
LJC10186 ^a	23	20	3	A	4,00	Mendoza	...
LJC10187 ^a	22	21	1	mu	3,33	Mendoza	...
LJC10188 ^a	15	10	5	A	2,00	Mendoza	...
LJC10189 ^a	14	9	5	A	4,33	Mendoza	...

^a y ^c Indica el hospedero a)- Ajo y c)- Cebolla.

^b Aislamientos con letra mayúscula (A, B, C, D, E, F y G) igual pertenecen a un mismo grupo de compatibilidad vegetativa (GCV), mu significa determinado como miembro único de un GCV.

^d * Indica no determinado

En las pruebas de apareamientos entre aislamientos se observó una formación de heterocariontes robusta. En algunos casos (Fig. 22) se formó un heterocarionte robusto entre un par complementario *nit1/3* y *nitM*, pero el par recíproco inverso fue débil o no existió la formación de micelio aéreo.

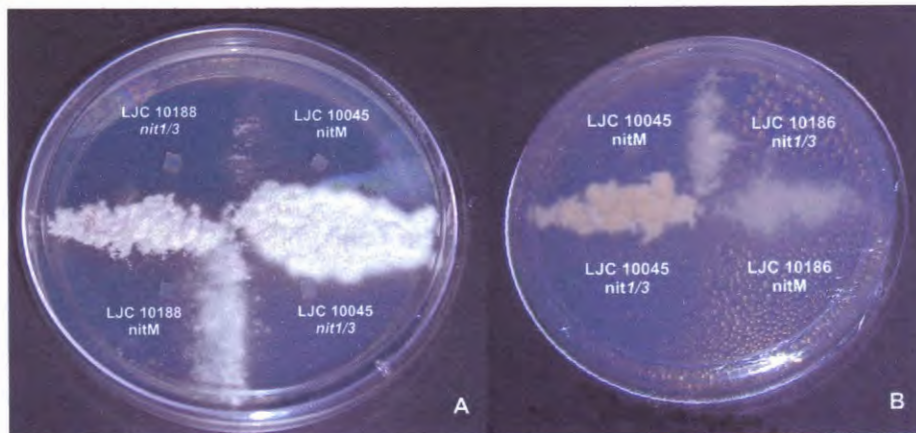


Figura 22. A)- Formación de un heterocarionte robusto entre los mutantes *nitM* de LJC10188 y *nit1/3* de LJC 10045 y de un heterocarionte débil entre los mutantes *nitM* de LJC 10045 y *nit1/3* de LJC 10188 en MM. B)- Formación de un heterocarionte robusto entre los mutantes *nitM* de LJC 10045 y *nit1/3* de LJC 10186 y ausencia de micelio entre los mutante *nitM* de LJC 10186 y *nit1/3* de LJC 10045.

3.2. Caracterización por marcadores moleculares

3.2.1. Extracción de ADN

De las extracciones realizadas según la metodología propuesta se obtuvieron buenos rendimientos de ADN de alto peso molecular. La relación de la absorbancia a A_{260}/A_{280} se ubicó en el rango de los 1,65 y 2,28, mostrando que la calidad de ADN fue de alta pureza para la mayoría de los aislamientos. Este ADN se utilizó como molde para los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la figura 23 se muestra cómo se visualizó la calidad del ADN extraído en un gel de agarosa al 1 % (TBE 1X con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bromuro de etidio). No se observó degradación del material genético.

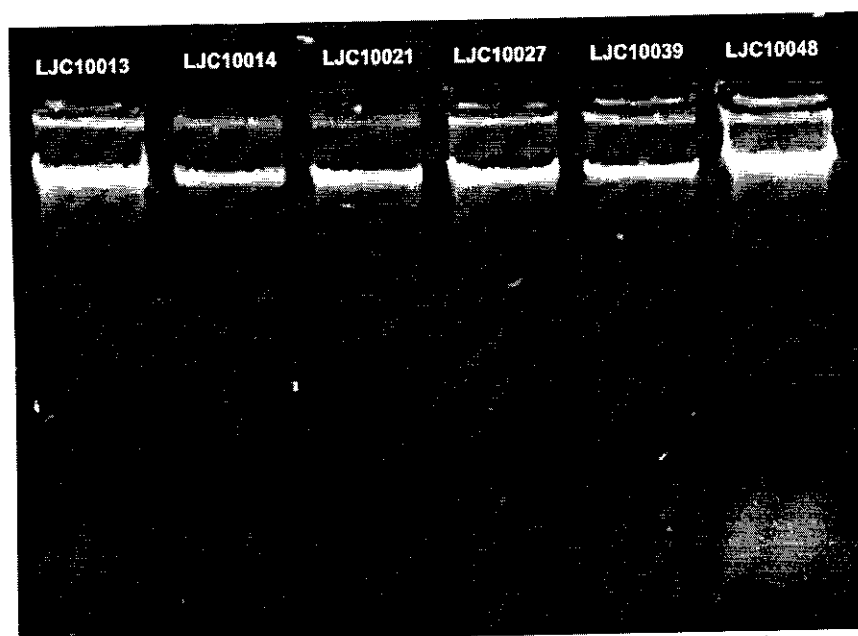


Figura 23. ADN extraído de micelio de *Fusarium* spp. cultivado en caldo de papa, las muestras se trataron con 10mg/mL de ARNasa para remover el ARN.

3.2.2. Reacción de ERIC-PCR

El iniciador ERIC-PCR amplificó el ADN de los aislamientos de todas las especies. Las bandas generadas tuvieron tamaños comprendidos entre 3600 y 50 pb aproximadamente.

En los 51 aislamientos de *F. oxysporum* se amplificó un total de 23 bandas polimórficas, se observaron 26 patrones diferentes (Fig. 24 y 25) que fueron reproducibles y distinguibles. Se generó un arreglo de bandas informativas compuesto de un mínimo de 6 y un máximo de 16 bandas.

Los 21 aislamientos obtenidos de cebolla en la provincia de San Juan presentaron 14 patrones de bandas diferentes. Dos aislamientos de la localidad de Pocito (LJC

10011 y LJC 10017) compartieron un mismo patrón. Otros dos aislamientos de la localidad de Jachal, con igual patrón de bandas, pertenecieron al GCV C.

En las localidades de Mendoza 15 aislamientos de cebolla mostraron 11 bandeos distintos, de los cuales, 2 aislamientos con un único patrón se observaron tanto en el departamento de Lavalle como en el de Luján. Además, de este último departamento, LJC 10041 y LJC 10043 compartieron igual patrón y formaron el GCV B junto a LJC 10033 de Maipú. Estos resultados indicaron que en la provincia de Mendoza los aislamientos obtenidos de cebolla fueron los de mayor variabilidad. Once aislamientos de ajo de Mendoza, exhibieron 7 patrones diferentes. Dos de los que compartieron bandas pertenecieron al mismo GCV.

Algunos de los aislamientos de ajo obtenidos en Mendoza presentaron el mismo patrón de bandas que los de cebolla de Mendoza, San Juan y Buenos Aires. Dos de los 4 aislamientos de Buenos Aires presentaron igual patrón de banda. Estos pertenecían a las localidades de Ascasubi y Villalonga.

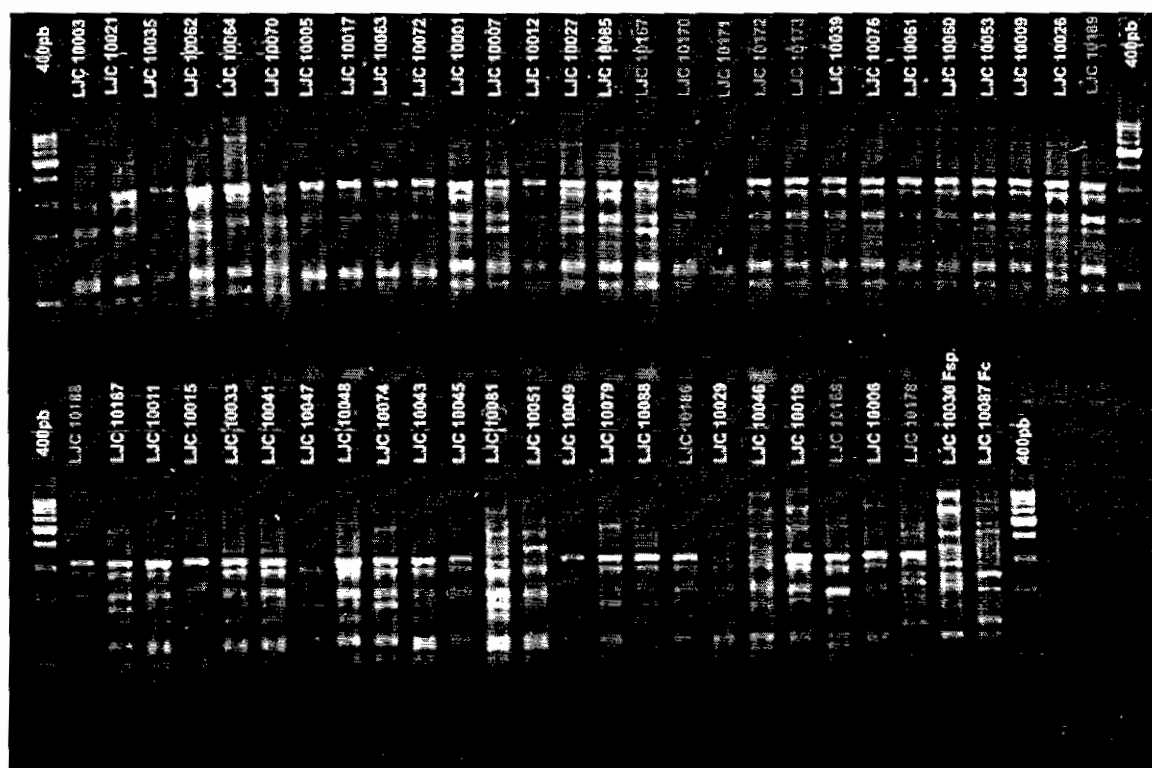


Figura 24. Patrones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC) de 51 aislamientos de *F. oxysporum* en las calles 2 a la 29 del peine superior y 2 a 24 del peine inferior y LJC 10030 de *Fusarium sp.* (Fsp.) en la calle 25 del peine inferior y LJC 10087 de *F. compactum* (Fc) en la calle 26 del peine inferior obtenidos de cebolla (letras blancas) y ajo (letras en color gris). La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H.").

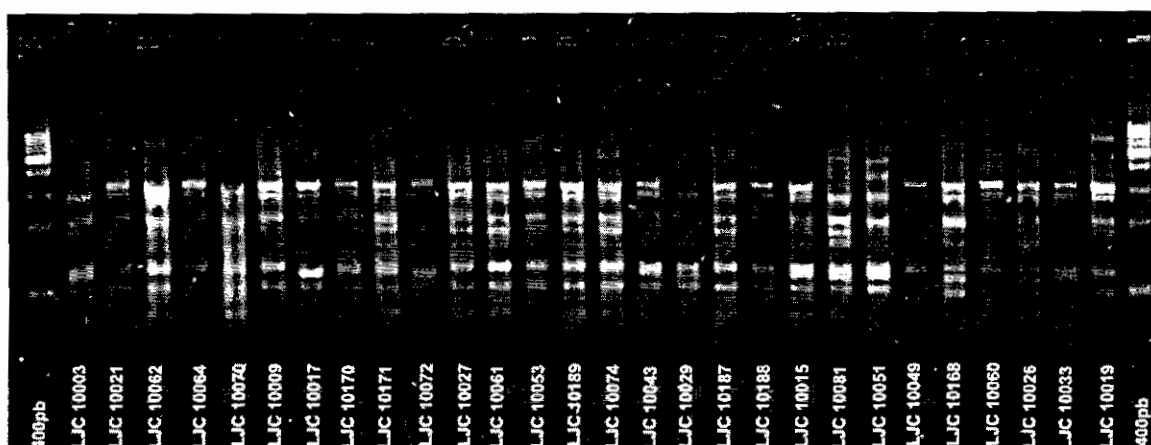


Figura 25. Patrones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC) de 28 aislamientos de *F. oxysporum* obtenidos de ajos y cebollas. La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H."). Esta figura muestra el resumen de los patrones polimórficos de la Fig. 24.

Cuando se analizaron para *F. oxysporum* todos los grupos que se determinaron por la metodología de UPGMA y empleando el coeficiente de concordancia se observó una similitud del 33 % aproximadamente (distancia genética de 0,67). De acuerdo al análisis UPGMA a una distancia de 0,20 se observaron 26 grupos diferentes, el más numeroso denominado A, tuvo una distancia genética del resto de 0,35 (Fig. 26). Este grupo se formó por aislamientos que pertenecieron a distintos GCV y fueron aislados de cebolla en Mendoza, San Juan y Buenos Aires, y de ajo en Mendoza. El resto de los grupos formados (B, C, D y F) presentaron también estas características. El grupo E, integrado por LJC 10072 y LJC 10063, pertenecieron al GCV C y se obtuvieron de la localidad de Jachal en la provincia de San Juan. Estos dos últimos individuos se encontraron a una distancia genética aproximada de 0,36 del resto de los aislamientos de *F. oxysporum*. A una distancia genética de 0,67 el dendograma se puede dividir en dos nodos. En la parte superior del árbol se ubica la mayoría de los aislamientos que fueron patógenos en cebolla y los miembros de los GCV C y B. En la parte inferior se encuentran todos los aislamientos obtenidos en la provincia de Buenos Aires y la mayoría de los aislamientos que conformaron el GCV A.

