

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Dirección de Proyectos

ESCUELA DE BIOLOGÍA
Informe Final

“Identificación y estudio molecular de *Fusarium sp* agente causal de la Marchitez necrótica presentes en los Sistemas Agroforestales en asocio con el cultivo de Vainilla (*Vainilla sp*)”

INVESTIGADORES:

M.Sc. Vladimir Villalba Velásquez

M.Sc. Ileana Moreira González (Coordinador)

Estudiante Gustavo Díaz Cruz (Ing. en Biotecnología)

25-01-2012

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
IMPORTANCIA COMERCIAL DE LA VAINILLA	6
EL HONGO FITOPATÓGENO <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	7
SINTOMATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	7
EPIDEMIOLOGÍA	8
ESTRATEGIAS DE CONTROL	8
BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA	9
ESTUDIOS MOLECULARES EN <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	9
OBJETIVO GENERAL	11
METODOLOGÍA	12
COLECTA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>FUSARIUM SP.</i>	12
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	13
AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR.....	14
RESULTADOS	16
RE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>FUSARIUM SP.</i>	18
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	21
AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR.....	22
DISCUSIÓN	26
COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE <i>FUSARIUM SP.</i>	26
AISLAMIENTO DE <i>FUSARIUM SP.</i>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	27
AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR.....	28
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES	31
AGRADECIMIENTOS	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS	33

“Identificación y estudio molecular de las especies del hongo *Fusarium sp* presentes en los Sistemas Agroforestales en asocio con el cultivo de Vainilla (*Vainilla sp*)”

Participantes:

Investigadores	Escuela-Centro de Investigación	Jornada asignada al proyecto (h/semana)
MSc. Ileana María Moreira Gonzalez	Biología-CIB	2
MSc. Vladimir Villalba Velásquez	Biología-CIB	12
Estudiante Gustavo Díaz Cruz	Ingeniería en Biotecnología	10

Resumen

La vainilla (*Vanilla* sp) es una orquídea cultivada a nivel mundial, y a partir de la cual se obtiene la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído). Dicho extracto es de amplio uso en industrias como la alimenticia, cosmética y farmacéutica, generando altos ingresos para los países exportadores.

Costa Rica está retomando este cultivo mediante sistemas agroforestales; sin embargo, es susceptible al ataque del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, que genera la pudrición de tallos, y aún no existen estrategias de control completamente eficaces. El presente trabajo muestra el aislamiento e identificación de cepas de *Fusarium* sp asociadas al cultivo de vainilla, y la estandarización de un protocolo de extracción y cuantificación de su ADN, para la identificación mediante PCR.

Se emplearon muestras de hoja, tallo y suelo, a partir de los cuales se aislaron e identificaron cepas de *Fusarium* sp. Estas fueron procesadas mediante un kit comercial de extracción de ADN, se cuantificaron mediante espectrofotometría, y se usaron para la amplificación del gen EF-1 α . Se obtuvieron 6 cepas distintas de *Fusarium* sp, cuyas extracciones mostraron concentraciones bajas de ADN y de pureza regular. A pesar de ello, el gen fue amplificado mediante PCR, pero no se observaron diferencias en la electroforesis en gel de agarosa

Palabras clave: *Vanilla* sp, *Fusarium oxysporum*, ADN, kit de extracción, EF-1 α , PCR.

Abstract

The Vanilla (*Vanilla* sp) is an orchid cultivated worldwide, and from which the vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) is obtained. Such extract has several uses in different industries, like food, cosmetic and pharmaceutical, giving high incomes to the exporter countries.

Costa Rica is returning to this crop by using agroforestry systems; however, it is susceptible to the infection of fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, which generates stem rot, and there are no effective control strategies yet. This work shows the isolation and identification of some strains of *Fusarium* sp associated to vanilla crop, and the standardization of a for extraction and quantification protocol of their DNA, for identification by PCR.

Leaf, stem and soil samples were used, from which *Fusarium* sp strains were isolated and identified. These were processed by using a commercial DNA extraction kit, they were quantified by spectrophotometry, and were used to amplify the EF-1 α gene. Six different strains of *Fusarium* sp were obtained, and their extractions show low DNA concentrations and regular purity. Nevertheless, the gene was amplified by PCR, but there were no differences in regards to the agarose gel electrophoresis.

Key words: *Vanilla* sp, *Fusarium oxysporum*, ADN, extraction kit, EF-1 α , PCR.

Introducción

El cultivo de vainilla se ha extendido desde su lugar de origen en territorio Maya hasta el resto del mundo con gran aceptación en diferentes industrias. Su género pertenece a la familia Orchidaceae, y posee más de 100 especies de las cuales sólo 15 son aromáticas, entre las que se encuentra *Vanilla plantifolia* Andrews, la cual es la especie más explotada con fines comerciales alrededor del mundo. *V. pompona* y *V. tahitensis* también son explotadas en pequeña escala (Korthou & Verpoorte, 2008).

Este es un cultivo con un costo económico debido al proceso y la relativamente lenta producción del mismo, sin embargo mantiene una alta demanda a nivel mundial, especialmente de los Estados Unidos (Camacho, 2008) y Europa. Este cultivo se ha visto sensiblemente afectado por distintas enfermedades producidas por agentes etiológicos como *Calospora vanillae* (antracnosis, en toda la planta), *Fusarium oxysporum*, *F. batati* Schlech F. sp. *vanillae*, *Phytophthora meadii*., *Colletotrichum* sp. y *Gloeralla vanilliae* (pudrición de raíz), pudrición por *Sclerotium*, todo lo cual se ve afectado por la falta de diversidad genética en el acervo de la especie debido a la reducción de su hábitat natural (Korthou & Verpoorte, 2008; Divakaran & Nirmal 2009).

En trabajos anteriores llevados a cabo por los autores se determinó la existencia de un complejo patológico que podría constituirse por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Erwinia carotovora*, y ser este el causante del secamiento de la raíz. Bajo esta premisa se determinó en primera instancia, la colecta y el aislamiento de dichos patógenos en caso de que estuvieran presentes, así como a determinar otros organismos que hayan sido reportados como potenciales patógenos del cultivo, en la que de manera generalizada se ha atribuido al hongo *Fusarium oxysporum*.

Importancia comercial de la Vainilla

A partir de la vainilla, se extrae la vanillina o vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), la cual es empleada en distintas formas a nivel mundial; por ejemplo, en la industria alimenticia se utiliza como saborizante y aromatizante; en la farmacéutica, como intermediario en la producción de algunos medicamentos, y también en la perfumería por su aroma (Buccellato, 2011).

Durante muchos años, la producción mundial estuvo encabezada por Madagascar, con un 40% del total, por lo que la dinámica de su cultivo y procesamiento, fijaba el precio por kilogramo global, entre los 20 y 500 dólares. Actualmente, Indonesia produce el 44% de la vainilla a nivel mundial, dejando a

Madagascar con el 28.8%. Estados Unidos adquiere poco más de la mitad de la producción, siendo históricamente, el principal comprador. Los países europeos como Inglaterra, Alemania y Francia, también compran otra parte importante (FAOSTAT, 2011).

Costa Rica por su parte, mantiene una limitada producción que ha ido aumentando con los años. Inicialmente, la vainilla se cultivó en zonas como San Carlos, Guácimo, Sarapiquí, La Cruz, Quepos entre otros (Varela, 2011). En 2010, se logró exportar, entre vainilla y vainillina, un total de 65500 dólares a distintas partes del mundo. A marzo de 2011, la exportación alcanzó los 17100 dólares (PROCOMER, 2011), por lo que el potencial de este cultivo es importante, sin embargo, se ha visto limitado por una asistencia técnica escasa y un severo ataque del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, el cual ha impactado profundamente la producción durante las últimas dos décadas (Ramírez *et al*, 1999).

El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum a nivel microscópico produce macroconidios curvados, fusiformes y pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie, lo cual es una de las características que los distingue. La principal enfermedad la causa el hongo *Fusarium* sp, especialmente por la cepa *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, reportada en China (He, 2007), Costa Rica (Villalobos *et al*, 2009), Indonesia (Pinaría *et al*, 2010), India (Radjacommare *et al*, 2010) y México (Olivares, 2010). Esta enfermedad representa un gran obstáculo en la producción, pues una vez detectada en un suelo, puede permanecer por largos períodos de tiempo, lo que ha requerido la búsqueda de híbridos resistentes, no obstante, hay alta homogeneidad en las variedades existentes, por lo que se requieren nuevas técnicas de identificación y caracterización (Ploetz, 2007).

