

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS**



***Fusarium* spp.: UN MODELO PARA EL ANÁLISIS DE PATÓGENOS
MULTIHOSPEDERO**

MELVA YOMARY LINARES LINARES

**DIRECTOR
MARÍA XIMENA RODRÍGUEZ**

**Bogotá, D.C.
6 DE DICIEMBRE DE 2010**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS**



***Fusarium* spp.: UN MODELO PARA EL ANÁLISIS DE PATÓGENOS
MULTIHOSPEDERO**

MELVA YOMARY LINARES LINARES

DIRECTOR

MARÍA XIMENA RODRÍGUEZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar al título de

Magíster en Ciencias Biológicas

Bogotá, D.C.

6 DE DICIEMBRE DE 2010

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

***Fusarium* spp.: UN MODELO PARA EL ANÁLISIS DE PATÓGENOS
MULTIHOSPEDERO**

MELVA YOMARY LINARES LINARES

APROBADO

MARÍA XIMENA RODRÍGUEZ PhD

Director

Dra. MARÍA CARIDAD CEPERO MSc.

Dra. LILIANA FRANCO PhD.

Dr. JOSE SALVADOR MONTAÑA PhD (C).

Ingrid Shuller, Biol. PhD

Decana Académica

Facultad de ciencias

Manuel Franco, MD, PhD.

Director de Posgrado

Facultad de ciencias

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	01
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	04
3. OBJETIVOS	06
3.1 Objetivo general	06
3.2 Objetivos específicos	06
4. MARCO TEÓRICO GENERAL	07
4.1 GENERALIDADES DEL GENERO <i>Fusarium</i>	07
4.2 PATÓGENO MULTIHOSPEDERO	07
4.3 PATOGÉNESIS DEL GÉNERO <i>Fusarium</i>	08
4.3.1 <i>Fusarium</i> como fitopatígeno	08
4.3.2 <i>Fusarium</i> como patógeno humano y animal	09
4.3 PATÓGENO EMERGENTE	10
5. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR	12
5.1 INTRODUCCIÓN	12
5.2 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DEL GÉNERO <i>Fusarium</i>	12
5.2.1 Medios de cultivo	12
5.2.2 Características morfológicas	13
5.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO <i>Fusarium</i>	14
5.4 METODOLOGÍA	15
5.4.1 Descripción de la muestra	15
5.4.2 Identificación morfológica	17
5.4.3 Identificación molecular	17
5.4.3.1 Extracción de ADN genómico	17
5.4.3.2 Técnicas de PCR	18
5.4.4 Análisis de las secuencias ITS 4-5, EF 1-2 y EF 3-22	20
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.5.1 Identificación morfológica de los aislamientos de <i>Fusarium</i>	20
5.5.2 Identificación molecular de los aislamientos de <i>Fusarium</i>	25

5.5.3 Comparación de la identificación morfológica y molecular	26
5.5.4 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso ITS de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de origen humano sistémico	30
5.5.5 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 1 α de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de origen humano sistémico y otras secuencias reportadas en el Genebank	32
5.5.6 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 1-2 de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de origen humano sistémico	34
5.5.7 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 1-2 de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de origen humano sistémico y otras secuencias reportadas en el Genebank	36
5.5.8 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 3-22 de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de origen humano sistémico	38
5.5.9 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 3-22 de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de origen humano sistémico y otras secuencias reportadas en el Genebank	40
5.5.10 Relaciones filogenéticas entre las secuencias consenso EF 1-2 de <i>Fusarium</i> spp. de los diferentes orígenes de aislamiento	42
5.5.11 Relaciones filogenéticas entre las secuencias consenso EF 1-2 de <i>Fusarium</i> spp. de los diferentes orígenes de aislamiento y otras secuencias reportadas en el Genebank	45
6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	49
6.1 INTRODUCCIÓN	49
6.2 ERIC Y REP PCR	50
6.3 METODOLOGÍA	50
6.3.1 Técnicas de PCR	50
6.3.2 Amplificación de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP) y secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC)	51
6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.4.1 Patrones de bandeo por ERIC- PCR	52
6.4.2 Patrones de bandeo por REP-PCR	55

6.4.3 Comparación ERIC y REP-PCR	56
7. FACTORES MODULADORES DE PATOGENICIDAD	59
7.1 INTRODUCCIÓN	59
7.2 PATOGÉNESIS DE <i>Fusarium</i>	59
7.3 FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA PATOGÉNESIS	61
7.4 METODOLOGÍA	63
7.4.1 Descripción de la muestra	63
7.4.2 Evaluación de las muestras	63
7.4.3 Análisis de los resultados	63
7.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
7.5.1 Comportamiento frente a diferentes temperaturas	64
7.5.2 Comportamiento frente a diferentes pH	68
7.5.3 Comportamiento frente a sustrato	71
7.5.4 Hidrólisis de la urea	72
8. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD	74
8.1 INTRODUCCIÓN	74
8.2 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	75
8.3 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA	76
8.4 CORRELACIÓN DE LOS RESULTADOS CON LA CLÍNICA	76
8.5 RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS	77
8.6 ANTIFÚNGICOS	78
8.6.1 Antifúngicos más utilizados en práctica clínica y su blanco de acción	78
8.7 METODOLOGÍA	79
8.7.1 Descripción de la muestra	79
8.7.2 Perfil de susceptibilidad de <i>Fusarium</i> spp. a los antifúngicos por el método de microdilución	79
8.7.3 Perfil de susceptibilidad de <i>Fusarium</i> spp. a los antifúngicos por E-test	81
8.7.4 Análisis de los resultados	82
8.8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
8.8.1 Perfil de susceptibilidad por microdilución y E-test	83
9.DISCUSIÓN GENERAL	90

10. CONCLUSIONES	98
11. RECOMENDACIONES	100
12. BIBLIOGRAFÍA	101
13. ANEXOS	117

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 5.1. Origen de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	16
Tabla 5.2. Condiciones de reacción utilizadas para amplificar regiones ITS 4 – ITS 5	18
Tabla 5.3. Condiciones de reacción utilizadas para amplificar regiones EF1-2 y EF 3-22	19
Tabla 5.4 Comparación de la identificación morfológica y molecular de <i>Fusarium</i> spp.(origen animal, humano superficial y vegetal).	28
Tabla 5.5 Comparación de la identificación morfológica y molecular de <i>Fusarium</i> spp. (Origen humano sistémico).	29
Tabla 6.1. Condiciones de reacción de amplificación ERIC - REP PCR	51
Tabla 6.2. Ciclos de reacción PCR para ERIC – REP	52
Tabla 8.1. Solventes utilizados para preparar las soluciones patrón	80
Tabla 8.2. CIMs de 40 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. de diferentes orígenes	84
Tabla 8.3. Control de calidad de prueba de microdilución - CIMs cepas de referencia	85
Tabla 8.4. Control de calidad de prueba E-test - CIMs cepas de referencia	85
Tabla 8.5. Medias geométricas (MG) e intervalos de confianza	87
Tabla 8.6. CIMs de <i>Fusarium</i> spp. por origen de aislamiento	88
Tabla 8.7. CIMs de <i>Fusarium</i> por especie identificada	89

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 5.1. Porcentaje de distribución de especies de <i>Fusarium</i> identificadas por morfología	22
Figura 5.2. Fotos identificación morfológica	22
Figura 5.3. Porcentaje de distribución de especies por origen de aislamiento	24
Figura 5.4. Cladograma de las secuencias ITS de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. (Origen humano sistémico) .	31
Figura 5.5. Cladograma de las secuencias ITS de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. (Origen humano sistémico vs secuencias reportadas en el Genebank)	33
Figura 5.6. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. (Origen humano sistémico)	35
Figura 5.7. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. (Origen humano sistémico vs secuencias reportadas en el Genebank)	37
Figura 5.8. Cladograma de las secuencias EF 3-22 de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. (Origen humano sistémico)	39
Figura 5.9. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. (Origen humano sistémico vs secuencias reportadas en el Genebank)	41
Figura 5.10. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. (Origen animal, vegetal, humano superficial y sistémico.)	44
Figura 5.11. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. (Origen animal, vegetal, humano superficial y sistémico vs secuencias reportadas en el Genebank)	47
Figura 6.1. Dendograma de los aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a patrones de bandeo por ERIC-PCR.	54
Figura 6.2. Dendograma de los aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a patrones de bandeo por REP-PCR.	56

Figura 7.1. Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes temperaturas según origen	65
Figura 7.2. Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a 40°C	66
Figura 7.3. Cultivos de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes temperaturas.	67
Figura 7.4. Comportamiento de <i>F. oxysporum</i> a diferentes temperaturas.	67
Figura 7.5. Comportamiento de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes temperaturas.	68
Figura 7.6. Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes pH según origen.	69
Figura 7.7. Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> a diferentes pH.	70
Figura 7.8. Comportamiento de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes pH.	70
Figura 7.9. Comportamiento de <i>Fusarium</i> spp. en agar extracto de malta.	71
Figura 7.10. Cultivos de <i>Fusarium</i> spp. en agar Extracto de malta.	72
Figura 7.11. Evaluación de pH en caldo urea.	73

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 5.1. Identificación morfológica de <i>Fusarium</i> spp.	117
Anexo 5.2 Fotos identificación morfológica.	158
Anexo 5.3. Protocolo de extracción de ADN	179
Anexo 5.4. Kit de limpieza Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	181
Anexo 7.1. Análisis de varianza de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes temperaturas.	182
Anexo 7.2. Agrupamientos Duncan de <i>Fusarium</i> spp, a diferentes temperaturas	183
Anexo 7.3. Comparación de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes temperaturas	186
Anexo 7.4. Análisis de varianza de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes pH.	187
Anexo 7.5. Agrupamientos Duncan de <i>Fusarium</i> spp, a diferentes pH.	188
Anexo 7.6. Comparación de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a diferentes pH.	191
Anexo 7.7. Análisis de varianza de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. en caldo urea.	192
Anexo 7.8. Agrupamientos Duncan de <i>Fusarium</i> spp, en caldo urea.	193

RESUMEN

Fusarium es un hongo filamentosos saprófito del suelo que se ha caracterizado por ser patógeno de diferentes hospederos, con un enorme impacto a nivel fitopatológico y clínico, por considerarse patógeno emergente. Su habilidad para causar enfermedad en un amplio rango de hospederos lo convierten un organismo modelo para analizar mecanismos patogénicos. En este trabajo se propuso evaluar aislamientos de *Fusarium* de diferentes orígenes con el fin de entender su capacidad como patógeno multihospedero.

Cuarenta aislamientos de *Fusarium* spp. origen humano (superficial y sistémico), animal y vegetal fueron identificados a nivel de especie, morfológica y molecularmente. Luego se caracterizaron por ERIC-PCR y REP-PCR, se evaluó su comportamiento frente a diferentes factores moduladores de patogenicidad (respuesta a diferentes temperaturas, pH y sustrato, y actividad ureasa) y su perfil de susceptibilidad a antifúngicos de uso en terapia clínica.

Se identificaron diferentes especies en los aislamientos de *Fusarium* de los cuatro orígenes, siendo *Fusarium oxysporum* la especie más representativa. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron inconsistencias entre identificación morfológica y molecular al momento de interpretar los resultados. En la caracterización molecular no se observó formación de conglomerados definidos por origen de aislamiento o por especie identificada, mostrando un alto grado de diversidad en los aislamientos estudiados, lo que explica porque *Fusarium* spp. puede considerarse un modelo de patógeno multihospedero; con la capacidad para adaptarse a diferentes condiciones de temperatura, pH y actividad ureasa, así como la resistencia presentada frente a diferentes antifúngicos.

Los resultados derivados de este trabajo permiten sugerir a *Fusarium* spp. como modelo para el análisis de patógenos multihospedero.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium* comprende individuos de distribución universal, con diferentes características ecológicas, morfológicas y fisiológicas, capaces de causar una amplia variedad de procesos infectivos en plantas, animales y humanos, y de producir una serie de micotoxinas. Este género persiste en suelo, plantas y material vegetal en descomposición, donde cambios en su estructura y diversidad pueden estar asociados a regiones específicas en el mundo.

Las especies involucradas en procesos infectivos son identificadas por características morfológicas diversas y complejas; lo cual dificulta establecer unas claves taxonómicas adecuadas y ampliamente aceptadas, mostrando una confusa e inestable historia taxonómica por características morfológicas no claras, por variaciones y mutaciones a nivel de cultivo y por el amplio concepto de especie. Las pruebas moleculares para su identificación son fundamentales pero necesitan ser evaluadas cuidadosamente en un amplio rango de especies, debido a su alta variabilidad genética.

Fusarium ha tenido un enorme impacto como fitopatógeno en el sector agrícola por las grandes pérdidas en cultivos de importancia económica. La amplia variedad de plantas hospederas y su difícil control en el campo han convertido a *Fusarium* en un microorganismo temido por los agricultores.

Las especies de *Fusarium* son también agentes causales de un gran número de infecciones oportunistas en humanos y animales, causando infecciones sistémicas con una alta mortalidad, así como infecciones localizadas en la piel y otras partes del cuerpo. Se encuentra asociado a pacientes inmunocompetentes en procesos de queratitis, patología ocasionada por implantación traumática, así como en procesos de onicomycosis donde se puede constituir en el punto de partida para las formas diseminadas. En pacientes inmunosuprimidos se describen infecciones con enfermedad de base como malignidad

hematológica o con tratamientos mielosupresores, por lo cual se constituye en un patógeno cuya importancia crece exponencialmente.

Algunos hongos causan enfermedad en un solo tipo de hospedero, sin embargo *Fusarium* por su marcada variabilidad, en cuanto a sus características fisiológicas y morfológicas, tiene la capacidad de colonizar un amplio rango de hospederos. Los mecanismos que determinan a estos hongos en relación al tipo de hospedero no han sido completamente entendidos, aunque existen determinantes de virulencia que son claramente específicos de hospederos, se sabe también que existen mecanismos de virulencia universales en hongos patógenos con alta diversidad de hospederos. Adicionalmente, los mecanismos moleculares que determinan la especificidad entre el rango de hospederos y el hongo no han sido completamente entendidos, pero la disponibilidad de secuencias de genomas completos de hongos patógenos en plantas y humanos y su hospedero, así como el desarrollo de protocolos para genes funcionales son de enorme importancia para avanzar en el entendimiento de la patogénesis del hongo y las defensas del hospedero.

La patogénesis de *Fusarium* no es muy clara, su amplia distribución se atribuye a su capacidad para crecer en gran número de sustratos y a los mecanismos de dispersión donde el viento y la lluvia juegan un importante papel en su diseminación. Dada la habilidad de causar enfermedad en plantas, animales y humanos, *Fusarium* se considera un modelo importante para analizar diferentes mecanismos de patogenicidad. Algunas especies son capaces de colonizar organismos vivos, por la habilidad para reconocer y penetrar hospederos específicos, utilizar diferentes tipos de nutrientes, protegerse de la respuesta inmune innata y causar enfermedad.

Este patógeno oportunista emergente es una creciente amenaza especialmente por las infecciones sistémicas que desarrolla en pacientes inmunosuprimidos, al ser la segunda causa de infección fúngica por hongos filamentosos, por los escasos principios activos disponibles para su tratamiento y por la continua aparición de especies resistentes. Patógenos que pueden ser transmitidos entre diferentes especies de hospederos son de

fundamental interés e importancia desde el punto de vista de salud pública y a nivel económico; por esto se hace necesario evaluar diferentes características del género *Fusarium* para entender la capacidad que tiene como patógeno emergente y causar enfermedad en diferentes tipos de hospederos.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En los últimos años *Fusarium* spp., hongo saprófito del suelo, se ha caracterizado como patógeno de diferentes hospederos, generando un alto impacto a nivel clínico y agrícola. El incremento en el número de casos por infecciones fúngicas ha aumentado el interés particular por el estudio de *Fusarium* como patógeno multihospedero, debido a su capacidad para infectar plantas, animales y humanos. *Fusarium* ha sido reportado como agente etiológico de infecciones oportunistas en animales y humanos, causando infecciones sistémicas con una alta mortalidad, así como infecciones localizadas en la piel y otras partes del cuerpo, tanto en hospederos inmunocomprometidos como inmunocompetentes (Raad *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2005; Hilmioglu *et al.*, 2005; Calado *et al.*, 2006), convirtiéndose en la segunda causa más común de las infecciones por hongos oportunistas después de *Aspergillus* (Godoy *et al.*, 2004).

Varias especies de *Fusarium* han sido caracterizadas como causantes de infecciones superficiales en individuos inmunocompetentes (Godoy *et al.*, 2004), sin embargo recientemente se ha visto una mayor incidencia de infecciones causadas por este hongo en tejidos profundos en pacientes inmunosuprimidos (Bushelman *et al.*, 1995; Giltroy *et al.*, 2006), así como una alta resistencia frente a los agentes antifúngicos de uso clásico (Linares *et al.*, 2005). Por otro lado, *Fusarium* también ha sido reportado como fitopatógeno causando marchitamiento vascular, daño en la raíz y semillas en especies vegetales de importancia económica, generando grandes pérdidas en la agricultura (Boutati y Anaissie, 1997; Gohel *et al.*, 2006).

Poco se conoce de la patogénesis de *Fusarium*, la mayoría de estudios solo se centran en la capacidad que tiene para penetrar diferentes tejidos por la producción de enzimas como pectinliasas, celulasas, proteasas y queratinasas, entre otras, que le permiten la degradación de diferentes sustratos (Roncero *et al.*, 2000; Richardson y Edward, 2000; Gracia y Rodríguez, 2008; Blyscal, 2009).

Se han utilizado herramientas moleculares que permiten caracterizar genéticamente este patógeno, contribuyendo al entendimiento de la dinámica poblacional en relación a sus hospederos (Godoy *et al.*, 2004, O'Donnell *et al.*, 2004; Pounder *et al.*, 2005). Sin embargo, siendo un patógeno emergente capaz de adaptarse a diferentes condiciones fisiológicas y ambientales, son pocos los reportes que asocian los casos de infección con el origen de contaminación.

Teniendo en cuenta la diversa problemática planteada y conociendo que la mayoría de los hongos se desarrollan en la naturaleza en condiciones muy diversas a las que encuentra en el hospedero, el propósito de esta investigación es identificar las especies involucradas en la relación patógeno-hospedero, evaluar factores moduladores de patogenicidad y conocer el perfil de susceptibilidad de los aislamientos de *Fusarium* spp. de los diferentes orígenes con el fin de contribuir a la caracterización de *Fusarium* como patógeno multihospedero.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar aislamientos de *Fusarium* spp. de diferentes orígenes para entender su capacidad como patógeno multihospedero.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar fenotípica y molecularmente aislamientos de *Fusarium* spp. implicados en procesos infectivos de plantas, animales y humanos.

Caracterizar molecularmente aislamientos de *Fusarium* spp. por ERIC-PCR y REP-PCR.

Evaluar *in vitro* factores moduladores de patogenicidad involucrados en la adaptación a diferentes hospederos.

Evaluar si existe asociación entre el perfil de susceptibilidad a antifúngicos de uso en terapia clínica y el origen de aislamiento de *Fusarium* spp.

4. MARCO TEÓRICO GENERAL

4.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO *Fusarium*

El género *Fusarium* es un hongo de distribución universal, saprófito común del suelo, asociado a materia orgánica en descomposición e insectos; parásito facultativo de numerosos hospederos como plantas, animales y humanos (Giani, 1997; Tosti *et al.*, 2000; Summerell *et al.*, 2001). *Fusarium* crece rápidamente en diferentes medios de cultivo, en agar papa dextrosa produce colonias blancas, rosadas, salmón o grises con textura algodonosa. Microscópicamente se observan filamentos hialinos septados, macroconidios fusoides y microconidios ovoides, cilíndricos en cabezas mucilaginosas o cadenas. (Dignani y Anaissie, 2004).

La forma perfecta (telemorfo) de *Fusarium*, en las especies que la presentan, pertenecen al filo Ascomycota, orden Hypocreales, a los géneros *Nectria*, *Calonectria*, *Micronectriella* y *Gibberella*; que se caracterizan por ascosporas producidas en ascocarpos en forma de peritecio. La forma anamorfa pertenece al filo Deuteromycota (hongos mitospóricos). Sumemerell y colaboradores (2006) describen 70 especies, de las cuales solo a 15 se les conoce su fase telemorfa (Nelson *et al.*, 1983; Pardo y Durán, 1999).

Se ha visto una confusa e inestable historia taxonómica por características morfológicas no claras, el concepto de especie tan amplio, variaciones y mutaciones a nivel de cultivo. Las bases taxonómicas más utilizadas actualmente son las de Booth (1971), Nelson y colaboradores (1983) y Leslie y Summerell (2006).

4.2 PATÓGENO MULTIHOSPEDERO

Fusarium se ha caracterizado como patógeno de diferentes hospederos, generando un alto impacto a nivel clínico y agrícola por la variedad de infecciones que causa en plantas,

humanos y animales. Esta capacidad que tiene un microorganismo para colonizar normalmente especies de un reino e infectar especies pertenecientes a otro se define como salto entre reinos, la cual ha sido denominada como capacidad multihospedero (Van Baarlen *et al.*, 2007).

Los hospederos que pueden ser colonizados pertenecen evolutivamente a distintos grupos de eucariotas como insectos, plantas, animales y humanos. Dentro de los hongos, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Curvularia* y *Fusarium* constituyen el grupo de microorganismos con esta capacidad, ya que han desarrollado habilidades para reconocer ciclos de vida parasíticos en distintos hospederos causando enfermedad (De Lucca, 2007; Van Baarlen *et al.*, 2007). Estos patógenos fúngicos poseen diferentes mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia que les permiten atravesar barreras de defensa, penetrar diferentes sustratos y tomar los nutrientes necesarios para causar enfermedad (Ortoneda *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 2001).

4.3 PATOGÉNESIS DEL GÉNERO *Fusarium*

La patogénesis de *Fusarium* no es muy clara, su amplia distribución se atribuye a su capacidad para crecer en un gran número de sustratos y a los mecanismos de dispersión donde el viento y la lluvia juegan un importante papel.

4.3.1 *Fusarium* como fitopatógeno

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos son una de las mayores preocupaciones en el campo de la agricultura. Diversos reportes han señalado a *Fusarium* como patógeno asociado con daños radiculares y aéreos de plantas en diferentes cultivos. Este penetra las diferentes capas de la corteza de la raíz hasta alcanzar el sistema vascular. Una vez establecido, la colonización de la planta es llevada a cabo rápidamente a través del xilema, lo que conlleva a la sintomatología característica de marchitez y posterior muerte de la planta (Agrios, 1997; Roncero *et al.*, 2000). Entre los síntomas característicos de la

enfermedad se describen el amarillamiento parcial, entorchamiento de las hojas, fenómenos de enanismo, disminución del crecimiento y marchitez progresiva.

Los cultivos más afectados son el clavel, algodón, tomate, plátano, caña de azúcar, café y frijol; donde se describen más de 120 formas especiales (Di Pietro y González, 2004; Agrios, 2005; Zambrano *et al.*, 2007).

Dentro de las especies más conocidas se encuentran *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum* y *F. tricinctum* encontradas en cereales; *F. nygamai* y *F. fujikuroi* en arroz; *F. nygamai*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* en maíz. En legumbres se observan *F. chlamydosporum* y *F. tumidum*, y en papa *F. solani* (Marasas *et al.*, 1984; Samuels *et al.*, 2001; Carrillo, 2003). *Fusarium oxysporum* es la especie más común y la más temida en todo el mundo por las pérdidas anuales en las producciones agrícolas que sobrepasan al 12%, pese a la utilización masiva de fungicidas (Di Pietro y González, 2004; Agrios, 2005; O'Donnell *et al.*, 2009).

Algunas especies de *Fusarium* afectan cereales y pueden producir micotoxinas en los granos, inclusive antes de la cosecha; otras se asocian a podredumbre de hortalizas y frutas almacenadas en refrigeración, marchitamiento vascular, pudrición basal y tizón (Booth, 1971; Nelson *et al.*, 1994; Summerell *et al.*, 2001; Agrios, 2005; Castro *et al.*, 2008).