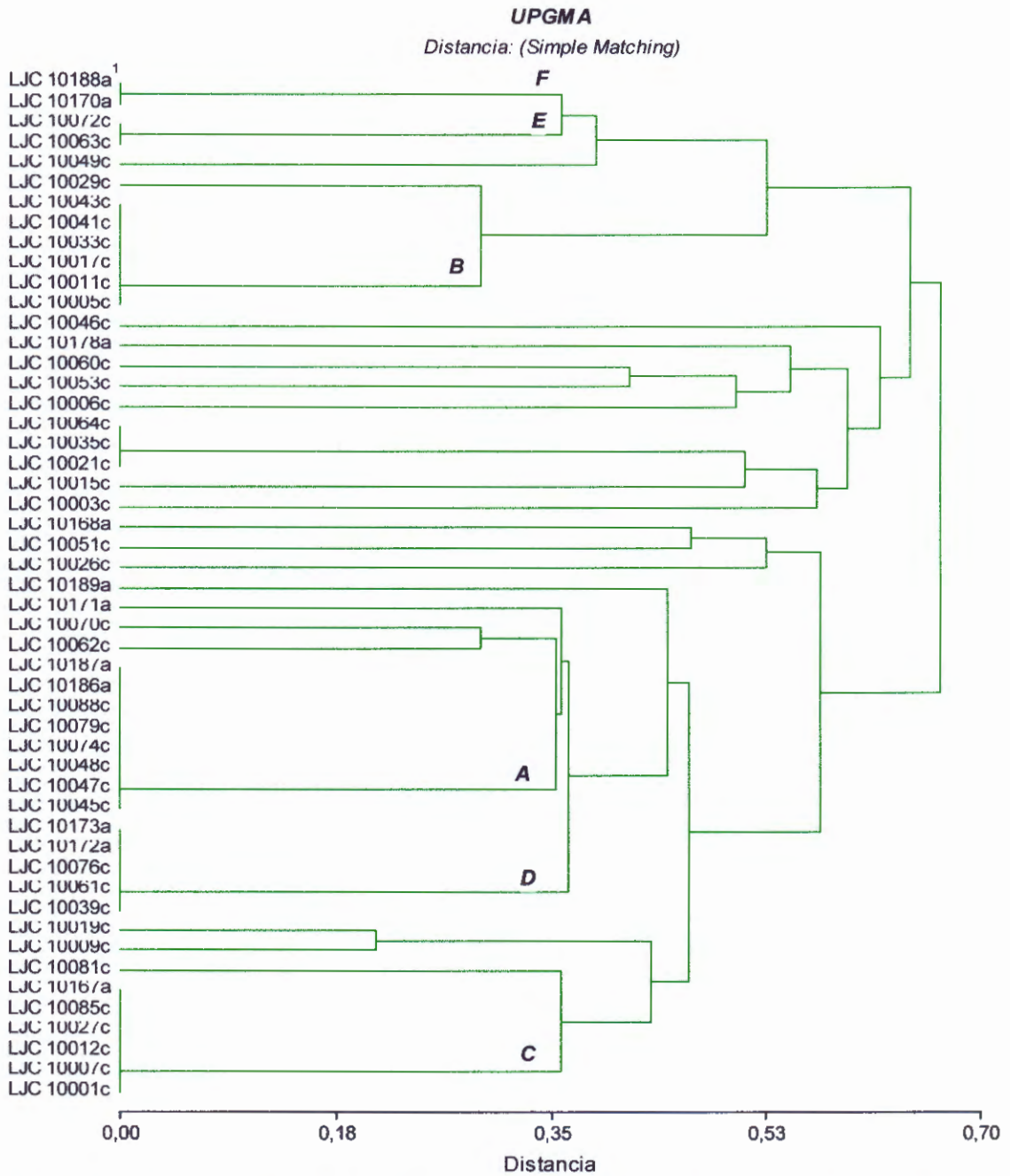


Figura 26. Dendrograma que muestra la relación entre 51 aislamientos de *F. oxysporum* aislados desde ajo y cebolla utilizando el método de UPGMA (o encadenamiento promedio) y el coeficiente Simple Matching (o de concordancia simple). ¹Indica el hospedero c = cebolla y a = ajo.

Los 16 aislamientos de la especie *F. proliferatum* fueron divididos en 5 grupos con el mismo patrón de banda (Fig. 27). De un total de 9 bandas, 7 fueron polimórficas. Se observó un mínimo de 4 y un máximo de 6 bandas que permitieron discriminar el patrón de cada grupo. Todos los patrones observados fueron reproducibles.

En los 9 aislamientos de cebolla se observaron 5 patrones distintos. De éstos, 2 de los obtenidos en Mendoza compartieron el mismo bandeo (LJC 10054 y LJC 10056), el aislamiento diferente en su patrón de bandas fue LJC 10031 que presentó la más alta patogenicidad. Dos de los 4 aislamientos de cebolla obtenidos en San Juan compartieron el mismo patrón.

De los 7 aislamientos de ajo de origen Mendoza, 6 exhibieron el mismo patrón de bandas lo que mostró menor variabilidad genética en este grupo. El aislamiento LJC 10185 tuvo un patrón distinto que el resto de los de ajo pero igual a LJC 10058 y LJC 10083 de cebolla.

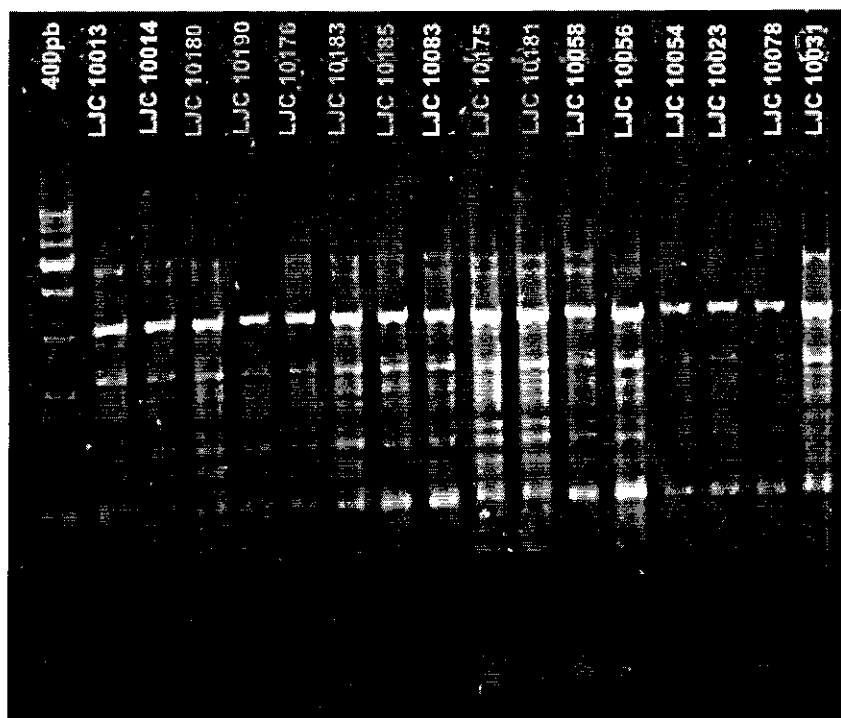


Figura 27. Patrones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC) de 16 aislamientos de *F. proliferatum* obtenidos de ajo (letras de color gris) y cebolla (letras de color blanco). La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H.").

En el dendograma de *F. proliferatum* el grupo A generado por los ERIC presentó la máxima asociación genética, a una distancia del resto de 0,34, mostrando un porcentaje de similitud del 66 % (Fig. 28). Éste conglomerado fue el más numeroso y todos sus integrantes se obtuvieron de ajo, en la provincia de Mendoza, excepto el aislamiento LJC 10014 que se obtuvo de cebolla en la localidad de Pocito en San Juan. Este grupo tuvo una tasa de crecimiento promedio al 5to día comprendida en un rango de 3,3 a 5 cm. Todos los individuos del grupo B se aislaron desde cebolla y ajo en las provincias de Mendoza, San Juan y Río Negro, y mostraron una tasa de

crecimiento promedio al 5to día entre 5,4 y 6,7 cm. La similitud entre los integrantes del grupo A y B fue de alrededor del 67 % ya que exhibieron una distancia genética de 0,33. Para el grupo designado C la distancia genética fue de 0,38, se aislaron de cebollas en Mendoza y San Juan y presentaron una tasa de crecimiento promedio al 5to día entre 6,4 y 7,2 cm. El LJC 10031 fue uno de los aislamientos de mayor agresividad, con un índice de severidad 5 en las pruebas de inoculación artificial en cebolla. Este individuo presentó una distancia genética muy alta, de 0,78. El aislamiento LJC 10013 obtenido desde cebolla manifestó una baja similitud, del 47 %, es decir una distancia genética de 0,53 respecto al resto de los aislamientos.

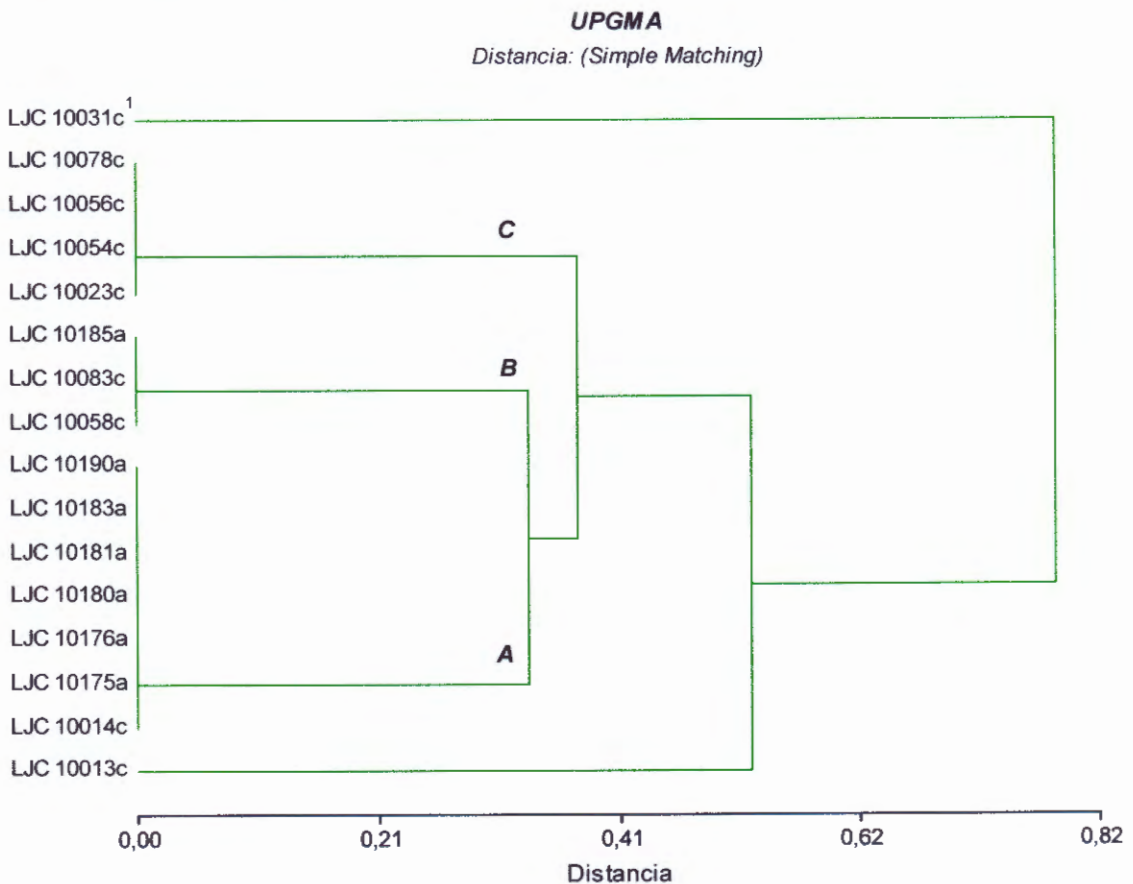


Figura 28. Dendrograma que muestra la relación entre 16 aislamientos de *F. proliferatum* aislados desde ajo y cebolla utilizando el método de UPGMA (o encadenamiento promedio) y el coeficiente Simple Matching (o de concordancia simple). ¹Indica el hospedero c = cebolla y a = ajo.

En los 7 individuos de la especie *F. verticillioides* (Fig. 29) se observaron 6 patrones diferentes con el mayor número de bandas de cada patrón, entre 10 y 12. LJC 10182 y LJC 10174 obtenidos de ajo en Mendoza, presentaron el mismo patrón de bandas y además tuvieron un IS de 5 y 4 respectivamente y se diferenciaron del aislamiento LJC

10166 en su patrón de bandeo y en el IS que fue de 3. Todos los aislamientos de cebolla se obtuvieron en San Juan y exhibieron patrones diferentes.

En el dendograma se observó una relación del 100 % entre los individuos LJC 10182 y LJC 10174, pero con una distancia genética de 0,76, es decir un porcentaje de similitud del 24 %, muy bajo cuando fue comparado con los otros aislamientos (Fig. 30). Este grupo de aislamientos obtenidos desde ajo fueron patógenos en las pruebas de inoculación artificial de plantas y moderadamente patógenos en la prueba de poscosecha (generaron un VP de 81,42 mm³ el primero y de 78,98 mm³ el segundo). LJC 10002 obtenido de cebolla en San Juan y LJC 10166 de ajo de Mendoza conformaron un grupo a una distancia genética de 0,30. Estos aislamientos fueron evaluados en la prueba de inoculación artificial en planta con IS de 3.

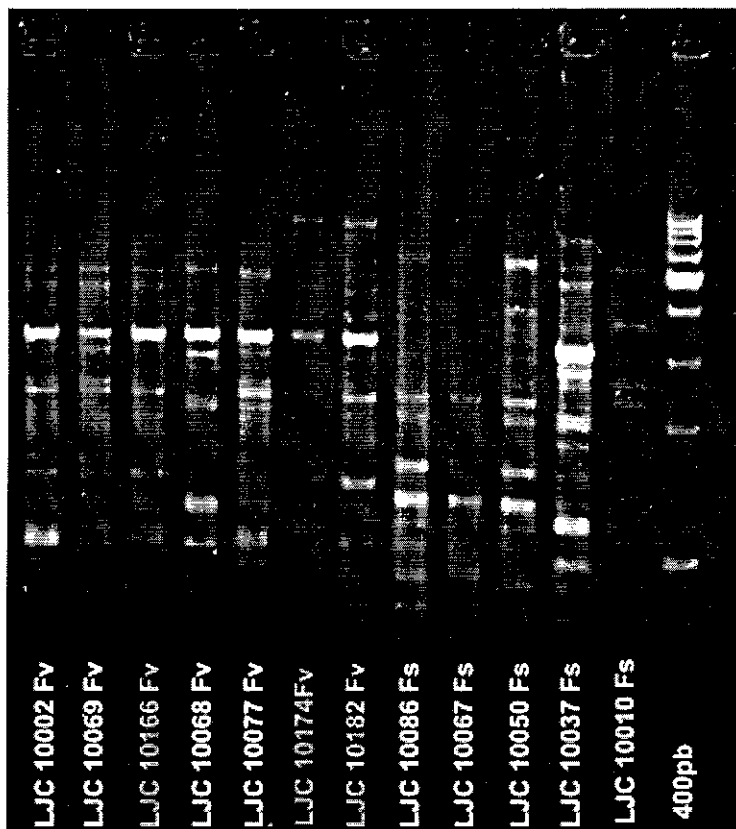


Figura 29. Patrones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC) de 7 aislamientos de *F. verticillioides* (Fv) en las calles 1 a la 7 y de *F. solani* (Fs) en las calles 8 a la 12 obtenidos de ajo (letras de color gris) y cebolla (letras de color blanco). La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H.").