El ataque de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* se caracteriza por afectar distintas partes de la planta, principalmente afectando tallos, pero también raíz y brotes, con pudrición en todos los casos, indistintamente de la edad de los órganos, con lo que se ve limitado el crecimiento integral de la planta, y la hace susceptible a otros fitopatógenos.

Sintomatología de la enfermedad

En tallos, se inicia con la aparición de lesiones café oscuro, junto con zonas cloróticas en la zona de entrenudos, hasta que hay necrosis, reducción y muerte del tejido. Esto sucede rápidamente, hasta alcanzar los nudos, los cuales no se ven afectados directamente (He, 2007). En el caso de raíces, el ataque se presenta de forma inicial en las adventicias, de forma descendente. Si la infección alcanza el

suelo, las raíces subterráneas sufren de la misma sintomatología. Para ambos casos, en condiciones de alta humedad, la pudrición es suave; la proliferación de micelio y conidios se presenta sobre el tejido dañado, agudizando el inóculo en la plantación (Bhai y Dhanesh, 2008).

Epidemiología

De forma general, la enfermedad se presenta desde la punta de la raíz hacia partes más gruesas y maduras, excepto en partes diferenciadas y vigorosas, salvo que la presencia del agente causal sea muy importante, y esté de forma latente en el tejido (He, 2007). La entrada a los tejidos se facilita mediante heridas que pueden darse por acción de nemátodos o insectos, aunque también puede que sea penetración directa (Tombe y Liew, 2011). Una vez que se ha determinado la presencia de *F. oxysporum* en una plantación, el cultivo de vainilla se dificulta mucho pues este hongo genera estructuras de resistencia o clamidiósporas, que pueden mantenerse viables hasta por 30 años (Ploetz, 2007).

Estrategias de control

Actualmente, no se reportan fungicidas químicos completamente efectivos contra *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*, sin embargo, se aplican principalmente Carbendazima y Mancozeb. Debido a esto, la investigación en el área de prevención y combate de esta enfermedad se ha enfocado al control biológico, con resultados promisorios, especialmente en sistemas de producción orgánicos.

Otro punto muy importante, es el desarrollo de variedades resistentes al ataque de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*. La escasa variabilidad genética y la aparente incompatibilidad en el comportamiento de características como tiempos de floración, polinización entre otras, no permiten que las técnicas de mejoramiento produzcan líneas con resistencia, aunque se ha encontrado un importante híbrido en Costa Rica, que presenta una resistencia considerable, y buenas características organolépticas, el cual es resultado de un cruce *V. planifolia* x *V. pompona* (Belanger y Havkin-Frenkel, 2011).

Para obtener resultados significativos, se han diseñado estrategias de control basados en las etapas de desarrollo del cultivo, desde la propagación del material a emplear, así como en el grado de infección que el suelo tenga, con énfasis en el biocontrol, abonos orgánicos y rotación de cultivos entre otros (Tombe y Liew, 2011).

Biología Molecular Aplicada

En los organismos fitopatógenos, las técnicas moleculares han permitido ahondar en las interacciones y la variabilidad genética de las distintas especies, con lo cual se facilita de gran forma el diagnóstico, así como la epidemiología, pues el análisis de proteínas y genes involucrados directamente con las infecciones, han sido los principales puntos de investigación, como paso para la implementación de programas de mejoramiento genético para obtener variedades resistentes al patógeno en cuestión (Narayanasamy, 2008).

Estudios moleculares en *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum es uno de los hongos de mayor importancia a nivel mundial debido a su presencia en todo el planeta, así como también por su amplio rango de cultivos hospedantes, e incluso, animales, sobre los cuales genera importantes afectaciones que son difícilmente tratables, como es el caso de *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*. Al tener tanta relevancia, los estudios moleculares son bastantes, mas no los necesarios para comprender en plenitud como actuar ante cada situación particular. Inicialmente, los estudios se enfocaron en los perfiles enzimáticos de las cepas bajo estudio, con lo cual, se establecieron relaciones filogenéticas. Por ejemplo, un estudio sobre las esterases permitió la separación de distintos aislamientos; sin embargo, no permitió discriminar por virulencia, origen geográfico o distancia fenotípica (El-Kazzaz *et al*, 2008), lo cual se ha repetido, en otros estudios, haciendo a esta técnica inadecuada para la identificación de especies de *Fusarium* (Bogale, 2006).

Al avanzar la manipulación del ADN, se involucraron genes en la taxonomía de *Fusarium*, de forma tal que actualmente los más usados son β -tubulina (*tub-2*), factor de elongación 1- α de la traducción (TEF-1 α), histona H3 y algunas partes de la región codificante del ARN ribosomal (Jiménez-Gasco *et al*, 2002). Incluso, se ha establecido una base de datos exclusiva para el género *Fusarium*: "Fusarium ID", que cuenta con gran cantidad de secuencias y herramientas virtuales para la investigación (Geiser *et al*, 2004).

A pesar de ello, para establecer diferencias a nivel de especies, así como variabilidad genética, se emplean técnicas basadas en PCR, anteriormente mencionadas, y comparación de genes por métodos bioinformáticos. Los análisis mediante RAPD han sido muy utilizados, pues su valor para diferenciar especies por la presencia/ausencia de bandas en un perfil, han sido probados como un buen punto de referencia a la hora de realizar detección y análisis dentro del género *Fusarium*, así como para establecer variabilidad genética (El-Fadly *et al*, 2008; Da Silva *et al*, 2010).

De forma similar, el uso de RFLP ha demostrado gran aplicabilidad y confiabilidad. Esta se emplea sobre regiones específicas, como el Factor de Elongación-1 α (EF-1 α) (Nitschke *et al*, 2009), los Espaciadores Transcritos Internos (ITS) (Mirhendi *et al*, 2010), y los Espaciadores Intergénicos (IGS) (Mbofung *et al*, 2006). En el caso del empleo de AFLP, resulta altamente discriminante para la identificación de formas especiales del hongo, aún más que mediante el uso de RAPD, o el gen EF-1 α (Park *et al*, 2006).

Por otra parte, la comparación de secuencias nucleotídicas es la otra forma de análisis de relaciones filogenéticas y variabilidad dentro de las especies de *Fusarium*. El principal gen que se emplea es el EF-1 α , incluso mediante chip de ADN (Kristensen *et al*, 2007), pero también se han utilizado los genes fosfato permeasa (PHO), β -tubulina (*tub-2*), la región codificante de Nitrato-reductasa (NIR); no obstante, por separado, no son de tanto valor, por lo que al realizar comparaciones, se usa más de un gen para establecer las diferencias (Kim *et al*, 2005).

Para el caso de aislamientos de *Fusarium* sp. a partir del cultivo de vainilla, la información de estudios moleculares es escasa. Pinaría *et al* (2010) han demostrado la utilidad de la comparación de secuencias, mediante el uso del gen EF-1 α . A partir de distintos aislamientos de plantaciones de vainilla con la sintomatología correspondiente a *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*, se realizó la amplificación del dicho gen, y se comparó con las bases de datos existentes. Se obtuvo una importante presencia de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. semitectum*, por lo que se condujo un análisis de patogenicidad para cada uno, demostrando que solo *F. oxysporum* causó los síntomas, por lo que se clasificó hasta el nivel de forma especial.

Objetivo General: Identificar y estudiar a nivel molecular al hongo *Fusarium sp* presente en los Sistemas Agroforestales en asocio con el cultivo de la Vainilla (*Vainilla sp*)

Objetivos Específicos:

1. Colectar, aislar e identificar plantas de vainillas enfermas por el hongo *Fusarium* en los Sistemas Agroforestales en asocio.
2. Estudiar y caracterizar por marcadores genéticos de las principales especies del hongo *Fusarium sp* por técnicas de PCR.
3. Determinar por métodos moleculares si son varias especies o solo una del hongo *Fusarium sp* presentes en plantaciones de Vainilla que causan marchitez y muerte de plantas.

Metodología

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biocontroladores y Biología Molecular, del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede Cartago.