4.3.2 *Fusarium* como patógeno humano y animal

En los últimos años varias especies del género *Fusarium* se han reportado como patógenos oportunistas de humanos, causando enfermedades tanto en pacientes inmunosuprimidos como inmunocompetentes (Moreno *et al.*, 2008), generando infecciones superficiales en piel, uñas y úlceras; mientras que en pacientes inmunosuprimidos puede causar infecciones sistémicas, comprometiendo cualquier órgano (Gilroy *et al.*, 2006). En la interacción del sistema inmune con *Fusarium*, los polimorfonucleares y macrófagos son la base de la respuesta de defensa. Los polimorfonucleares inhiben el crecimiento de las hifas, mientras que los macrófagos, inhiben la germinación de conidios (Díaz *et al.*, 2007). Es por esto, que

la susceptibilidad del hospedero es el factor determinante para el establecimiento de la infección. Existen muchos factores de riesgo asociados a la generación de estas infecciones, dentro de los que se destacan el déficit numérico o funcional de neutrófilos (neutropenia), el uso de corticoesteroides como tratamiento quimioterapéutico y trasplantes de médula ósea (Cohen, 2000; Gilroy *et al.*, 2006). La enfermedad se desarrolla por la diseminación de conidios que tienen la capacidad de soportar temperatura corporal. Una vez estos germinan empiezan a desarrollar hifas, que se adhieren a los tejidos y tratan de penetrar las partes más profundas de la piel a través de la liberación de enzimas como lipasas y proteasas, generando de esta manera enfermedad (Pérez, 2005).

Las patologías a las cuales se ha asociado *Fusarium* son intoxicación alimentaria, queratitis, infecciones en la piel, onicomycosis, otitis, infección intranasal invasiva, absceso cerebral, endocarditis y enfermedades diseminadas (Nelson, 1994; Di Pietro y González, 2005). Las especies de *Fusarium* más comúnmente asociadas a estas patologías son *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* (Hoog *et al.*, 2003; Dignani y Anaissie, 2004).

4.4 PATÓGENO EMERGENTE

Fusarium spp. al causar enfermedad diseminada en pacientes inmunosuprimidos y ser la segunda causa más frecuente de los hongos filamentosos después de *Aspergillus*, es considerado un patógeno emergente (Dignani y Anaissie, 2004). Enfermedades emergentes son las que aparecen en un tiempo, incrementan su incidencia o han sido reportadas en nuevas áreas, donde una serie de factores tienen que ser propuestos para explicar este comportamiento. Estos factores incluyen características del patógeno (mutación, recombinación o variabilidad genética), características del hospedero (inmunosupresión), características de la población del hospedero (tamaño, movimiento) y factores ecológicos (cambios en agricultura, uso de la tierra, urbanización) (Morse, 1995; Schrag y Weiner, 1995; Morris y Potter, 1997).

Los patógenos que infectan más de un hospedero tienen mayor probabilidad de ser emergentes en comparación con los patógenos que infectan un solo hospedero. En toda enfermedad emergente se debe cumplir al menos uno de dos elementos claves, el patógeno debe ser capaz de entrar en contacto e infectar un nuevo hospedero y/o ser capaz de diseminarse de un hospedero a otro (Morse, 1995; Cleaveland *et al.*, 2001).

Patógenos que pueden ser transmitidos entre diferentes especies de hospederos son de fundamental interés e importancia desde la perspectiva de salud pública y económica. Desde la perspectiva de conservación, los patógenos que pueden ser transmitidos a través de un rango de hospederos son de especial cuidado en poblaciones pequeñas y en riesgo, mientras que los patógenos de especies específicas son altamente improbables que persistan en poblaciones pequeñas de hospederos en riesgo (McCallum y Dobson, 1995). Los patógenos que pueden infectar más de una especie y persisten en otras especies con una población amplia de hospederos, han sido responsables de muchos brotes recientes de enfermedades (Murray *et al.*, 1999; Daszak *et al.*, 2000; Cleaveland *et al.*, 2001).

5. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR

5.1 INTRODUCCIÓN

El concepto de especie fúngica se basa en características morfológicas, pruebas de entrecruzamiento o pruebas moleculares (Carrillo, 2003). *Fusarium* es un género difícil de identificar, sobre todo a nivel de especie, por lo que generalmente se acude a laboratorios especializados. Su marcada variabilidad en cuanto a las características fisiológicas y morfológicas explica la dificultad para establecer el manejo de claves taxonómicas. Además, muchas especies requieren condiciones específicas para desarrollarse adecuadamente y otras sufren mutaciones rápidamente. Esto explica la cantidad de sistemas de clasificación y especies descritas por los diversos autores (Monzón y Rodríguez, 2000).

La alta variación de *Fusarium* spp. explica la capacidad que tiene para colonizar diversos nichos ecológicos alrededor del mundo (Nelson *et al.*, 1994). Debido al impacto que tiene *Fusarium* causando enfermedad en diferentes hospederos existe la necesidad de identificar las especies involucradas en cada proceso infeccioso con el fin de evaluar la dinámica poblacional, ya que el número de especies reportadas hace algunos años ha cambiado respecto al número de especies reconocidas actualmente.

5.2 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DEL GÉNERO *Fusarium*

5.2.1 Medios de cultivo

Cuando las cepas se desarrollan en medios apropiados la identificación se puede realizar con mayor exactitud. En medios habituales como agar sabouraud y PDA las colonias se desarrollan rápidamente cubriendo la placa de cultivo (caja Petri, 9cm de diámetro) en una semana. Las características macroscópicas como textura, color y pigmentos difusibles

dependen de la especie. El color que desarrollan puede ser blanco, crema, naranja, rosa, rojizo y púrpura, entre otros, y dependen de igual forma del medio de cultivo utilizado.

Varios medios de cultivo han sido utilizados para evaluar la morfología que permita identificar las especies de *Fusarium*. Características morfológicas que pueden ser evaluadas comúnmente en un mismo medio de cultivo, pueden no estar presentes o estar alteradas en otro medio (Leslie y Summerell, 2006).

Los medios de cultivo más utilizados son agar extracto de malta, que permite evaluar características macroscópicas, microscópicas y producción de conidios. El agar papa dextrosa (PDA), es útil para evaluar aspectos morfológicos y pigmentación de la colonia; su alto contenido en carbohidratos permite un mayor crecimiento, pero poca producción de conidios. El agar avena (OA), permite evaluar velocidad de crecimiento, color, aspecto de la colonia y características microscópicas (Nelson *et al.*, 1983; Summerell *et al.*, 2003; Leslie y Summerell, 2006).

Otros medios de cultivo como agar hoja de clavel (CLA), medio con KCl, agar arena y agar nutriente sintético (SNA), entre otros, son utilizados en laboratorios especializados. La temperatura habitual de incubación de estos hongos es de 25 - 28 °C. La formación de conidios se puede estimular incubando los diferentes medios bajo oscuridad y alternando luz y temperatura (25 °C día / 20 °C noche) (Monzón y Rodríguez, 2000; Leslie y Summerell, 2006).

5.2.2 Características morfológicas

Actualmente, las características morfológicas son los criterios más empleados para la identificación de especies de *Fusarium*. La identificación se realiza con base en características macroscópicas y microscópicas, las cuales son agrupadas en características primarias y secundarias, que son usadas para separar las especies en los sistemas taxonómicos existentes (Nelson *et al.*, 1994; Carrillo, 2003; Leslie y Summerell, 2006).

Entre las características primarias, se incluye como la estructura más importante para la identificación de especie la forma de los macroconidios, los cuales pueden ser hialinos, multicelulares, curvados, rectos, con células apicales ahusadas, curvadas, en punta y con células basales en forma de pie. Los microconidios no son producidos por todas las especies de *Fusarium*, pero estos pueden ser hialinos, unicelulares, ovoides a cilíndricos, de base truncada y formarse en cabezas mucilaginosas o cadenas. El tipo de conidióforo, formación de fiálides y polifiálides y por último la presencia o ausencia de clamidosporas en masas o cadenas de pared lisa o rugosa (Nelson *et al.*, 1994; Carrillo, 2003; Leslie y Summerell, 2006).

Dentro de las características secundarias se encuentran la presencia o ausencia de esporodoquios, morfología y pigmentación de la colonia (Nelson *et al.*, 1994; Pardo y Durán, 1999).

5.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *Fusarium*

Los estudios moleculares tienen aplicación práctica pues permiten distinguir un aislamiento de otro, estas técnicas han sido desarrolladas en poco tiempo y a veces son fundamentales en el diagnóstico, sin embargo, en la rutina diaria es dudoso que suplan los métodos morfológicos tradicionales. El uso de herramientas moleculares ha permitido estudiar características estables en el ADN (Arenas, 2006).

La principal estrategia de identificación molecular de hongos filamentosos es la secuenciación de ADN. Para esto, se deben evaluar regiones altamente conservadas, las cuales deben flanquear regiones con alta variabilidad de secuencias, para poder discriminar entre géneros y especies (Wengenack y Binnicker, 2009).

En hongos las regiones más evaluadas son ITS1 e ITS2, entre las subunidades ribosomales 18S y 28S, sin embargo, en algunos casos no se logra suficiente variabilidad, por lo cual se han utilizado otros genes como: Factor de elongación 1 α , subunidad 18S de RNA

ribosomal, subunidad 28S de RNA ribosomal, subunidad más grande de la RNA polimerasa II (β') y la segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II (β) (James *et al.*, 2006; Wengenack y Binnicker, 2009).

Los análisis de secuencias de espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosomal permiten identificar y evaluar las relaciones filogenéticas entre taxas distantes por las secuencias altamente conservadas y las tasas de evolución lentas (Hillis y Dixon, 1991; Baldwin *et al.*, 1995; Aguilar, 2002). Los genes de ADN ribosomal son familias multigénicas con repeticiones en tándem, con regiones génicas y espaciadores, donde cada unidad repetitiva posee una copia de las subunidades 18S, 5.8S, 28S, dos espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) y un espaciador intergénico (IGS) (O'Donnell, 1992). La región de espaciadores internos transcritos (ITS), considerada región altamente conservada, está formada por el ITS 1, la subunidad 5.8S y el ITS 2 (Baldwin *et al.*, 1995).

El factor de elongación 1α codifica para una región de una proteína altamente conservada involucrada en el proceso de traducción (Roger *et al.*, 1999; Geiser *et al.*, 2004); ha sido utilizada para el análisis filogenético de muchas especies así como de especies de *Fusarium*. Los cebadores EF1-2 y EF3-22 han sido utilizados para investigar linajes en el complejo de *Fusarium oxysporum* (O'Donnell, 1998). Estos cebadores amplifican 700pb de la región EF, la cual flanquea tres intrones, constituyendo más de la mitad de la longitud del amplicón en las especies de *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004).

5.4 METODOLOGÍA

5.4.1 Descripción de la muestra

Se evaluaron 40 aislamientos del género *Fusarium*, 30 aislamientos provenientes de la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana y 10 aislamientos de la colección de microorganismos del Instituto Nacional de Cancerología y La Corporación

de Investigaciones Biológicas (CIB). Todos los aislamientos fueron conservados en agua destilada estéril y papel de filtro estéril a partir de cultivos monospóricos (Tabla 5.1).

La identificación morfológica fue realizada a los 40 aislamientos debido a las diferencias observadas en la identificación morfológica y molecular reportada en el trabajo realizado por Vega (2009). Se realizó una identificación de forma más rigurosa como se describe más adelante. La identificación molecular solo se realizó a los 10 aislamientos de origen humano sistémico.

Tabla 5.1. Origen de los aislamientos de *Fusarium* spp.

Código	Fuente	Origen	Código	Fuente	Origen
108	Bovino	HL en ojo	302	Vegetal	Haces vasculares de clavel
111	Canino	HL superficial extremidad	303	Vegetal	Haces vasculares de tomate
121	Canino	HL superficial lomo anterior	308	Vegetal	Haces vasculares de tomate
131	Canino	RL superficial lomo anterior	309	Vegetal	Haces vasculares de tomate
155	Canino	RL superficial lomo anterior	310	Vegetal	Haces vasculares de tomate
156	Canino	RL superficial lomo anterior	311	Vegetal	Haces vasculares de tomate
159	Canino	HL superficial articulación posterior	312	Vegetal	Haces vasculares de tomate
160	Bovino	RL cutánea zona media del lomo	313	Vegetal	Haces vasculares de clavel
161	Canino	RL cutánea en cola	314	Vegetal	Haces vasculares de clavel
162	Canino	HL cutánea lomo superior	315	Vegetal	Haces vasculares de clavel
201	Humano	Onicomycosis	401	Humano	Hemocultivos
202	Humano	Onicomycosis	402	Humano	Hemocultivos
203	Humano	Queratitis	403	Humano	Hemocultivos
204	Humano	Onicomycosis	404	Humano	Hemocultivos
205	Humano	Onicomycosis	405	Humano	Hemocultivos
206	Humano	Onicomycosis	406	Humano	Hemocultivos
207	Humano	Onicomycosis	407	Humano	Hemocultivos
208	Humano	Onicomycosis	408	Humano	Hemocultivos
209	Humano	Onicomycosis	409	Humano	Hemocultivo
210	Humano	Onicomycosis	410	Humano	Hemocultivo

HL Hisopado lesión RL Rasgado lesión

5.4.2 Identificación morfológica

Para la identificación morfológica de las especies de *Fusarium*, las cepas fueron recuperadas en PDA e incubadas a 28°C por 7 días, se verificó pureza por observación microscópica con azul de lactofenol y se procedió a realizar una segunda siembra en el mismo agar bajo las mismas condiciones. Cumplidos los 7 días de incubación se evaluaron características macroscópicas (color, textura y pigmentos difusibles al medio) y se realizaron los montajes correspondientes en agar hojas de clavel (CLA) y microcultivos en PDA, CLA y OA.

Las siembras en CLA fueron evaluadas a los 7, 14 y 21 días de incubación a 28°C y los microcultivos a los 7 días de incubación a la misma temperatura. La lectura se realizó bajo observaciones microscópicas en aumento 100X y se realizaron mediciones de macroconidios, microconidios y fiálides. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Para la identificación morfológica se tuvieron en cuenta las claves de Nelson *et al.*, 1983; Leslie y Summerell, 2006 y Samson *et al.*, 2004, manejando los parámetros indicados en el formato (Anexo 5.1).

5.4.3 Identificación molecular

5.4.3.1 Extracción de ADN genómico

Para realizar la extracción de ADN fúngico se tomó como base el método propuesto por Ávila *et al.* (2007) (Anexo 5.3). Una vez se obtuvo el ADN se verificó la calidad de la extracción mediante electroforesis, utilizando un gel de agarosa al 1%. El ADN extraído fue tratado con 1mg/ml de ARNasa para su purificación, posteriormente se incubó en baño serológico a 37°C por dos horas.

5.4.3.2 Técnicas de PCR

Amplificación de espaciadores internos transcritos (ITS)

Para realizar la reacción en cadena de polimerasa (PCR), se utilizaron 2 μL de ADN a una concentración de 50ng/ μL , amplificando regiones ITS, para lo cual se usaron los cebadores, ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') siguiendo la metodología utilizada por Castro *et al.* (2008) (Tabla 5.2).

Tabla 5.2.

Condiciones de reacción utilizadas para amplificar regiones ITS 4 – ITS 5

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final en reacción	Volumen por reacción de 25 μl
ddh ₂ O	---	---	17,8 μL
Buffer	10x	1x	2,5 μL
MgCl ₂	50mM	2mM	1 μL
Mix dNTPs	10mM	0,2mM	0,5 μL
Cebador 1 (ITS 4)	10 μM	0,2 μM	0,5 μL
Cebador 2 (ITS 5)	10 μM	0,2 μM	0,5 μL
DNA	50 ng/ μL	100ng	2 μL
Taq polimerasa	5U/ μL	1U	0,2 μL

Las reacciones de PCR fueron realizadas teniendo en cuenta las siguientes condiciones: una denaturación inicial de 96°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (denaturación a 96°C por 1 min, anillamiento a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min) y una extensión final de 72°C por 10 min. El producto fue evaluado en gel de agarosa al 1.5%. La electroforesis se corrió a 70 Voltios en buffer TAE 1x.

Una vez se verificó la presencia de bandas entre 500-600 bp se realizó una purificación del amplificado utilizando el kit Wizard (Anexo 5.4), y posteriormente se envió a Macrogen Korea para ser secuenciado.

Amplificación de Factor de elongación traduccional 1-alfa (EF 1 α) 1-2 y 3-22

Para la reacción de PCR, se utilizaron 2 μ L de ADN a una concentración de 50ng/ μ L, amplificando la región de Factor de elongación 1 α utilizando cebadores de exones conservados, EF-1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'), EF-2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'), EF-3 (5'-GTAAGGAGGASAAGACTCACC-3') y EF-22 (5'-AGGAACCCTTACCGAGCTC -3') siguiendo la metodología utilizada por O'Donnell *et al.* (1998) y Lewis *et al.* (2002) (Tabla 5.3).

Tabla 5.3.

Condiciones de reacción utilizadas para amplificar regiones EF1-2 y EF 3-22

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final en reacción	Volumen por reacción de 25 μl
ddH ₂ O	---	---	15,8 μ L
Buffer	10X	1X	2,5 μ L
MgCl ₂	50mM	3mM	1,5 μ L
Mix dNTP's	10mM	0,2mM	0,5 μ L
Cebador 1(EF1)	10 μ M	0,5 μ M	1,25 μ L
Cebador 2 (EF2)	10 μ M	0,5 μ M	1,25 μ L
DNA	50 ng/ μ L	100ng	2 μ L
Taq polimerasa	5U/ μ L	1U	0,2 μ L

Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95°C por 6 min, seguido por 40 ciclos de amplificación (denaturación a 95°C por 30 seg, anillamiento a 56°C por 20 seg, extensión a 72°C por 2 min) y una extensión final de 72°C

por 5 min. La electroforesis se corrió a 70 Voltios en buffer TAE 1x y el producto se visualizó en gel de agarosa al 1,5%.

Después de verificar las bandas con un peso molecular aproximado de 700 bp se realizó una purificación del amplificado del gen utilizando el kit Wizard (Anexo 5.4), y posteriormente se envió a secuenciar a Macrogen Korea.

5.4.4 Análisis de las secuencia ITS 4-5, EF 1-2 y EF 3-22

Recibidas las secuencias se realizó un alineamiento entre las secuencias “forward” y “reverse” de cada aislamiento, para evaluar la calidad de cada base obtenida y eliminar fragmentos de baja calidad. A partir de las secuencias consenso se realizó un alineamiento por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para tener una identificación preliminar del hongo.

Posteriormente, se realizaron alineamientos de las secuencias consenso con el programa CLC DNA Workbench 5.1 (<http://www.download3000.com/download-clc-dna-workbench-count-reg-13733.html>) para hacer la identificación taxonómica comparando con secuencias reportadas en Genbank. Luego se realizaron análisis filogenéticos de máxima parsimonia con el programa SeaView 4 (<http://en.bio-soft.net/format/SeaView.html>) alineando las secuencias por el algoritmo Muscle (Edgar, 2004) para posteriormente generar un cladograma (1000 pseudoréplicas). Finalmente, los cladogramas se editaron con el programa FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5.1 Identificación morfológica de los aislamientos de *Fusarium*

La identificación de los 40 aislamientos bajo características macroscópicas y microscópicas utilizando las claves taxonómicas descritas por Nelson *et al.* (1983), Leslie y Summerell (2006) y Samson *et al.* (2004) se muestran en el anexo 5.1.

El 90% (36/40) de los aislamientos fueron identificados claramente a nivel de especie, donde el 65% correspondió a *Fusarium oxysporum*, seguido de *F. sporotrichoides* (7,5%), *F. solani* (7,5%), *F. equiseti* (5%) y *F. verticillioides* (5%) (Figura 5.1).

Fusarium oxysporum fue la especie más común lo que concuerda con lo reportado por otros autores en la identificación fenotípica de aislamientos de *Fusarium* clínicos y fitopatógenos (Hoog *et al.*, 2003; Dignani y Anaissie, 2004). Se observó variabilidad en cuanto a características fisiológicas y morfológicas en el 10% de los aislamientos, explicando la dificultad para el manejo de claves taxonómicas, la cantidad de clasificaciones y especies descritas por los diversos autores (Monzón y Rodríguez, 2000).

Del 10% (4/40) de los aislamientos que difícilmente se identificaron, dos (5%), de origen animal y humano sistémico (Figura 5.1), presentaron características morfológicas compatibles con dos especies (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*), posiblemente porque requieren de condiciones específicas para desarrollarse adecuadamente o por mutaciones generadas en los cultivos (Figura 5.2). Un aislamiento (2,5%) no pudo ser identificado a nivel de especie por presentar características morfológicas atípicas y un aislamiento (2,5%) correspondió al género *Acremonium*.

Finalmente las cepas que presentaron dualidad morfológica fueron clasificadas así: la cepa 155 de origen animal como *F. verticillioides* por presentar monofiálides verticiladas, orejas de conejo y microconidios de base truncada. Respecto a *F. proliferatum* no se observaron polifiálides pero sí falsas cabezas mucilaginosas. La cepa 203 de origen humano superficial se clasificó como *F. proliferatum* por presentar monofiálides no verticiladas, polifiálides y falsas cabezas mucilaginosas (Figura 5.2).

El aislamiento de origen humano sistémico identificado como *Acremonium* estaba clasificado como *Fusarium solani*, al momento de la donación de las cepas. *Acremonium* presenta características morfológicas compatibles con el género *Fusarium*, donde estructuras como fiálides, falsas cabezas mucilaginosas y microconidios pueden

comunmente ser confundidas. *Acremonium* fácilmente puede ser confundido con *F. solani* ya que esta especie difícilmente desarrolla macroconidios, característica que debe ser evaluada cuidadosamente para evitar errores al momento de la identificación.

Figura 5.1. Porcentaje de distribución de especies de *Fusarium* identificadas por morfología

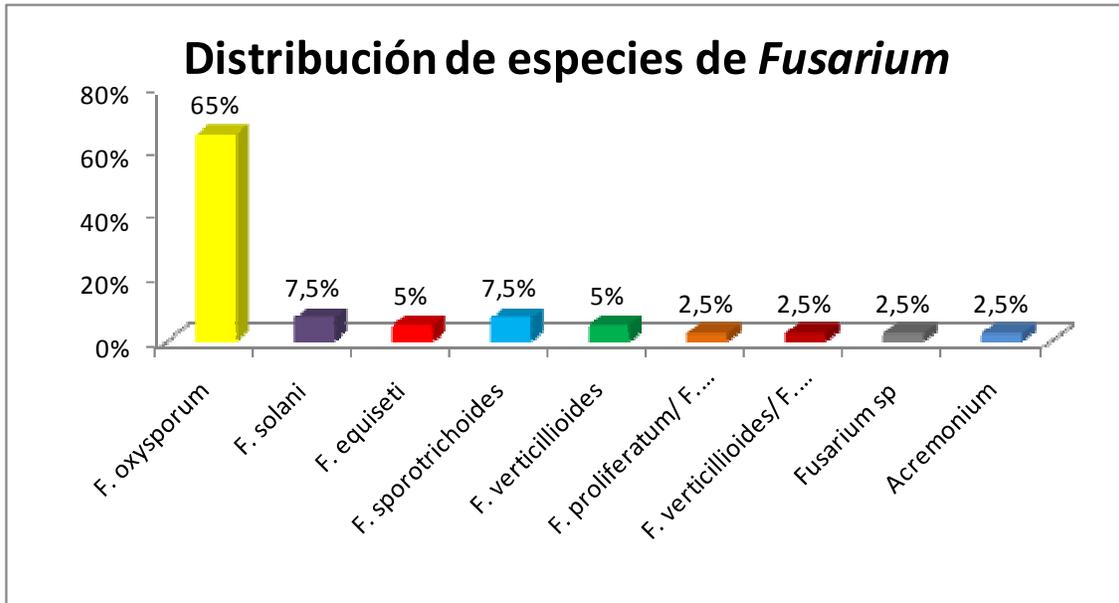
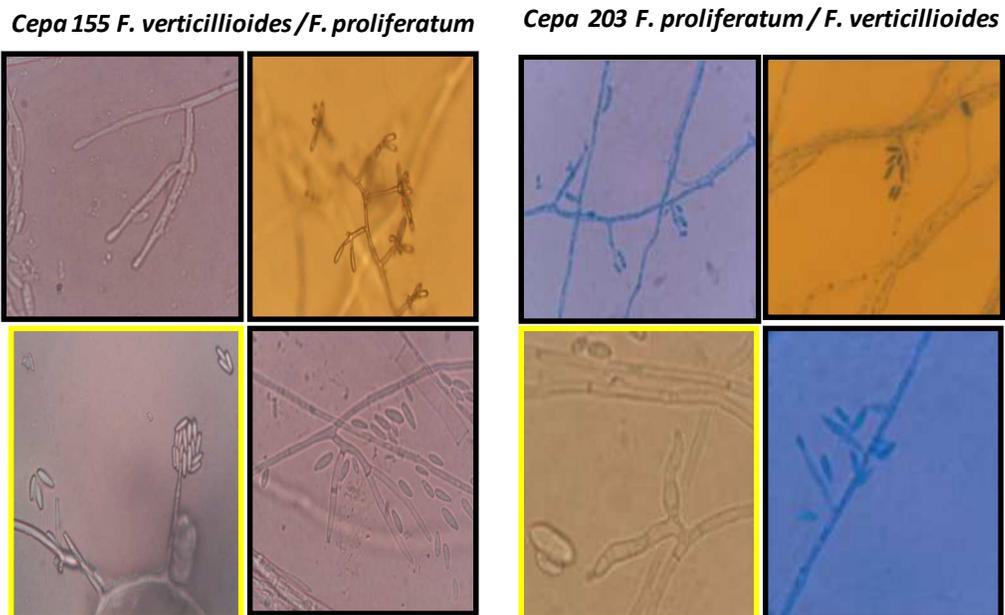


Figura 5.2. Fotos identificación morfológica.