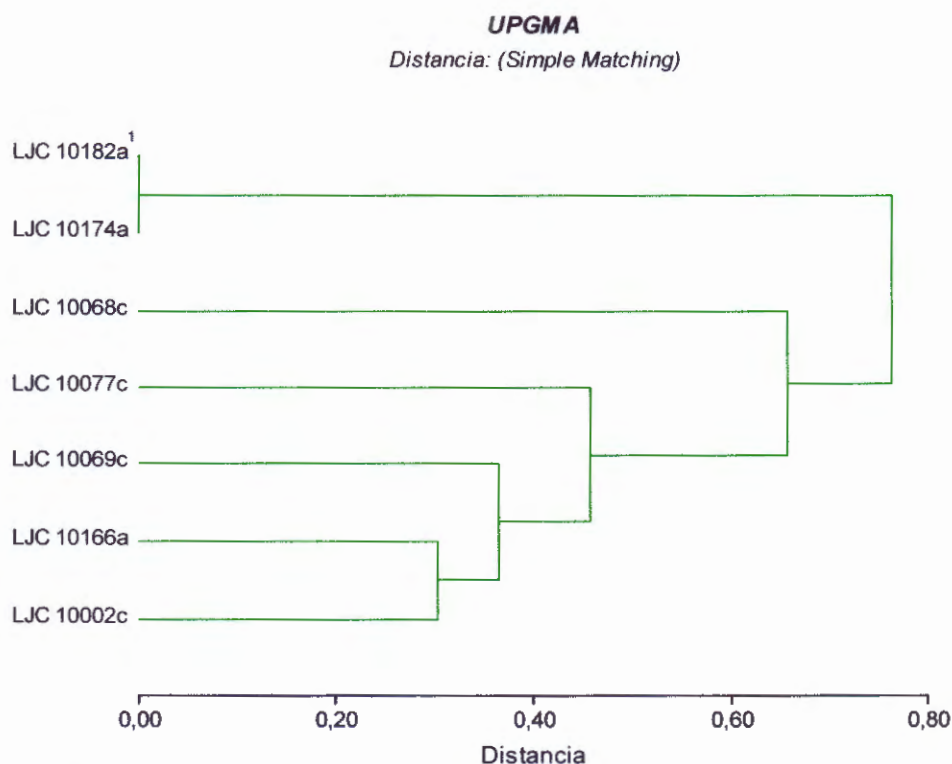


Figura 30. Dendrograma de relación entre 7 aislamientos de *F. verticillioides* utilizando UPGMA y el coeficiente de concordancia simple. ¹Indica el hospedero c = cebolla y a = ajo.

Los 5 aislamientos de *F. solani* fueron representados por 3 patrones diferentes (Fig. 29). Generaron un arreglo de bandas informativas que estuvieron compuestos de un mínimo de 4 a un máximo de 12 bandas, 11 de ellas polimórficas. Los tres aislamientos que compartieron el mismo patrón no presentaron relación con el origen ya que se obtuvieron en Mendoza, San Juan y Buenos Aires.

De acuerdo al análisis UPGMA, los aislamientos de *F. solani* se pudieron clasificar en 3 grupos diferentes a una distancia de 0,64 (Fig. 31). Se halló una relación del 100 %, la máxima asociación, entre LJC 10050, LJC 10067 y LJC 10086, estos se aislaron desde cebolla y se obtuvieron en tres localidades diferentes de Mendoza, San Juan y Buenos Aires respectivamente. Además estos tres aislamientos generaron un grupo separado por una distancia genética del 0,86 cuando se lo comparó con el resto de los individuos. Estos aislamientos presentaron características morfológicas similares como la forma de microconidios y la pigmentación del micelio. Se observó una distancia genética entre LJC 10010 y LJC 10037 de 0,65, aislados en San Juan y Mendoza respectivamente.

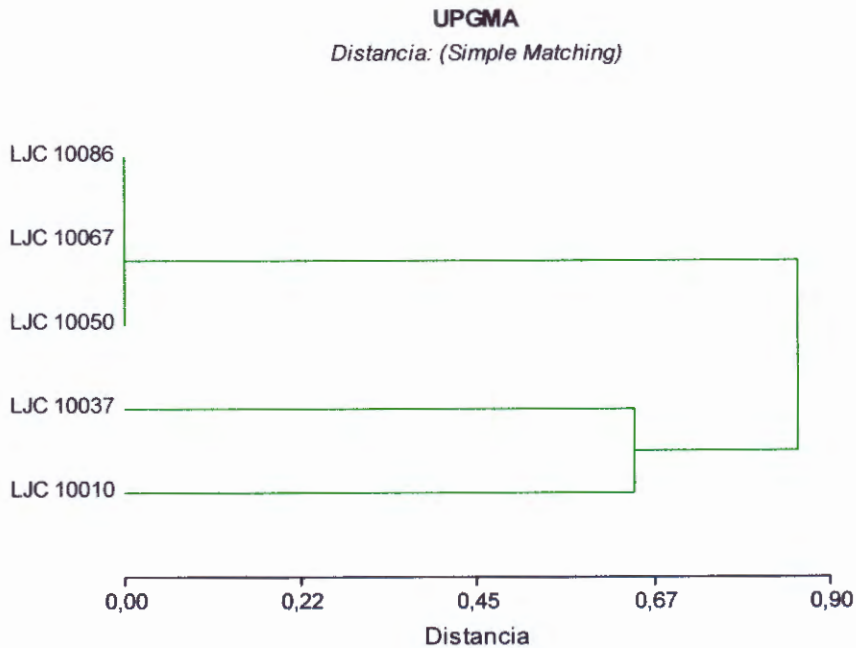


Figura 31. Dendrograma de relación ente aislamientos de *F. solani* obtenidos desde cebolla, empleando el método UPGMA y el coeficiente de concordancia simple.

Al analizar todos los patrones generados en las distintas especies de *Fusarium* aisladas de cebolla y ajo se observaron 41 patrones únicos (Fig. 32). Se observaron 26 patrones diferentes en 51 aislamientos de *F. oxysporum*; 5 en los 16 aislamientos de *F. proliferatum*; 5 en los 7 de *F. verticillioides* y 3 en los 5 de *F. solani*. *F. compactum* exhibió dos bandas únicas.

Del análisis de los 41 patrones distintivos de cada especie se obtuvo el dendrograma de relaciones que se observa en la Figura 33. A una distancia genética de 0.47 se observaron 10 conglomerados denominados A, B, C, D, E, F, G, H, I y J. El conglomerado que fue denominado A, que se encontró a una distancia de 0,44 del resto de los aislamientos, estuvo conformado por los patrones de las especie de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (Fp y Fv en la Fig. 33), a excepción del patrón único del aislado LJC 10013, quien exhibió una similitud genética del 56 %. El conglomerado B estuvo integrado por otros dos conjuntos menores de la especie *F. oxysporum*, a excepción del conjunto designado b1 que contenía al individuo LJC 10013 de la especie *F. proliferatum*. En el conjunto b1 se ubicaron la mayoría de los aislamientos con patrones únicos. El conjunto b2 incluyó a los patrones que representaron a varios aislamientos y la mayoría de éstos integró algún GCV. Al conglomerado C pertenecieron exclusivamente patrones de la especie de *F. oxysporum* que presentaron el patrón más común de la especie. Los conglomerados D y E

correspondieron a patrones que representaban a un solo aislamiento de *F. oxysporum*. En el conglomerado F se ubicó un patrón que representó un solo aislamiento de *F. oxysporum* obtenido de ajo y los patrones únicos de *F. solani* de cebolla, a excepción de uno que se ubicó en la rama G. Al resto de los conglomerados pertenecieron patrones que representaban a un solo aislamiento: en el conglomerado H se ubicó a *Fusarium* sp., en el I al aislamiento de *F. compactum* y en el J a un aislamiento de *F. oxysporum*, todos ellos aislados de cebolla.

En cuanto a *F. compactum* y *Fusarium* sp., generaron un bandeo único que permitió diferenciarlos del resto de las especies ensayadas. Estos patrones de bandas fueron fácilmente distinguibles y reproducibles. Se observó en la Fig. 33 que *F. compactum* mostró un patrón de 11 bandas, 2 de ellas únicas, se ubicó a una distancia genética de 0,57. *Fusarium* sp. generó 9 bandas y se encontró a una distancia genética de aproximadamente 0,54. La distancia genética de todos los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de ajos y cebollas fue de 0,6.

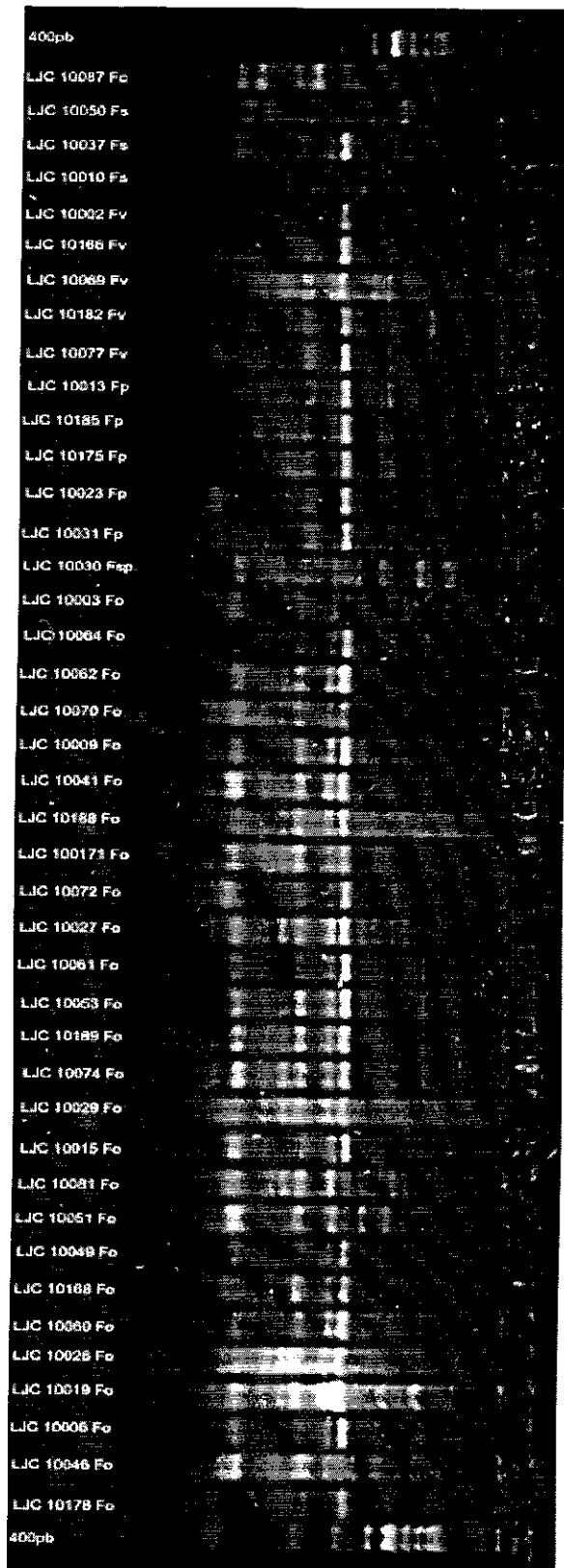


Figura 32. Patrones de bandas tipo de todos los aislamientos de *F.oxysporum* (Fo), *F. proliferatum* (Fp), *F. verticillioides* (Fv), *F. solani* (Fs), *F. compactum* (Fc) y *Fusarium* sp. (Fsp.), obtenidos de ajos y cebollas generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias repetitivas intergénicas consenso (ERIC). La línea 400pb indica el marcador de peso molecular de 400 pares de bases (PB-L, "Productos Bio-Lógicos S. H.").