Colecta, Aislamiento e identificación de *Fusarium* sp.

Las colectas de las plantas enfermas o con síntomas de la enfermedad se realizaron principalmente en la zona de Sarapiquí, específicamente en la finca agroforestal y con manejo orgánico propiedad del señor David Gardella ubicada a 1.5 km al noroeste de la ciudad de Puerto Viejo. Con la ayuda del equipo de colecta se realizaron cuatro colectas en campo desde enero al mes de abril del año 2012 sobre aquellas plantas que manifestaban la sintomatología de pudrición del tallo; se colectó la cantidad de 10 muestras por colecta que consistían en 5 pedazos de 10 cm de tallo por planta enferma para un total de 50 muestras/ muestreo y 200 muestras analizadas durante el desarrollo del ensayo. Cada muestra colectada en campo se colocaron en bolsas de papel de 1Kg de capacidad para ser trasladadas en hieleras hasta las instalaciones del laboratorio de Biocontroladores del CIB, al llegar al laboratorio el material se lavó con agua y jabón, y luego se limpió con alcohol de 70%. En cámara de flujo laminar, y con bisturí previamente flameado, se realizaron cortes que incluyeron tanto tejido dañado como tejido sano, y se colocaron 4 secciones por placa petri. Los medios de cultivo empleados fueron: KB, Arroz, Maíz, AA, Garbanzo, Agar nutritivo, PDA (Difco), V8, Talloi, Jofee. YDC, Marmita y Glucosa y Tochinoi el cual es selectivo para *Fusarium* sp (Villalba, 2010); todos se acidificaron para evitar el crecimiento de bacterias, y se incubaron a 25-27°C por 10 días.

También se utilizaron tres muestras de suelo/ muestreo colectada en la base y alrededor de cada una de las plantas muestreadas para el tallo enfermo que presentaba el mayor daño y muerte de la planta, con la ayuda de una pala jardinera se tomaban de los primeros 10 cm del suelo cuatro submuestras que aproximaban a los 500 gr de peso. En total, se procesaron 3 muestras de suelo/ muestreo para un total de 12 por ensayo. Para esto, se pesaron 100g de cada muestra, que fueron mezclados con 900ml de agua destilada y se agitaron durante 5 minutos. Posteriormente se prepararon diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000, tomando 1 ml de solución original en 9ml de agua destilada (1:10), igualmente se preparó la solución 1:100, a partir de la dilución 1:10. Seguidamente, se realizó una dilución 1:1000 a partir de la solución 1:100. Finalmente, se sembró 0.5 ml de cada una de las diluciones preparadas sobre los medios de cultivo PDA (Difco), V8, y Tochinoi, el cual es selectivo para *Fusarium* sp; todos se acidificaron para evitar el crecimiento de bacterias, y se incubaron a 25-27°C por 10 días.

Pasado el tiempo de incubación, se subcultivaron los hongos, separando las cepas obtenidas para identificarlas al microscopio de luz, empleando el manual Finch & Finch (1990) y Barnett y Hunter (2003). Para esto, se tomó una porción de micelio con asa micológica, se colocó sobre un portaobjetos con una gota de agua, y se observó al microscopio, con 4, 10, 40 y 100x.

Las cepas identificadas como *Fusarium* se multiplicaron en medio PDA y “Tochinoi acidificado”, para evaluar sus características morfológicas al microscopio; luego se confirmó su género por comparación con un manual de especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

Por otra parte, se evaluó preliminarmente un cultivo líquido de los aislamientos de *Fusarium* sp. En cámara de flujo laminar, se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5ml, agregando 0.5 ml de medio selectivo Tochinoi acidificado, y una asada del hongo. Los tubos se pusieron en agitación a 200 rpm durante un mes; pasado el tiempo, se inoculó en medios sólidos PDA y Tochinoi, y se evaluó su viabilidad al día siguiente de sembrado.

Extracción y cuantificación de ADN

Se utilizó el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, para los aislamientos de *Fusarium* sp obtenidos. Además, se incluyó una muestra de *F. oxysporum* de piña, previamente identificada y que sirviera como comparación.

Para completar 100 mg de tejido micelial se tomó la muestra a partir de 3 placas que presentaban la morfología y coloración igual y que fueron inicialmente separadas por las características del crecimiento cualitativo observado en placa desde la Cepa 1 hasta la Cepa 7, se congelaron usando nitrógeno líquido. Posteriormente se maceró con mortero y pistilo, hasta obtener un polvo muy fino. Luego, se le agregaron 400 µl de buffer AP1 (EDTA y SDS) y 4 µl de RNasa A. Se agitó en vórtex y se incubó por 10 minutos, en baño maría, a 65°C, invirtiendo el tubo 2 o 3 veces durante ese tiempo. Seguidamente, se agregaron 130 µl de buffer AP2 (Ácido acético); se mezcló e incubó por 5 minutos en hielo; luego, se centrifugó el lisado por 5 minutos, a 14000 rpm. Seguidamente se transfirió a una columna QIAshredder, ubicada dentro de un tubo de 2 ml. Esta se centrifugó 2 minutos a 14000 rpm. El filtrado se transfirió a un nuevo tubo. A este nuevo tubo se le agregó 1.5 volúmenes de buffer AP3/E (Clorhidrato de Guanidina) y se mezcló.

Posteriormente, se tomaron 650 µl de la nueva mezcla, y se transfirieron a una columna DNeasy Mini con tubo colector de 2 ml. Se centrifugó 1 minuto a ≥ 8000 rpm, para luego descartar el filtrado, y se repitió este paso con la muestra restante. Se cambió el tubo colector de 2 ml, y se agregaron 500 µl de buffer AW; se mezcló y se centrifugó por 1 minuto a ≥ 6000 rpm; se descartó el filtrado.

Seguidamente, se agregaron 500 µl de buffer AW, y se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm. Se removió la columna con cuidado, para evitar contacto con el filtrado; se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1.5ml o 2 ml, se le agregaron 100 µl de buffer AE (10 mM Tris·Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0), para la elución. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó por 1 minuto a 14000 rpm. Luego, se repitió nuevamente la adición del buffer AE. Con esto, el ADN quedó listo para su uso.

Seguidamente, se evaluaron las muestras de ADN mediante electroforesis, usando 10 µl de cada muestra y 2 µl de Buffer de Carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25 % azul xilencianol y 30 % glicerol), empleando los marcadores Mass Ruler (Fermentas) y DNA 1Kb Ladder (Sigma-Aldrich), y se corrió en una electroforesis de gel de agarosa al 1%, a 100 V durante 1 hora. Este procedimiento se realizó bajo tres repeticiones con la

Para la cuantificación, se utilizó un espectrofotómetro de luz UV, marca Jasco V630. Para cada Cepa previamente separada por los aspectos morfológicos y anatómico de las estructuras reproductivas Primero se realizó una dilución 1:20 (50 µl de ADN y 950 µl de agua destilada estéril). Se midió la absorbancia a 260 y 280 nm, y se estableció la relación A_{260}/A_{280} , para evaluar la pureza del ADN. Como blanco, se utilizó agua destilada estéril. La lectura se repitió tres veces

Posteriormente, se calculó la concentración de ADN mediante la fórmula:

$$\text{Absorbancia 260 nm} * \text{Factor de dilución (20)} * 50 \mu\text{g/mL}$$

Registrándose las mediciones obtenidas mediante el software del equipo de cuantificación.

Amplificación mediante PCR

Se realizó un análisis bioinformático de los primers a utilizar, mediante la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies®). Además, se realizó una PCR *in silico* con el programa FastPCR 6.1 (Kalendar *et al*, 2009), para determinar los productos de PCR esperados, con la accesión de GenBank FJ538242.1. Para la técnica de PCR se utilizó el protocolo reportado por Pinaría *et al* (2010), que se detalla a continuación: se empleó un volumen de reacción de 25 µl, que contiene 1X de buffer de PCR, 2.5 mM de MgCl₂, 1 U DreamTaq (Fermentas), 1.0 mM dNTP mix, 0,25 mM de cada primer (EF-1 forward primer; 5-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3 y EF2 reverse primer: 5-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3) y 50 ng de ADN genómico de cada muestra obtenida. Además, se usó también el primer reverso EF-22 (5-AGGAACCCTTACCGAGCTC-3), bajo las mismas

condiciones de reacción; asimismo, se evaluó una amplificación en la que se incluyeron los tres primers en la misma reacción, donde se duplicó la concentración del primer EF-1.