La distribución de especies por origen de aislamiento muestra a *Fusarium oxysporum* como la especie más representativa, en el origen humano superficial 80% (8/10), humano sistémico 70% (7/10) y vegetal 100% (10/10). En este último origen podría haber un sesgo ya que los aislamientos se hicieron a partir de plantas de tomate y clavel con sintomatología típica de marchitamiento vascular, donde esta es la especie responsable de la enfermedad (Di Pietro *et al.*, 2003). Es así, como *F. oxysporum* se constituye en la especie responsable de un gran número de enfermedades en plantas y la especie más implicada en los casos clínicos de las formas diseminadas en humanos (Figura 5.3). *F. solani* solo se identificó en el 20% (2/10) de los aislamientos de origen humano sistémico. Estos resultados concuerdan con lo reportado sobre las especies más frecuentemente implicadas en fusariosis humana, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. moniliforme* (Dignani y Anaissie, 2004).

En los aislamientos de origen animal se observó la mayor diversidad de especies; encontrando a *Fusarium sporotrichioides* (30%) como la especie más representativa, seguida de *F. verticillioides* (20%) y *F. equiseti* (20%). *Fusarium oxysporum* a diferencia de los otros orígenes fue la especie menos común (Figura 5.3). Estos hallazgos difícilmente se pueden correlacionar ya que no se encuentran estudios que reporten la incidencia de *Fusarium* en especies animales, debido a que no se establece el diagnóstico por laboratorio. Sin embargo, algunas de las especies identificadas ya han sido reportadas en casos clínicos, lo cual se puede asociar como posible contagio de los humanos al contacto con los animales. Por otro lado, al ser *F. oxysporum* la especie más implicada como fitopatógeno y una de las especies con mayor incidencia en los casos clínicos humanos podría considerarse de igual forma una manera de contaminación al momento de manipular plantas en cultivos, constituyéndose en un factor de riesgo de tipo ocupacional.

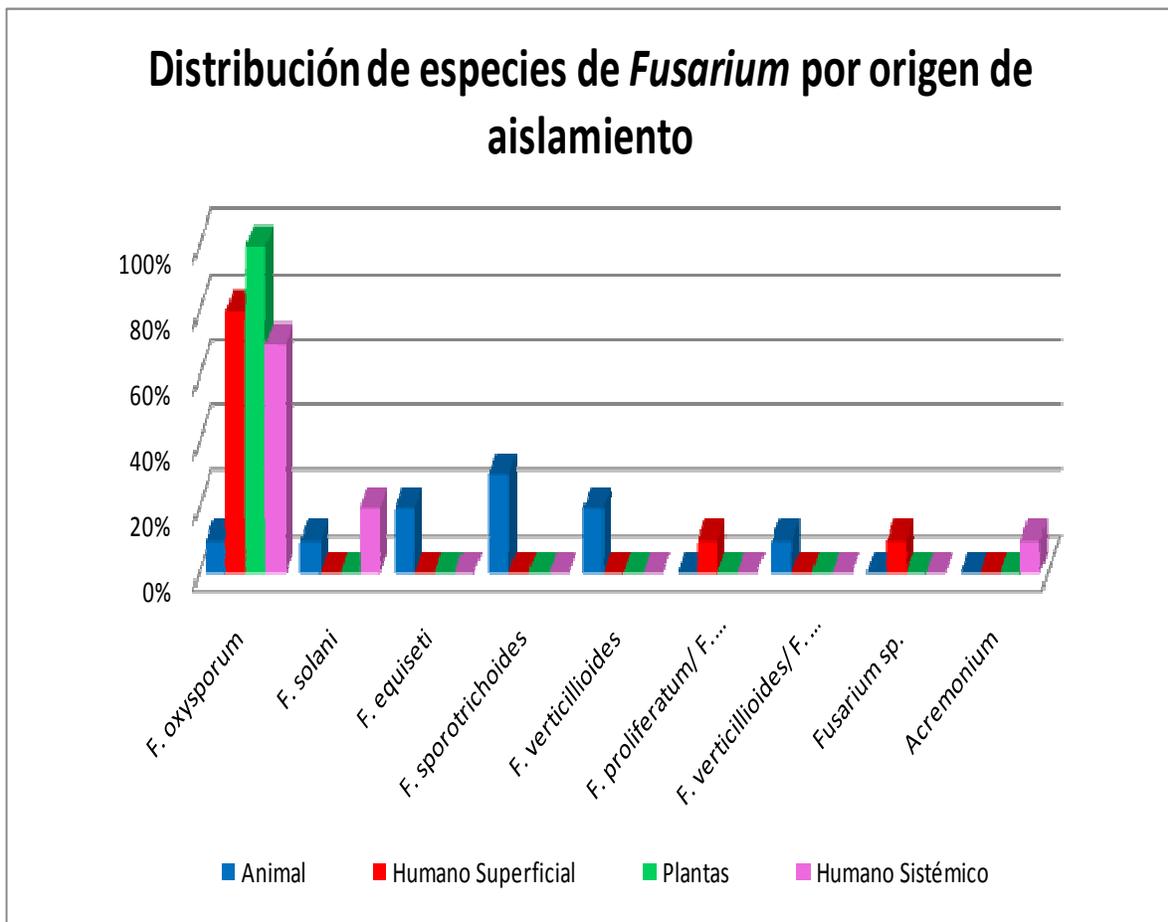
F. sporotrichioides es una especie reconocida por la producción de micotoxinas, asociada con aleukia tóxica alimentaria en humanos y toxicosis en animales (Leslie y Summerell, 2006). *F. equiseti* es reportado en toxicidad de ganado vacuno, pollos, patos, cerdos, ratones y conejos; en humanos se conoce como alérgeno (Leslie y Summerell, 2006).

F. verticillioides ha sido reportado como agente causal en enfermedad de caimanes y peces de agua fresca, en humanos puede causar infección diseminada en pacientes con cáncer y

HIV y en pacientes inmunocompetentes lesiones en piel y queratitis (Leslie y Summerell, 2006).

La especie *F. proliferatum* de origen humano superficial (onicomicosis), ha sido descrita en pacientes inmunosuprimidos e inmunocompetentes y en enfermedades de plantas, asociada a pudrición de raíz. En 1988 se reportó el primer caso fatal de infección diseminada en paciente con leucemia linfoblástica. Es importante resaltar que las onicomicosis causadas por *Fusarium* pueden constituirse en el punto de partida de las formas diseminadas (Summerell *et al.*, 1988; Leslie y Summerell, 2006).

Figura 5.3. Porcentaje de distribución de especies por origen de aislamiento.



5.5.2 Identificación molecular de los aislamientos de *Fusarium*

Los criterios para definir las especies identificadas en las comparaciones realizadas por BLASTN fueron las secuencias que coincidieran con especies definidas y “E-value” cercanos o iguales a cero, porcentajes de identidad y “score” altos. Con estas determinaciones se escogieron las cinco primeras secuencias similares a nuestra secuencia consenso, las cuales fueron registradas en una base de datos para luego seleccionar las secuencias para realizar los análisis filogenéticos.

Los resultados de la identificación molecular se muestran en la tabla 5.4 y 5.5. Las comparaciones BLAST de las secuencias ITS y EF 1 α muestran coincidencia en la identificación en el 85% (34/40), donde se identificó *F. oxysporum* (62,5%), *F. solani* (7,5%), *F. equiseti* (5%), *F. nelsonii* (7,5%), *F. verticillioides* (2,5%).

F. oxysporum fue igualmente la especie más representativa por identificación molecular, en el origen humano superficial 80% (8/10), humano sistémico 50% (5/10), vegetal 100% (10/10) y para el origen animal solo fue del 20% (2/10).

La especie *F. solani* fue identificada molecularmente en aislamientos animales 10% (1/10) y humano sistémico 30% (3/10), *F. nelsonii* 10% y 20% (1-2/10) en los aislamientos de animales y humanos superficial respectivamente y *F. equiseti* 20% (2/10) únicamente en los aislamientos de origen animal. En los aislamientos humanos sistémicos es importante resaltar la identificación molecular de dos aislamientos como *Acremonium*.

Se observaron discrepancias del 15% (6/40) de los aislamientos entre los patrones moleculares evaluados (ITS y EF 1 α). En los aislamientos de origen animal, humano superficial y vegetal 7,5% (3) y para los aislamientos de origen humano sistémico 7,5%(3) entre ITS y EF 1-2. Teniendo en cuenta que para los aislamientos de origen humano sistémico se secuenciaron regiones EF 3-22 se encontró diferencias del 20% (2/10) respecto a EF 1-2.

5.5.3 Comparación de la identificación morfológica y molecular

Los resultados de la identificación morfológica y molecular de los 40 aislamientos son concordantes en el 75% (30/40) de los casos (Tabla 5.4 y 5.5). *Fusarium oxysporum* que es la especie más común se identificó en un 60% (24), seguido de *F. solani* 7,5% (3), *F. equiseti* 5% (2), *F. verticillioides* 2,5% (1).

Se encontraron discrepancias entre la identificación morfológica y molecular en el 25% (10/40) de los aislamientos, donde el 12,5% (5) de los aislamientos no coincidieron con ningún patrón molecular evaluado y 12,5% (5) coincidieron al menos con un patrón molecular.

En los aislamientos que no coincidieron con la identificación molecular; de los tres aislamientos identificados morfológicamente como *F. sporotrichioides*, dos (cepa 121 y 159) fueron molecularmente identificados como *F. nelsonii*, dato no validado ya que morfológicamente se observaron monofiáides. El otro aislamiento identificado como *F. oxysporum*, de igual forma no fue validado ya que se observaron mono y polifiáides.

El aislamiento identificado morfológicamente como *F. oxysporum* y reportado molecularmente como *Acremonium*, *Trichoderma* y *F. solani* no se acepta porque fue la especie que menos dificultad presentó en la identificación morfológica y por sus estructuras características de monofiáides cortas y abundantes cabezas mucilaginosas, hallazgo que cuestiona la confiabilidad de la identificación molecular.

En los aislamiento de origen humano superficial solo un aislamiento no fue identificado a nivel de especie ya que no se evidenciaron estructuras típicas, pero molecularmente se identificó como *F. nelsonii*.

En los aislamientos que coincidieron con al menos un patrón molecular; un aislamiento de origen humano sistémico identificado morfológicamente como *Acremonium* solo coincidió con la identificación molecular por ITS y el aislamiento identificado morfológicamente como *F. oxysporum* correspondió molecularmente por EF 1-2 y EF3-22. Los dos

aislamientos de origen animal identificados morfológicamente como *F. verticillioides* coincidieron molecularmente por EF1-2 y el aislamiento de origen humano superficial identificado morfológicamente como *F. proliferatum* coincidió molecularmente por ITS.

Los aislamientos de origen animal, que presentaron la mayor diversidad de especies, fueron los que mayormente presentaron discrepancias en la identificación morfológica y molecular.

Estos hallazgos muestran diversidad y variabilidad de *Fusarium* implicados en los procesos infectivos de animales, plantas y humanos; cuestionando la utilidad de estos marcadores para la identificación de especies, lo cual dificulta la interpretación de los resultados y muestra la posible adaptación en condiciones cambiantes en diferentes tipos de hospederos.

Tabla 5.4 Comparación de la identificación morfológica y molecular de *Fusarium* spp. (Origen animal, humano superficial y vegetal).

Cepa	ID Morfológica		Identificación por ITS				Identificación por EF 1-2				
	Especie	N° Acceso	Especie	E-value	Score	% Id	N° Acceso	Especie	E-value	Score	% Id
108	<i>F. solani</i>	EU326189	<i>F. solani</i>	0	574	100	DQ220264	<i>F. solani</i>	1,01E-171	308	100
111	<i>F. equiseti</i>	AY147362	<i>F. equiseti</i>	0	503	100	AJ543570	<i>F. equiseti</i>	6,52E-117	216	96
121	<i>F. sporotrichoides</i>	GQ505436	<i>F. nelsonii</i>	0	529	99	GQ505404	<i>F. nelsonii</i>	0	514	97
131	<i>F. equiseti</i>	AY147362	<i>F. equiseti</i>	0	508	100	DQ842092	<i>F. equiseti</i>	0	523	97
155	<i>F. verticillioides</i>	EF577235	<i>F. proliferatum</i>	0	548	100	FN179343	<i>F. verticillioides</i>	9,70E-172	308	100
156	<i>F. verticillioides</i>	X94166	<i>F. verticillioides</i>	0	519	100	FN179339	<i>F. verticillioides</i>	0	608	100
159	<i>F. sporotrichoides</i>	GQ505436	<i>F. nelsonii</i>	0	530	99	GQ505404	<i>F. nelsonii</i>	0,00E+00	515	97
160	<i>F. sporotrichoides</i>	EU839386	<i>F. oxysporum</i>	0	546	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	628	100
161	<i>F. verticillioides</i>	EU821467	<i>F. proliferatum</i>	0	473	100	FN179339	<i>F. verticillioides</i>	0	606	100
162	<i>F. oxysporum</i>	DQ132824	<i>F. oxysporum</i>	0	472	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	598	100
201	<i>Fusarium</i> sp	GQ505436	<i>F. nelsonii</i>	0	525	99	GQ505404	<i>F. nelsonii</i>	2,48E-94	178	96
202	<i>F. oxysporum</i>	EU839389	<i>F. oxysporum</i>	0	534	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	595	100
203	<i>F. proliferatum</i>	EU821467	<i>F. proliferatum</i>	0	515	100	FN179343	<i>F. verticillioides</i>	0	616	100
204	<i>F. oxysporum</i>	EU839389	<i>F. oxysporum</i>	0	526	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	585	100
205	<i>F. oxysporum</i>	EU715659	<i>F. oxysporum</i>	0	477	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	600	100
206	<i>F. oxysporum</i>	DQ132824	<i>F. oxysporum</i>	0	477	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	590	100
207	<i>F. oxysporum</i>	EU715659	<i>F. oxysporum</i>	0	480	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	630	100
208	<i>F. oxysporum</i>	EU715659	<i>F. oxysporum</i>	1,90E-135	247	100	DQ837687	<i>F. oxysporum</i>	0	592	98
209	<i>F. oxysporum</i>	EU839389	<i>F. oxysporum</i>	0	528	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	620	100
210	<i>F. oxysporum</i>	EU715659	<i>F. oxysporum</i>	5,16E-117	216	100	GU170546	<i>F. oxysporum</i>	0	589	100
302	<i>F. oxysporum</i>	EU839393	<i>F. oxysporum</i>	0	481	100	EU246549	<i>F. oxysporum</i>	0	334	100
303	<i>F. oxysporum</i>	FJ157215	<i>F. oxysporum</i>	0	468	100	DQ487324	<i>F. oxysporum</i>	0	616	100
308	<i>F. oxysporum</i>	EU715659	<i>F. oxysporum</i>	0	461	100	DQ837687	<i>F. oxysporum</i>	0	583	98
309	<i>F. oxysporum</i>	AF322074	<i>F. oxysporum</i>	0	557	100	DQ465933	<i>F. oxysporum</i>	0	624	100
310	<i>F. oxysporum</i>	FJ157215	<i>F. oxysporum</i>	8,53E-62	123	100	FJ985404	<i>F. oxysporum</i>	0	569	100
311	<i>F. oxysporum</i>	EU839377	<i>F. oxysporum</i>	0	528	100	FJ939699	<i>F. oxysporum</i>	0	619	100
312	<i>F. oxysporum</i>	EU715659	<i>F. oxysporum</i>	0	473	100	DQ837676	<i>F. oxysporum</i>	0	624	100
313	<i>F. oxysporum</i>	AB470894	<i>F. oxysporum</i>	0	469	100	DQ837676	<i>F. oxysporum</i>	0	633	100
314	<i>F. oxysporum</i>	EU839385	<i>F. oxysporum</i>	0	541	100	DQ220127	<i>F. oxysporum</i>	0	328	100
315	<i>F. oxysporum</i>	EU715659	<i>F. oxysporum</i>	4,29E-70	137	100	DQ837676	<i>F. oxysporum</i>	0	633	100

Tabla 5.5 Comparación de la identificación morfológica y molecular de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico

Cepa	ID Morfológica		Identificación por ITS				Identificación por EF 1-2					Identificación por EF 3-22				
	Especie	N° Acceso	Especie	E-value	Score	% Id	N° Acceso	Especie	E-value	Score	% Id	N° Acceso	Especie	E-value	Score	% Id
401	<i>F. oxysporum</i>	GU205445	<i>F. oxysporum</i>	0	455	100	GU165940	<i>F. oxysporum</i>	0	530	98	GU165956	<i>F. oxysporum</i>	0	373	98
402	<i>F. solani</i>	HQ315846	<i>F. solani</i>	1,44E-172	307	98	HQ201753	<i>F. solani</i>	0	556	98	HQ201753	<i>F. solani</i>	0	336	94
403	<i>Acremonium</i>	FR717902	<i>Acremonium strictum</i>	1,54E-135	245	95	GU165940	<i>F. oxysporum</i>	0	509	97	HQ201753	<i>F. solani</i>	0	365	96
404	<i>F. solani</i>	HQ315846	<i>F. solani</i>	7,12E-178	316	99	HQ201753	<i>F. solani</i>	0	559	98	HQ201753	<i>F. solani</i>	2,56E-39	84	99
405	<i>F. oxysporum</i>	GU205445	<i>F. oxysporum</i>	0	448	100	GU165956	<i>F. oxysporum</i>	0	523	98	GU165956	<i>F. oxysporum</i>	1,18E-145	262	96
406	<i>F. oxysporum</i>	FR717902	<i>Acremonium strictum</i>	2,73E-162	290	92	HQ342219	<i>T. vermipilum</i>	1,03E-60	120	95	HQ014854	<i>F. solani</i>	4,51E-25	60	95
407	<i>F. oxysporum</i>	GU205445	<i>F. oxysporum</i>	0	461	100	GU165940	<i>F. oxysporum</i>	0	560	99	GU165956	<i>F. oxysporum</i>	2,31E-142	257	96
408	<i>F. oxysporum</i>	GU205445	<i>F. oxysporum</i>	0	457	100	GU165940	<i>F. oxysporum</i>	0	537	98	GU165956	<i>F. oxysporum</i>	1,23E-153	276	98
409	<i>F. oxysporum</i>	GU205428	<i>F. lactis</i>	0	483	99	GU165945	<i>F. oxysporum</i>	0	386	93	GU165945	<i>F. oxysporum</i>	3,14E-119	218	93
410	<i>F. oxysporum</i>	GU205445	<i>F. oxysporum</i>	0	465	100	GU165940	<i>F. oxysporum</i>	0	546	99	GU165956	<i>F. oxysporum</i>	5,06E-134	243	98

 Discrepancia de la identificación morfológica respecto a lo molecular 10% (4/40)
 Discrepancia de lo morfológico con uno de los patrones moleculares 12,5% (5/40)
 Discrepancia de lo morfológico con todos los patrones moleculares 2,5% (1/40)

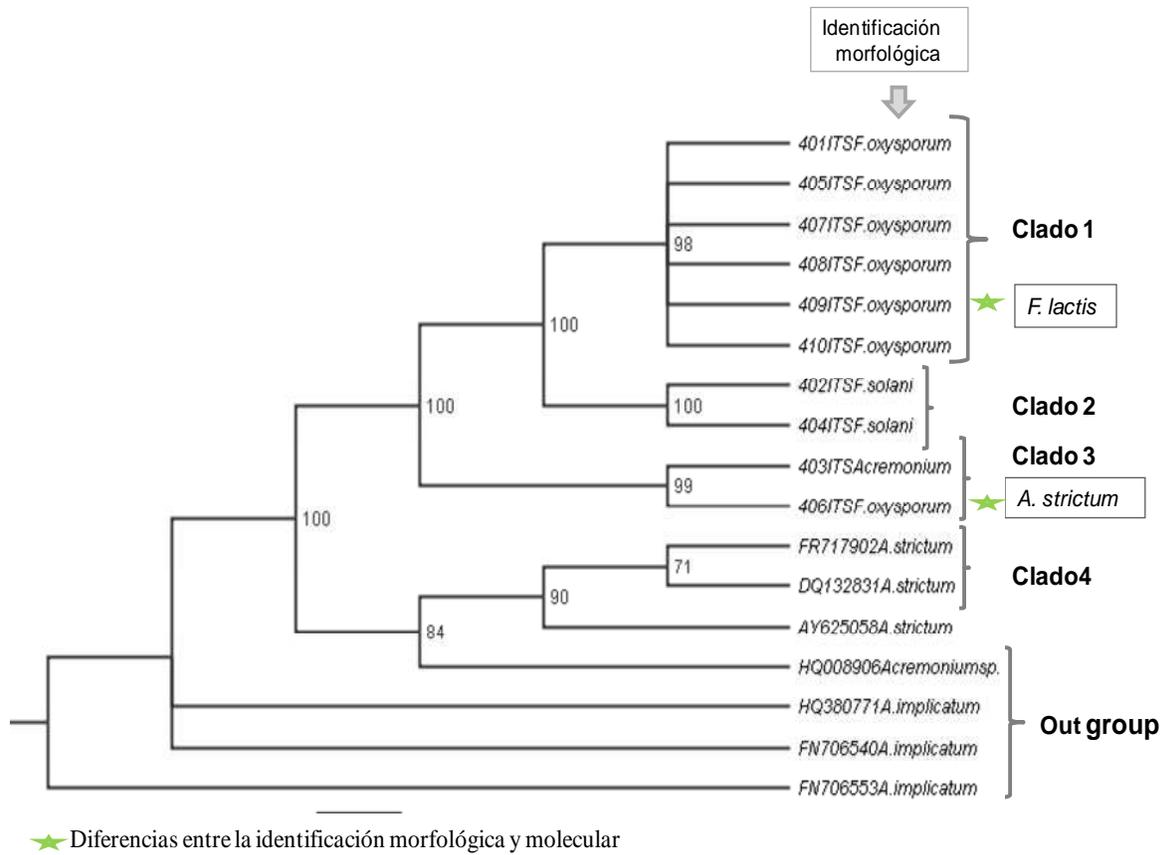
5.5.4 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso ITS de aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico.

El análisis de máxima parsimonia con el programa Sea View 4, donde se realizó un alineamiento utilizando el algoritmo Muscle para generar el cladograma de las secuencias ITS de los aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico con 1000 pseudorélicas y un grupo externo de siete secuencias de *Acremonium*, se muestra en la figura 5.4.

Se observa la formación de clados por especie identificada, en donde el clado uno, agrupa aislamientos de *F. oxysporum*, inclusive la cepa 409 que morfológicamente corresponde a *F. oxysporum*, pero de acuerdo a la secuencia ITS a *F. lactis*. Este resultado apoya la correlación que debe existir entre la identificación morfológica y molecular.

El clado dos incluye aislamientos de *F. solani*, que coinciden con ambos tipos de identificación y el clado tres formado por la cepa 403 y 406 identificadas morfológicamente como *Acremonium* y *F. oxysporum*, respectivamente. Este agrupamiento corresponde según identificación molecular, por el patrón ITS, a *Acremonium strictum* (Tabla 5.5), ubicándose cerca al clado cuatro que está formado por las secuencias del grupo externo correspondientes a la misma especie. Sin embargo, es importante resaltar que el clado tres se agrupa con los clados uno y dos formados por las especies de *F. oxysporum* y *F. solani* con bootstrap superiores a 98; mientras que el clado cuatro con bootstrap de 71, se agrupa con las secuencias del grupo externo (Figura 5.4).