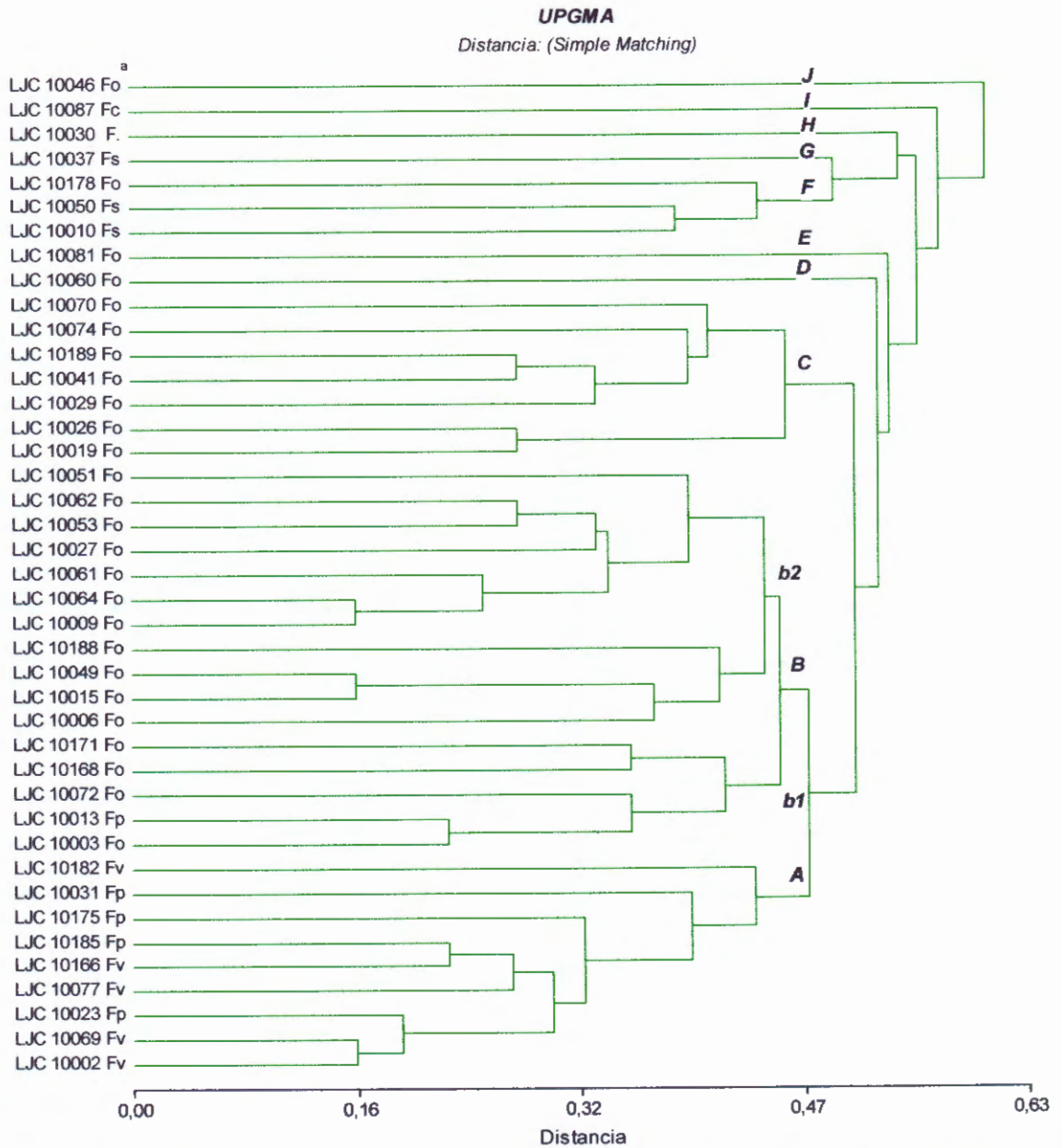


Figura 33. Dendrograma que muestra la relación entre aislamientos distintivos de *Fusarium* spp. obtenidos desde ajo y cebolla utilizando el método de UPGMA (o encadenamiento promedio) y el coeficiente Simple Matching (o de concordancia simple). a.- Fo, *F. oxysporum*; Fv, *F. verticillioides*; Fp, *F. proliferatum*; Fs, *F. solani*; Fc, *F. compactum*; F., *Fusarium* sp.)

DISCUSIÓN

1. Caracterización morfológica e identificación de los agentes causales

F. oxysporum fue la más frecuentemente aislada lo que concuerda con estudios previos realizados en el sur de Argentina por Kiehr y Delhey (2005) y además del hecho de ser un hongo ubicuo habitante del suelo (Di Pietro *et al.*, 2003). Los aislamientos así identificados presentaron características morfológicas, principalmente por la forma de los macroconidios, la estructura de los microconidióforos y la disposición y forma de las clamidosporas coincidentes con lo descrito por Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983). La identificación morfológica de los aislamientos LJC 10045 y LJC 10081 como *F. oxysporum* coincide con la realizada por Galvan *et al.* (2008) a través del marcador molecular desarrollado para esta especie (Mulè *et al.*, 2004).

La especie clasificada como *F. proliferatum* también correspondió por sus caracteres morfológicos a lo descrito en la bibliografía por Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983), en particular, por su rasgo distintivo de la presencia de microconidios producidos en largas cadenas sobre polifiálides. Esta especie se encontró en bulbos de cebollas en América del norte por du Toit *et al.* (2003) y en Argentina por Kiehr y Delhey (2005). En ajos, Dugan *et al.* (2003) lo citaron en América del Norte. Más recientemente y sobre ambos hospederos esta especie fue identificada por Stankovic *et al.* (2007) en Serbia. Las caracterizaciones concordaron con las que realizó Ridao en 2005 de los aislamientos de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* señalados con (*) en la Tabla 1 (Valdez *et al.*, 2005). Además los aislamientos LJC 10013 y 10023, fueron reconocidos como *F. proliferatum* por Galvan *et al.* (2008), por medio del empleo de un marcador molecular específico desarrollado por Waalwijk *et al.* (2003)

Los aislamientos determinados como *F. verticillioides* poseen los caracteres descritos por Gerlach y Nirenberg (1982). Esta especie fue citada por primera vez por Dugan *et al.* en 2007 afectando ajos, en EEUU y China. Sin embargo en Argentina nunca había sido mencionada por lo que esta sería la primera cita del patógeno tanto en ajo como en cebolla. Esta especie se aisló exclusivamente de cebolla en la provincia de San Juan y de ajo en la provincia de Mendoza.

Para la especie *F. solani*, se determinó que los aislamientos LJC 10050, LJC 10067 y LJC 10086 presentaron microconidios de forma oval, y se demostró su patogenicidad sobre cebolla lo que sugiere su inclusión en una misma forma especial, pero en este

trabajo no se profundizó ese aspecto. *F. solani* sólo se aisló a partir de cebolla. Kiehr y Delhey (2005) también lo identificaron pero no probaron su patogenicidad. Sin embargo Calle Bellido (2005) aisló a esta especie de plantas de cebollas enfermas, realizó ensayos pero no pudo probar su patogenicidad en el campo. Mientras que en esta investigación, el aislamiento LJC 10010 fue levemente patógeno ya que afectó a menos del 10 % de las raíces y los aislamientos LJC 10086, LJC 10067 y LJC 10037 con índices de severidad de 3; 3,67 y 4,67 fueron de moderada a altamente patógenos.

De un lote de la provincia de Río Negro, con cultivo antecesor zapallo, se aisló *F. compactum*, especie nunca antes mencionada como patógena de cebolla, a nuestro conocimiento, y que mostró una patogenicidad moderada (IS = 3), por lo que se sugiere que pudo ser un oportunista. *F. equiseti* ha sido citado como causante de podredumbres en zapallos (Vigliola; Calot, 1982 y Elmer, 1996). Habría que considerar que *F. compactum* y *F. equiseti* se mencionan como similares de difícil diferenciación y con la morfología de los macroconidios como único carácter distintivo (Leslie; Summerell, 2006).

Los aislamientos de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides* provenientes de cebolla mostraron una tasa de crecimiento mayor que los de ajo. Esta diferencia tal vez se debió a que estos últimos están adaptados a una temperatura de crecimiento distinta de la experimentada de 25° C. La enfermedad se manifiesta en cebollas a altas temperaturas de suelos entre 25° y 35° C (Maude, 2006). Sin embargo el rango en el cual puede producirse la enfermedad es de 20° a 38° C (Kehr *et al.*, 1962). Para dilucidar este punto, se debería medir la tasa de crecimiento de estos aislamientos a otras temperaturas, dentro de estos rangos. Luego determinar la correlación para la tasa de crecimiento entre la temperatura óptima y el origen de los aislamientos.

Los valores de crecimiento de *F. oxysporum* estuvieron dentro de los rangos propuestos por Gerlach y Nirenberg (1982), pero fueron menores para el resto de las especies. Esto puede deberse a que los aislamientos corresponden a otro origen geográfico. O tal vez, si bien el medio utilizado fue PDA Difco ajustado a pH 6.5-7, este último pudo haber sufrido algún cambio durante la esterilización en el autoclave, lo que afectó a la tasa de crecimiento, la que depende de estas condiciones como lo describe Booth (1971).

Las características en cuanto a la forma de los micro y macro conidios coincidieron con la referida por la bibliografía, lo mismo que para el rango de valores del largo de estas estructuras. En cambio para el ancho, los valores obtenidos fueron superiores a

los establecidos por Gerlach y Nirenberg (1982). Estos autores emplearon SNA y en este trabajo se usó AHC, ya que este medio promueve el buen crecimiento y la esporulación, reduce la variación fenotípica y mantiene el tipo cultural de cada especie de *Fusarium* de acuerdo a lo expuesto por Fisher *et al.* (1982) y Nelson *et al.* (1983). También se ha descrito que el medio de cultivo puede afectar las variables cuali y cuantitativas de la morfología de los aislamientos (Nirenberg, 1990). Kaiser 1978 demostró para algunas especies de *Fusarium* que el film plástico ocasionó un aumento en la variabilidad de la forma de las esporas debido a modificaciones en la atmósfera dentro de la caja de petri.

2. Caracterización por patogenicidad

F. oxysporum incluye tanto a aislamientos patogénicos como no patogénicos, con características morfológicas que los hacen indistinguibles (Gordon; Martyn, 1997, Lievens *et al.*, 2008) por lo que fue necesario caracterizarlo por su patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad se realizaron sobre cebolla y ajo con las especies de *Fusarium* aisladas del respectivo hospedero. Los aislamientos de ajo no fueron inoculados sobre cebolla y viceversa debido tanto al tiempo extra necesario como a la disponibilidad de infraestructura. Sería interesante realizar estas pruebas, para poder determinar si los aislamientos obtenidos de cebolla y ajo pertenecen a la forma especial *cepae* y *allii* respectivamente o sólo a *cepae* y así corroborar los resultados obtenidos con la técnica de GCV.

En las pruebas de patogenicidad de los aislamientos de *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. compactum* obtenidos desde cebolla, se determinaron diferencias significativas con respecto al control, cuando el IS fue mayor a 3.33. Esto se debió a que el coeficiente de variación del ensayo fue alto, con un valor de 17.8 %. Los aislamientos de *F. oxysporum* con un IS de 4 que corresponde a los que generaron más del 50 % de raíces podridas y leves síntomas en los bulbos se pueden considerar como patógenos y que pertenecen a la *formae speciales cepae*. Esta forma especial es la que ocasiona la infección del disco y también la muerte y abscisión de raíces (Summer; 1995). Se determinó que la patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *cepae* dependió de factores que aparecen conjuntamente, como la capacidad de los aislamientos de producir diferente tipo de enzimas, o también de la expresión de compuestos antifúngicos por parte de cultivares resistentes (Özer *et al.*, 2003; Holz; Knox-Davies, 2008). Link y Walker (1933) encontraron que el catecol presente en cebollas pigmentadas, fue tóxico para el hongo *Colletotrichum circinans*.

Los aislamientos logrados de ajo exhibieron diferencias significativas en los ensayos con respecto al control, excepto LJC 10188. En esta prueba el coeficiente de variación fue bajo (11,5%). Los resultados alcanzados concuerdan con los obtenidos por Stankovic *et al.* (2007). La razón por la que se eligió el método de prueba presentado por este autor para determinar la patogenicidad, fue porque recreó las condiciones de la enfermedad. Esta metodología también podría emplearse a través de un conjunto de cultivares para determinar razas del hongo. Además este ensayo resultó práctico dadas las disponibilidades de infraestructura existentes durante la realización de la tesis.

Otros tipos de evaluación para esta enfermedad se descartaron debido a las desventajas que han presentado. Con el método de semilla sembrada en arena inoculada (Krueger *et al.*, 1989; Villeveille, 1996; Valdez *et al.*, 2004), se advirtió que la enfermedad evaluada fue la de damping-off (mal de los almácigos) en lugar de la podredumbre basal. Tampoco se adoptó la técnica propuesta por Swift *et al.* (2002), ya que solo reprodujo los síntomas que se manifiestan en el bulbo y no en las raíces. Este autor comprobó la patogenicidad de *F. oxysporum* a través de su capacidad o no de colonizar rodajas de cebolla.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad dependen de las condiciones ambientales, del tipo de inoculación y de la edad del hospedero (Stadnik; Dhingra; 1996). Calle Bellido (2005), determinó *in-vitro* por inoculación de bulbos, que aislamientos de *Fusarium* spp. tenían capacidad de producir síntomas, no así cuando realizó las pruebas en el campo. Kehr *et al.* (1962) establecieron que aislamientos de *Fusarium* fueron patogénicos en un rango de temperaturas de 20 a 38° C. En cebolla, las heridas mecánicas incrementaron significativamente la incidencia de la podredumbre basal en suelos infectados con *Fusarium* (Everest *et al.*, 1985). Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, es que se debería establecer un protocolo único para comprobar la patogenicidad en el campo y para que los resultados sean comparables.

La metodología para probar la patogenicidad de aislamientos de ajo es similar a la realizada por Matuo *et al.* (1986). Los resultados obtenidos con las dos pruebas de patogenicidad ensayadas concuerdan con los de estos investigadores. Sería interesante, al igual que Matuo *et al.* (1986) probar la patogenicidad de los aislamientos en varias especies de liliáceas y determinar la forma especial a la que corresponden.

Se determinó que existe correlación ($r= 0.74$) entre los métodos empleados para probar la patogenicidad de los aislamientos de ajo. La asociación entre las pruebas fue del tipo exponencial, modelo que puede ser utilizado para predecir lo que sucede en la poscosecha, conociendo el IS del hongo que afecta las plantas de ajo. Para los aislamientos de *F. verticillioides* se confirmó la patogenicidad en planta ($IS>3$) y en poscosecha ($VP>52$) de ajo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Dugan *et al.* (2007).

El inóculo empleado en las pruebas de patogenicidad en planta fue obtenido en caldo de papa, medio rico en nutrientes. Este medio podría favorecer la actividad patogénica de aislamientos patógenos débiles o no patógenos. Mientras que en las pruebas en poscosecha el inóculo se obtuvo con ADE. Como queda de manifiesto, independientemente del modo de obtención del inóculo las dos pruebas se correlacionaron positivamente.

Se conoce que los miembros de la sección *Liseola* son productores de micotoxinas (Nelson *et al.*, 1992; Shephard *et al.*, 1999). Seefelder *et al.* (2002) determinaron que ajos infectados con *F. proliferatum* producían una micotoxina (fumonisina B₁). Stankovic *et al.* (2007) probaron que este hongo aislado de ajo y de cebolla también la producía sobre granos de maíz. Se sabe además que *F. verticillioides* produce micotoxinas sobre otras especies vegetales (Gamanya; Sibanda, 2001). Sería importante entonces determinar si los aislamientos patogénicos identificados en este estudio, tienen la capacidad de producir micotoxinas *in-vitro* e *in-vivo*, para poder evaluar los posibles riesgos toxigénicos relacionados.