Se utilizó un termociclador marca Applied Biosystems Veriti™. El programa de PCR aplicado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 1 minuto a 97°C; 35 ciclos, que comprenden desnaturalización a 96°C por 1 minuto, 1 minuto de alineamiento a 50°C, y extensión a 72°C por un minuto, seguido de una extensión final a 72°C por 7 minutos. Para la evaluación electroforética de las muestras, se usaron 10 µl de cada muestra del PCR y 2 µl de Buffer de Carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25 % azul xilencianol y 30 % glicerol), empleando los marcadores Mass Ruler (Fermentas) y DNA 1Kb Ladder (Sigma-Aldrich), y se corrió en una electroforesis de gel de agarosa al 1%, a 100 V durante 1 hora.

Para la cuantificación, se utilizó un espectrofotómetro de luz UV, marca Jasco V630. Para esto, se realizó una dilución 1:200 del ADN (5 µl de ADN y 995 µl de agua destilada estéril), y se midió la absorbancia a 260nm. Como blanco, se utilizó agua destilada estéril.

Posteriormente, se calculó la concentración de ADN mediante la fórmula:

$$\text{Absorbancia 260 nm} * \text{Factor de dilución (200)} * 50 \mu\text{g/mL}$$

Registrándose las mediciones obtenidas mediante el software del equipo de cuantificación.

Para los análisis de los resultados en este ensayo se obvia los aspectos estadísticos por cuanto los resultados son de carácter cualitativo si está o no presente el gene evaluado.

Resultados

Colecta, Aislamiento e identificación de *Fusarium* sp.

Las hojas colectadas así como los tallos presentaban manchas en la lamina foliar, con clorosis y necrosamiento (Figura 1). La muestra de suelo analizada presentó crecimiento de microorganismos en la mayoría de los medios, las coloraciones del micelio, así como su tamaño variaron con el medio utilizado y la dilución empleada (Cuadro 1).

Cuadro 1. Observaciones macroscópicas de los medios de cultivo inoculados con diluciones de muestras de suelo.

Medio de cultivo	Dilución		
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
KB	Micelio blanco	Micelio blanco	Levadura
Arroz	Micelio blanco con tonalidades verdes	Micelio blanco con tonalidades verdes	Micelio blanco
Maíz	Micelio blanco con tonalidades verdes	Micelio blanco con tonalidades verdes	Micelio blanco
V8	Micelio amarillo	Micelio amarillo	Micelio blanco, pequeño
AA	-	-	-
Garbanzo	Micelio blanco con tonalidades moradas	Micelio blanco con tonalidades moradas	Micelio blanco
Agar Nutritivo	-	-	-
PDA	Micelio blanco en toda la placa	Micelio blanco en toda la placa	Levadura
Tochinoi	Micelio blanco	Micelio blanco	-
Tallos	Micelio blanco en toda la placa	-	Micelio blanco con tonalidades verdes
Jofee	Levadura	Levadura	Levadura
YDC	Micelio blanco en toda la placa	Micelio blanco	Micelio blanco
Marmita	Micelio blanco	Micelio blanco con tonalidades verdes	Micelio verde
Glucosa	-	-	-

- Indica que no se dio crecimiento de microorganismos.



Figura 1. Síntomas de la enfermedad expresados en las hojas

En el caso de las muestras de hojas y tallos que se inocularon, no en todos los medios hubo crecimiento, y en muchas placas se repetía el mismo hongo. En el cuadro 2 se pueden observar los hongos fitopatógenos identificados.

Cuadro 2. Hongos identificados en el procesamiento de muestras de hojas y tallos de vainilla.

Medio de cultivo	Observación	Hongo según manual*
PDA	Colonia negra	Oidium
PDA	Colonias negras redondas	Phoma
Garbanzo	Colonia negra	Rosellinia
Maíz	Micelio Blanco	Phytophthora
Tochinoi	Micelio crema	Fusarium

* Manual utilizado Finch & Finch (1990)

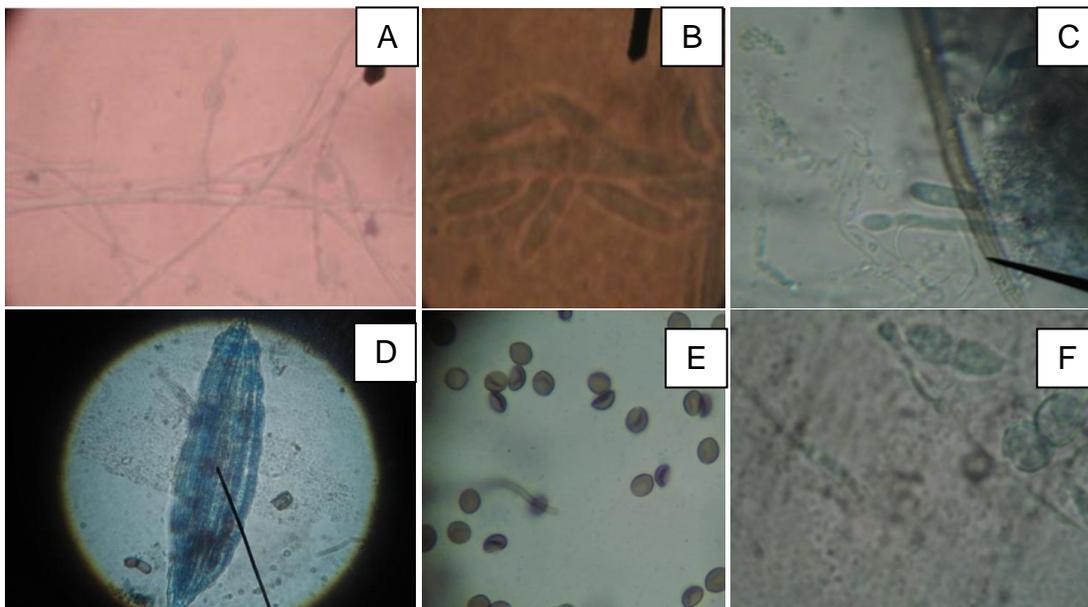


Figura 2. Hongos fitopatógenos identificados en las muestras de hojas y tallos recolectadas en Sarapiquí. A) *Phytophthora*. B) *Fusarium*. C) *Phoma*. D & E) *Rosellinia* y F) *Oidium*

Por un daño en la cámara climática en donde se establecieron los primeros hongos y el exceso de humedad que producía se tuvo que realizar un segundo aislamiento de los patógenos especialmente buscando y haciendo énfasis en la colecta del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

Reislamiento e identificación de *Fusarium* sp.

El medio V8 no fue efectivo para el crecimiento de hongos durante los aislamientos primarios, ni en suelo, ni en tallos, por lo que se continuó utilizando los medios PDA y Tochinoi. Este último presentó mejor crecimiento micelial de los aislamientos, por lo que se mantuvo para realizar subcultivos en lugar del PDA.

A partir de los tallos muestreados (Figura 2), mediante el microscopio de luz, se identificaron los hongos, y se lograron obtener una cepa de *Pestalotia* sp, una de *Mucor* sp (Figura 3 A y 3B) y cuatro de *Fusarium* sp (Figuras 4 y 5).

Además, de las muestras de suelos, se obtuvieron una cepa de *Mucor* sp y dos cepas de *Fusarium*.



Figura 2. Tallos de vainilla con sintomatología correspondiente a pudrición por *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*.

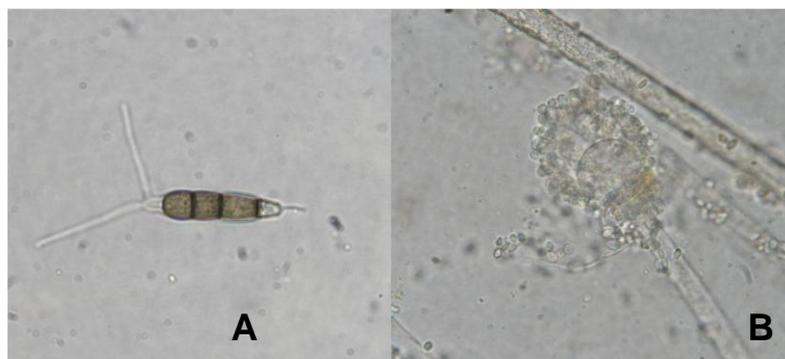


Figura 3. A) Conidio de *Pestalotia* sp. B) Esporangio de *Mucor* sp.