**Figura 5.4. Cladograma de las secuencias ITS de los aislamientos de *Fusarium* spp.
(Origen humano sistémico)**



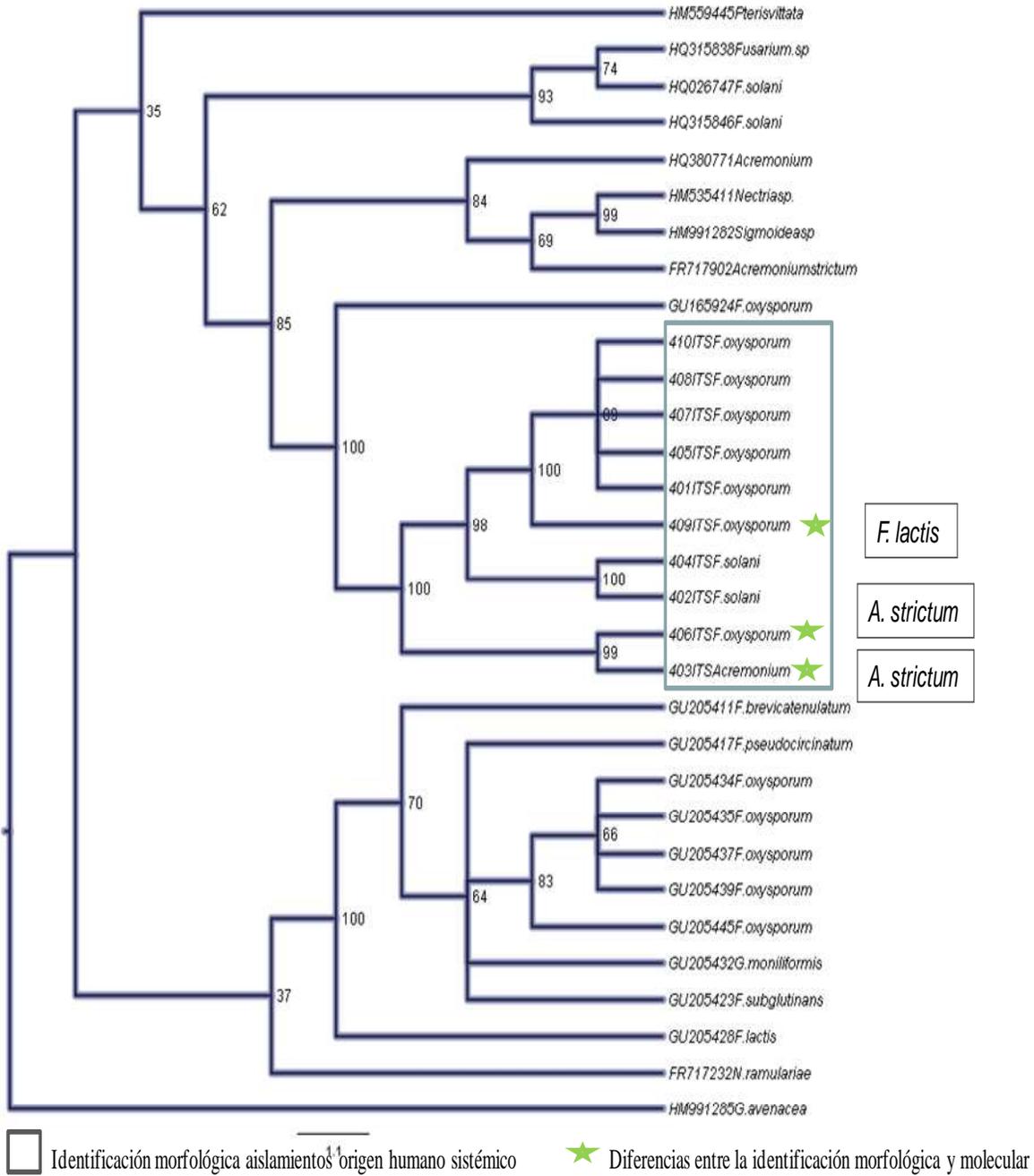
5.5.5 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso ITS de aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico y otras secuencias reportadas en el Genebank.

El análisis de máxima parsimonia con el programa Sea View 4, donde se realizó un alineamiento utilizando el algoritmo Muscle para generar el cladograma de las secuencias de espacios transcritos (ITS) de los aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico y 5 de las secuencias reportadas por Blast en el Genebank para cada uno de los aislamientos, con 1000 pseudoréplicas se muestran en la figura 5.5. De las 50 secuencias seleccionadas por BLAST teniendo en cuenta los Score, E-value y porcentaje de similitud, se quitaron las secuencias repetidas, quedando con un total de 21 secuencias por el Genebank.

Se observa agrupamiento de las secuencias de los aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico entre las secuencias del Genebank. Dentro de este grupo se forman cuatro subclados con bootstraps superiores a 89, donde la cepa 409, identificada morfológicamente como *F. oxysporum*, es independiente del agrupamiento constituido por los otros aislamientos de la misma especie; comportamiento no observado en el cladograma de la figura 5.4 que no incluye secuencias del Genebank. La cepa 406 y 403, identificadas morfológicamente como *F. oxysporum* y *Acremonium* respectivamente, forman un clado, comportamiento esperado ya que molecularmente por el patrón ITS se reportan como *Acremonium*.

Es importante resaltar que las diferentes especies de los aislamientos de origen humano sistémico no se agrupan con las mismas especies de las secuencias reportadas en el Genebank y forman parte de un clado mayor conformado por especies diferentes a *F. oxysporum*, que es la especie más representativa en los aislamientos de este origen (Figura 5.5).

**Figura 5.5. Cladograma de las secuencias ITS de los aislamientos de *Fusarium* spp.
(Origen humano sistémico vs secuencias reportadas en el Genebank)**



5.5.6 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 1-2 de aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico.

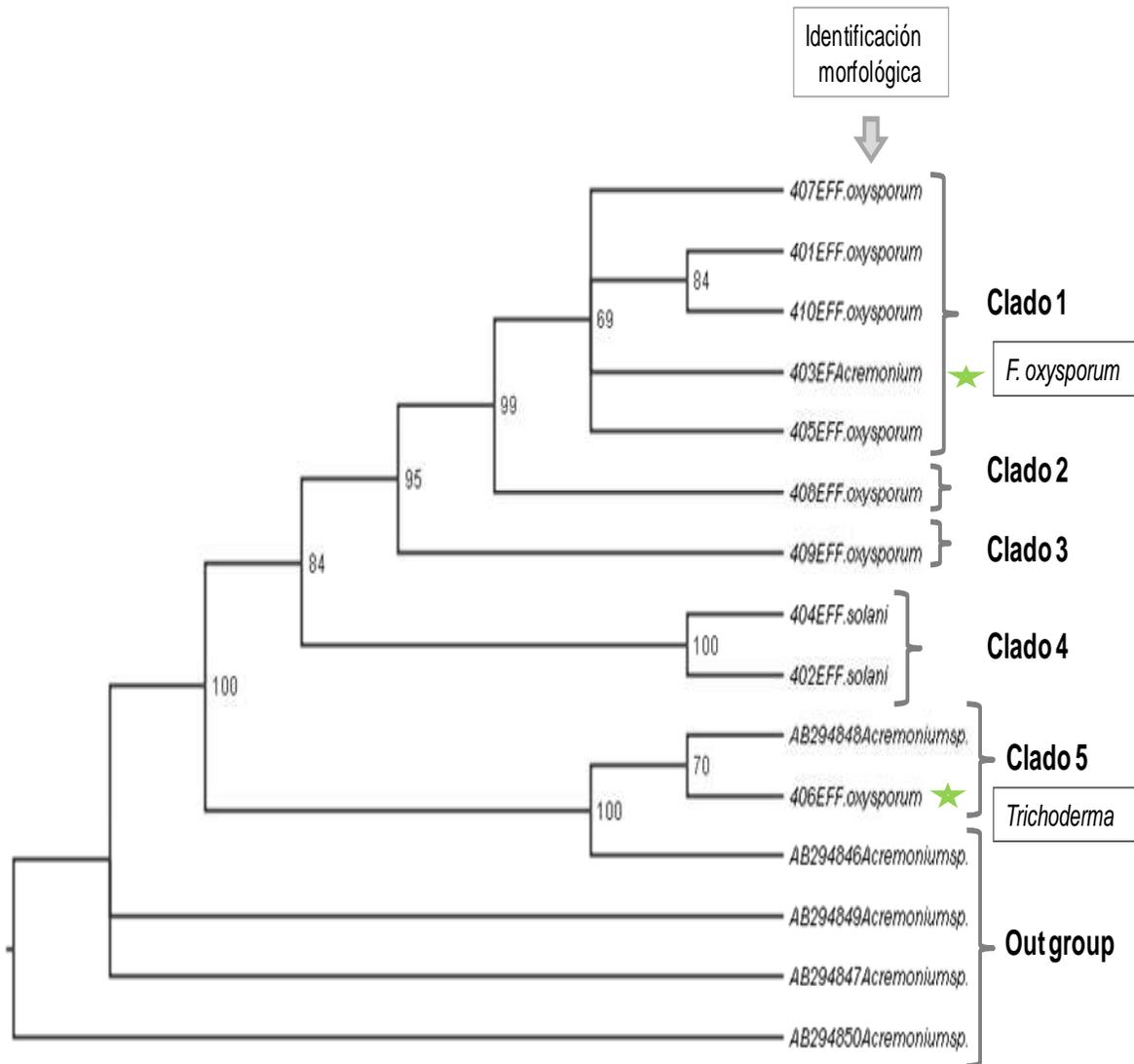
El análisis de máxima parsimonia con el programa Sea View 4, donde se realizó un alineamiento utilizando el algoritmo Muscle para generar el cladograma de las secuencias de factor de elongación (EF 1- 2) de los aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico con 1000 pseudirélicas y un grupo externo de cinco secuencias de *Acremonium* se muestra en la figura 5.6.

Se observa la formación de clados por especie identificada, donde el clado uno corresponde a aislamientos de *F. oxysporum* con un bootstrap de 69, que a su vez incluye un subclado con un bootstrap de 84, correspondiente a las cepas 401 y 410. Aquí se incluye la cepa 403, la cual morfológicamente se identificó como *Acremonium* pero molecularmente como *F. oxysporum* por el patrón EF 1-2.

El clado dos y tres se forman por un solo aislamiento (cepa 408 y 409) correspondientes a *F. oxysporum* con un bootstrap superior a 95. El clado cuatro agrupa especies de *F. solani*, comportamiento igual al observado con el patrón molecular ITS.

Por otro lado, la cepa 406 identificada morfológicamente como *F. oxysporum* se incluye en el clado 5 con dos secuencias del grupo externo correspondientes a *Acremonium*, cepa que molecularmente por el patrón EF 1-2 registra como *Trichoderma*. Este mismo comportamiento fue observado con el patrón molecular ITS, donde el patrón molecular ITS registra como *Acremonium*. De igual forma este último clado se ubica cerca a los grupos externos de *Acremonium* (Figura 5.6).

**Figura 5.6. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de *Fusarium* spp.
(Origen humano sistémico)**



★ Diferencias entre la identificación morfológica y molecular

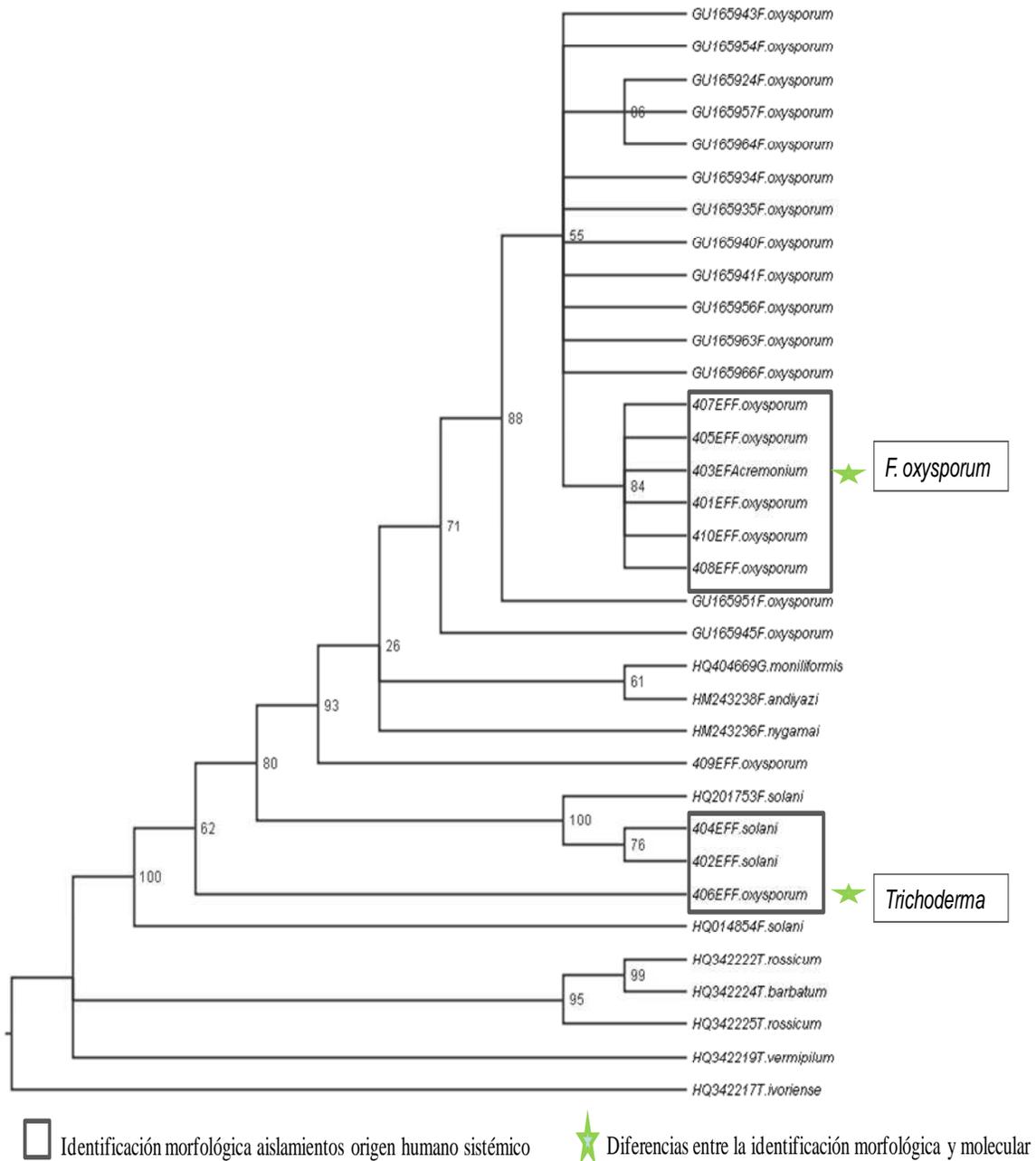
5.5.7 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 1-2 de aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico y otras secuencias reportadas en el Genebank.

El análisis de máxima parsimonia con el programa Sea View 4, donde se realizó un alineamiento utilizando el algoritmo Muscle para generar el cladograma de las secuencias de factor de elongación (EF 1-2) de los aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico y las secuencias reportadas en el Genebank, con 1000 pseudoréplicas se muestra en la figura 5.7.

A diferencia del comportamiento observado con el patrón ITS y las secuencias del Genebank, se observa agrupamiento de las especies de *Fusarium* de origen humano sistémico con las secuencias del Genebank. Se formó un clado con un bootstrap de 71 que incluye todas las especies de *F. oxysporum*, donde nuevamente se incluye la cepa 403 identificada morfológicamente como *Acremonium* y molecularmente como *F. oxysporum*. De igual forma la cepa 409 identificada morfológicamente como *F. oxysporum* con un bootstrap 93, forma un clado independiente a los otros aislamientos de la misma especie.

La cepa 406 identificada morfológicamente como *F. oxysporum* y molecularmente por EF 1-2 como *Trichoderma*, se agrupa a un clado mayor cercano a especies de *F. solani* y de forma seguida a especies de *F. oxysporum*, con un bootstrap de 62, comportamiento diferente a lo observado en la figura 5.6 donde se agrupa a secuencias de *Acremonium*. También llama la atención que no forma un clado con las secuencias del Genebank reportadas como *Trichoderma*, ya que ésta fue la identificación por el patrón molecular EF 1-2. Estos resultados muestran las posibles inconsistencias en la identificación molecular (Figura 5.7).

**Figura 5.7. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de *Fusarium* spp.
(Origen humano sistémico vs secuencias reportadas en el Genebank)**



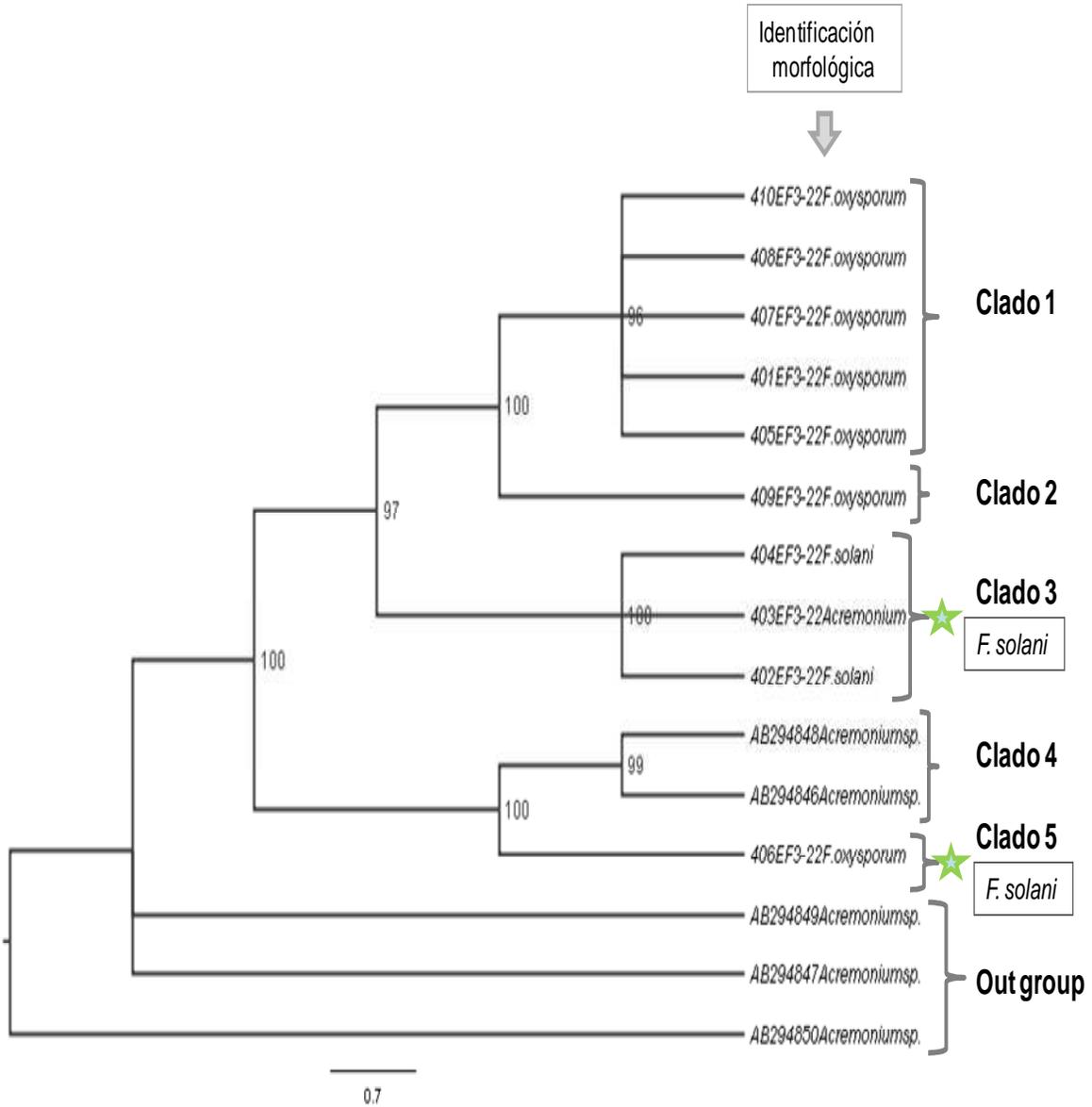
5.5.8 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 3-22 de aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico.

El análisis de máxima parsimonia con el programa Sea View 4, donde se realizó un alineamiento utilizando el algoritmo Muscle para generar el cladograma de las secuencias de factor de elongación (EF 3-22) de los aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico con 1000 pseudoréplicas y un grupo externo de cinco secuencias de *Acremonium* se muestra en la figura 5.8.

Se observa un comportamiento muy similar al observado con el patrón molecular EF 1-2 donde los clados se muestran por especie. El clado uno y dos con bootstrap de 96 y 100 respectivamente, representan especies de *F. oxysporum*, este último por una sola especie (cepa 409), comportamiento ya observado con los otros patrones moleculares. La única diferencia se representa en el clado tres formado por especies de *F. solani* que incluye la cepa 403, identificada morfológicamente como *Acremonium*, comportamiento esperado ya que por el patrón molecular EF 3-22 se identifica como *F. solani*.

El clado cinco formado por la cepa 406 identificada morfológicamente como *F. oxysporum* se agrupa en un bootstrap de 100 con aislamientos del grupo externo correspondientes a *Acremonium*; comportamiento observado con el patrón molecular EF 1-2 sin las secuencias del Genebank con un bootstrap de 70. Este comportamiento no se esperaba ya que esta cepa fue identificada molecularmente por el patrón EF 3-22 como *F. solani*.

**Figura 5.8. Cladograma de las secuencias EF 3-22 de los aislamientos de *Fusarium* spp.
(Origen humano sistémico)**



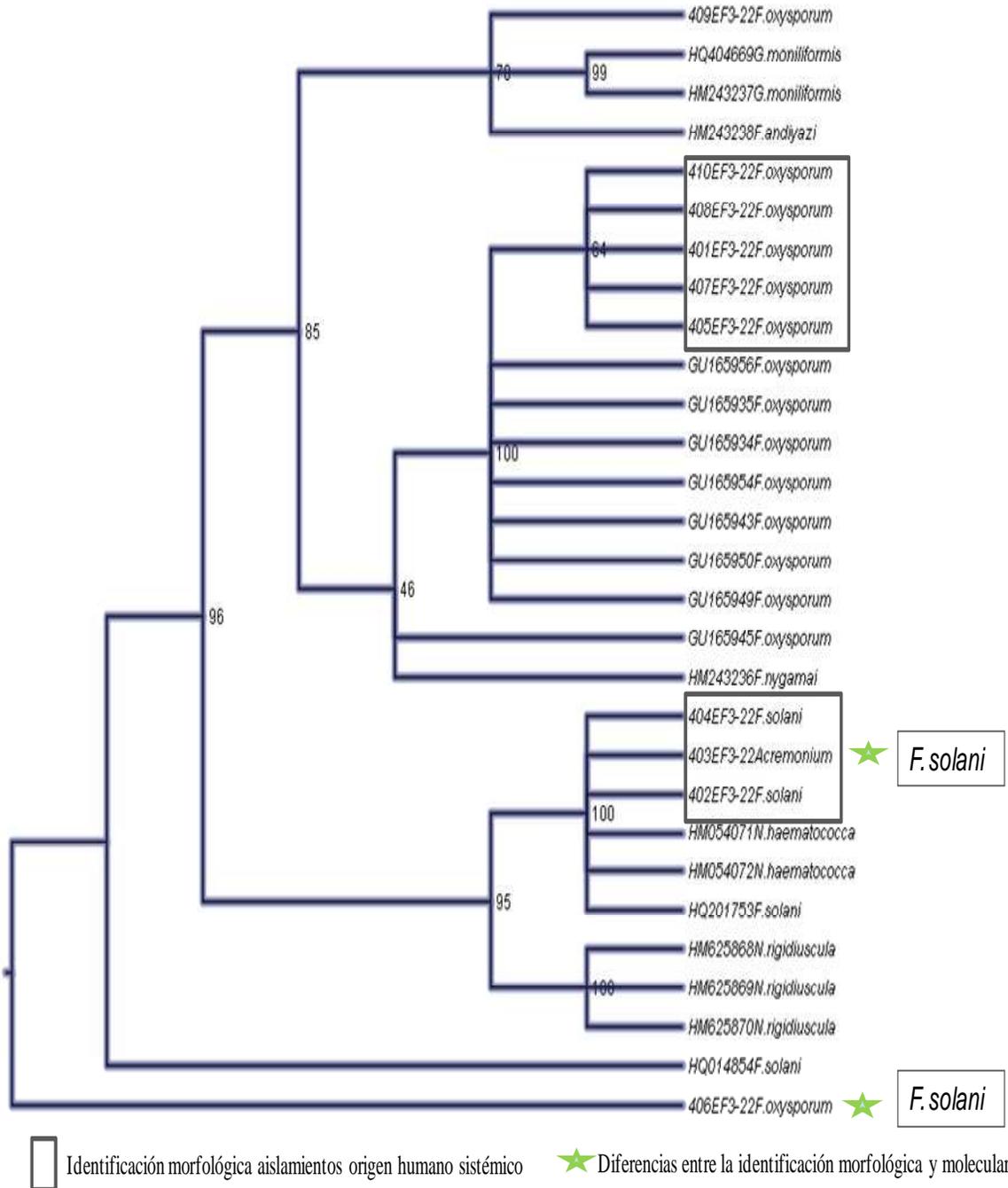
★ Diferencias entre la identificación morfológica y molecular

5.5.9 Relaciones filogenéticas de las secuencias consenso EF 3-22 de aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico y otras secuencias reportadas en el Genebank.