3. Caracterización de *F. oxysporum* por GCV

A los aislamientos patogénicos se los dividió en *formae speciales* debido a su alto nivel de especificidad con el hospedero. La prueba de compatibilidad vegetativa puede además caracterizar grupos basados en la genética. El método propuesto para *F. oxysporum* por Puhalla (1985) se basó en la capacidad de formar heterocariontes, por el apareamiento de mutantes incapaces de reducir nitratos. Estos mutantes fueron generados en un medio con 1.5 % de KClO₃ (Correll *et al.*, 1987). En esta investigación se consiguió mayor frecuencia de mutantes *nit* en el medio PDC con 3 % de KClO₃, en cambio en MMC a la misma concentración el crecimiento de casi todos los aislamientos fue completamente restringido. Otros investigadores también debieron aumentar la concentración de KClO₃, al 3 % para obtener los mutantes *nit* de *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (Swift *et al.*, 2002), f. sp. *chrysanthemi* (Pasquali *et al.*, 2004) y

f. sp. *latacae* (Paquali *et al.*, 2005) y de 3 a 5 % para la f. sp. *betae* (Harveson; Rus, 1997), para la f. sp. *dianthi* (Lori *et al.*, 2004) y para la f. sp. *melonis* (Jacobson; Gordon, 1988, Schreuder *et al.*, 2000).

En este estudio se determinó una considerable diversidad genética entre los aislamientos de *F. oxysporum* de ajo y cebolla por los múltiples GCV detectados. Otros estudios que han obtenidos similares resultados son los realizados para *F. oxysporum* f. sp. *betae* (Harveson, Rush, 1997). Dado que la compatibilidad vegetativa requiere de un alto grado de relación genética entre individuos (Leslie; Summerell, 2006), la existencia de varios GCV implica que existe gran variación entre individuos de una población (Correll *et al.*, 1986, Jacobson; Gordon; 1988, Leslie; 1993, Smith-White *et al.*, 2001). Otros ejemplos de aislamientos de *F. oxysporum* que presentan cierto nivel de diversidad genética ya que pertenecen a relativamente pocos GCV son la f. sp. *cubense* (Koenig *et al.*, 1997, Bentley *et al.*, 1998), la f. sp. *canariensis* (Gunn; Summerell, 2002) o la f. sp. *radicis-lycopersci* (di Primo *et al.*, 2001; Katan; Katan, 1999). En contraste con estos resultados, di Primo *et al.* (2002) determinaron que todos los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, aislados de azafrán en Italia y España pertenecieron al mismo GCV.

Junto a varios GCV, un número de cinco aislamientos se establecieron como auto-incompatibles. Este resultado es otro indicador de la existencia de una sustancial variación entre los aislamientos empleados en esta investigación. Jacobson y Gordon (1988) encontraron aislamientos auto-incompatibles de *F. oxysporum* aislados de melón (*Cucumis melo*), también Woo *et al.* (1996) en porotos (*Phaseolus vulgaris*) y Katan y Katan (1999) en tomate (*Solanum lycopersico* = *Lycopersicon esculentum*). Sería necesario identificar el mecanismo que generó esta variación genética.

No se encontró relación entre los GCV y los hospederos desde los cuales fueron obtenidos o con el nivel de patogenicidad de los aislamientos. Por ejemplo al GCV denominado A lo conformaron aislamientos de ajo y también de cebolla. Este resultado coincide con lo que obtuvieron Catti *et al.* (2007) en crucíferas (*Eruca vesicaria* y *Diplotaxis* spp.). Vakalounakis *et al.* (2004) encontraron que aislamientos con diferente valor de severidad, en plantas inoculadas artificialmente pertenecían al mismo GCV. En una población asexual como es la de *F. oxysporum*, no debería haber recombinación sexual. Aislamientos con un similar nivel de patogenicidad provendrían de un linaje clonal y todos deberían pertenecer al mismo GCV (Leslie; Summerell; 2006). La falta de relación entre estos aspectos (variabilidad genética del hongo y patogenicidad) revela la complejidad de esta enfermedad en las zonas muestreadas.

Tampoco se pudo establecer una relación entre los GCV y el origen geográfico de los aislamientos obtenidos desde ajo y/o cebolla. El hecho de que aislamientos de localidades distantes se ubicaran en el mismo GCV puede ser explicado por el método de propagación de estas aliáceas. El ajo puede transportar el inóculo en dientes infectados utilizados como "semillas" y la semilla de cebolla transmitirlo (Özer; Koycu, 2004), así se transfiere al suelo y es introducido a zonas libres de este patógeno.

4. Caracterización molecular por ERIC-PCR

De los 51 aislamientos de *F. oxysporum* fue posible diferenciar 26 patrones y se determinó una relación genética máxima de 35 % entre los grupos. Sin embargo no se pudo relacionar a los grupos con el origen geográfico, la patogenicidad o el GCV. Gunn y Summerell (2002) encontraron discrepancias entre el patrón ERIC y el GCV de un aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *canariensis*. Pequeñas diferencias, tal como un cambio en una sola base entre los *loci* de compatibilidad, son suficientes para dividir dos aislamientos casi idénticos en GCV separados. El patrón de bandas generados por los ERIC puede separar a aislamientos de un mismo GCV, si existe alguna mutación en uno o más lugares donde el iniciador se aparee, de manera que se produzca o no la amplificación.

El método ERIC-PCR permitió realizar suposiciones en cuanto a las relaciones de los aislamientos. En *F. oxysporum* los patrones generaron tres grandes grupos A, D y C con una similitud del 55 %. En particular los patrones de los aislamientos de *F. oxysporum* de cebolla permitieron determinar que para esta especie, en las localidades de Mendoza y San Juan, hubo gran variabilidad, de 73 % y 66 % respectivamente. En las localidades de Buenos Aires la variabilidad fue de 50 % pero debido al número reducido de muestras (4) este valor no se debería considerar. No se pudo establecer relación entre los patrones de bandas observados y los hospederos, ya que aislamientos de cebolla y de ajo presentaron el mismo bandeo. Los resultados obtenidos con ERIC-PCR coinciden con los de GCV y patogenicidad, todos revelaron gran variabilidad de los aislamientos. Esta variabilidad podría ser el resultado de varios factores incluyendo la introducción de nuevas razas, la dispersión amplia de una raza o la adaptación de la población local a nuevas condiciones medioambientales o del hospedero (Gunn; Summerell, 2002). El número de grupos generados por ERIC-PCR y GCV y las diferencias entre ellos indican un grado de diversidad relativamente alto en *F. oxysporum*. El conocimiento de la variación existente dentro de la *forma specialis* es esencial para efectivas prácticas de manejo de la enfermedad (Gunn, Summerell,

2002). ERIC detectó que aislamientos de ajo y cebolla compartieron patrones de banda, estos provenían de distintas provincias y localidades, por lo que podría suceder que se importe el inóculo de un lugar a otro a través de las semillas de cebolla (Özer; Köycü, 2004) o a través del ajo "semilla".

Los aislamientos de *F. proliferatum* generaron 5 patrones de bandas diferentes con una similitud del 20 % entre todos los grupos. El aislamiento altamente patogénico, LJC 10031, mostró un patrón de bandas único. Sería interesante probar si este patrón de bandas está relacionado con la patogenicidad en esta especie. Para realizar este estudio se necesitaría un mayor número de aislamientos muy patogénicos. Los aislamientos de ajo, a excepción de uno, tuvieron el mismo patrón de banda y además en las pruebas de patogenicidad desarrollaron síntomas en niveles similares. En los aislamientos de cebolla también se observó poca variabilidad. Se manifestó baja variabilidad en *F. proliferatum* por medio de esta técnica molecular.

Los aislamientos de *F. verticillioides* exhibieron el mayor nivel de variabilidad, el 70 % de ellos tuvieron diferentes patrones de bandas. Tres aislamientos de cebolla obtenidos de San Juan en la misma localidad fueron distintos. Ningún aislamiento de cebolla presentó el mismo patrón de bandas que los ajo, esto indicó variabilidad. En particular dos aislamientos de ajo tuvieron el mismo patrón, lo que mostraría una menor variación sobre este hospedero.

En *F. solani* se determinó baja diversidad cuando se observaron los patrones de bandas generados. Estos resultados coinciden con los obtenidos por las otras técnicas con los que se caracterizaron. LJC 10050, LJC 10067 y LJC 10086, además de que tuvieron el mismo patrón de bandeado en la caracterización morfológica, presentaron microconidios de forma ovalada a diferencia de los otros que fueron reniformes y fueron patógenos. Esta evidencia reafirmó la suposición que estos tres aislamientos corresponderían a la misma forma especial. O tal vez podría ocurrir que ERIC-PCR detectaría el mismo patrón para aislamientos de igual grado de patogenicidad.

Se reveló polimorfismos en todas las especies de *Fusarium* aisladas de ajo y cebolla. Los patrones generados permitieron distinguir variabilidad en las distintas especies. Además esta técnica proporcionó una manera de agrupar a los aislamientos de la misma especie y de estimar la relación genética entre grupos (Edel *et al.*, 1995). En el análisis conjunto de todos los patrones distintos (Fig. 33), ERIC-PCR permitió detectar similitudes entre *F. proliferatum* y *F. verticillioides*. En el caso de *F. oxysporum* y *F. solani* no pudo discriminar entre los aislamientos de estas especies. Este marcador se utilizó para describir la variabilidad de una especie pero no fue tan

informativo para la descripción entre especies. Por lo que para poder realizar una discriminación entre especies debería probarse otra técnica como el AFLP. Esta última técnica fue empleada por Abdel-Satar *et al.* (2003) en estudios filogenéticos de *F. oxysporum*, *F. moniliforme* y *F. solani*, y además para detectar variación genética en aislamientos obtenidos de maíz de la sección *Liseola* por Chulze *et al.* (2000) en Argentina. Smith-White *et al.* (2001) utilizó ERIC-PCR para caracterizar y determinar la diversidad de una población natural de *F. oxysporum* en Australia. En el presente trabajo todas las especies generaron patrones de bandas polimórficos por lo que esta técnica podría ser empleada para continuar con los estudios de diferenciación de cada una de ellas.

Con respecto a *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, los patrones de ERIC revelaron similitud entre aislamientos de estas dos especies. Esto podría ser explicado porque *F. proliferatum* y *F. verticillioides* son especies que se agrupan en la sección *Liseola* dentro del complejo *Gibberella fujikuroi*/*Fusarium*, antes considerados *F. moniliforme*, basados en la caracterización morfológica (Nelson *et al.*, 1983).

CONCLUSIONES

- i. *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. compactum* y un aislamiento no identificado fueron las especies aisladas de cebolla y ajo con síntomas de podredumbre basal en localidades productoras de las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro.
- ii. *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. compactum* y *Fusarium* sp. son agentes causales de la podredumbre basal en plantas de cebolla en localidades productoras de las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro.
- iii. *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son agentes causales de la podredumbre basal en plantas y bulbos de ajo en Mendoza.
- iv. Este trabajo representa la primer referencia en Argentina, de *F. verticillioides* como agente causal de podredumbre basal en cebolla en las localidades productoras de San Juan y en ajo en las localidades productoras de Mendoza y, también de *F. compactum* en cebolla, en Río Negro.
- v. Se demostró la patogenicidad de *F. solani* en cebolla evaluando la podredumbre basal.
- vi. *F. oxysporum* fue la especie más frecuentemente aislada de cebolla y ajo, y corresponde a la forma especial *cepae* determinada por la técnica de GCV.
- vii. Empleando la técnica de ERIC-PCR se detectó variabilidad genética dentro de las especies, pero esta no fue útil para diferenciar entre especies de *Fusarium* aisladas de cebolla y ajo.
- viii. Aislamientos de cebolla y de ajo de *F. oxysporum* mostraron variabilidad genética determinada por GCV y ERIC-PCR.
- ix. *F. proliferatum* fue la especie de menor variabilidad genética determinado por la técnica de ERIC-PCR.
- x. Los aislamientos de *F. verticillioides* obtenidos de ajo en Mendoza y de cebolla en San Juan exhibieron la mayor variabilidad por ERIC-PCR.

BIBLIOGRAFÍA

- ABAWI, G. S.; LORBEER, J. W. 1971a. Populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in organic soils of New York. *Phytopathology*. 61: 1042–10048.
- ABAWI, G. S.; LORBEER, J. W. 1971b. Pathological histology of four onion cultivars infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology*. 61: 1164–1169.
- ABAWI, G. S.; LORBEER, J. W. 1972. Several aspects of the ecology and the pathology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology*. 62: 870–876.
- ABDEL-SATAR, M.A.; KHALIL, M.S.; MOHMED, I. N.; ABD-ELSALAM, K.A.; VERREET, J.A. 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *African Journal of Biotechnology*. 2 (3):51–55.
- ACOSTA, A.; GAVIOLA, J. C.; GALMARINI, C. 1993. Producción de semilla de cebolla. José Crnko ed. Taller gráfico de la EEA Mendoza. 83 p.
- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th Ed. Elsevier Academic Press Publications, California, USA. 922 p.
- AHN, I.-P. ; CHUNG, H.-S.; LEE, Y.-H. 1998. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Disease*. 82: 244-246.
- ALVES-SANTOS, F. M.; BENITO, E. P.; ESLAVA, A. P.; DÍAZ-MÍNGUEZ. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (8): 3335-3340.
- ARMENGOL, J.; MORETTI, A.; PERRONE, G.; VINCENT, A.; BENGOCHEA, J. A., GARCIA-JEMENEZ, J. 2005. Identification, incidence and characterization of *Fusarium proliferatum* on ornamental palms in Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 112: 123-131.
- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. 1981. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: P. E. Nelson; Toussoun, T. A.; Cook, R. (ed.), *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park. 391–399 p.
- ASSIGBETSE, K. B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M. P; GEIGER, J. P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology*. 84:622-626.
- BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K., BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. *Phytopathology*. 90:891-900.

- BENTLEY, S.; PEGG, K. G.; MOORE, N. Y.; DAVIS, R. D.; BUDDENHAGEN, I. W. 1998. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology*. 88: 1283-1293.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Surrey, England. 237 p.
- BOOTH, C. 1977. *Fusarium*: Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute Surrey, England. 58 p.
- BOSLAND, P. W. 1988. *Fusarium oxysporum*, a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology* 6:281-290.
- CALLE BELLIDO, J. 2005. Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Tesis *Magister Scientiae*. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. 115 p.
- CARRILLO, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. V1. Universidad Nacional de Salta, Argentina. 165 p. [en línea] <<http://www.unsa.edu.ar/matbib>> [Consulta: Julio 2006].
- CATTI, A.; PASQUALI, M.; GHIRINGHELLI, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. 2007. Analysis of vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* from *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*. *Journal of Phytopathology*. 155: 61-64.
- CHULZE, S. N.; RAMIREZ, M. L.; TORRES, A.; LESLIE, J. F. 2000. Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (12): 5312-5315.
- CORRELL, J. C. 1991. The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 81: 1061-64.
- CORRELL, J. C.; PUHALLA, J. E.; SCHNEIDER, R. W. 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the basis of colony size, virulence and vegetative compatibility. *Phytopathology*. 76: 396-400.
- CORRELL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*. 77:1640-1646.
- CORZO-MARTINEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in food science & technology*. 18: 609-625.
- CRAMER, C. S. 2000. Breeding and genetics of *Fusarium* basal rot resistance in onion. *Euphytica*. 115: 159-166.
- CROWE, F.; MOHAN, S. K.; SCHWARTZ, H. F. 1995. Downy Mildeu. In: Howard F. Schwartz and S. Krishana Mohan ed. *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. The American Phytopathological Society, Minnesota. pp. 20-21.