Tanto en medio Tochinoi como en PDA, se observaron coloraciones distintas para los aislamientos de *Fusarium* sp a los 12 días de incubación. Las cepas obtenidas de tallos presentaron coloración roja, anaranjada, amarilla y blanca. En el caso de los aislamientos de suelo, las coloraciones observadas

fueron amarillo y blanco-rosado. Todas las 7 cepas aisladas en medio selectivo presentaron micelio color blanco, circular y difuso con variabilidad en el tamaño de las conidias, tanto las macro como las micro y en algunos casos la presencia de clamidiosporas lo que hizo suponer a nivel morfológico que estábamos ante la evidencia de varias especies de *Fusarium* por esta variabilidad de las 7 cepas aisladas y mantenidas en el laboratorio (Figura 4). A partir de ese momento, se identificaron las cepas como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Nomenclatura de trabajo de los siete aislamientos o cepas de *Fusarium sp* utilizada durante la investigación

Aislamiento o Cepa	Código de uso en Laboratorio
<i>Fusarium</i> tallo-Amarillo	1
<i>Fusarium</i> tallo-Blanco	2
<i>Fusarium</i> tallo-Rojo	3
<i>Fusarium</i> tallo-Anaranjado	4
<i>Fusarium</i> suelo-Blanco	5
<i>Fusarium</i> suelo-amarillo	6
<i>Fusarium oxysporum</i> Piña	7

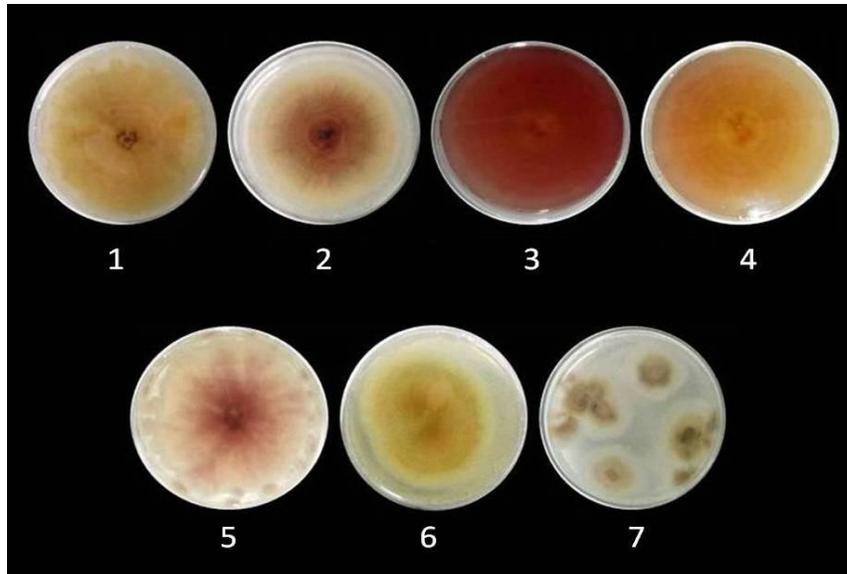


Figura 4. Cepas de *Fusarium* sp, en medio Toichinoi después de 12 días de incubación. La numeración correspondiente a la nomenclatura de trabajo detallada en el cuadro 2.

A nivel microscópico, se observó la estructura característica de *Fusarium* sp, que corresponde a un macroconidio con forma curva, septado en más de dos ocasiones (Figura 5A). Los microconidios presentan forma oval, pequeños, con 2 ó menos septos. Además, se observaron microconidios *in situ*, formando estructuras globosas tipo clamidiosporas así como grupos dispuestos de forma alternada (Figura 5 B y C).

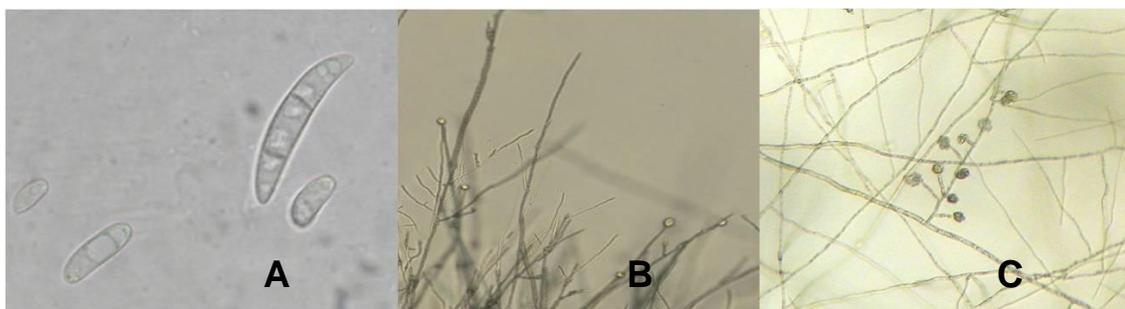


Figura 5. A) Macro y microconidio de *Fusarium* sp. de tallo B) Microconidios de *Fusarium in situ*, aislado de suelo. C) Microconidios de *Fusarium in situ* aislados de tallo

Por otra parte, los hongos en medio Tochinoi líquido y acidificado, mostraron viabilidad en medio sólido un mes después de inoculados, mediante elongación de hifas (Figura 6).



Figura 6. Germinación de *Fusarium* sp. en medio sólido un día después de inoculado

Extracción y cuantificación de ADN

La electroforesis del ADN genómico de las 7 cepas aisladas de *Fusarium* sp, se lograron observar sobre el gel después de 3 repeticiones, esto debido fundamentalmente a que el marcador de masa utilizado generó problemas en su corrida porque no existía una correcta separación de las bandas de mayor peso molecular. Finalmente a la tercera repetición se logra su separación (Figura 7)

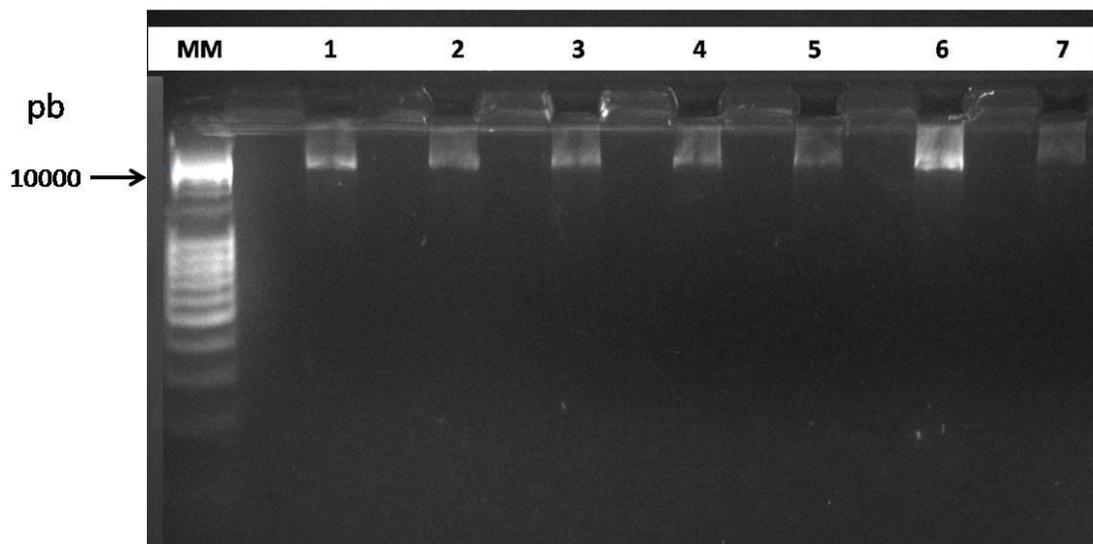


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico de las siete cepas de *Fusarium* sp a 100V por 1 hora. MM: Marcador de peso molecular

Las lecturas realizadas en espectrofotómetro a cada una de las siete cepas evaluadas arrojó que la concentración de ADN fue muy variable (Cuadro 3); la cepa 3, reportó valores negativos de absorbancia a 260nm; la cepa 5, el valor a 280nm fue negativo, y en la cepa 7, ambos valores fueron negativos. No obstante las cepas 1, 2, 4 y 6 reportaron valores positivos.