El análisis de máxima parsimonia con el programa Sea View 4, donde se realizó un alineamiento utilizando el algoritmo Muscle para generar el cladograma de las secuencias de factor de elongación (EF 3-22) de los aislamientos de *Fusarium* spp. de origen humano sistémico y las secuencias reportadas en el Genebank, con 1000 pseudoréplicas se muestran en la figura 5.9.

El comportamiento observado es similar al observado con EF 1-2 y las secuencias del Genebank, donde los agrupamientos se dan por especie y se incluyen dentro de las especies reportadas por el Genebank. Se observan dos grandes clados, uno formado por las especies de *F. oxysporum* con un bootstrap de 100, donde se forma un subclado que reúne los aislamientos de origen humano sistémico con un bootstrap de 64; y otro formado por especies de *F. solani* con un bootstrap de 100 donde se incluye la cepa 403. La diferencia observada respecto al patrón molecular EF 1-2 y las secuencias del Genebank es que las cepas 406 y 409 las ubica en los extremos del cladograma y no las agrupa teniendo en cuenta la identificación molecular por éste patrón (*F. solani* y *F. oxysporum* respectivamente), como lo observado en los otros cladogramas.

**Figura 5.9. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de *Fusarium* spp.
(Origen humano sistémico vs secuencias reportadas en el Genebank)**



5.5.10 Relaciones filogenéticas entre las secuencias consenso EF 1-2 de *Fusarium* spp. de los diferentes orígenes de aislamiento.

Se realizó un análisis de las secuencias de EF 1-2 reportadas por Vega (2009) de los aislamientos de origen animal, vegetal y humano superficial con las secuencias obtenidas por el mismo marcador molecular de los aislamientos de origen humano sistémico, para observar el comportamiento de las especies de los diferentes orígenes y contribuir al entendimiento de *Fusarium* como posible patógeno multihospedero. No se generaron árboles para el patrón molecular ITS ya que al realizar el análisis con el programa SeaView 4 de los 40 aislamientos, se mostraron datos divergentes. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Vega (2009) de las 30 secuencias de origen animal, vegetal y humano superficial donde los cladogramas obtenidos no son informativos. Tampoco se realizó comparación con el patrón molecular EF 3-22, debido a que no se obtuvieron secuencias por este patrón en los aislamientos trabajados por Vega (2009).

El análisis de máxima parsimonia con el programa Sea View 4, donde se realizó un alineamiento múltiple utilizando el algoritmo Muscle para generar el cladograma de las secuencias de factor de elongación (EF 1-2) de los 40 aislamientos de *Fusarium* spp. de los diferentes orígenes, con 1000 pseudoréplicas y un grupo externo de cinco secuencias de *Acremonium* se muestra en la figura 5.10.

Se observa la formación de ocho clados constituídos por especies de *F. oxysporum*. Un clado con un bootstrap de 30, que incluye quince aislamientos de origen animal, humano superficial y sistémico. En este clado se incluye la cepa 160 y 403 identificadas morfológicamente como *F. sporotrichioides* y *Acremonium*, respectivamente, pero molecularmente identificadas por este patrón como *F. oxysporum*. Otro clado con un bootstrap de 71 reúne solo aislamientos de origen vegetal; un clado con bootstrap de 63, formado por dos aislamientos (origen vegetal y animal) y cinco clados formados por un solo aislamiento, todos de origen vegetal.

Las especies identificadas como *F. verticillioides* forman un clado con un bootstrap de 90, donde se incluye la cepa 203 identificada morfológicamente y por el patrón molecular ITS como *F. proliferatum*, pero por EF 1-2 como *F. verticillioides*.

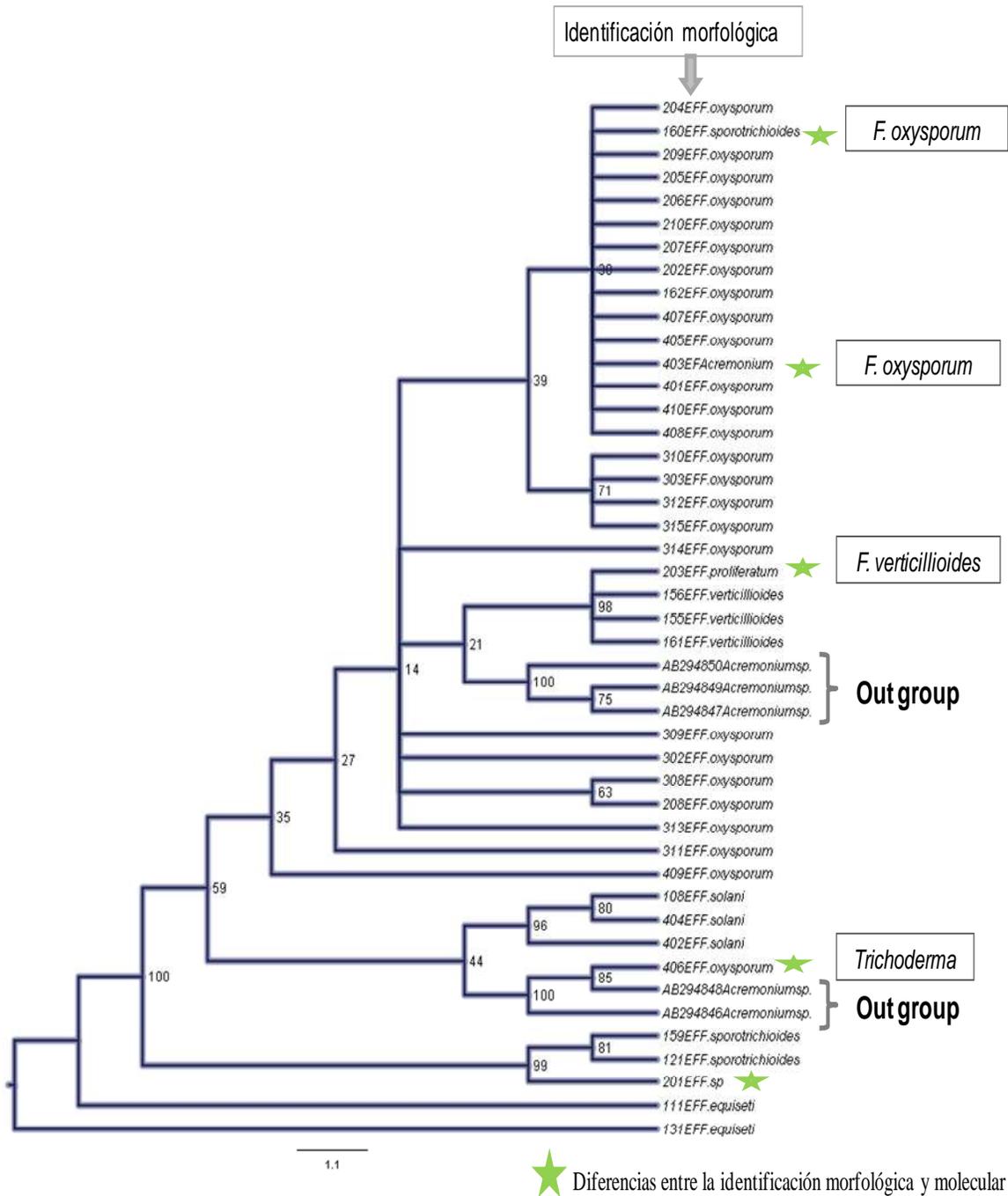
Un clado con un bootstrap de 96 incluye dentro de las cepas de origen humano sistémico identificadas como *F. solani*, a la cepa 108 de origen animal identificada igualmente como *F. solani* tanto morfológica como molecularmente.

El clado que agrupa las especies de *F. sporotrichioides*, según la identificación morfológica, incluye con un bootstrap de 99 la cepa 201 que morfológicamente no pudo ser identificada, pero molecularmente por este patrón todas corresponden a *F. nelsonii*.

Las cepas de origen animal identificadas como *F. equiseti*, tanto morfológica como molecularmente, se ubican en clados independientes. Finalmente las cepas 406 y 409 identificadas morfológicamente como *F. oxysporum* siguen el mismo comportamiento, formando clados independientes. La cepa 409 cerca de los aislamientos de origen vegetal correspondientes a la misma especie y la cepa 406 cerca al grupo externo de *Acremonium*, comportamiento no esperado ya que molecularmente por este patrón se identificó como *Trichoderma*.

Por otro lado, otro comportamiento que llama la atención, es la ubicación de tres secuencias de *Acremonium* del grupo externo entre aislamientos de *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, comportamiento que se podría asociar con la dificultad en la identificación de éste género tanto morfológica como molecularmente o, por otro lado, a la cercanía filogenética del género *Acremonium* al género *Fusarium* (Figura 5.10).

Figura 5.10. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de *Fusarium* spp. (Origen animal, vegetal, humano superficial y sistémico.)



5.5.11 Relaciones filogenéticas entre las secuencias consenso EF 1-2 de *Fusarium* spp. de los diferentes orígenes de aislamiento y otras secuencias reportadas en el Genbank.

El análisis de máxima parsimonia con el programa Sea View 4, donde se realizó un alineamiento utilizando el algoritmo Muscle para generar el cladograma de las secuencias de factor de elongación (EF 1-2) de los aislamientos de *Fusarium* spp. de origen animal, vegetal, humano superficial y sistémico y las secuencias reportadas en el Genbank, con 100 pseudorreplicas se muestran en la figura 5.11.

Partiendo de la raíz del árbol se observa la formación de 2 clados con un bootstrap de 100, uno de ellos reúne todos los aislamientos de *Fusarium* de los diferentes orígenes, agrupando los aislamientos por especie. Este comportamiento se podría asociar con la capacidad de *Fusarium* para colonizar diferentes hospederos.

En este clado se observa un subclado que agrupa todos los aislamientos de los diferentes orígenes identificados como *F. oxysporum* y las secuencias del Genbank. Este agrupamiento muestra los aislamientos de origen vegetal (serie 300) a un lado del clado, mostrando la similitud de los aislamientos, mientras que los aislamientos de origen animal, humano superficial y sistémico se distribuyen aleatoriamente al otro lado del clado. Vale la pena resaltar que nuevamente se incluye la cepa 160 y 403, identificadas molecularmente por este patrón como *F. oxysporum*, pero morfológicamente como *F. sporotrichioides* y *Acremonium* respectivamente.

Las secuencias del Genbank y de los aislamientos de *Fusarium* identificadas como *F. verticillioides* forman un clado con un bootstrap 97, donde se incluye la cepa 203 identificada molecularmente como la misma especie.

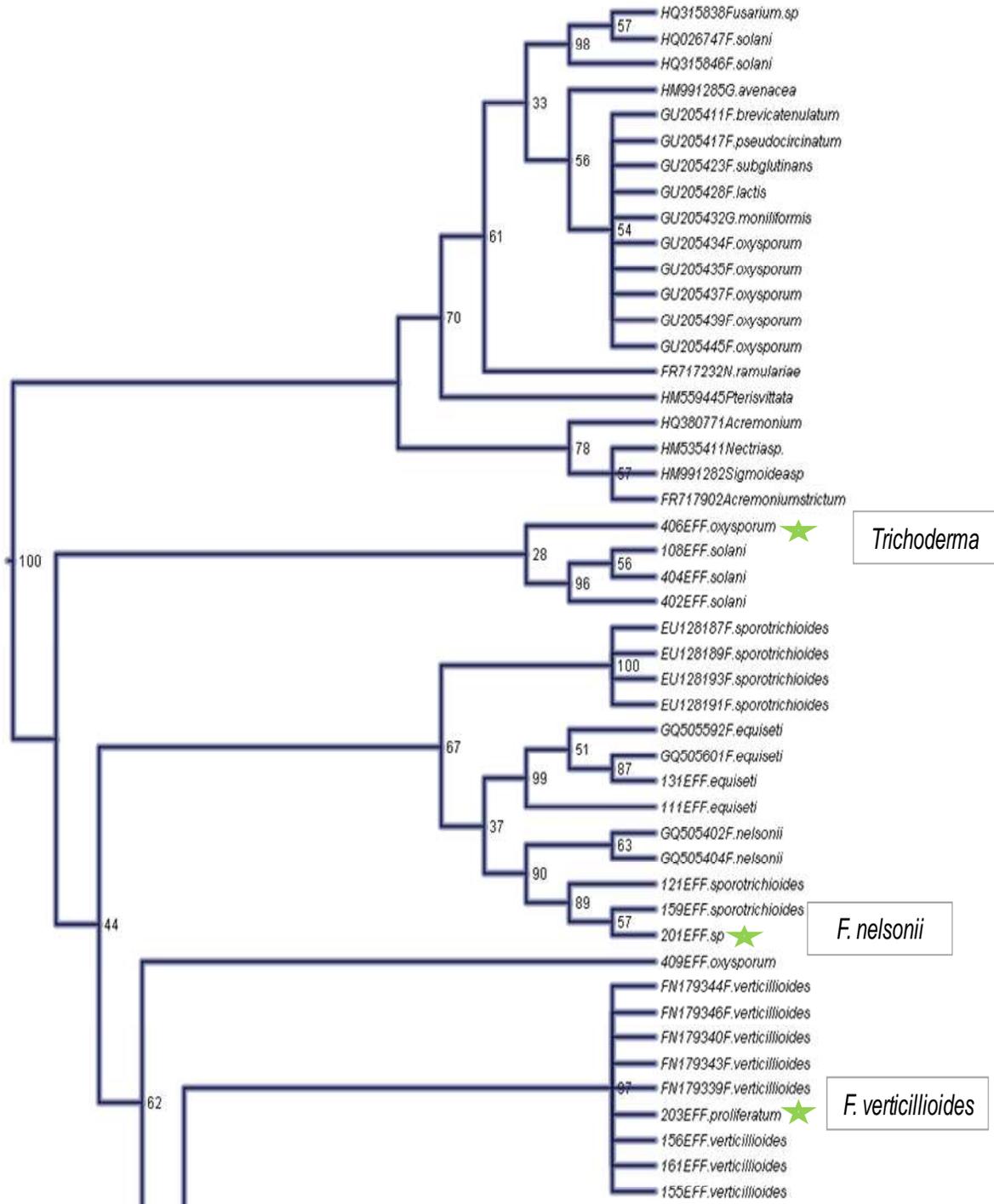
Los aislamientos de *F. sporotrichioides*, identificación morfológica, pero que molecularmente corresponden a *F. nelsonii* se agrupan en un clado con bootstrap 90, con

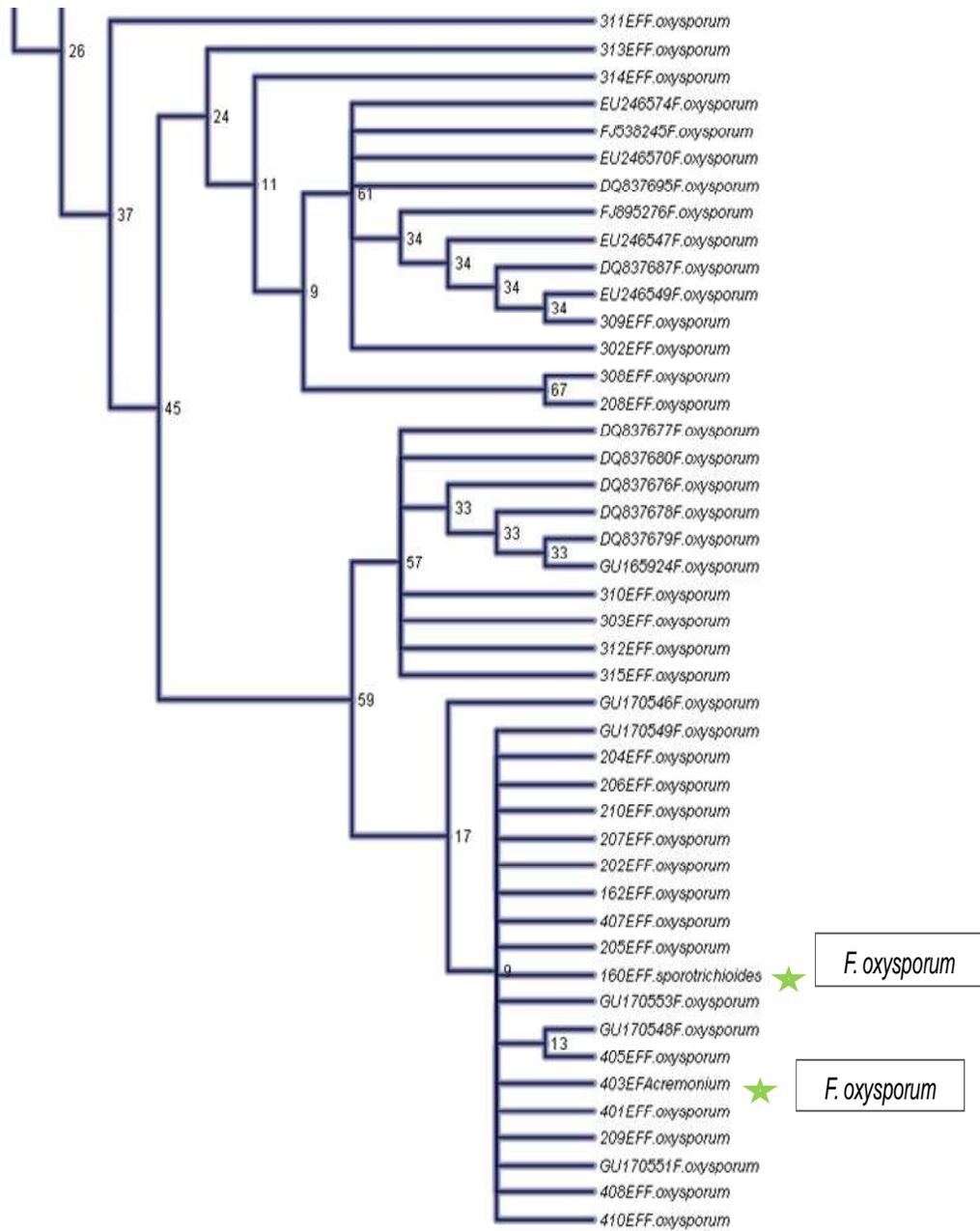
secuencias del Genebank reportadas como *F. nelsonii* y no con secuencias reportadas como *F. sporotrichioides*.

La cepa 406 identificada molecularmente por este patrón molecular como *Trichoderma* se agrupa en un clado con aislamientos de *F. solani*, los cuales no se agrupan con otras secuencias del Genebank correspondientes a la misma especie; agrupamiento observado con el patrón molecular EF1-2 y las secuencias del Genebank.

La cepa 409 identificada morfológicamente y por EF 1-2 como *F. oxysporum* forma un clado independiente entre aislamientos de *F. nelsonii* y *F. verticillioides*, comportamiento diferente al observado con los otros patrones moleculares (ITS y EF3-22) donde se ubicaba cerca a otras secuencias de *F. oxysporum* (Figura 5.5, 5.8, 5.10, 5.11).

Figura 5.11. Cladograma de las secuencias EF 1-2 de los aislamientos de *Fusarium* spp. (Origen animal, vegetal, humano superficial y sistémico vs secuencias reportadas en el Genebank.)





2.0

★ Diferencias entre la identificación morfológica y molecular

6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

6.1 INTRODUCCIÓN

Disponer de secuencias de genomas completos de hongos patógenos en plantas y animales y desarrollar protocolos para el análisis de genes funcionales, tiene un enorme potencial para el entendimiento de la interacción del hongo con el hospedero en el ciclo patogénico (Ortoneda *et al.*, 2004).

Actualmente métodos de genotipificación están siendo parte integral de laboratorios clínicos y de investigación, para distinguir cepas o clones de una especie. Los métodos de genotipificación incluyen análisis plasmídicos, ensayos de PCR, electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), tipificación de secuencias multilocus (MLST), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), secuenciación del ADN, amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP) y secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC) (Wu y Della-Latta, 2002; Fernández, 2004; Healy *et al.*, 2005). Estas técnicas facilitan los análisis epidemiológicos moleculares que buscan determinar la relación clonal que existe entre aislamientos de una misma especie, información útil para determinar clones en diferentes interacciones.

La identificación a nivel de especie es importante en el campo epidemiológico y clínico, la cual se basa en características morfológicas, método laborioso donde solo micólogos bien entrenados son capaces de asegurar el diagnóstico a nivel de género y especie. Sin embargo, casi siempre los resultados no son concluyentes y más de la mitad de los aislamientos no se logran identificar hasta especie (Healy *et al.*, 2005). Godoy y colaboradores (2004) recientemente mostraron la utilidad clínica de técnicas de PCR basada en secuencias repetitivas (rep-PCR) para genotipificación de cepas de *Fusarium*.

6.2 ERIC Y REP-PCR

Las técnicas de PCR que utilizan cebadores que hibridan al azar (AP-PCR) y la PCR que utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (rep-PCR) son las técnicas más utilizadas para tipificar bacterias y hongos (Versalovic *et al.*, 1991; Bruijn, 1992).

La técnica rep-PCR para tipificación utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (secuencias rep) que se encuentran en los cromosomas de enterobacterias, bacterias Gram positivas y hongos. Se amplifican regiones que separan las secuencias rep, donde el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y la distancia entre copias (Fernández, 2004). Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias rep que más se utilizan en estudios epidemiológicos (Versalovic *et al.*, 1991; Bruijn, 1992; Versalovic *et al.*, 1994; Rademaker *et al.*, 1998). Aunque los cebadores de ERIC y REP fueron desarrollados para genomas procariontes, estos han sido aplicados con éxito en la tipificación molecular de genomas eucariotas (Van Belkum *et al.*, 1998).

Los fragmentos amplificados son evaluados mediante una matriz de presencia/ausencia, obteniendo los perfiles de REP-PCR y ERIC-PCR genómico (fingerprinting), los cuales son analizados por programas computarizados como NTSYSpc 2.0 y Diversilab. Estos análisis permiten identificar las fuentes y las cepas involucradas en un brote, vigilar la existencia y frecuencia de especies de patógenos como *Fusarium* spp. (Healy *et al.*, 2005).

6.3 METODOLOGÍA

6.3.1 Técnicas de PCR

La caracterización molecular de los aislamientos de *Fusarium* de origen humano sistémico se realizó mediante dos reacciones de PCR, teniendo en cuenta secuencias repetitivas

extragénicas (REP) y secuencias repetitivas intragénicas (ERIC) del genoma. Los resultados fueron analizados en conjunto con los datos previamente reportados por Vega (2009), correspondientes a los aislamientos de origen animal, vegetal y humano superficial, con el fin de observar el comportamiento de todos los aislamientos de *Fusarium* en la aproximación al modelo multihospedero.

6.3.2 Amplificación de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP) y secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC).

Para amplificar las secuencias repetitivas extragénicas e intragénicas se usaron los cebadores REP 1R (5'-IIICGICGICATCIGGC-3'), REP 2I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'), ERIC 1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), siguiendo la metodología utilizada por Versalovic y colaboradores (1991). Se utilizó 1 µL de cada muestra de ADN a una concentración de 50ng/µL. Las condiciones de reacción de ERIC y REP PCR se presentan en las tablas 6.1 y 6.2.

Tabla 6.1. Condiciones de reacción de amplificación ERIC - REP PCR

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final en la reacción	Volumen por reacción de 25 µl
ddh ₂ O			12,45 µL
Buffer 5X Gitschier	5X	1X	5 µL
BSA	10mg/mL	1,6 mg/mL	0,4 µL
DMSO	100%	10%	2,5 µL
Mix dNTPs	10mM	0,5mM	1,25 µL
Cebador 1 (ERIC 1/REP1)	50µM	50pmol	1 µL
Cebador 2 (ERIC2/REP2)	50µM	50pmol	1 µL
Taq polimerasa	5U/µL	2U/µl	0,4 µL
ADN			1 µL

Tabla 6.2. Ciclos de reacción PCR para ERIC - REP

Ciclo		ERIC	REP
Denaturación inicial		95°C por 7 minutos	95°C por 7 minutos
Denaturación	30 ciclos	94°C por 1 minuto	94°C por 1 minuto
Anillamiento		52°C por 1 minuto	40°C por 1 minuto
Extensión		65°C por 8 minutos	65°C por 8 minutos
Extensión final		65°C por 16 minutos	65°C por 16 minutos

Para observar los productos de la reacción se realizó un gel de agarosa al 1.5% y la electroforesis se corrió a 50 Voltios en buffer TAE 1x. Posteriormente, se tiñó el gel con una mezcla de TAE 1x con Bromuro de etidio, protegido de la luz por 20 min. Por último, se observó y registró en el fotodocumentador de geles (Gel Doc).