- DE OLIVEIRA, V.C.; DA COSTA, J. L. S. 2003. Compatibilidade vegetativa de nit-mutantes de *Fusarium solani* patogênicos e não-patogênicos ao feijoeiro e à soja. *Fitopatologia Brasileira*. 28:089-092.
- DE VISSER, C.; VAN DEN BROEK, R.; VAN DEN BRINK, L. 2006. *Fusarium* basal rot in the Netherlands. *Vegetable crops research bulletin*. 65: 5-16.
- DI PIETRO, A.; MADRID, M. P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO M. I. G. 2003. *Fusarium oxysporum* exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 2003. 4(5): 315-325.
- DI PRIMO, P.; CAPPELLI, C.; KATAN, T. 2002. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* from saffron. *European Journal of Plant Pathology* 108: 869-875.
- DI PRIMO, P.; CARTIA, C.; KATAN, T. 2001. Vegetative compatibility and heterokaryon stability in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* from Italy. *Plant Pathology*. 50: 371-382.
- DU TOIT, L. J.; INGLIS, D. A.; PELTER, G. Q. 2003. *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease* 87:750.
- DUGAN, F. M.; HELLIER, B. C.; LUPIEN, S. L. 2003. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology* 52: 426. [en línea] <<http://www.bspp.org.uk/ndr/>> [Consulta: Junio: 2006].
- DUGAN, F. M.; HELLIER, B. C.; LUPIEN, S. L. 2007. Pathogenic fungi in garlic seed cloves from the United States and China, and efficacy of fungicides against pathogens in garlic germplasm in Washington state. *Journal of Phytopathology*. 155: 437-445
- EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; RECORBET, G.; ALABOUVETE, C. 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolates from different soils in France. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 61-71.
- EDEL, V. 1998. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In: Bridge, P. D.; Arora, D. K.; Reddy, C. A.; Elander, R. P. eds. *Applications of PCR to Mycology*. CAB International New York, USA. pp. 1-20.
- EDEL, V.; STEINBERG, C.; AVELANGE I.; LAGUERRE, G.; ALABOUVETTE, C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology*. 85:579-585.
- ELMER, W.H; STEPHENS, C.T. 1989. Classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* into Vegetatively Compatible Groups. *Phytopathology*. 79:88-93.
- ELMER, W.H. 1991. Vegetative Compatibility Groups of *Fusarium proliferatum* from Asparagus and Comparisons of Virulence, Growth Rates and Colonizations of Asparagus Residues Among groups. *Phytopathology*. 81:852-857.
- ELMER, W. H. 1996. *Fusarium* fruit rot of pumpkin in Connecticut. *Plant Disease*. 80: 131-135.

- EVERTS, K. L.; SCHWARTZ, H. F.; EPSKY, N. D.; CAPINERA, J. L. 1985. Effects of maggots and wounding on occurrence of fusarium basal rot of onions in Colorado. *Plant Disease*. 69: 878-882.
- FANTINO, M. G.; SCHIAVI, M. 1987. Onion breeding for tolerance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 26:108-112.
- FISHER, N. L.; BURGESS, L. W.; TOUSSOUN, T. A.; NELSON, P. E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*. 72:151-153.
- GALVAN, G. A.; KONING-BOUCOIRAN, C. F. S.; KOOPMAN, W. J. M.; BURGER-MEIJER, K.; GONZÁLEZ, P. H.; WAALWIJK, C.; KIK, C.; SCHOLTEN, O. E. 2008. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion and resistance to fusarium basal rot in related *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*. 121: 499-512.
- GAMANYA, R.; SIBANDA, L. 2001. Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B₁ in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 145-149.
- GATICA, M.; ORIOLANI, E. 1997. Enfermedades. In: Manual del cultivo de la cebolla. Claudio Galmarini ed. INTA, Centro Regional Cuyo, Mendoza. pp. 76-82.
- GEISTLINGER, J.; WEISING, K.; KAISER, J.; KAHL, G. 1997. Allelic variation at hypervariable compound microsatellite locus in the ascomycete *Ascochyta rabiei*. *Molecular Gen Genetic*. 256:298-305.
- GERLACH, W.; NIRENBERG, H. 1982. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Dahlem, Berlin. 406 p.
- GILLINGS, M.; HOLLEY, M. 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacteria repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*. 25: 17-21.
- GIRAUD, T.; REFRÉGIER, G.; LE GAC, M.; DE VIENNE, D. M.; HOOD, M. E. 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 45:791-802.
- GITAITIS, R. D. 1995. Soft Rot. In: Howard F. Schwartz and S. Krishana Mohan ed. Compendium of Onion and Garlic Diseases. The American Phytopathological Society, Minnesota. pp. 32.
- GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; SHIU, P. K. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics*. 34:165-186.
- GLASS, N.L.; KANEKO, I. 2003. Fatal attraction: non-self recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*. 2 (1): 1-8.

- GODOY, P.; CANO, J.; GENÉ, J.; GUARRO, J.; HÖFLING-LIMA, A. L.; LOPES COLOMBO, A. 2004. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (10): 4494-4497.
- GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. 1997. The evolutionary history of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 111-128.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 454-500.
- GUNN, L. V.; SUMMERELL, B. A. 2002. Differentiation of *Fusarium oxysporum* isolates from *Phoenix canariensis* (canary island date palm) by vegetative compatibility grouping and molecular analysis. *Australasian Plant Pathology*. 31: 351-358.
- HARVESON, R. M.; RUSH, C. M. 1997. Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from sugar beet as determined by vegetative compatibility. *Plant Disease*. 81: 85-88.
- HILL, J. P. 1995. Stemphylium leaf blight and stalk rot. Powdery Mildew. Black Mold In: Howard F. Schwartz and S. Krishana Mohan ed. *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. The American Phytopathological Society, Minnesota. pp. 22-27.
- HOLZ, G.; KNOX-DAVIES, P. S. 2008. Production of Pectic Enzymes by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and its Involvement in Onion Bulb Rot. *Journal of Phytopathology*. 112 (1): 69-80.
- HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*. 5 (4): 825-834.
- HUNGER, S.A.; McLEAN, K.L.; EADY, C.C.; STEWART, A. 2002. Seedling infection assay for resistance to *Sclerotium cepivorum* in *Allium* species. *New Zealand Plant Protection*. 55:193-196. [en línea] <www.hornet.co.nz/publications/nzpps> [Consulta: Marzo 2008].
- INSTITUTO DE DESARROLLO RURAL. 2005a. "Serie de Informes de Coyuntura, Situación Actual de Cebolla", IDR. 68p.
- INSTITUTO DE DESARROLLO RURAL. 2005b. "Serie de Informes de Coyuntura, Situación Actual de Ajo", IDR. 51p.
- INDEC. 2002. Censo Nacional Agropecuario 2002.
- INFOSTAT. 2002. InfoStat versión 1.1. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- JACOBSON, D. J.; GORDON, T. R. 1988. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology*. 78: 668-672.

- KAISER, R. P. 1978. Effect of plastic film as a closure method on cultural morphology of *Fusarium* species. *Phytopathology*. 68: 669-671.
- KATAN, T.; ZAMIR, D.; SARFATTI, M.; KATAN, J. 1991. Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*. 81: 255-262.
- KATAN T.; KATAN J.; GORDON T. R.; POZNIAK D. 1994. Physiologic races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in Israel. *Phytopathology* 84. 153-157.
- KATAN T.; DI PRIMO P. 1999. Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*. 27: 51-64.
- KATAN, T; KATAN, J. 1999. Vegetative compatibility grouping in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* from the UK, the Netherlands, Belgium and France. *Plant Pathology*. 48: 541-549.
- KEHR, A. E.; O'BRIEN, M. J.; DAVIS, E. W. 1962. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and its interaction with *Pyrenochaeta terrestris* on onion. *Euphytica*. 11 (2): 197-208.
- KAWABE, M.; KATSUBE, K.; YOSHIDA, T.; ARIE, T. TSUCHIYA, K. 2007. Genetic diversity of *Fusarium* f. sp. *spinaciae* in Japan based on phylogenetic analyses of rDNA-IGS and *MAT1* sequences. *Journal of Genetic Plant Pathology*. 73: 353-359.
- KIEHR, M.; DELHEY, R. 2005. *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. 12º Congreso Latinoamericano- 28º Congreso Argentino de Horticultura, Argentina pp. HV13.
- KISTLER, C. H. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 87 (4): 474-479.
- KOENING, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C. 1997. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consist of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages, *Phytopathology*. 87: 915-923.
- KOIKE, S. T.; SMITH, R. F.; DAVIS; R. M.; NUNEZ, J. J.; VOSS, R. E. 2001. Characterization and control of garlic rust in California. *Plant Disease*. 85:585-591.
- KÖYÇÜ, N. D.; ÖZER, N. 1997 Determination of seed borne fungi in onion and their transmission to onion sets. *Phytoparasitica*. 25:25-31.
- KRUEGER, S. K.; WEINMAN, A. A.; GABELMAN, W. H. 1989. Combining ability among inbred onions for resistance to *Fusarium* Basal Rot. *Hortscience*. 24: 1021-1023.
- LA MONDIA, J. A.; ELMER, W. H. 1989. Pathogenicity and vegetative compatibility among isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* colonizing asparagus tissues. *Canadian Journal of Phytopathology*. 67: 2420-2424.

- LACY, M. L.; LORBEER, J. W. 1995. Botrytis Neck Rot. In: Howard F. Schwartz and S. Krishana Mohan ed. Compendium of Onion and Garlic Diseases. The American Phytopathological Society, Minnesota. pp. 18.
- LESLIE, J. F., 1991. Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology*. 81: 1058–1060.
- LESLIE, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*. 31: 127-150.
- LESLIE, J. F. 1996. Fungal Vegetative Compatibility –Promises and Prospects. *Phytoparasitica*. 24 (1): 3-6.
- LESLIE J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 59: 107–117.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing Professional. Iowa, USA. 388 p.
- LESLIE, J. F.; ANDERSON, L. L.; BOWDEN, R. L.; LEE, Y. W. 2007. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*. 119:25-32.
- LIEVENS, B.; REP, M.; THOMMA, B. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*. 64: 781-788.
- LINKS, K. P.; WALKER, J. C. 1933. The isolation of catechol from pigmented onion scales and its significance en relation to disease resistance in onions. *The Journal of Biological Chemistry*. 100: 379-383.
- LORI, G.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. 2004. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. *Phytopathology*. 94: 661-668.
- MATUO. T; MIYAGAWA, M.; SAITO, H. 1986. *Fusarium oxysporum* f. sp. *garlic* n. f. sp. causing basal rot of garlic. *Annual Phytopathological Society of Japan*. 52: 860-864.
- MAUDE, R. B. 2006. Onion diseases. In: B. M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye eds. *The epidemiology of Plant Diseases*. 2nd edition. Springer, Netherlands. pp. 491-520.
- MIGUELI, Q.; BRIATIORE, E.; GARIBALDI, A. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 49–57.
- MILLER, M. E.; LACY, M. L. 1995. Rust. In: Howard F. Schwartz and S. Krishana Mohan ed. Compendium of Onion and Garlic Diseases. The American Phytopathological Society, Minnesota. pp. 24.

- MIRETE, S.; VÁZQUEZ, C.; MULÈ, G.; JURADO, M.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. 2004. Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1 α sequence analyses. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 515-523.
- MOHAN, S. K.; BIJMAN V. P.; KNOTT E. A. 1997. Bulb rots of onions caused by *Fusarium proliferatum*. (Abstract) *Phytopathology* 87:S67.
- MOHAN, S. K. 1995. Yeast Soft Rot. In: Howard F. Schwartz and S. Krishana Mohan ed. *Compendium of Onion and Garlic Diseases*. The American Phytopathological Society, Minnesota. pp. 33-34.
- MULÈ, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MORETTI, A. 2004. Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 230: 235-240
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A.; SCHARF, S. J.; SAIKI, R. K.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51: 263-273.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase- catalyzed chain reaction. *Methods un Enzymology*. 155: 335-350.
- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS; W. F. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, USA. 193 p.
- NELSON, P. E.; DIGNAN, M. C.; ANAISSIE E. J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*. 7(4): 479-504.
- NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; DESJARDINS, A. E. 1992. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Applied and Enviromental Microbiology*. 58 (3): 984-989.
- NIRENBERG, H. I. 1990. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Studies in Mycology*. 32: 91-101.
- O'DONNELL, K., CIGELNIK, E., NIRENBERG, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90: 465-493.
- OUELLET, T.; SEIFERT, K. A. 1993. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology*. 83:1003-1007.
- ÖZER, N.; KÖYÇÜ, N. D.; CHILOSI, G.; PIZZUOLO, P.H.; COSKUNTUNA, A.; MAGRO, P. 2003. Pectolytic izoenzymes by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and antifungal compounds in onion cultivars as response to pathogen infection. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 25: 249-257.