Los valores de pureza obtenidos indicaron que las muestras presentaron contaminación; esto pues valores menores a 1.8 implican contaminación por proteínas, y valores mayores a 2 significan contaminación por ARN (Cuadro 3).

Cuadro 3. Absorbancia a 260nm y 280 nm, calidad y concentración de las muestras de ADN genómico extraído de las 7 Cepas de *Fusarium sp* aisladas en el laboratorio.

Cepa	Absorbancia (nm)		Relación 260/280	Concentración (ng/μl)
	260	280		
Blanco	0	0	0	0
1	0,0284	0,0136	2,09	28,4
2	0,0298	0,0146	2,04	29,8
3	-0,0034	0	0	0
4	0,0416	0,0266	1,56	41,6
5	0,012	-0,0015	0	12
6	0,0542	0,0405	1,34	54,2
7	-0,0057	-0,0127	0	0

Amplificación mediante PCR

El análisis de primers realizado demostró que valores menores a -6 kcal/mol indican complementariedad entre primers (Cuadro 3); esto implica que en una reacción de PCR hay una alta probabilidad de que los primers se agrupen y la polimerasa actúe agregando nucleótidos entre ellos, en lugar de amplificar la región del ADN de interés, lo cual disminuye la concentración final de productos de PCR (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valor de complementariedad en los primers empleados para amplificar el gen EF-1 α .

Primers	Delta G (kcal/mol)		
	EF-1	EF-2	EF-22
EF-1	-1.95	-5.37	-11.98
EF-2	--	-8.53	-5.37
EF-22	--	--	-9.49

Por otra parte, de acuerdo al PCR virtual realizado, se esperaron productos de PCR de un tamaño aproximado a las 709 pb, para la amplificación del gen completo; el otro producto de PCR obtenido, correspondió a la amplificación parcial del gen, y fue de aproximadamente 495 pb.

En la electroforesis de los productos de PCR del gen completo no se observaron diferencias en la migración (Figura 8), manteniéndose todas las muestras entre los 500 y los 1000 pares de bases, lo cual coincidió con el producto esperado de mayor tamaño según el PCR virtual.

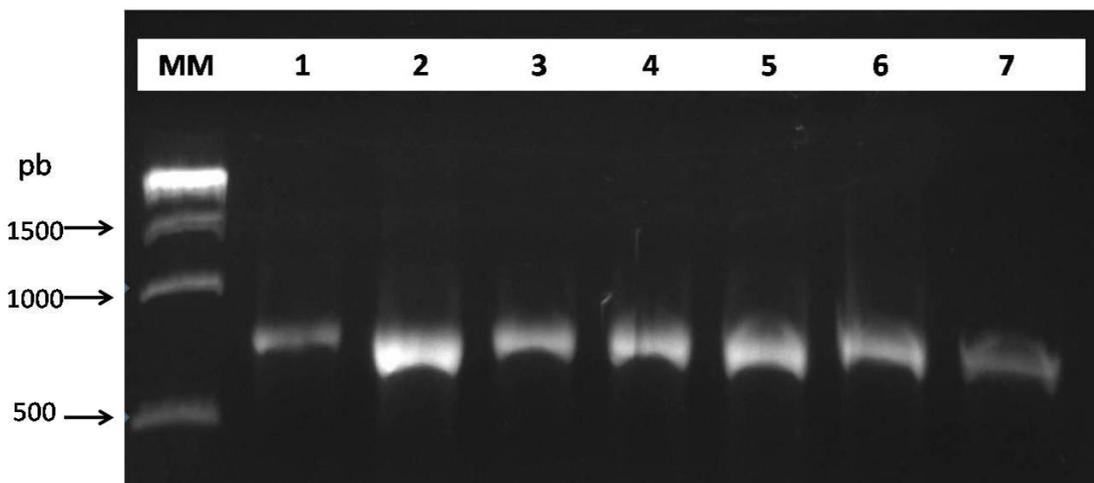


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificación del gen EF-1 α . MM: Marcador de peso molecular

La cuantificación de los productos de PCR obtenidos al amplificar el gen completo de cada cepa, permitió confirmar el aumento en la cantidad de copias del gen de interés; sin embargo, se observó

que la intensidad de las bandas a la hora de evaluar por electroforesis los productos obtenidos no coincidieron con la cuantificación realizada por espectrofotometría. La banda del carril 2 no coincidió con la absorbancia obtenida para la cepa 2, pues su intensidad en la fotografía es mayor a las demás (Figura 8); sin embargo, la concentración estimada es menor a la calculada para los productos de los carriles 3, 4, 5 y 6. Esto implica que las metodologías de cuantificación por comparación de intensidades, así como por espectrofotometría, manejan un rango de incertidumbre que reduce la exactitud de la concentración (Cuadro 5).

Cuadro 5. Absorbancia a 260nm y concentración de productos de PCR

Muestra	Absorbancia (nm)	Concentración (ng/μl)
260		
Blanco	0	0
1	0,0759	759,0
2	0,0803	803,0
3	0,1024	1024,0
4	0,0990	990,0
5	0,0996	996,0
6	0,0995	995,0
7	0,0724	724,0

En la amplificación múltiple del gen EF-1α se observa un grado importante de degradación de las muestras (Figura 9), pero hay dos bandas de mayor intensidad en todos los carriles: la primera muy cerca de los 500 pb, y otra ubicada entre 500 y 1000pb. Esto corresponde, aproximadamente, a lo obtenido por el PCR virtual efectuado, donde la amplificación del gen completo, se ve cercana a la banda de los 700pb, mientras que la amplificación parcial, en las bandas que se lograron obtener, se ubica entre los 400 y 500 pb. Por lo que a pesar de la variabilidad morfológica observada en la figura 4 las siete cepas corresponden al mismo hongo determinando como *Fusarium oxysporum* por el patrón de distribución observado durante la electroforesis por amplificación múltiple (Figura 9).

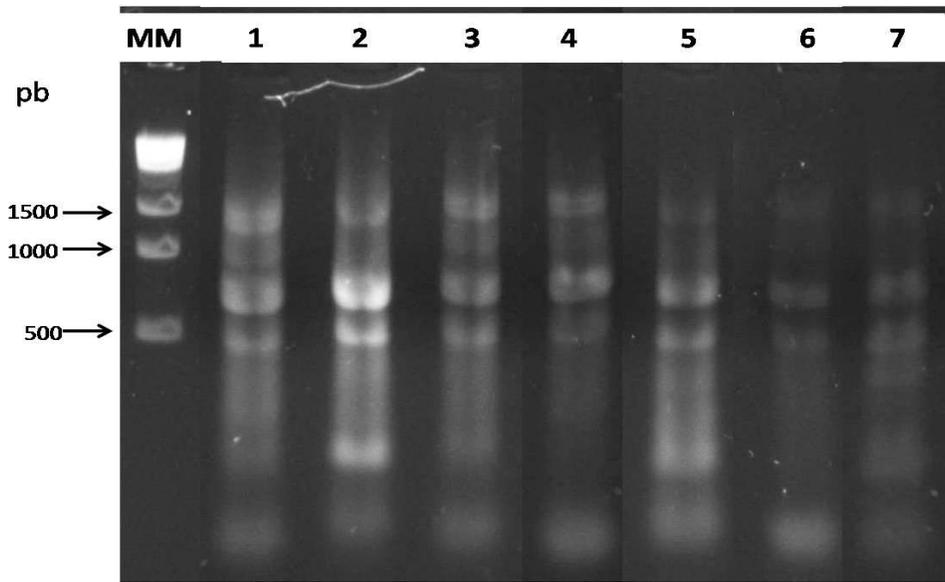


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplificación múltiple con dos juegos de del gen EF-1 α . MM: Marcador de peso molecular.

Discusión

Colecta, Aislamiento e Identificación de *Fusarium* sp.