La talla de los productos obtenidos se determinó por regresión logarítmica teniendo en cuenta la movilidad electroforética de los marcadores de talla molecular en cada uno de los geles, Hyperladder II (2000bp, Bioline) e Hyperladder III (5000bp, Bioline). Luego se realizó una matriz de presencia y ausencia de bandas polimórficas, la cual se analizó mediante el programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 2.0. Este programa permite la elaboración de una matriz de similitud entre los aislamientos con el índice DICE, para luego desarrollar un dendograma por el algoritmo UPGMA. El dendograma se analizó con un porcentaje de similitud del 70% teniendo en cuenta reportes de la literatura.

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la caracterización molecular por ERIC-PCR y REP-PCR se realizó teniendo en cuenta los resultados de la identificación morfológica de todos los aislamientos de *Fusarium* de los diferentes orígenes.

6.4.1 Patrones de bandeo por ERIC-PCR

El dendograma obtenido mediante el programa NTSYS analizado con un porcentaje de similitud del 70% muestra un total de 20 conglomerados con los patrones de bandeo obtenidos por ERIC-PCR, trece de ellos formados por un solo aislamiento (Figura 6.1).

Cuatro conglomerados presentan un porcentaje de similitud del 100%, que incluyen 16 (40%) aislamientos de origen animal y humano superficial, observándose en tres especies de *Fusarium* diferentes. Estas agrupaciones no son representativas por el número de individuos, sin embargo, llama la atención los orígenes agrupados, lo cual se podría asociar con posible contaminación por contacto directo del humano con el animal, como se describe en la patogénesis de los dermatofitos (Weitzman y Summerbell, 1995).

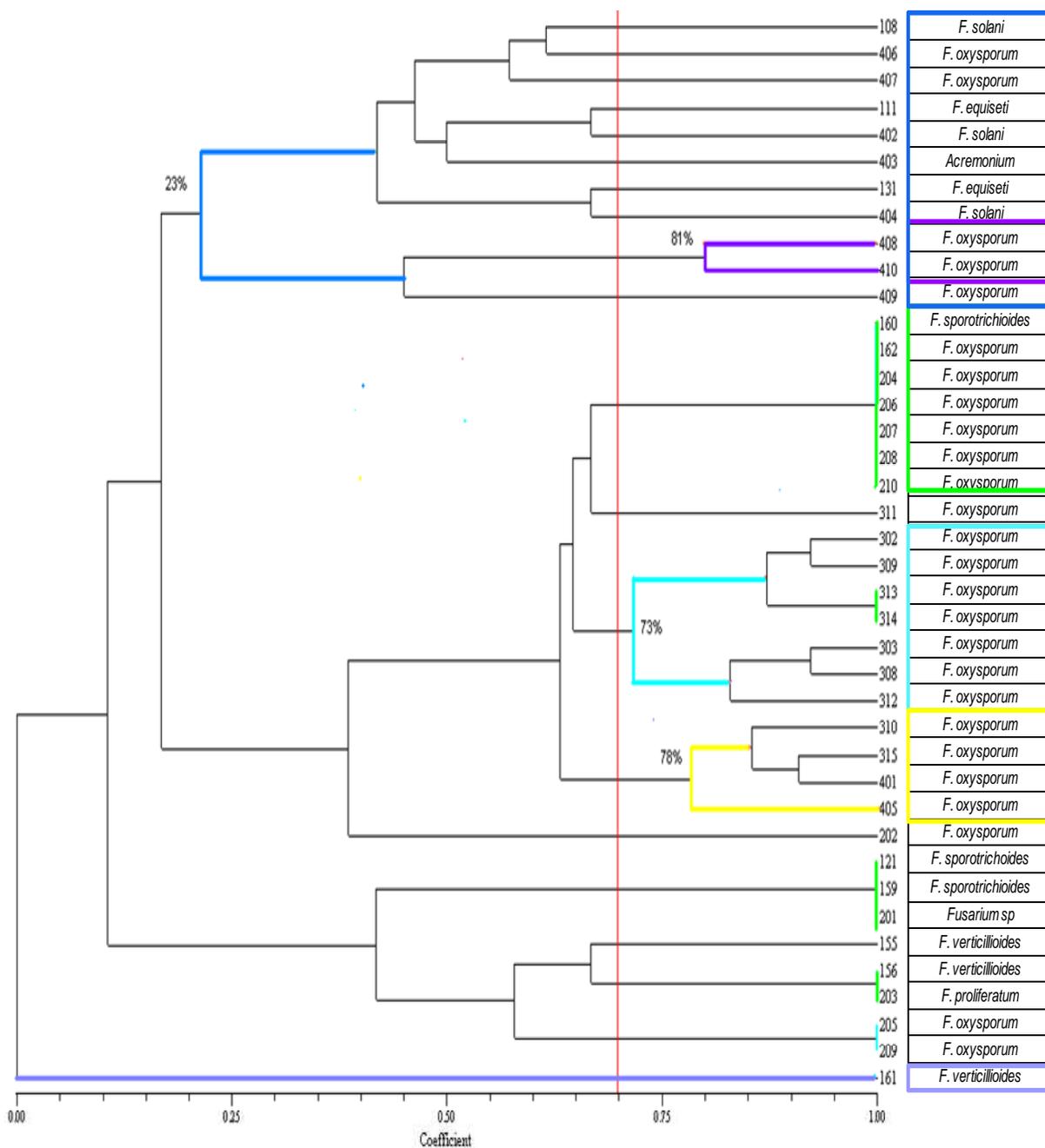
Se observan tres grandes conglomerados, el primero con un porcentaje de similitud del 78% formado por cuatro aislamientos de *F. oxysporum*, dos de origen vegetal y dos de origen humano sistémico; el segundo con un porcentaje de similitud del 73% formado por siete aislamientos de *F. oxysporum* de origen vegetal y el tercero con un porcentaje de similitud del 81% formado por dos aislamientos de *F. oxysporum* de origen humano sistémico. La especie *F. oxysporum* se encuentra presente en todos los conglomerados formados, posiblemente porque es la especie más comúnmente aislada a nivel fitopatógeno, humano superficial y sistémico.

Es importante resaltar la formación de un conglomerado por un solo individuo de origen animal correspondiente a la especie *F. verticillioides*, ya que no se agrupa con las mismas especies identificadas en los aislamientos de origen animal.

Los aislamientos de origen humano sistémico se observan de forma dispersa en todos los conglomerados formados; sin embargo, en el conglomerado formado con un porcentaje de similitud del 23% se ven agrupados la mayoría de aislamientos de origen humano sistémico, además de observarse en este mismo grupo diferentes especies de *Fusarium* representado por aislamientos de origen animal. El aislamiento de origen humano sistémico identificado como *Acremonium* se agrupa con diferentes especies de *Fusarium* en un

conglomerado con un porcentaje de similitud del 23%, resultado esperado ya que lo reportado en otros estudios es la formación de conglomerados a nivel de especie (Healy *et al.*, 2005).

Figura 6.1. Dendograma de los aislamientos de *Fusarium* asociados a patrones de bandeo por ERIC-PCR



6.4.2 Patrones de bandeo por REP-PCR

El análisis del dendograma obtenido por el programa NTSYS analizado con un 70% de similitud muestra un total de 17 conglomerados para patrones de bandeo obtenidos por REP-PCR (Figura 6.2).

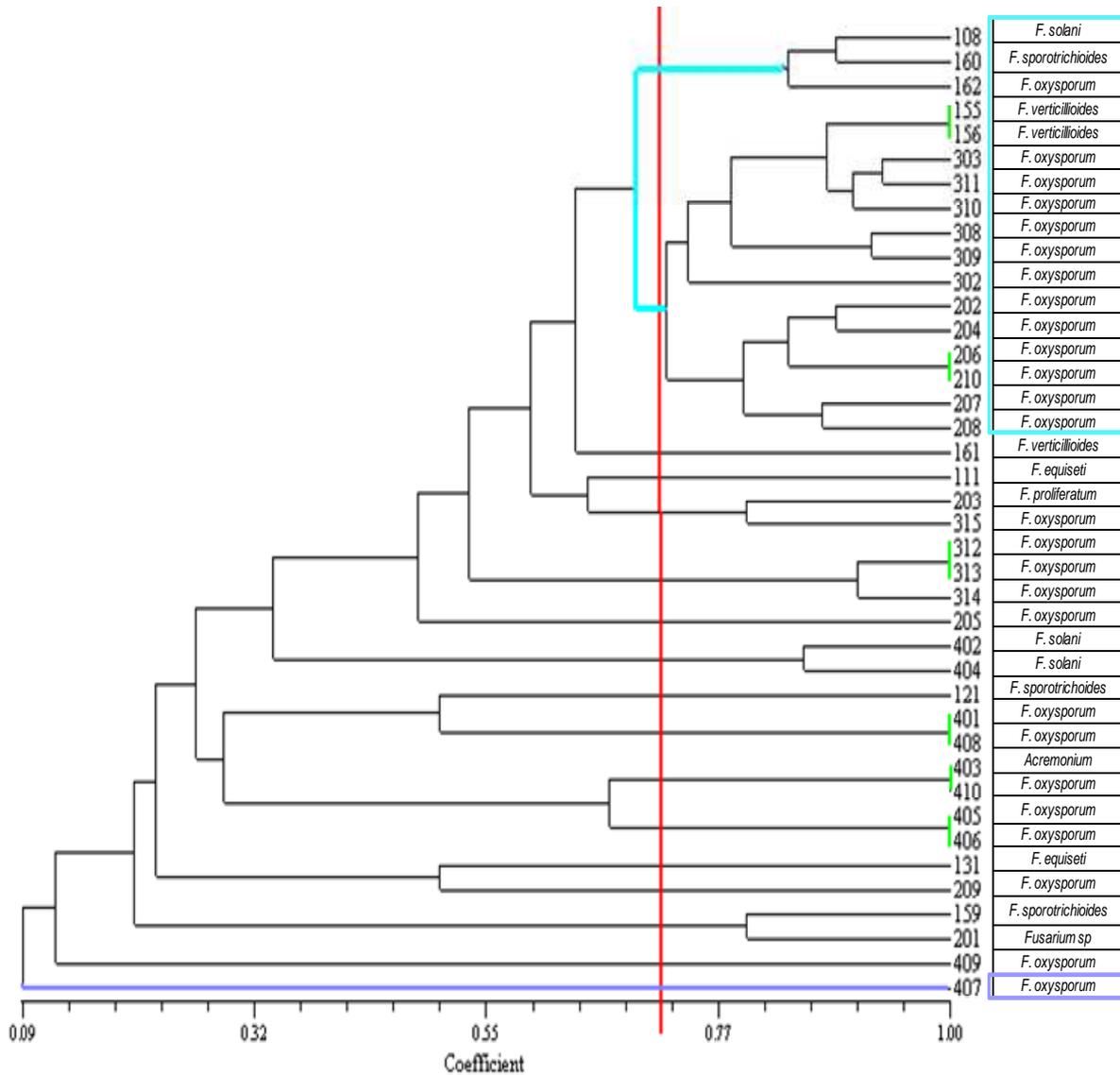
Seis conglomerados presentan un porcentaje de similitud del 100%, incluyendo 12 aislamientos (30%); todos agrupan aislamientos del mismo origen y aislamientos de la misma especie.

Se observa un conglomerado con un porcentaje de similitud del 75%, formado en su mayoría por aislamientos de *F. oxysporum* de origen vegetal y humano superficial. Este conglomerado incluye dos aislamientos de origen animal que corresponden a *F. verticillioides*.

Es importante resaltar la formación de un conglomerado por un solo individuo de origen humano sistémico que corresponde a la especie *F. oxysporum*, la cual no se agrupa con la misma especie identificada en los otros orígenes.

El aislamiento de origen humano sistémico identificado como *Acremonium* se agrupa en un conglomerado con un porcentaje de similitud del 100% con un aislamiento de *F. solani* de origen humano sistémico y un aislamiento de *F. equiseti* de origen animal.

Figura 6.2. Dendograma de los aislamientos de *Fusarium* asociados a patrones de bandeo por REP-PCR.



6.4.3 Comparación ERIC-PCR y REP-PCR

Comparando los resultados obtenidos por ERIC-PCR y REP-PCR los datos no son concluyentes, no se observa formación de conglomerados definidos por origen de aislamiento ni por especie identificada. En los 40 aislamientos evaluados se observaron 34 patrones de bandeo para ERIC-PCR y 24 para REP-PCR, mostrando la eficiencia de la

técnica para diferenciar entre cepas estrechamente relacionadas (Edel *et al.*, 1995). Este comportamiento observado en los diferentes aislamientos demuestra la variabilidad genética del género *Fusarium* (Healy *et al.*, 2005; Pounder *et al.*, 2005).

La diferencia entre estas técnicas puede estar relacionada con los fragmentos de amplificación y la variabilidad genética que presentan los hongos. Esto se puede relacionar con el estudio de Godoy y colaboradores (2004), donde evaluaron por ERIC-PCR aislamientos de *F. solani* provenientes de pacientes con queratitis, observándose la formación de varios conglomerados dentro de la misma especie con un índice de similitud del 90%.

Por otro lado, al comparar los resultados reportados por Vega (2009), del análisis de 30 aislamientos (origen animal, humano superficial y vegetal), se muestra un patrón de distribución diferente al observado con la inclusión de los 10 aislamientos de origen humano sistémico, donde los conglomerados por ERIC-PCR, estaban definidos por especie, contrario a lo observado en nuestro análisis.

La formación de conglomerados con porcentajes de similitud del 100% en ERIC-PCR no está definida por especies específicas, ya que se observan agrupaciones que relacionan individuos de diferentes especies; fenómeno contrario a lo observado en REP-PCR donde la mayoría de conglomerados con el 100% de similitud están definidos por especies específicas. Respecto a la distribución por origen de aislamiento hay correlación entre ERIC-PCR y REP-PCR, ya que estos están distribuidos aleatoriamente a lo largo de los conglomerados.

Los resultados obtenidos no concuerdan con lo reportado en otros estudios donde hay formación de conglomerados por especie. Alves y colaboradores (2004) realizaron un estudio donde evaluaron la aplicabilidad de REP-PCR para tipificar molecularmente hongos de los géneros *Phaeoacremonium* y *Phaeomoniella*, analizando los patrones de bandedo por el programa NTSYS, donde hubo formación de conglomerados por especie y se consideró como una técnica de apoyo para complementar otros métodos de identificación.

Por otro lado, análisis realizados por el programa Diversilab REP-PCR para identificar dermatofitos y especies de *Fusarium* también se observó formación de conglomerados según especie (Healy *et al.*, 2005; Pounder *et al.*, 2005).

Los análisis realizados de estas especies y el agrupamiento que presentan a nivel molecular, confirma la alta variabilidad de este género, lo cual apoyaría la capacidad multihospedero de *Fusarium* spp, a pesar de no existir estudios que consoliden ésta hipótesis. Esta variabilidad se puede definir como la capacidad para responder a cambios ambientales y en el hospedero (Ortoneda *et al.*, 2004; Rochambeau *et al.*, 2000). La discriminación de cepas observada en los patrones de rep-PCR fueron esperados debido a la dinámica compleja del género *Fusarium*, cuya clasificación ha sido controversial y frecuentemente confusa (Groenewald, 2005).

7. FACTORES MODULADORES DE PATOGENICIDAD

7.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades son el resultado de la interacción entre los microorganismos, el hospedero y el medio ambiente. La capacidad de los microorganismos de causar infección depende de sus factores de virulencia, la respuesta inmune y la susceptibilidad genética en relación con las condiciones físicas, culturales y económicas del medio ambiente.

En la patogénesis, las características propias de un microorganismo o factores de virulencia que facilitan la capacidad de adhesión o transgresión de barreras naturales, la capacidad de alterar los tejidos o la fisiología del hospedero y la capacidad de evadir la respuesta inmune son el resultado de una enfermedad.

Hoy en día muchas enfermedades se logran controlar gracias al conocimiento de los agentes causales y su interacción en la respuesta por el hospedero. Sin embargo, la patogénesis de *Fusarium* en modelos animales no es clara, donde el factor de virulencia más descrito es la actividad enzimática pero únicamente en modelos vegetales. Por este motivo es importante evaluar otros factores moduladores de virulencia en la interacción con diferentes hospederos.

7.2 PATOGÉNESIS DE *Fusarium*

La patogénesis se describe como el proceso completo del desarrollo de enfermedad en el hospedero. Durante las etapas iniciales de la interacción, el microorganismo debe percibir estímulos y responder mediante cambios morfológicos y bioquímicos donde los procesos de señalización son claves para definir la infección (Roncero *et al.*, 2003).

Entre los mecanismos de patogenicidad que le permiten al patógeno detectar la presencia del hospedero y posteriormente generar enfermedad, se encuentra la capacidad de adherirse

a los tejidos e interferir con las funciones celulares (Prados *et al.*, 2006). La relación entre germinación y adherencia se considera una de las principales causas de patogenicidad. Los receptores de las células del hospedero para las adhesinas de algunos hongos juegan un papel importante. Este es el caso de fibronectina, trombina, lectinas y factor G, esenciales para que el microorganismo se establezca en el tejido (Mitola *et al.*, 2001).

En el género *Fusarium* se encuentran algunas especies productoras de toxinas que producen más de 50 sustancias tóxicas, que pueden causar sensibilidad del tejido o necrosis hasta la extrema inmunodeficiencia, supresión humoral y celular, produciendo efectos mutagénicos y cancerígenos tanto en el hombre como en animales (Marasas, 1984; Di Pietro y González, 2005). *Fusarium* spp. también tiene la habilidad para adherirse a material de plástico como lentes de contacto y catéteres.

Los sideróforos son considerados otro factor de patogenicidad al favorecer la adquisición de hierro, indispensable para una variedad de procesos celulares como respiración, ciclo del ácido tricarbóxico, detoxificación de radicales de estrés oxidativo, síntesis de aminoácidos, desoxiribonucleótidos, lípidos y esteroides (Haas *et al.*, 2008).

Fusarium tiene la capacidad de producir enzimas que pueden alterar o degradar distintos polímeros presentes en las paredes celulares de las plantas. Este complejo enzimático constituye un importante factor de virulencia para *Fusarium* ya que le permite no solo penetrar el tejido del hospedero al mediar la maceración tisular y la disgregación de la estructura de la pared, sino que es un mecanismo necesario para la obtención de nutrientes (Di Pietro y González, 2005). Así mismo, algunas enzimas pueden facilitar la multiplicación del propio hongo, favoreciendo la diseminación por los tejidos del hospedero.

Fusarium como fitopatógeno necesita atravesar las paredes celulares de sus hospederos para proliferar en el apoplasto y tener acceso al protoplasto, debido a que durante el proceso infeccioso el hongo encuentra diversas barreras estructurales tales como la endodermis, paredes vesiculares y tilosas, entre otras. Se ha establecido que la secreción de un complejo

enzimático que actúa en la degradación de la pared celular (cell wall-degrading enzymes CWDEs) es el mecanismo principal mediante el cual se despolimeriza cada uno de los componentes de las paredes celulares (celulosa, xilano, pectinas, ácidos poligalacturónicos y extensinas) (Di Pietro y González, 2005). Las CWDEs son utilizadas por los patógenos durante el proceso de infección para diferentes propósitos, tales como penetración y ramificación dentro de los tejidos de la planta hospedero, liberación de nutrientes o interferencia con la respuesta de defensa de la planta (Roncero *et al.*, 2000; Guevara, 2003; Di Pietro y González, 2005). Se ha establecido la existencia de dos tipos de enzimas, enzimas que presentan actividad "endo" (aquellas que actúan en los enlaces centrales de la molécula), capaces de producir necrosis y por tanto destrucción de tejidos y enzimas de actividad exo (actúan en los enlaces externos de la molécula) que proporcionan nutrientes al patógeno a partir de las sustancias poliméricas de la pared del hospedero (Imai, 1991).

Algunos hongos presentan capacidad queratinofílica y queratinolítica como un importante factor de patogenicidad, ya que les permite colonizar tejidos de humanos y animales y de esta forma convertirse en agentes patógenos. Los hongos queratinofílicos producen un complejo de enzimas proteolíticas que tienen una amplia gama de especificidad (Kurnet, 2000), pueden hidrolizar proteínas solubles (caseína, gelatina, albúmina, hemoglobina, mioglobina) y otras insolubles (queratina, elastina, colágeno, fibrina, fibronectina) (Imai, 1991). La producción y secreción de enzimas proteolíticas se lleva a cabo a través del micelio activo de hongos dermatofitos y de géneros de hongos queratinofílicos como *Fusarium* (Richardson y Edgard, 2000).

7.3 FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA PATOGÉNESIS

Otros factores que favorecen al patógeno la supervivencia dentro del hospedero y ambientes hostiles, son la temperatura, disponibilidad de oxígeno, concentración de iones, disponibilidad de nutrientes y pH, los cuales se asocian a patogenicidad.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes para el crecimiento óptimo de los hongos, la cual oscila entre 25 y 28°C. Sin embargo, estudios realizados *in vitro* han demostrado que especies de *F. moniliforme* y *F. graminearum* se adaptan a un amplio rango de temperaturas (Xiangming *et al.*, 2007). El marchitamiento en plantas también es afectado por la temperatura. Ben Yephet y Shtienberg (1994) indicaron la relación entre la temperatura del sustrato y la intensidad de la enfermedad. En las formas diseminadas en modelos animales, la temperatura juega un papel fundamental en la adaptación del microorganismo a las células del tejido (BuriK *et al.*, 2001).

El pH es importante en varios modelos de patogenicidad ya que favorece la supervivencia del patógeno en el hospedero (Hogan, 1996). Los microorganismos que crecen a diferentes pH, tienen la capacidad de reconocer y responder adecuadamente a las condiciones ambientales a las cuales se encuentran expuestos (Hogan, 1996; Nosanchuk, 2003). Se ha demostrado que el pH influencia la germinación de clamidosporas en *F. oxysporum*, aunque la germinación al parecer ocurre en un amplio rango (Peng *et al.*, 1999). Estudios previos han reportado que el pH intracelular se asocia con diferentes procesos celulares, como la transcripción de ADN, la regulación de las actividades enzimáticas, la síntesis de proteínas y pared celular (Chitarra *et al.*, 2005). Los hongos al tener la capacidad de modular el pH dentro del fagolisosoma, de pH ácido a pH alcalino, son capaces de sobrevivir a la respuesta inmune (Segal, 2006).

Las etapas de crecimiento también se ven influenciadas por el balance ecológico y la disponibilidad de nutrientes. Dentro de las condiciones de colonización en las células y tejidos animales, se debe reconocer la importancia de los requerimientos nutricionales presentes en la sangre, tales como hemoglobina, albumina y mioglobina que son proteínas solubles (Imai, 1991).

7.4 METODOLOGÍA

7.4.1 Descripción de la muestra

Se evaluó el comportamiento de los 40 aislamientos frente a factores moduladores de crecimiento como temperatura, pH, sustrato e hidrólisis de urea.

7.4.2 Evaluación de las muestras

Se evaluaron aislamientos de *Fusarium* previamente crecidos en PDA con un período de incubación de 7 días. Se tomaron discos de agar del borde del crecimiento radial y se colocaron en el centro de las cajas con el medio a evaluar.

Para observar el comportamiento a diferentes temperaturas se sembraron cajas de agar PDA y se incubaron a 28, 37 y 40°C. Para evaluar pH se sembró en cajas de agar PDA con pH 4, 7 y 9, las cuales se incubaron a 28°C. La evaluación frente al sustrato se realizó en agar extracto de malta suplementado con sangre al 5%, tomando como control el mismo agar sin suplementar e incubando a 28°C. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado por un período de 7 días midiendo el diámetro de la colonia cada 24h.

La actividad ureasa se determinó por crecimiento y viraje del indicador de pH en agar y caldo urea, formulación de Christensen.