- ÖZER, N.; KÖYÇÜ, D. N. 2004. Seed-borne fungal diseases of onion, and their control. In: K. G. Mukerji ed. Disease Management of Fruit and Vegetables. Vol.1. Fruit and Vegetables Disease. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 281-306.
- PARODI, L. 1972 Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Volumen I descripción de Plantas Cultivadas. 2ª ed. (Ampliada x Dimitri Milan J) Parodi Lorenzo R. ACME S.A.C.I. Buenos Aires, Argentina. pp. 224-226.
- PASQUALI, M.; MARENA, L.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. 2004. Vegetative compatibility grouping of the *Fusarium* wilt pathogen of paris daisy (*Argyranthemum frutescens* L.). *Journal of Phytopathology*. 152:257-259.
- PASQUALI, M.; DEMATHEIS, F.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. 2005. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* from lettuce. *Plant Disease*. 89: 237-240.
- PRIOLETTA, S. M.; GARCÍA, C. D.; BELLACOMO, M. C. 2005. Comportamiento de materiales genéticos de cebolla frente a la podredumbre basal. 13th Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 314p
- PUHALLA, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Phytopathology*. 63:179-183.
- PUHALLA, J. E.; SPIETH, P.T. 1985 .A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Experimental Mycology*. 9: 39-47.
- RENGWALSKA; M. M.; SIMOM, P. W. 1986. Laboratory evaluation of pink root and *Fusarium* basal rot resistance in garlic. *Plant Disease*. 70:670-672
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. 1984. Fungal DNA isolation. John Pitkin, Plant Research Laboratory, Michigan State University, USA [en línea] <<http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/lazo/dnafun.html>> [Consulta: Agosto de 2006].
- SAGPyA. 2005. Informes especiales, Cultivo del ajo en la Argentina. [en línea] <<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>> [Consulta: Marzo de 2007].
- SAGPyA. 2006. Informes especiales, Situación y perspectiva del mercado de la cebolla fresca. [en línea] <<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>> [Consulta: Marzo de 2007].
- SAIK, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; GLENN T. H.; MULLIS, K. B.; ERLICH H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science*. 239: 487-491.
- SARLI, A. 1980. Tratado de Horticultura 2º ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 459 p.
- SAS INSTITUTE. 1996. SAS Companion for Microsoft Windows Enviroment, Version 8. SAS Institute, Cary, Notrh California, USA.

- SCHREUDER, W.; LAMPRECHT, S. C.; HOLZ, G. 2000. Race determination and vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* from South Africa. *Plant Disease*. 84: 231- 234.
- SCHWARTZ, H. F.; MOHAN S. K. 1995. Compendium of Onion and Garlic Diseases. The American Phytopathological Society, Minnesota. 54p.
- SEEFELDER, W.; GOSSMANN, M.; HUMPF, H-U. 2002. Analysis of fumonisin B₁ in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2778-2781.
- SHEPHARD, G. S.; SEWRAM, V.; NIEUWOUDT, T. W.; MARASAS, W. F. O.; RITIENI, A. 1999. Production of the mycotoxins fusaproliferin and beauvericin by South African isolates in the *Fusarium* Section *Liseola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 5111-5115.
- SIMS, W. L.; LITTLE, T. M.; VOSS, R. E. 1976. Growing garlic in California. UC Davis, Vegetable Research and Information Center. USA. Folleto N° 2948. 14 p.
- SMITH-WHITE, J. L.; GUNN, L. V.; SUMMERELL, B. A. 2001. Analysis of diversity within *Fusarium oxysporum* populations using molecular and vegetative compatibility grouping. *Australasian Plant Pathology*. 30: 153-157
- SORENSEN, L. H.; SPARKS, W. C. 1980. A method for determining the bruise resistance of potatoes. *American Potato Journal*. 57: 494.
- STADNIK, M. J.; DHINGRA, O. D. 1996. Response of onion genotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* during the growth phase and in store. *Fitopatologia Brasileira*. 21: 431-435.
- STANKOVIC, S.; LEVIC, J.; PETROVIC, T.; LOGRIECO, A.; MORETTI, A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*. 118:165-172.
- SUMMER, D. R. 1995. *Fusarium* Damping-off. Pink Root. White Rot. Penicillium Decay of Garlic. *Fusarium Basal Plate Rot*. In: Howard F. Schwartz and S. Krishana Mohan ed. Compendium of Onion and Garlic Diseases. The American Phytopathological Society, Minnesota. pp. 9-28.
- SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*. 87:117-128.
- SWIFT, C. E.; WICKLIFFE, E. R.; SCHWARTZ, H. F. 2002. Vegetative Compatibility Groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from Onion in Colorado. *Plant Disease*. 86: 606-610.
- THORNTON, M. K.; MOHAN, S. K. 1996. Response to sweet Spanish onion cultivars and numbered hybrids to basal rot and pink root. *Plant Disease*. 80:660-663.

- VAKALOUNAKIS, D. J.; WANG, Z.; FRAGKIADAKIS, G. A.; SKARACIS, G. N.; LI, D.-B. 2004. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD. *Plant Disease*. 88: 645-649.
- VALDEZ, J. G.; MAKUCH, M. A.; MARINI, G. V. 2004. Patogenicidad de aislamientos de *Fusarium spp.* en plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.). 27th Congreso Argentino de Horticultura, Villa de Merlo, Argentina. pp.60.
- VALDEZ, J. G.; MAKUCH, M. A.; SALVALAGGIO, A. E.; MARINI, G. V.; PICCOLO, R. J.; GALMARINI, C. R. L. 2005. Introducción de resistencia a *Fusarium* y Raíz Rosada: *Fusarium spp.* Informe anual de progresos. [en línea] <<http://www.inta.gov.ar/Laconsulta/info/documentos/Inf%20prog5/LaCon/info/documentos/Cebolla/cebolla%20do/Hoja%20trabajo%2024.pdf>> [Consulta: Febrero de 2008]
- VALDEZ, J. G.; MAKUCH, M. A.; ORDOVINI, A. F.; MASUELLI, R. W.; OVERY, D.P.; PICCOLO, R. 2006. First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathology*. 55: 583.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19:6823-6831.
- VIGLIOLA, M. I.; CALOT L. I. 1982. Hortalizas enfermedades en poscosecha Hemisferio Sur. 80p.
- VILLEVIEILLE, M. 1996. Mise au point d'un test de sélection pour *Fusarium oxysporum* Schlect. Emend. Snyder & Hansen f. sp. *cepae*. *Acta Botanica Gallica*. 143: 109-115.
- 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 DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414.
- WALKER, J. C.; TIMS E. C. 1924. A *Fusarium* bulb rot of onion and the relation of environment to its development. *Journal of Agricultural Research* 28:683-693.
- WAALWIJK, C.; KASTELEIN, P.; DE VRIES, I.; KERÉNYI, Z.; VAN DER LEE, T.; HESSELINK, T.; KÖHL, J.; KEMA, G. 2003. Major changes in *Fusarium spp.* in wheat in The Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 743-754.
- WANG, B.; BRUBAKER, C. L., TATE, W.; WOODS, M. J.; MATHENSON, B. A.; BURDON, J. J. 2006. Genetic variation and population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australia. *Plant Pathology*. 55: 746-755.
- WOO, S. L.; ZOINA, A.; DEL SORBO, G.; LORITO, M.; NANNI, B.; SCALA, F., NOVIELLO, C. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology*. 86: 966-973.

Apéndice 1

Caracterización morfológica de 81 aislamientos de *Fusarium* spp. aislados de cebolla y ajo en las localidades productoras de las provincias de Mendoza, San Juan, Buenos Aires y Río Negro. Las características de los conidióforos y disposición de los microconidios se observaron por la técnica de micro-cultivo en APD. Los datos de la presencia o ausencia y las medidas del largo y ancho en micrones y desvío estándar (D.E.) de los microconidios, macroconidios; y presencia o ausencia clamidosporas se registraron en el medio de cultivo AHC a 25° C. Además se observó la pigmentación de la colonia en APD a 25° C y se empleó un taco de color de pinturas (Sherwin Williams) para su valoración.

Aislamiento	Especie ¹	Conidióforo	Microconidios						Macroconidios				Clamidosporas	Pigmentación de la colonia en APD	
			Disposición	Forma	Largo	D.E.	Ancho	D.E.	Nº septas	Largo	D.E.	Ancho			D.E.
LJC10001	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	8,57	3,07	4,15	0,58	1	18,76	0	4,23	0	Presentes	SW 1627 Violeta
									2	14,49	1,73	4,78	0,57		
									3	18,26	0	5,31	0		
									4	21,79	3,05	4,54	0,62		
									5	20,75	0	5,64	0		
									6	23,57	0	5,4	0		
LJC10003	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme u oval	10,07	1,05	4,56	0,7	3	39,37	9,42	5,77	0,38	Presentes	SW 1557 Blanquecino con durazno
									4	42,65	5,46	5,61	0,63		
									5	44,86	7,83	6,46	0,37		
LJC10005	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme u oval	13,81	3,53	4,08	0,38	1	15,89	0	5,83	0	Presentes	SW 1552 Bordo
									3	33,98	2,61	6,04	1,02		
									4	44,76	0	5,93	0		
LJC10006	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	10,78	3,07	4,22	0,43	1	15,21	4,07	4,63	0,87	Presentes	SW 1631 Crema
									3	35,69	7,15	4,88	0,83		
									4	50,99	4,59	6,13	1,01		
									5	52,77	2,87	5,95	0,68		
									7	54,65	0	4,88	0		
LJC10007	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	10,06	1,71	5,04	1,76	1	14,3	4,08	4,57	0,77	Presentes	SW 1558 Blanquecino con violeta
									3	42,14	7,63	5,67	0,74		
									4	44,79	4,41	5,22	0,24		
									5	49,67	3,49	4,86	1,14		
LJC10009	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,03	1,51	4,93	1,04	1	15,82	4,55	4,93	0,96	Presentes	SW 1625 Crema
									2	24,24	0	4,86	0		
									3	47,68	7,04	5,27	0,69		
									4	53,35	6,61	5,42	0,42		
									5	56,13	5,44	6,18	0,74		

LJC10011	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,61	1,68	4,07	0,88	1	16,79	3,81	4,59	0,32	Presentes	SW 1562 Durazno
									2	20,56	0	4,26	0		
									3	36,89	10,82	4,64	0,68		
									5	48,2	0	5,37	0		
LJC10012	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,46	1,96	5,17	1,44	1	18,02	6,2	5,02	0,6	Presentes	SW 1632 Blanquecino con durazno
									3	46,3	8,34	5,49	0,92		
									4	53,32	3,63	5,96	0,85		
									5	63,35	4,29	5,41	0,64		
LJC10015	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	13,19	2,89	5,12	0,5	1	23,03	4,32	5,34	0,64	Presentes	SW 1624 Bordo
									2	24,42	0	5,67	0		
									3	38,14	5,1	5,65	0,76		
									5	68,73	0	6,96	0		
LJC10017	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	10,43	0,65	4,9	0,77	1	15,73	1,61	4,87	0,48	Presentes	SW 1559 Violeta
									3	44,82	5,84	7,68	9,59		
									4	56,03	5,87	5,3	0,76		
									5	58,36	8,13	5,6	0,57		
LJC10019	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme u oval	11,36	1,49	5	0,65	1	18,1	3,8	5,49	0,89	Presentes	SW 1624 Durazno
									3	45,33	6,37	6,3	0,77		
									4	51,54	0	5,94	0		
									5	57,64	4,68	6,32	1,09		
LJC10021	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	9,53	0,75	3,78	0,5	1	18,95	2,56	4,21	0,53	Presentes	SW 1567 Bordo
									3	41,5	4,59	5,18	0,71		
									4	45,12	0	5,49	0		
									5	50,85	0	5,67	0		
LJC10023	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	12,31	1,93	4,4	0,56	3	43,13	5,81	5,11	0,73	Ausentes	SW 1619 Blanquecino con violeta
									5	54,46	4,76	5,41	0,12		
LJC10026	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme u oval	14,23	1,18	5,07	0,43	1	17,47	3,29	4,65	0,5	Presentes	SW 1560 Bordo
									2	17,9	0	4,61	0		
									3	47,62	5,79	5,87	0,66		
									4	66,73	0	6,22	0		
LJC10027	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,47	1,63	5	0,61	1	17,86	2,5	5,2	0,66	Presentes	SW 1554 Violeta
									2	22,18	1,96	5,81	0,04		
									3	39,36	5,21	5,97	0,53		

									4	36,04	0	5,84	0				
									5	52,39	1,63	6,78	0,66				
LJC10029	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,13	1,6	4,84	0,63	1	18,05	3,62	5,38	0,64	Presentes	SW 1554 Violeta		
									3	41,45	4,65	5,98	0,64				
									4	45,72	1,31	6,99	0,36				
									5	46,88	5,47	6,27	0,57				
									7	58,94	0	6,69	0				
LJC10033	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	10,7	1,78	6,01	0,41	1	18,76	2,15	5,3	0,6	Presentes	SW 1560 Bordo		
									2	23,12	1,6	5,61	0,24				
									3	39,49	5,21	5,46	0,53				
									4	41,25	1,45	5,84	0,23				
									5	53,1	1,13	6,7	0,86				
LJC10035	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,04	1,13	4,34	0,55	1	17,04	2,35	4,83	0,61	Presentes	SW 1558 Blanquecino con violeta		
									3	41,84	2,88	5,44	0,7				
									4	45,23	5,17	5,33	0,48				
									5	47,37	2,3	5,43	0,46				
									6	57,8	0	5,84	0				
									7	49,82	0	5,48	0				
LJC10039	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,1	1,22	4,65	0,34	1	15,84	2,04	4,97	0,64	Presentes	SW 1632 Bordo		
									3	43,63	7,45	5,43	0,58				
									5	54,32	3,84	6,12	0,74				
									7	60,5	4,42	5,8	0,28				
LJC10041	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,8	1,76	4,81	0,56	1	18,83	0,44	5,27	0,24	Presentes	SW 1558 Durazno		
									3	38,33	0	6,54	0				
LJC10043	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	13,52	1,58	4,39	0,48	1	21,76	6,78	5,06	0,75	Presentes	SW 1560 Violeta		
									3	51,43	4,74	6,69	0,55				
									4	59,67	2,31	6,16	0,31				
									5	63,76	5,42	6,58	0,65				
LJC10045	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	9,72	1,54	4,43	0,58	1	12,74	1,61	6,34	0,37	Presentes	SW 1632 Crema		
									2	11,5	0	5,48	0				
									3	33,54	10,39	4,98	0,57				
LJC10046	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	13,25	2,85	4,9	0,84	1	19,95	7,33	4,74	0,5	Ausentes	SW 1550 Crema		
									3	51,79	5,81	6,57	0,61				
									4	56,92	4,18	6,72	0,59				
									5	59,49	3,64	6,78	0,61				
LJC10047	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	10,8	1,01	5,21	0,26	1	14,6	2,56	4,92	0,4	Presentes	SW 1618 Durazno		
									3	37,59	5,32	7,31	6,56				
									4	32,49	2,64	6	0,83				
									5	37,52	0	6,58	0				