Fusarium oxysporum es uno de los hongos más obicuos en los ecosistemas terrestres, asociado a plantas superiores (Ploetz, 2007). Este hongo mantiene una gran diversidad genética, lo cual le ha permitido adaptarse a diferentes hospedantes en diferentes condiciones. *F. oxysporium* var. *vanillae* es una variedad que produce pudrición de tallo y raíces en *V. plantifolia*, reduciendo el tamaño del vástago, desecación y marchitamiento de la planta (Ploetz, 2007). Se reporta que en los suelos en los que ha habido presencia de *Fusarium* es difícil volver a plantar sin que el cultivo se infecte, debido a la permanencia de las clamidiosporas del hongo en el suelo. En este caso los síntomas descritos coinciden con los encontrados en las muestras de hoja, raíz y suelo en donde el marchitamiento de la planta evidencia la presencia del fitopatógeno en cuestión. En estadios tempranos ataca las raíces bajo la tierra, sin embargo una vez que las raíces aéreas tocan el suelo, el hongo penetra e infecta el tejido. Esta puede ser la razón por la que en campo se observó la pudrición de raíces aéreas en cultivos que además se encontraron presentes en las muestras de tallo y suelo evaluadas.

A nivel microscópico producen macroconidios curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma redondeada, lo cual es una de las características que distingue a las clamidiospora (Varella, 2011). Las macroconidias en forma de fusil son las esporas más representativas de la especie que identifican a la especie de *Fusarium oxysporum* (Figura 5).

La pudrición descendente de tallos de vainilla se ha asociado principalmente con el ataque de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, debido a su diseminación y difícil control. Los aislamientos realizados sobre medio selectivo confirmaron, efectivamente, la presencia del género *Fusarium* en las muestras analizadas y colectadas en campo; sin embargo, se confirmó también la presencia del hongo *Mucor* sp, el cual se ha reportado también como agente causal de pudrición en vaina, hoja y tallo (Bhai y Dhanesh, 2008); dicho aislamiento no se ha reportado en Costa Rica como responsable de la patología citada, por lo cual se abre la brecha para evaluar a futuro la patogenicidad del hongo en el cultivo de vainilla, y así separar las sintomatología de éste hongo que evite ser confundido con la infección con la de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*.

El hongo *Pestalotia* sp, aunque se ha relacionado con manchas foliares y daños en tallo en gran cantidad de cultivos, no se ha reportado como agente causal de ninguna patología en vainilla; este aislamiento también cobra trascendencia para evaluar su patogenicidad e impacto sobre el cultivo.

La cantidad de aislamientos obtenidos a partir de tallo fue de cuatro cepas de *Fusarium* sp, mientras que solo dos cepas se obtuvieron de muestras suelo, pero todas al final correspondieron a la especie *Fusarium oxysporum*; éste hongo al ser principalmente un patógeno cuya acción se da de forma descendente en la planta y además se ubica en el tejido conductor favorece su aislamiento en medio de cultivo selectivo como lo reportado por Pinaria y colaboradores en Indonesia en el año 2010. Los datos sugieren que los sitios muestreados aun no presentan un alcance de la infección a nivel radical subterráneo, o este es muy bajo. Por esto, los análisis fitopatológicos cuantitativos deben implementarse en las estrategias de control de enfermedades, pues con esto se puede diseñar un programa más efectivo de control de este fitopatógeno, antes de la diseminación en la plantación con focos de infección (Ploetz, 2007).

Los aislamientos de *Fusarium* sp mostraron diferentes coloraciones sobre los medios de cultivo empleados, se ha reportado el comportamiento en medio sólido como una característica de clasificación a nivel de especie; a pesar de ello, en *F. oxysporum*, el rango de colores va desde blanco hasta violeta, por lo cual, no se puede determinar con seguridad una especie basado solamente en dicha característica morfológica; por tal razón, las estructuras de reproducción toman un papel importante, pues mediante comparaciones con manuales taxonómicos, así como del conocimiento del hospedante, región geográfica y condiciones ambientales, se puede dar un diagnóstico más preciso de la especie o forma especial con la que se está trabajando (Leslie y Summerell, 2006).

El empleo del medio Tochinoi líquido resultó como una opción diferente para el mantenimiento y crecimiento de *Fusarium oxysporum*, pues al ser un medio selectivo, presenta grandes ventajas para el desarrollo nutricional del hongo, y por ende, de la cantidad de micelio que puede emplearse en extracciones de ADN, lo cual se confirmó en los aislamientos realizados, pues el crecimiento en medio Tochinoi, era notable en comparación con el PDA, lo que coincide con esta evaluación preliminar con lo reportado por Kulkarni y Chittem, 2008 en donde demuestran que el uso de medios de cultivo líquidos favorecen el aumento de la biomasa micelial.

Extracción y cuantificación de ADN

La electroforesis de muestras de ADN genómico de *Fusarium* sp, mostró en general, bandas de muy baja intensidad, lo cual fue corroborado por el análisis espectrofotométrico. Las bajas concentraciones de ADN pueden darse debido al uso de medios de cultivo sólidos para la producción del material, pues la presencia de estructuras de reproducción podrían requerir una lisis más fuerte, incluso si se toma en

cuenta que pudo darse la formación de clamidiósporas, las cuales son responsables del mantenimiento de *Fusarium* en suelos por más de dos décadas (Ploetz, 2007).

Durante la recuperación del micelio a partir de medio sólido, se puede alterar el peso requerido por acarreo de restos del medio de cultivo y el agua que se pudo generar por la condensación dentro de la placa Petri en donde fueron mantenidas las cepas evaluadas (Ploetz, 2007). Por ello, el empleo de medios de cultivo líquidos podría favorecer la concentración de material fúngico, pues generalmente se recupera mediante centrifugación, con el inconveniente de enzimas que puedan ser excretadas al medio, que lleguen a contaminar la muestra (Kulkarni y Chittem, 2008).

Como punto de referencia, Aguilar (2006) empleó medio sólido con filtro para el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*, el cual se reportó como el mejor tratamiento para la producción de micelio, en comparación con medio líquido y medio sólido, pues aumentó la humedad y disminuyó la absorción de agua por parte del hongo. Bajo esta premisa, la humedad relativa que se pueda establecer en el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum*, se favorecería su desarrollo en términos de micelio, con lo cual las extracciones podrían tener mayor posibilidad de aumentar su concentración.

Se determinaron valores de pureza tanto encima como debajo del valor óptimo, que es 1.8; estas diferencias se dan por la contaminación residual durante el proceso de extracción de ADN. Esto implica una disminución en la concentración final de ADN, lo que interfiere en el desarrollo de aplicaciones como PCR, limitando a su vez, la amplificación.

En comparación con otro método de extracción de ADN de *Fusarium oxysporum*, cuya concentración menor fue de 867.5 ng/μl, con una pureza de 1.761 (Kuramae, 1997), los rendimientos del kit empleado fueron muy bajos, tanto en concentración de ADN como en pureza, debido a los problemas en la recuperación de material para la extracción; a pesar de ello, las concentraciones obtenidas fueron suficientes para realizar la amplificación del gen EF-1α mediante el protocolo de PCR propuesto que logra evidenciar en las cepas analizadas que se corresponde a una única especie y ésta es *Fusarium oxysporum*.

Amplificación mediante PCR

El análisis de complementariedad indicó que es probable la formación de agregados de primers, debido a un importante nivel de autocompatibilidad del primer EF-2, así como del primer EF-22,

además de la heterocompatibilidad de EF-1 con EF-22; a pesar de ello, han sido empleados sin ninguna limitación en análisis filogenéticos del género *Fusarium* por Pinaría *et al.* (2010).

Los fragmentos amplificados del gen completo y los obtenidos mediante primers múltiples, se mantuvieron constantes en su tamaño en las muestras de *Fusarium* sp de vainilla, así como en el *Fusarium oxysporum* de piña, por lo que solo la amplificación del gen y su evaluación electroforética no son criterios suficiente que permitiera la diferenciación entre aislamientos (Tombe 2011); sin embargo, la amplificación por PCR es un paso fundamental para el diagnóstico molecular. Al mantenerse los productos de PCR con alta similitud en tamaño, el análisis bioinformático de la secuencia puede determinar, por comparación con otras especies de *Fusarium*, sitios de restricción que generen un perfil único para *Fusarium oxysporum*, con la ventaja de permitir una metodología de diagnóstico a nivel molecular sencilla y rápida como la realizada en éste trabajo.