7.4.3 Análisis de los resultados

Para cada parámetro evaluado los datos fueron registrados en una base de datos de Excel y analizados estadísticamente por área bajo la curva (ABC) (Istifadah *et al.*, 2006), en el programa estadístico SPSS 11.5.

$$ABC = \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{(Y_{i+1} + Y_i)}{2} \right] (t_{i+1} - t_i)$$

7.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

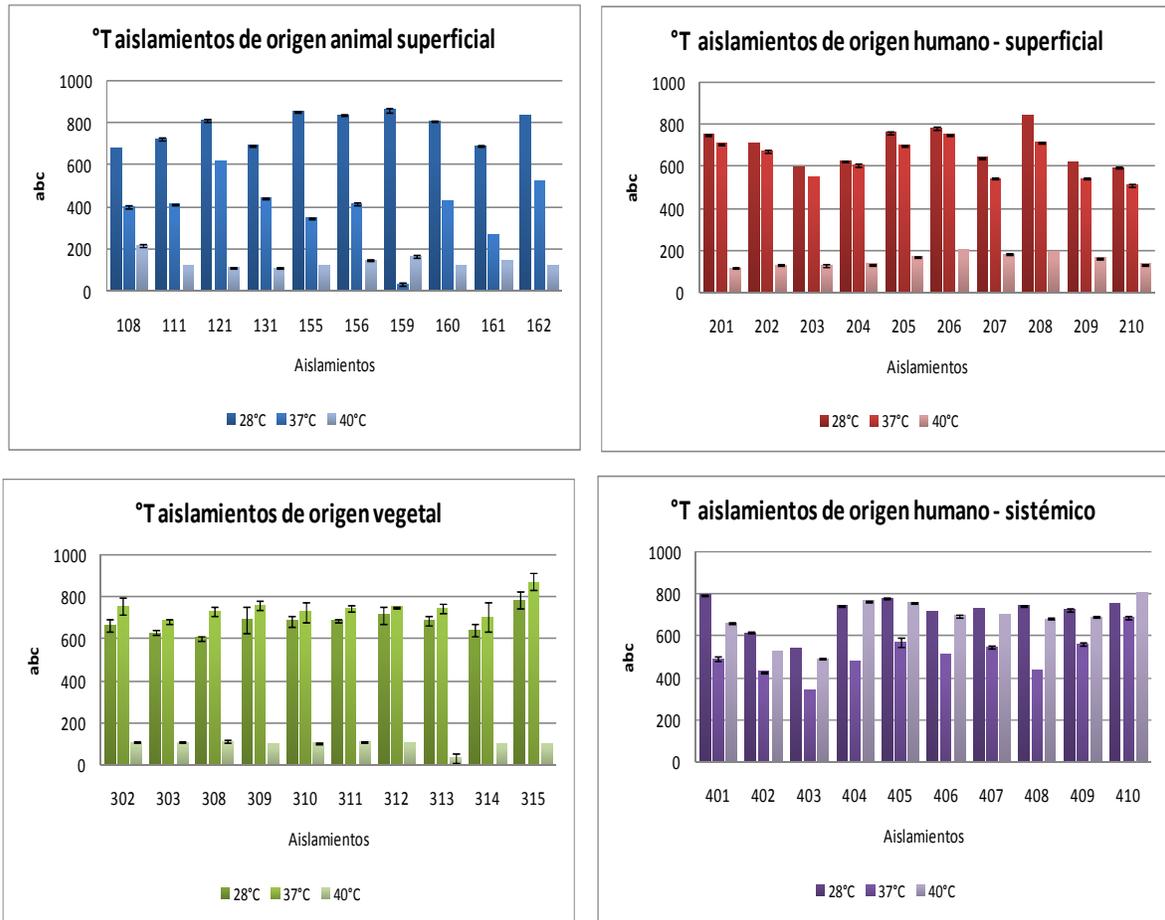
7.5.1 Comportamiento frente a diferentes temperaturas

El comportamiento de los 40 aislamientos frente a las diferentes temperaturas evaluadas mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Anexo 7.1). Se observó un buen desarrollo de las colonias a 28°C de todos los aislamientos, lo que demuestra la condición fisiológica de los hongos para desarrollarse en el medio ambiente en forma saprófita (Figura 7.1 y 7.3). Sin embargo, es importante resaltar el mejor crecimiento de las colonias a 37°C de los aislamientos de origen vegetal, comparado con el de 28°C (Figura 7.1 y 7.2) (Anexo 7.3). Este comportamiento podría considerarse un factor importante al momento de colonizar hospederos animales, donde las condiciones de temperatura cambian y deben adaptarse a las nuevas condiciones dentro del hospedero, o a las condiciones en diferentes regiones climáticas.

El análisis por Duncan muestra varios agrupamientos los cuales reúne aislamientos de diferentes orígenes, excepto para la evaluación a 40°C donde solo se agrupan aislamientos de origen humano sistémico (Anexo 7.2).

Investigaciones realizadas en control biológico de patógenos en plantas revelan que éste es más agresivo a 28°C y que a temperaturas extremas el desarrollo del patógeno se inhibe y no favorece el progreso de la enfermedad. El crecimiento evidenciado a 37°C podría ser una forma de adaptación del ciclo parasítico en otro hospedero (Groenewald, 2006).

Figura 7.1. Aislamientos de *Fusarium* spp a diferentes temperaturas según origen



Abc: área bajo la curva (mediciones del crecimiento radial).

La temperatura es uno de los factores ambientales que más influye en el desarrollo de una enfermedad y en la expresión de síntomas. La temperatura óptima para el desarrollo del patógeno está entre 25 y 30°C, una temperatura mínima de 5°C y una temperatura máxima de 37°C, considerándose un rango de muerte en el suelo entre 57.5 a 60°C durante 30 minutos (Groenewald, 2006). Estudios realizados por Ortoneda (2003), indican que las patologías causadas por *Fusarium* spp. son mayores en áreas tropicales y subtropicales aumentando su incidencia en temporadas de lluvia por los cambios de temperatura y humedad, condiciones que favorecen la capacidad de germinación.

Los aislamientos de origen animal presentaron diferencias en el comportamiento frente a las tres temperaturas evaluadas. La cepa 159 de origen animal, identificada como *F.*

sporotrichioides, tiene un menor desarrollo a 37°C diferente a otros aislamientos de la misma especie, lo que podría indicar que el comportamiento no está definido por especie sino por adaptación evolutiva en relación al hospedero (Figura 7.1).

Por otro lado, se observan diferencias estadísticas (Anexo 2) del comportamiento de los aislamientos de origen humano sistémico a 40°C frente a los otros orígenes. Esta condición de termotolerancia explica la adaptación de las especies de *Fusarium* aisladas de procesos sistémicos para sobrevivir a temperaturas que oscilan entre los 38°C y 40°C, en los cuadros febriles de pacientes inmunosuprimidos (Pérez y Carrasco, 2006) (Figura 7.2). La termotolerancia se encuentra relacionada con la presencia de proteínas hidrofóbicas en la pared celular de los conidios que protegen al hongo del estrés térmico y favorecen la adhesión a las células del hospedero (Ying, 2004).

Figura 7.2. Aislamientos de *Fusarium* spp. a 40°C.

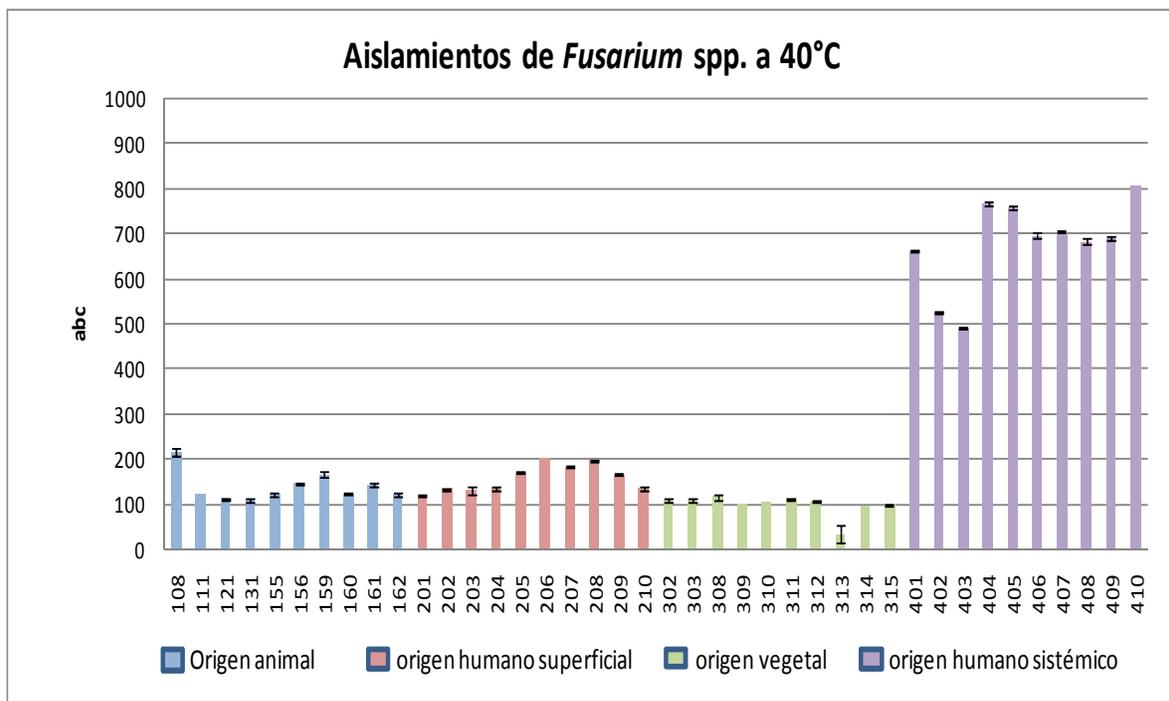
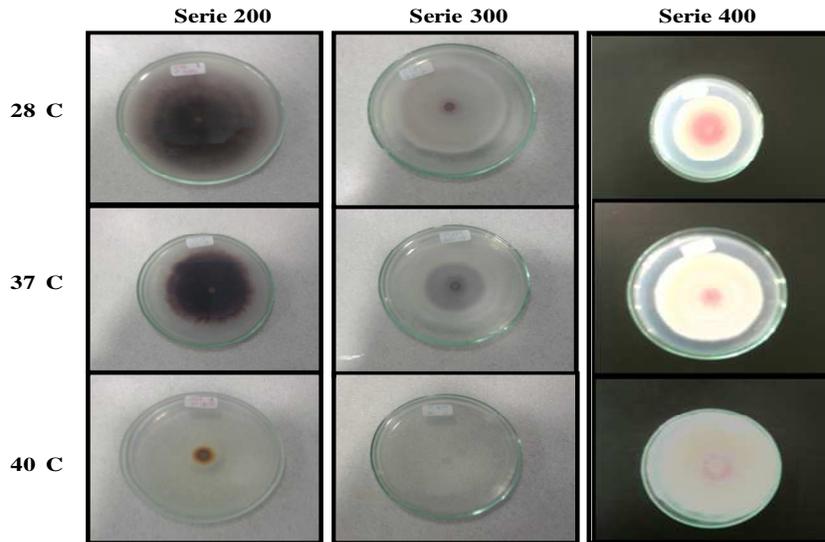


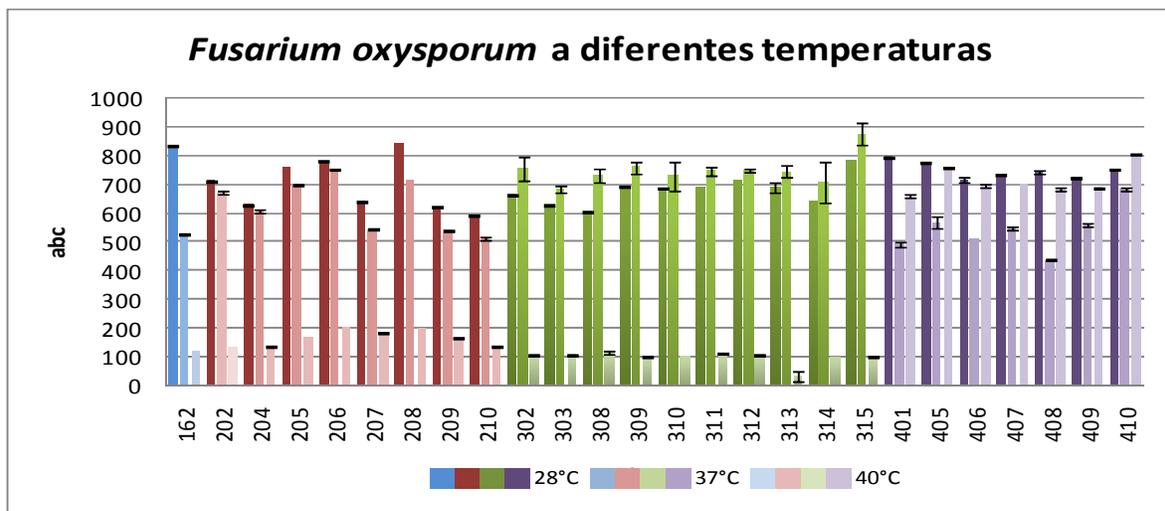
Figura 7.3. Cultivos de *Fusarium* spp. a diferentes temperaturas.



Serie 200 (aislamientos origen humano superficial), serie 300 (aislamientos origen vegetal) y serie 400 (aislamientos origen humano sistémico).

El comportamiento de *F. oxysporum* a las diferentes temperaturas es similar en aislamientos de origen animal, humano superficial y vegetal. El mayor crecimiento de aislamientos humanos sistémicos a 40°C indica la adaptación de esta especie a los cuadros febriles de hospederos humanos con patologías diseminadas (Figura 7.4).

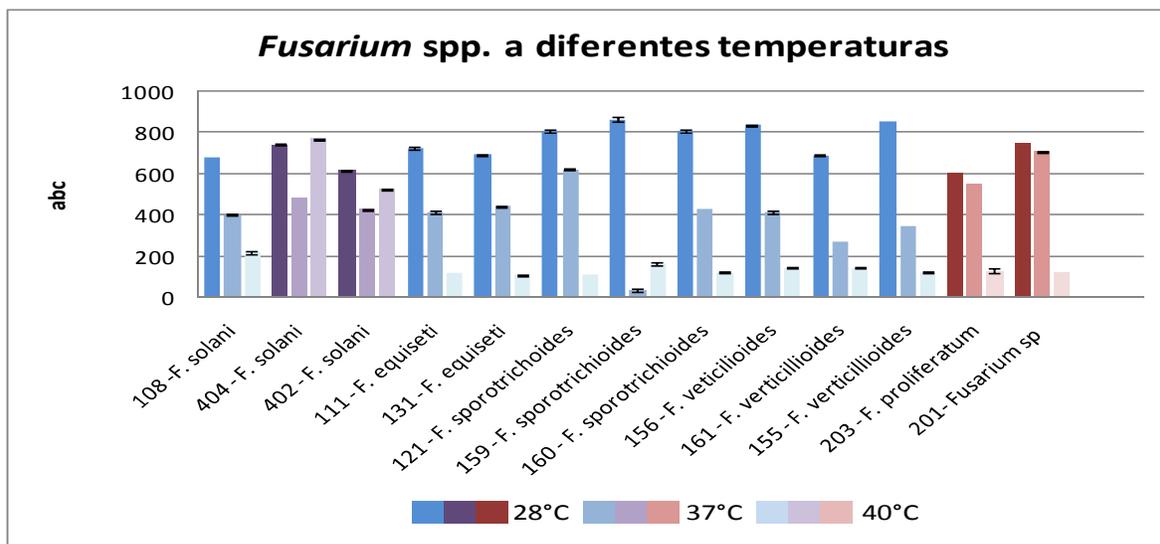
Figura 7.4. Comportamiento de *F. oxysporum* a diferentes temperaturas.



Azul: aislamientos origen animal. **Rosado:** aislamientos origen humano superficial. **Verde:** aislamientos origen vegetal. **Morado:** aislamientos origen humano sistémico.

El comportamiento de las especies diferentes a *F. oxysporum* a las diferentes temperaturas se muestran en la figura 7.5.

Figura 7.5. Comportamiento de *Fusarium* spp. a diferentes temperaturas.



Azul: aislamientos origen animal. **Rosado:** aislamientos origen humano superficial. **Morado:** aislamientos origen humano sistémico.

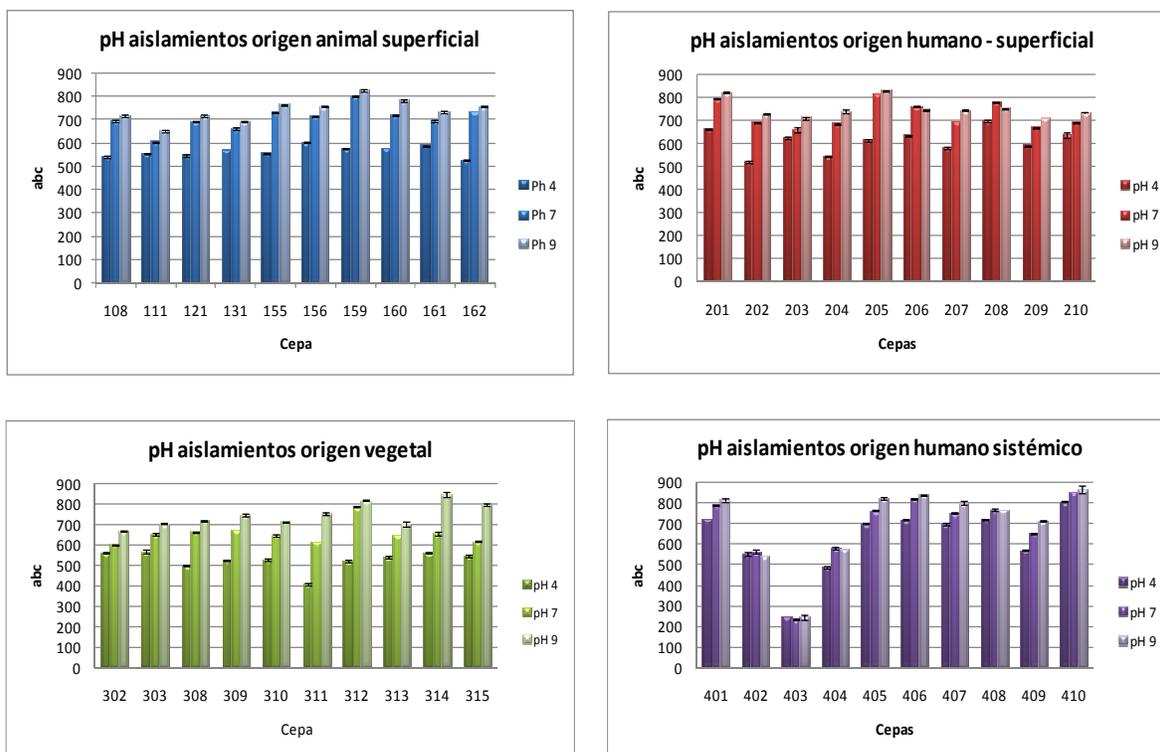
7.5.2 Comportamiento frente a diferentes pH

Todos los aislamientos se desarrollaron en un rango de pH ácido (4) a alcalino (7), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Anexo 7.4). Este comportamiento indica la adaptabilidad de *Fusarium* en un amplio rango de pH, lo cual favorece al microorganismo la supervivencia en diferentes ambientes del hospedero (Figura 7.6). Los análisis por Duncan muestran agrupamientos dados por diferentes orígenes de aislamiento (Anexo 7.5).

El crecimiento de las cepas a pH 4 se asocia con la condición fisiológica requerida por los hongos para desarrollarse de forma saprófita. En el 100% de los aislamientos provenientes de origen animal, donde hay diversidad de especies, y de aislamientos de plantas, donde solamente se encuentra *F. oxysporum*, se presentó un mayor crecimiento a pH 9. Los aislamientos de origen humano superficial y sistémico mostraron mayor crecimiento a pH 9

en un 80% y 60% respectivamente (Figura 7.6). El aislamiento 403 de origen humano sistémico, identificado como *Acremonium*, no mostró diferencias estadísticamente significativas en su crecimiento en los tres pH evaluados (Anexo 6), pero si respecto a los otros aislamientos; comportamiento fisiológico diferente al género *Fusarium* (Figura 7.6).

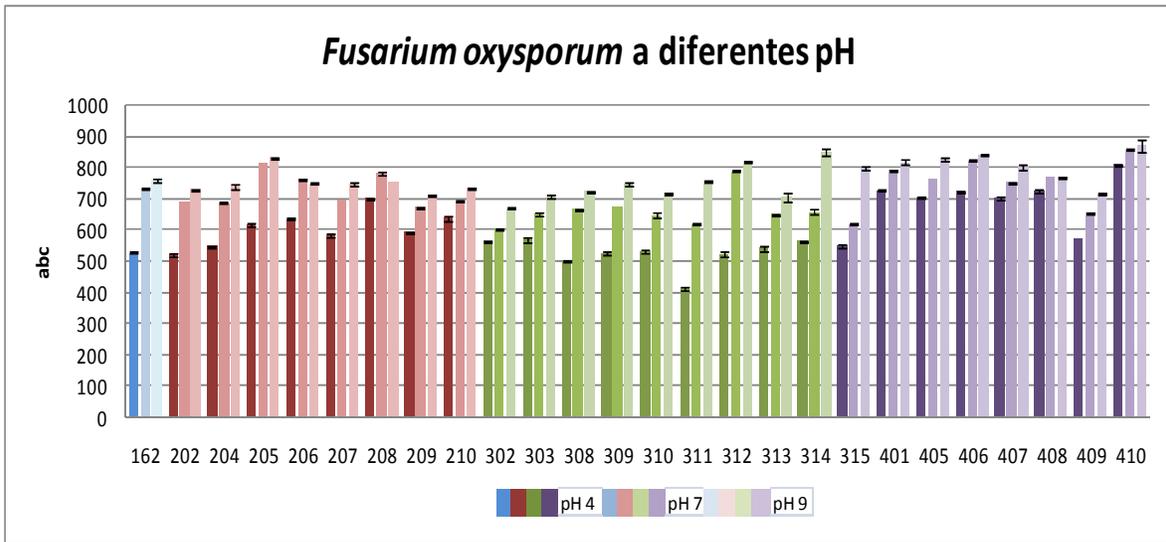
Figura 7.6. Aislamientos de *Fusarium* spp. a diferentes pH según origen.



Abc: área bajo la curva (mediciones del crecimiento radial).

Hogan y colaboradores (1996), afirman que la capacidad para modular un amplio rango de pH, favorece la supervivencia del patógeno en el hospedero, incrementando su virulencia y habilidad para crecer a pH fisiológico. Las especies estudiadas no mostraron diferencias en su comportamiento cuando se crecieron a pH 4, 7 y 9, llevando a concluir que esta es una condición favorable para todas las especies del género *Fusarium* (Figura 7.7 y 7.8).

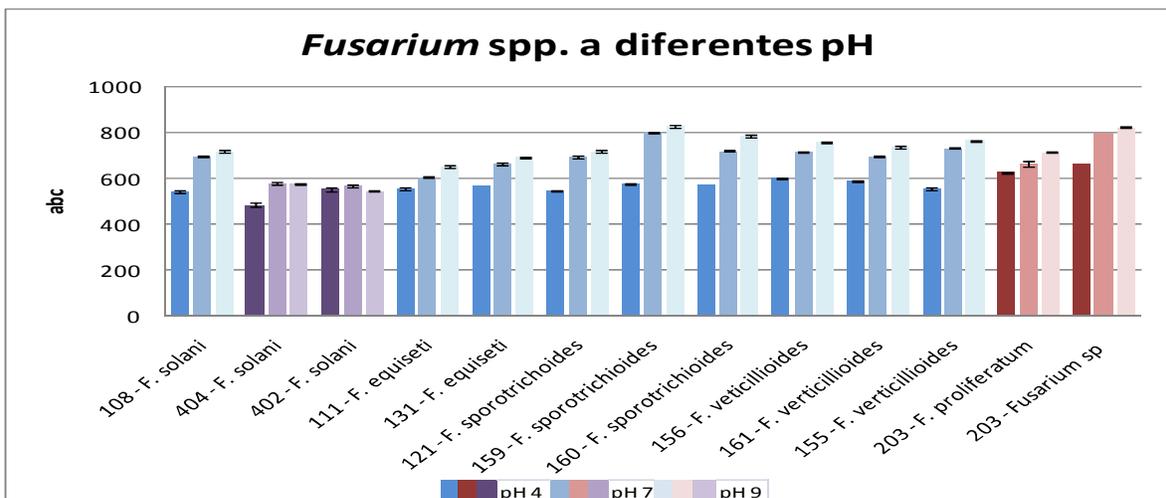
Figura 7.7. Aislamientos de *Fusarium oxysporum* a diferentes pH



Azul: aislamientos origen animal. **Rosado:** aislamientos origen humano superficial. **Verde:** aislamientos origen vegetal.
Morado: aislamientos origen humano sistémico.

En *F. oxysporum* fue clonado un gen ortólogo *pacC* que regula pH y funciona como regulador de virulencia en plantas. Cepas mutantes *pacC* de *F. oxysporum* muestran crecimiento en ambientes a pH ácidos aumentando su virulencia, mientras que cepas *pacC* silvestres que expresan el alelo dominante *pacC* crecen a pH alcalinos disminuyendo significativamente su virulencia (Caracuel *et al.*, 2003).