									7	63,66	14,25	6,37	0,8				
LJC10048	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,16	1,34	4,32	0,48	1	19,98	3,08	4,85	0,46	Presentes	SW 1641 Crema		
									3	41,15	5,81	5,21	0,48				
									5	53,18	0,79	6,18	0,05				
LJC10049	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,93	1,88	4,05	0,66	1	19,59	4,62	4,9	0,46	Presentes	SW 1618 Blanquecino con durazno		
									3	47,73	5,51	5,03	0,44				
									5	60,26	2,92	6,04	0,31				
LJC10051	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	oval de base truncada	10,46	3,17	4,61	0,27	1	20,62	4,5	5,14	0,55	Presentes	SW 1625 Durazno		
									3	42,81	8,82	5,58	0,6				
LJC10053	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme u oval	10,68	2,45	3,92	0,61	2	13,43	1,53	4,6	0,28	Presentes	SW 1618 Crema		
									3	21,23	4,92	4,73	0,57				
									4	24,28	4,84	5,01	0,7				
									5	32,33	0,41	5,23	0,47				
LJC10060	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	13,33	2,7	4,87	0,22	1	17,07	5,46	5,11	1,13	Presentes	SW 1559 Blanquecino con violeta		
									3	49	6,94	6,66	0,52				
									4	55,05	8,83	6,34	0,37				
									5	62,1	2,03	6,51	0,42				
LJC10061	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme u oval	13,92	3,53	4,71	0,61	1	17,61	5,67	6,11	2,15	Presentes	SW 1550 Violeta		
									2	14,07	1,47	4,19	0,76				
									3	19,44	4,53	5,67	1,96				
LJC10062	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,05	2,16	4,89	0,94	1	17,84	2,58	5,61	1,01	Presentes	SW 1551 Durazno		
									3	41,2	7,95	5,83	0,93				
									4	57	5,56	6,18	1				
LJC10063	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,62	0,89	4,11	0,47	1	18,52	1,07	4,3	0,46	Presentes	SW 1546 Bordo		
									2	39,8	0	5,13	0				
									3	51,74	8,3	5,88	0,62				
									7	82,93	0	6,23	0				
LCJ10064	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	13,01	2,8	4,76	0,75	1	19,28	3,59	5,44	0,69	Presentes	SW 1559 Durazno		
									3	49,3	5,43	6,82	0,56				
									4	58,68	3,66	6,62	0,78				
LJC10070	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,01	1,97	4,28	0,68	1	19,14	4,07	4,53	0,72	Presentes	SW 1554 Durazno		
									3	50,48	7,36	5,88	0,69				
									4	55,86	6,75	5,55	0,93				
									5	58,3	2,36	5,72	0,42				
LJC10072	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,58	1,04	3,46	0,52	1	18,27	0,76	4,71	0,82	Presentes	SW 1559 Blanquecino con		
									3	49,35	6,75	6,17	0,77				
									4	53,05	3,67	6,18	0,37				

									5	53,95	4,02	6,42	1,16		violeta
LJC10074	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,58	1,51	4,32	0,56	1	19,75	3,27	4,65	0,57	Presentes	SW 1557 Durazno
									3	44,9	6,52	5,5	0,7		
									4	64,84	4,84	5,16	0,04		
									5	57,65	1,59	4,1	0,23		
								7	68,11	0	4,02	0			
LJC10076	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,92	3,41	4,75	0,73	1	16,48	4,13	5,68	0,45	Presentes	SW 1627 Crema
									3	49,68	4,48	6,6	0,52		
									4	56,74	6,43	7,12	0,9		
									5	63,12	6,07	6,61	1,02		
								7	58,38	0	6,54	0			
LJC10079	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,48	3,19	4,04	0,83	1	19,23	3,71	5,17	0,87	Presentes	SW 1626 Durazno
									3	52,78	4,92	6,22	0,54		
									4	58,01	3,92	6,04	0,7		
									5	64,12	3,44	6,14	0,55		
LJC10081	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,01	1,01	4,23	0,54	1	20,12	4,44	5,07	0,83	Presentes	SW 1553 Violeta
									3	48	4,11	6,43	0,54		
									4	57,1	0,97	6,78	0,45		
									5	59,25	4,92	6,61	0,24		
LJC10085	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,09	1	4,47	0,29	1	19,46	1,37	5,22	0,38	Presentes	SW 1627 Durazno
									3	48,6	6,76	6,34	0,64		
									4	57,75	0	6,6	0		
									5	61,36	0,25	6,49	0,13		
LJC10088	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	14,61	2	4,9	0,28	1	19,83	3,75	5,41	0,68	Presentes	SW 1559 Violeta
									3	49,84	6	6,08	0,7		
									5	55,62	4,69	5,85	0,39		
LJC10167	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,5	3,05	3,93	0,59	1	21,84	1,99	5,12	0,22	Presentes	SW 1559 Durazno
									3	50,47	7,31	6,08	0,65		
									5	63,79	4,39	6,63	0,69		
LJC10168	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,55	2,68	3,89	0,54	1	16,41	3,05	4,49	0,81	Presentes	SW 1559 Blanquecino con durazno
									3	42,97	6,59	5,62	0,45		
									4	56,17	3,9	5,86	0,24		
									5	54,35	3,78	5,54	1,02		
LJC10170	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,81	1,84	5,08	0,79	1	18,17	0,62	5,57	0,41	Presentes	SW 1626 Durazno
									3	55,75	5,17	6,88	0,64		
									5	74,7	10,93	7,13	0,92		
LJC10171	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme u oval	11,47	0,47	4,18	0,45	1	18,62	3,67	4,69	0,32	Presentes	SW 1627 Durazno
									3	46,53	5,3	6,7	0,55		
									5	56,71	2,88	6,91	0,15		

LJC10172	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,59	1,4	4,23	0,38	1	18,89	5,11	5,3	0,48	Presentes	SW 1613 Durazno
									3	57,48	5,99	6,1	0,78		
									4	67,99	0,08	7,5	0,52		
									5	69,05	3,94	6,32	0,63		
LJC10173	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	13,96	1,92	5,47	1,11	1	29,23	0	4,74	0	Presentes	SW 1572 Blanquecino con durazno
									3	45,84	6,1	6,14	0,66		
									5	90,51	0	6,01	0		
LJC10178	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,85	1,75	4,42	0,57	1	18,75	3,57	4,85	0,67	Presentes	SW 1572 Blanquecino con violeta
									3	42,89	6,92	5,5	0,57		
									4	63,86	4,48	5,22	0,14		
									5	56,7	1,9	4,95	0,23		
LJC10186	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,66	3,31	4,8	0,97	1	19,37	3,16	5,12	0,52	Presentes	SW 1560 Bordo
LJC10187	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	13,95	1,15	5,23	1,25	1	18,91	3,89	5,71	0,77	Presentes	SW 1620 Durazno
									3	43,92	2,88	6,6	0,35		
LJC10188	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	12,28	2,14	4,23	0,68	1	19,56	4,05	4,93	0,64	Ausentes	SW 1564 Blanquecino con durazno
									3	49,48	7,16	5,98	0,69		
									4	55,63	5,18	5,5	0,83		
									5	57,93	1,96	5,7	0,4		
LJC10189	Fo	monofiálide corta	falsas cabezas	reniforme	11,5	0,64	5,08	0,54	3	49,23	7,05	5,87	0,68	Presentes	SW 1620 Crema
									5	64,87	5,58	6,6	0,25		
LJC10013	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	12,05	2,09	4,74	0,65	2	25,61	5,78	5,75	0,72	Ausentes	SW 1551 Blanquecino con violeta
									3	44,16	8,39	5,32	0,46		
									4	59,03	1,43	5,37	0,58		
									5	62,88	7,41	5,93	0,64		
LJC10014	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	10,01	1,39	3,32	0,6	3	42,54	1,42	5,36	0,54	Ausentes	SW 1564 Blanquecino con durazno
									4	58,48	2,03	5,27	0,49		
									5	63,02	8,37	5,87	0,86		
LJC10031	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	12,35	1,36	4,92	0,48	2	25,75	4,91	5,3	0,2	Ausentes	SW 1620 Crema
									3	41,19	6,43	5,69	0,44		
									4	46,73	0	5,78	0		
									5	57,33	1,87	5,7	0,33		
LJC10054	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	12,6	1,96	4,76	1,19	3	42,26	0	4,05	0	Ausentes	SW 1618 Blanquecino con durazno
									5	57,55	0	5,64	0		

LJC10056	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	12,29	1,48	4,39	0,71	3	23,55	3,14	4,48	0,56	Ausentes	SW 1620 Blanquecino con violeta
									5	56,24	2,05	5,12	0,23		
LJC10058	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	13,8	3,95	5,05	0,75	3	28,24	3,23	4,8	0,54	Ausentes	SW 1620 Blanquecino con durazno
									5	57,89	4,16	5,48	0,38		
LJC10078	Fp	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	10,09	2,17	4,52	0,72	3	48,48	4,26	5,5	0,72	Ausentes	SW 1619 Blanquecino con durazno
									4	49,48	0	5,18	0		
									5	52,66	5,4	6,14	0,22		
LJC10175	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	9,86	1,3	4,63	0,88	5	58,32	3,12	4,69	0,61	Ausentes	SW 1558 Blanquecino con durazno
LJC10176	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	12,24	2,07	4,4	0,67	3	56,78	2,45	5,01	0,82	Ausentes	SW 1618 Blanquecino con durazno
LJC10180	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	12,6	1,01	4,28	0,68	3	43,97	4,66	6,08	0,78	Ausentes	SW 1620 Blanquecino con violeta
LJC10181	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	13,35	1,22	5,24	0,64	3	45,57	2,24	4,87	0,43	Ausentes	SW 1620 Blanquecino con durazno
LJC10183	Fp	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	11,54	1,48	4,87	0,72	3	47,37	1,25	4,87	0,51	Ausentes	SW 1559 Blanquecino con violeta
LJC10185	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	10,97	1,56	4,88	0,55	3	42,48	2,15	4,33	0,41	Ausentes	SW 1620 Blanquecino con violeta
LJC10190	Fp	monofiálide y polifiálides	largas cadenas	oval de base truncada	13,33	2,37	5,5	0,82	5	58,34	2,58	4,98	0,45	Ausentes	SW 1557 Blanquecino con durazno

LJC10083	Fp	monofiálide		oval de base truncada	11,6	1,16	4,82	0,65	3	45,91	5,67	6,18	0,89	Ausentes	SW 1619 Blanquecino con violeta
LJC10002	Fv	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	9,1	0,55	4,07	0,58	3	54,18	6,52	5,58	0,43	Ausentes	SW 1619 Blanquecino con durazno
LJC10068	Fv	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	12,54	2,66	4,44	0,59	3	51,98	7,34	5,75	0,5	Ausentes células abultadas	SW 1625 Crema
									4	61,18	2,14	6,48	0,88		
LJC10069	Fv	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	12,46	2,48	4,29	0,55	3	53,68	5,24	5,05	0,52	Ausentes células abultadas	SW 1627 Blanquecino con violeta
LJC10077	Fv	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	10,08	2,46	4,65	0,55	3	44,57	12,48	5,45	0,82	Ausentes	SW 1619 Blanquecino con durazno
									4	53,94	4,54	5,11	0,37		
									5	52,29	2,24	5,5	0,3		
LJC10166	Fv	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	12,24	1,44	4,72	1,03	5	51,92	1,45	5,75	0,62	Ausentes células abultadas	SW 1620 Blanquecino con violeta
LJC10174	Fv	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	13,16	1,16	5,06	0,9	1	23,27	8,17	4,61	0,51	Ausentes	SW 1620 Blanquecino con violeta
									5	87,64	1,12	5,11	0,52		
LJC10182	Fv	monofiálide	largas cadenas	oval de base truncada	12,07	1,37	5,77	0,63	5	77,64	2,12	5,14	0,58	Ausentes	SW 1619 Blanquecino con durazno
LJC10010	Fs	monofiálide larga	falsas cabezas	reniforme	10,02	0,95	4,52	0,56	1	24,11	3,54	5,21	0,97	Presentes	SW 1631 Crema
									4	56,08	2,13	6,54	0,42		
									5	60,24	1,23	6,68	0,33		
LJC10037	Fs	monofiálide larga	falsas cabezas	reniforme	11,09	0	5,32	0	1	23,01	3,63	5,86	1,07	Presentes	SW 1571 Crema
									2	31,16	4,89	6,16	1,43		
									3	39,57	0	7,22	0		
LJC10050	Fs	monofiálide larga	falsas cabezas	oval	16,93	2,2	5,73	0,52	1	28,78	4,85	6,86	1,02	Presentes	SW 1648 Crema
									3	55,65	6,37	8,19	0,65		
									4	62,55	2,53	8,45	0,39		

									5	66,33	3	8,89	0,41				
LJC10067	Fs	monofiálide larga	falsas cabezas	oval	11,99	1,76	4,09	0,65	1	21,27	5,15	4,72	0,57	Presentes	SW 1566 Blanquecino con violeta		
									2	26,82	0	4,69	0				
									3	48,25	6,76	5,82	0,61				
LJC10086	Fs	monofiálide larga	falsas cabezas	oval	13,83	1,55	5,2	0,76	1	23,12	5,91	6,62	0,91	Presentes	SW 1634 Crema		
									2	33,6	1,39	7,42	1,4				
									3	45,08	6,88	7,57	0,72				
									4	56,98	5,42	8,44	0,51				
									5	69,09	5	8,6	0,94				
LJC10087	Fc	monofiálide corta y compacta	-	Ausentes					3	30,85	2,11	5,35	0,86	Presentes	SW 1612 Rosa		
									4	39,15	2,42	6,12	0,87				
									5	44,38	5,5	6,39	0,94				
									6	47,37	0	6	0				
									7	47,61	0	5,85	0				
LJC10030	F.	monofiálide	falsas cabezas	oval	13,34	1,42	4,57	0,47	1	18,59	2,87	5,11	0,52	Ausentes	SW 1559 Violeta		
									3	50,19	6,96	5,56	0,63				
									5	67,22	9,52	5,87	0,75				
									6	71,01	0	6,07	0				
									7	65,5	9,55	6,04	0,13				

¹Indica la especie Fo: *F. oxysporum*, Fp: *F. proliferatum*, Fv: *F. verticillioides*, Fs: *F. solani*, Fc: *F. compactum*, F: *Fusarium* sp.