Conclusiones

- Se colectó y se identificaron siete cepas del hongo *Fusarium sp*, de la parte aérea de las plantas de vainilla y del suelo en un Sistema Agroforestal en asocio, también se aislaron los hongos *Mucor sp* y *Pestalotia sp* en muestras de tallo y hojas respectivamente que no habían sido reportados como patógenos en el cultivo en Costa Rica.
- Se logró con el uso del kit DNeasy de Qiagen la extracción y comparación de las siete cepas aisladas determinar una metodología sencilla en la extracción de ADN aún con concentración muy baja, y pureza regular, pero que no impidieron el desarrollo de las pruebas de amplificación realizadas.
- Se validó un protocolo de PCR para la amplificación del gen EF-1 α en aislamientos de *Fusarium sp*. con primers múltiples y electroforesis, identificando que es solo la especie *Fusarium oxysporum* la causante de las muertes regresivas en plantaciones en asocio con sistemas agroforestales.

Recomendaciones

- Evaluar los aislamientos de *Mucor* sp y *Pestalotia* sp mediante pruebas de patogenicidad y Postulados de Koch para determinar si actúan como agentes fitopatógenos para la vainilla, pues no se han reportado como tales en el país.
- Se debe perfeccionar el medio de cultivo líquido para la producción de material fúngico con miras a la extracción de ADN, y determinar si mejoran los rendimientos de extracción y pureza. Hay buenas perspectivas para el empleo de este tipo de medios.
- La secuenciación del gen completo permite que se mantenga un respaldo de la información genética obtenida, con la cual se pueden realizar comparaciones con bases de datos, así como técnicas basadas en PCR de forma virtual, como RFLP, que posteriormente faciliten el diagnóstico del agente causal, particularmente, *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*

Agradecimientos

- Expresamos nuestro agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR por el apoyo económico facilitado para la culminación de este proyecto.
- Al estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Gustavo Díaz Cruz por su colaboración como asistente técnico del proyecto.

Referencias Bibliográficas citadas

- Aguilar, X. 2006. Optimización del protocolo de extracción de ADN de *Mycosphaerella fijiensis*. Práctica de Especialidad. Ingeniería en Biotecnología. ITCR.
- Belanger, F. Havkin-Frenkel, D. 2011. Molecular analysis of a Vanilla hybrid cultivated in Costa Rica. In: Havkin-Frenkel, D. Belanger, F. (eds.) Handbook of vanilla science and technology. Blackwell Publishing Ltd. Iowa, USA.
- Bhai, S. Dhanesh, J. 2008. Occurrence of fungal diseases in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in Kerala. Journal of Spices and Aromatic crops. 17(2), pp. 140-148.
- Buccellato, F. 2011. Vanilla in perfumery and beverage flavors. In: Havkin-Frenkel, D. Belanger, F. (eds.) Handbook of vanilla science and technology. Blackwell Publishing Ltd. Iowa, USA.
- Bogale, M. 2006. Molecular characterization of *Fusarium* isolates from Ethiopia. Ph.D. thesis. University of Pretoria, South Africa.
- Camacho, A. 2008 Vainilla seduce a productores: Proyecto de la UNA pretende expandir cultivo orgánico y obtener subproductos. Diario El Financiero. Edición 690. Domingo 26 de Octubre 2008. Edición electrónica. Disponible en: http://www.elfinancierocr.com/ef_archivo/2008/octubre/26/negocios1736217.html. Consultado 5 abril 2010.
- Divakaran, M and K. Nirmal. 2009. Micropropagation and *In Vitro* Conservation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). In: *Methods in Molecular Biology, Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*, vol. 547. S. Mohan Jain and Praveen K. Saxena (eds.). Ed. Humana Press. pp. 129-138.
- El-Fadly, G. El-Kazzaz, M. Hassan, M. El-Kot, G. 2008. Identification of some *Fusarium* spp. Using RAPD-PCR Technique. Egypt Journal of Phytopathology. 36(1-2), pp. 71-80.
- El-Kazzaz, M. El-Fadly, G. Hassan, M. El-Kot, G. 2008. Identification of some *Fusarium* spp. Using Molecular Biology Techniques. Egypt Journal of Phytopathology. 36(1-2), pp. 57-69.
- FAOSTAT. 2011. Consultado: 20 de mayo, 2011. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>
- Finch, H. & Finch, A. 1990. *Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina*. Editorial Trillas. California, EEUU.
- Geiser, D. Jiménez-Gasco, M. Kang, S. Makalowska, I. Veeraraghavan, N. Ward, T. Zhang, N. Kulda, G. O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal Plant Pathology. 110, pp. 473-479.
- He, X. 2007. Bio-control of root rot disease in Vanilla. Tesis doctoral. University of Wolverhampton.
- Kim, Y. Hutmacher, R. Davis, R. 2005. Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Plant Disease. 89 (4), pp. 366-372.
- Korthou, H. & R. Verpoorte. 2008. *Vanilla planifolia*. In: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. 3er Edición. G. Rédei (eds). Springer Netherlands. pp. 203-217.
- Kulkarni, S. Chittem, K. 2008. Effect of Media on the Growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gerberae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 21 (2), pp. 303-304.
- Kuramae, E. 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporoides* and *Fusarium oxysporum*. Revista UNIMAR. 19(3), pp.683-689.

- Leslie, J. Summerell, B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Iowa, USA.
- Mbofung, G. Y., Hong, S. G., and Pryor, B. M. 2007. Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- α , and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Phytopathology* 97(1), pp. 87-98.
- Mirhendi, H. Ghiasian, A. Vismar, H. Asgary, M. Jalalizand, N. Arendrup, M. Makimura, K. 2010. Preliminary identification and typing of pathogenic and toxigenic *Fusarium* species using Restriction digestion of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 Region. *Iranian Journal Public Health*. 39(4), pp. 35-44
- Narayanasamy, P. 2008. *Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management: Microbial Plant Pathogens*. Vol. 1. Springer Science+Business Media B.V.
- Nitschke, E. Nihlgard, M. Varrelmann, M. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. Isolated from sugar beet, using Restriction Fragment Analysis of a Polymerase Chain Reaction-Amplified Translation Elongation Factor 1 α Gene Fragment. *Phytopathology*. 99(8), pp. 921-929
- Olivares, H. 2010. Sombra artificial y aplicación del Thidiazurón en el crecimiento y la fisiología de la vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Tesis de maestría. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Estado de México.
- Park, J. Kim, G. Lee, Kim, M. Huh, M. Lee, T. Lee, J. 2006. Comparison of RAPD, AFLP, and EF-1 α sequences for the phylogenetic analysis of *Fusarium oxysporum* and its formae speciales in Korea. *Mycobiology*. 34(2), pp. 45-55.
- Pinaria, A. Liew, E. Burgess, L. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australasian Plant Pathology*. 39, pp. 176-183
- Ploetz, R. 2007 *Fusarium*-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops. *Phytopathology*. 96 (6): 648-652pp.
- PROCOMER. 2011. Consultado: 20 de mayo, 2011. Disponible en: <http://servicios.procomer.go.cr/estadisticas/inicio.aspx>
- Radjacommare, R. Venkatesan, S. Samiyappan, R. 2010. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*, 43: 1. pp. 1-17
- Ramírez, C. Rapidel, B. Matthey, J. 1999. Principales Factores Agronómicos Restrictivos en el Cultivo de La Vainilla y su Alivio en la Zona de Quepos, Costa Rica. XI Congreso Nacional Agronómico, pp. 309–313.
- Tombe, M. Liew, E. 2011. Fungal diseases of vanilla. In: Odoux, E. Grisoni, M. (eds.) *Vanilla*. CRC Press, Florida, USA.
- Varela, E. 2011. Vanilla production in Costa Rica. In: Havkin-Frenkel, D. Belanger, F. (eds.) *Handbook of vanilla science and technology*. Blackwell Publishing Ltd. Iowa, USA.
- Villalba, V. 2010. *Manual de Laboratorio "Aspectos moleculares de la Fitopatología"*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Villalobos, J., F. Cárdenas and J. Cordero. 2009. Lista de Enfermedades de los Cultivos Agrícolas y Forestales de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Servicio Fitosanitario del Estado: Diagnóstico Fitosanitario. Disponible en: www.protecnet.go.cr/.../diagnostico_fitosanitario.html. Consultado 5 junio 2010.