Figura 7.8. Comportamiento de *Fusarium* spp. a diferentes pH



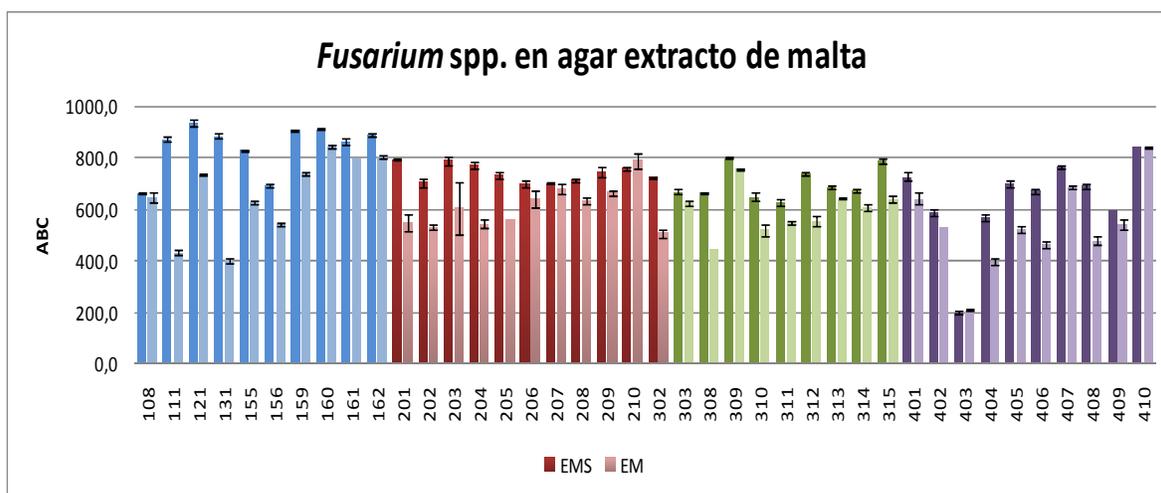
Azul: aislamientos origen animal. **Rosado:** aislamientos origen humano superficial. **Morado:** aislamientos origen humano sistémico.

La capacidad observada de los aislamientos de los diferentes orígenes para adaptarse a diferentes condiciones de pH muestra una propiedad de los hongos y un determinante de su evolución por su capacidad para adaptarse a un amplio rango de condiciones extremas. Esta habilidad podría depender de la presencia de sensores que monitorean el ambiente y median cambios en la expresión de genes en respuesta a cambios en las condiciones externas, los cuales pueden estar involucrados en la virulencia del hongo. Por otro lado, el pH intracelular se asocia con diferentes procesos celulares (Chitarra *et al.*, 2005).

7.5.3 Comportamiento frente a sustrato

La evaluación del crecimiento en agar extracto de malta suplementado con sangre al 5%, en la mayoría de aislamientos no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control, agar extracto de malta sin suplementar (Figura 7.9). Se observó un buen desarrollo de todos los aislamientos independientemente del origen, sin embargo, es importante resaltar el comportamiento de la cepa 403 identificada como *Acremonium*, donde se observó un menor desarrollo a pesar de las fuentes nutricionales.

Figura 7.9. Comportamiento de *Fusarium* spp. en agar extracto de malta.



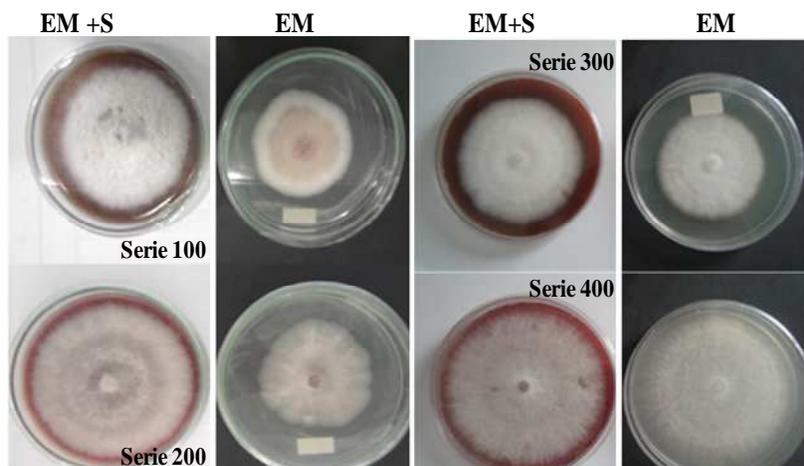
EMS: Agar extracto de malta suplementado con sangre al 5%

EM: Agar extracto de malta

El mayor desarrollo observado en el agar suplementado con sangre al 5% puede correlacionarse con la adaptación en modelos animales a la disponibilidad de nutrientes

proporcionados en la sangre como azúcares, proteínas y vitaminas. Estos resultados muestran el comportamiento de las especies de *Fusarium* en condiciones naturales de colonización en hospederos animales (Figura 7.10).

Figura 7.10. Cultivos de *Fusarium* spp. en agar Extracto de malta.



EM+S: Agar extracto de malta suplementado con sangre al 5%

EM: Agar extracto de malta

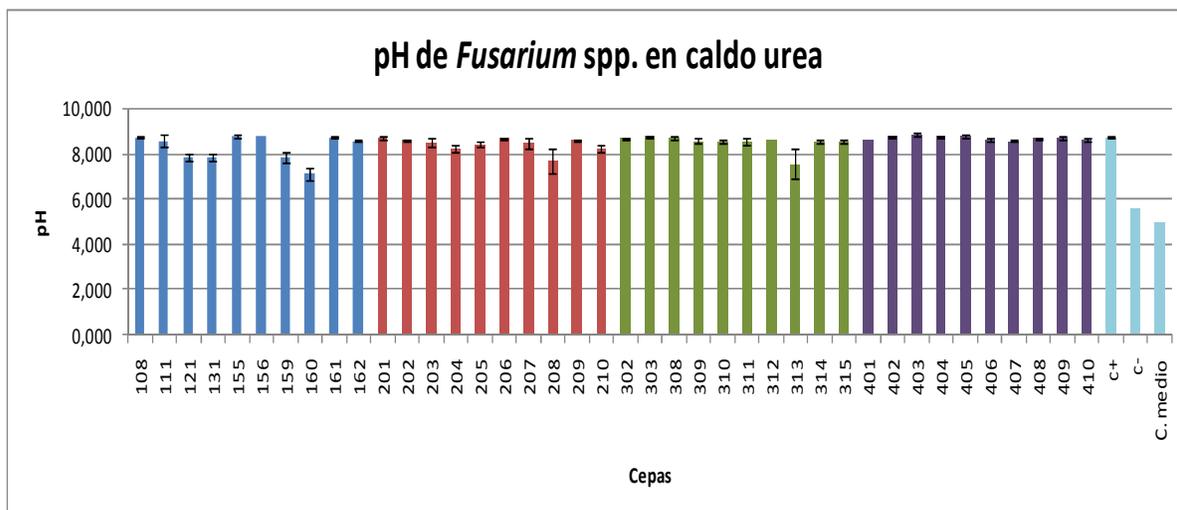
7.4.4 Hidrólisis de la urea

Dentro de los factores de virulencia asociados a *Fusarium*, se destaca el papel de las enzimas, las cuales le permiten degradar importantes constituyentes de las barreras de protección externa de sus hospederos. En este estudio, el 100% de los aislamientos de *Fusarium* de los diferentes orígenes, mostraron actividad ureasa en medio sólido y líquido.

La evaluación de pH en caldo úrea se determinó para conocer los rangos de pH en la alcalinización del medio, teniendo en cuenta los resultados observados en la evaluación de pH en PDA, donde los aislamientos presentaron un buen desarrollo a pH 9. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los aislamientos evaluados ($p < 0.05$) (Anexo 7.7). Los rangos de pH obtenidos para los aislamientos de *Fusarium*, independiente del origen, oscilaron entre pH 7 y 9, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la evaluación de pH en PDA. El análisis por Duncan mostró seis agrupamientos, donde cinco estuvieron representados por aislamientos de diferentes orígenes, presentándose

solapamiento entre ellos y un grupo está constituido por un solo aislamiento de origen animal (Anexo 7.8).

Figura 7.11. Evaluación de pH en caldo úrea.



Azul: aislamientos origen animal. **Rosado:** aislamientos origen humano superficial. **Verde:** aislamientos origen vegetal.

Morado: aislamientos origen humano sistémico.

El comportamiento frente a un amplio rango de pH le permite a *Fusarium* modular frente a la respuesta inmune del hospedero y de igual forma frente a diferentes pH en el suelo. Reportes de Segal (2006), afirman que los procesos celulares como la regulación de la actividad enzimática y la síntesis de proteínas están asociados al pH intracelular; es allí, donde el microorganismo debe sobrevivir a la respuesta inmune del hospedero modulando el pH dentro del fagolisosoma, de pH ácido a pH alcalino, condición modulada posiblemente por actividad enzimática de la ureasa (Eissenberg, 1997).

La gran diversidad y las variaciones estructurales de *Fusarium* spp. podrían estar asociadas a regiones climáticas específicas en el mundo. Sin embargo, el rango real de especies de *Fusarium* asociadas a hospederos capaces de causar enfermedad no ha sido investigada y los efectos de diferentes factores como temperatura, pH y nutrientes en la distribución de especies no ha sido completamente entendida (Vladimir *et al.* 2000).

8. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD

8.1 INTRODUCCIÓN

Existe aumento en la incidencia de infecciones fúngicas que han sido documentadas desde los años 80, con patógenos fúngicos emergentes. Aunque el número de infecciones diseminadas causadas por hongos filamentosos es baja comparada con las infecciones causadas por levaduras, el incremento en su incidencia y el aumento en la resistencia requieren de la evaluación mediante pruebas de susceptibilidad *in vitro* a antifúngicos de terapia clínica. En los últimos años, hongos patógenos emergentes han generado resistencia intrínseca frente a agentes antifúngicos de uso clásico, presentándose una transición de aislamientos sensibles a resistentes (Linares *et al.*, 2005).

Especies de *Fusarium* han emergido como un importante grupo de hongos filamentosos que causan infecciones localizadas y diseminadas con una alta morbilidad y mortalidad. Se han reportado tasas de mortalidad del 100% en pacientes inmunosuprimidos con fusariosis diseminadas, donde *Fusarium solani* es considerada una de las especies más patógenas después de *Aspergillus fumigatus*. *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* son las especies más frecuentemente encontradas en los aislamientos clínicos (Pujol *et al.*, 1997).

El tratamiento apropiado para las infecciones diseminadas es limitado y existe poca información acerca de la actividad *in vitro* frente a los antifúngicos, sin embargo el uso de nuevos antifúngicos como el voriconazol ofrece una mayor eficacia clínica y una menor toxicidad (Linares *et al.*, 2005).

Por este motivo, se pretende tener datos adicionales sobre el perfil de susceptibilidad frente a antifúngicos de terapia clínica de aislamientos de *Fusarium* spp. siguiendo el protocolo del CLSI (M38A2) para determinar posibles asociaciones o diferencias entre los aislamientos y su origen.

8.2 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

En 1982 el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) estableció los parámetros para determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro* a las levaduras. Para el año 1998 se publicó el primer documento que describe el método de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* de los hongos filamentosos M38-P (NCCLS, 1998), documento que ha sido modificado, hasta llegar al que hoy se conoce como documento de referencia M38-A2 (CLSI, 2008).

Las pruebas de susceptibilidad están orientadas a conocer si los microorganismos son sensibles o resistentes a los antimicrobianos, a pesar de que las condiciones simuladas en la técnica son diferentes a lo que ocurre en el ser humano. Sin embargo, si estos resultados son bien interpretados son de utilidad para el clínico, además de ser pruebas importantes para el desarrollo y descubrimiento de nuevos antimicrobianos.

En los últimos años se han desarrollado técnicas para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos de las cuales el método de microdilución en caldo es considerado la técnica de referencia. Aunque con dificultad se ha establecido un protocolo para evaluar susceptibilidad de hongos filamentosos, el CLSI cuenta con el estándar M38-A. Este método ha sido estandarizado para *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Pseudallescheria boydii* y la forma filamentosa de *Sporothrix shenckii*. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), en hongos filamentosos es complejo, pues además del recuento por densidad óptica, requiere un recuento de conidios por cámara de Neubauer, debido a la presencia de conidios y elementos hifales que influyen en la preparación del inóculo (Tapia, 2009).

Existen métodos alternos que surgen por la necesidad de contar con técnicas que puedan ser utilizadas para el diagnóstico de rutina en el laboratorio clínico. Las técnicas de difusión en agar han sido una de las más generalizadas, donde el E-test es la más utilizada. Esta técnica cuantitativa permite determinar si una cepa es sensible o resistente, siendo un método simple, donde se inocula el hongo en la superficie de un agar, se aplica una tira plástica

impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM). Esta técnica permite evaluar CIM de anfotericina B, fluconazol, itraconazol, fluocitosina, voriconazol, posaconazol y caspofungina (Espinel-Ingroff *et al.*, 2001; Ballesté *et al.*, 2006; Tapia, 2009).

8.3 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA

La realización de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos permite efectuar estudios de vigilancia epidemiológica para conocer los perfiles de susceptibilidad y de resistencia de aislamientos en un país o zona geográfica. Por otro lado, permite vigilar el nivel de resistencia frente a nuevos antifúngicos y predecir la respuesta clínica o mejorar la terapia de pacientes que no responden adecuadamente a tratamientos convencionales (Tapia, 2009).

8.4 CORRELACIÓN DE LOS RESULTADOS CON LA CLÍNICA

Un dato de CIM sin una correlación clínica no tiene valor. Sin embargo, existen varios factores que influyen en la interacción que se genera entre el microorganismo y el hospedero. La respuesta clínica puede estar influenciada por factores intrínsecos del antifúngico, del hospedero y del microorganismo. Estos factores juegan un papel importante en la respuesta al tratamiento (Rodríguez *et al.*, 2000; Tapia, 2009).

Dentro de los factores del hospedero que pueden influir en la terapia encontramos respuestas inespecíficas como quimiotaxis, fagocitosis, inflamación, etc.; respuestas específicas como activación del complemento, inmunidad celular e inmunidad humoral y sitio de la infección como zonas donde la respuesta inmune es efectiva, formación de abscesos, presencia de cuerpos extraños, pH del sitio de infección y anaerobiosis (Rodríguez *et al.*, 2000; Tapia, 2009).

Otros factores a tener en cuenta, son las características propias del patógeno como tamaño del inóculo, fase de crecimiento, factores de virulencia (toxinas, enzimas extracelulares), factores de adherencia y resistencia a la acción del suero (Rodríguez *et al.*, 2000).

8.5 RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS

Existe un mayor reconocimiento por la morbilidad y mortalidad de las infecciones fúngicas causadas por hongos resistentes. El aumento del número de pacientes trasplantados, población infectada por el virus de inmunodeficiencia humana y en general de pacientes inmunosuprimidos ha generado un aumento paralelo de infecciones fúngicas, uso de antifúngicos y aparición de hongos resistentes a éstos (Peréa y Patterson, 2002).

La resistencia se define desde el punto de vista microbiológico y clínico. La resistencia clínica es la persistencia o progresión de una infección a pesar de la administración apropiada de tratamiento antifúngico y la resistencia microbiológica es cuando la cepa es resistente al antifúngico presentando CIM más elevados de lo habitual (Peréa y Patterson, 2002; Kerridge *et al.*, 1988). Dentro de resistencia se habla de resistencia intrínseca cuando ningún miembro de una especie es sensible a un antifúngico, resistencia primaria cuando una cepa perteneciente a una especie normalmente sensible al antifúngico posee resistencia natural al mismo sin necesidad de haber estado en contacto con él y resistencia secundaria cuando una cepa previamente sensible adquiere resistencia al compuesto después de haber estado en contacto con él (Rodríguez *et al.*, 2000; Kontoyiannis y Lewis, 2002).

Se han descrito mecanismos bioquímicos de resistencia a los antifúngicos como alteración de la membrana celular que conlleva a una menor permeabilidad de los antifúngicos, defecto enzimático, aumento en la síntesis de compuestos naturales del hongo que compiten con el antifúngico y desaparición del blanco o cambio estructural del mismo. Los mecanismos de resistencia descritos por bases genéticas son mutaciones cromosómicas, mutaciones extra cromosómicas y segregación mitótica de homocigotos resistentes (Rodríguez *et al.*, 2000; Vanden, 1997; Masiá y Gutiérrez, 2002).

8.6 ANTIFÚNGICOS

Los principios activos disponibles hoy en día para el tratamiento de las micosis pueden dividirse en cuatro grupos de acuerdo a su mecanismo de acción: alteración de la función de membrana (polienos), inhibición de la síntesis de ADN o ARN (fluocitosina), inhibición de la biosíntesis de ergosterol (azoles, alilaminas), e inhibición de la síntesis de glucanos (equinocandinas) (Vanden, 1997; Peréa y Patterson, 2002).

8.6.1 Antifúngicos más utilizados en práctica clínica y su blanco de acción

Anfotericina B (Fungizone): polieno que actúa a nivel de síntesis de ergosterol. Resistencia primaria ha sido vista en *Pseudallesheria boydii*, *Scedosporium*, *Fusarium* spp, *Aspergillus terreus* y *A. flavus*.

Fluconazol (Diflucan): compuesto que actúan mediante la inhibición de la enzima lanosterol 14- demetilasa en el complejo citocromo P-450 de los hongos. Presenta actividad frente a *Candida* spp.y *Cryptococcus* spp. No tiene actividad contra hongos filamentosos invasivos. Resistencia primaria con especies de *Candida* no *albicans* y resistencia secundaria frente a *C. albicans* en pacientes con SIDA.

Voriconazol (Vfend): triazol de segunda generación derivado sintético del fluconazol. Inhibe el citocromo P450 dependiente de 14 lanosterol demetilasa, la enzima requerida para la síntesis de ergosterol. El Voriconazol es mucho más potente inhibidor de la enzima fúngica comparado con el Fluconazol, resultando en un antifúngico de amplio espectro. Presenta actividad frente a hongos filamentosos de formas clínicas invasivas como *Aspergillus* y *Fusarium* spp. No presenta actividad contra los Zygomycetes.

Casporfungina: es el primer representante de una nueva clase antifúngicos denominados quinocandinas que interfieren en la síntesis de la pared del hongo, 1,3 D-glucano componente clave de la pared de la célula fúngica, produciendo inestabilidad osmótica y muerte celular. Fungicida contra *Candida* spp. y especies resistentes a los azoles.

Terbinafina: alilamina que inhibe la enzima escualeno 2-3 epoxidasa, interfiriendo en la síntesis del ergosterol, componente fundamental de la membrana del hongo, llevando a deficiencia del ergosterol ocasionando la muerte celular.

8.7 METODOLOGÍA

8.7.1 Descripción de la muestra

Se evaluó el perfil de susceptibilidad de los 40 aislamientos de *Fusarium* spp. de los diferentes orígenes de aislamiento.

8.7.2 Perfil de susceptibilidad de *Fusarium* spp. a los antifúngicos por el método de microdilución

Se realizó la técnica de microdilución en caldo para hongos filamentosos según el protocolo del CLSI M38-A2. Los antifúngicos evaluados fueron Anfotericina B, Fluconazol, Voriconazol y Terbinafina. Se utilizó RPMI 1640 + MOPS (0,164M) a pH 7,0 suplementado con 2% de glucosa como medio de cultivo.

Las soluciones de antifúngico se prepararon de acuerdo al solvente (Tabla 8.1) y pesando la cantidad correspondiente para obtener una concentración 100 veces superior a la concentración más alta del antifúngico a evaluar.

Tabla 8.1. Solventes utilizados para preparar las soluciones patrón.

Antifúngico	Solvente	Concentración evaluada µg/mL
* Anfotericina B (Bristol M) Fungizone	DMSO	16 – 0.03
* Fluconazol (Phizer) Diflucan	Agua	64 – 0.125
* Voriconazol (Phizer) Vfend™	DMSO	16 – 0.03
Terbinafina (Sigma)	DMSO	16 – 0.03

* Preparado comercial para infusión endovenosa.

Las diluciones de los antifúngicos se prepararon de acuerdo al esquema propuesto por el documento M38-A2, teniendo en cuenta el intervalo de concentración de cada antifúngico en la microplaca fondo en U.

- Antifúngicos no solubles en agua: a partir de la solución patrón se realizaron diluciones seriadas en DMSO a una concentración 10 veces mayor a la concentración final a evaluar. Luego se realizó una dilución 1/50 en RPMI quedando una concentración dos veces mayor a la concentración final deseada. El volumen de cada tubo de dilución se colocó en caja de Petri estéril y con pipeta multicanal se llenaron con 100 µl de la concentración correspondiente, los pozos de las microplacas fondo en U (columnas 1 a 10). Los pozos de la columna 11 se llenaron con 100µl de RPMI con 2% de DMSO (control de crecimiento) y los pozos de la columna 12 con 200µl de RPMI (control de esterilidad).
- Antifúngicos solubles en agua: a partir de la solución patrón se realizaron diluciones seriadas en RPMI 1640 a una concentración 10 veces mayor a la concentración final a evaluar. Luego se realizó una dilución 1/5 en RPMI quedando una concentración dos veces mayor a la concentración final deseada. El volumen de cada tubo de dilución se colocó en caja de petri estéril y con pipeta multicanal se llenaron los pozos de las microplacas fondo en U (columnas 1 a 10) con 100 µl de la concentración correspondiente. Los pozos de la columna 11 se llenaron con

100µl de RPMI (control de crecimiento) y los pozos de la columna 12 con 200µl de RPMI (control de esterilidad).

Para evaluar los aislamientos de *Fusarium* spp. se tomó un cultivo de siete días de crecimiento en agar Avena en tubo (72h a 35°C seguido de 96h a 25 - 28°C para completar los 7 días). Se realizó una suspensión de conidios en solución salina de $1-5 \times 10^6$ células/mL, la cual se ajustó por recuento en cámara de Neubauer. Se hizo una dilución 1/50 en RPMI, con una concentración final de $0,4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ UFC/mL. Todas las microplacas fondo en U se llenaron con 100µl de la suspensión de conidios y se incubaron a 35°C por 48h. Posteriormente, se realizó lectura espectrofotométrica a 405nm. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los azoles (antifúngicos fungiestáticos) se evaluó con la concentración más baja que produjera el 50% de inhibición de crecimiento respecto al control, anfotericina B (antifúngico fungicida) y voriconazol con el 100% inhibición y terbinafina con el 80% de inhibición.

La prueba se validó con el control de calidad utilizando como cepas de referencia *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258. Las cepas fueron obtenidas de un banco liofilizado en la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana. Las cepas se reconstituyeron comprobando su pureza y posteriormente se conservó en varios viales, para evitar el riesgo de variación en su perfil de sensibilidad por la realización de varios repiques durante el estudio.

8.7.3 Perfil de susceptibilidad de *Fusarium* spp. a los antifúngicos por E-test

Los antifúngicos evaluados fueron Anfotericina B, Fluconazol, Voriconazol y Caspofungina. Se utilizaron placas de agar con RPMI 1640 + MOPS (0,164M) a pH 7,0 suplementado con 2% de glucosa.

A partir de cultivos de *Fusarium* spp. en agar Avena en tubo inclinado e incubados por 3 días a 35°C y posteriormente 4 días a 28°C, se realizó una suspensión en solución salina

(0,85%), ajustando la concentración de conidios por recuento en cámara de Neubauer de 10^6 células/mL.

Las suspensiones se inocularon en las placas de agar impregnando escobillones estériles y sembrando en tres direcciones. Se dejó secar por 10 minutos para absorber el exceso de inóculo y posteriormente con pinza estéril se colocaron las tiras de E-test sobre la superficie del agar (1 tira por caja). Las placas fueron incubadas a 35°C por 48 horas.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) como el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de antifúngico teniendo en cuenta los siguientes criterios. Para anfotericina B: cualquier colonia dentro de la elipse de inhibición independiente del tamaño se tuvo en cuenta para determinar el CIM y para los azoles: no se tuvo en cuenta colonias dentro de la elipse de inhibición para determinar el CIM.

La prueba se validó utilizando cepas de referencia de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258, bajo las mismas condiciones descritas para la técnica de microdilución.

8.7.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para el análisis de los resultados se realizó un estudio de tipo descriptivo de corte transversal, para esto los datos obtenidos de las CIMs se grabaron en una base de datos diseñada en formato Access, donde se incluyeron reglas de validación. Para el análisis, los datos se exportaron al programa Stata®. El análisis del componente descriptivo se fundamentó en el uso de proporciones y medias o medianas junto con las correspondientes medidas de dispersión (rangos de intercuartiles o desviaciones estándar). Para los CIMs de los aislamientos, se hallaron las medias geométricas (MG) de cada especie para los cuatro antifúngicos evaluados y se establecieron los rangos de sensibilidad para la misma. Además se determinaron los percentiles 50 (CIM₅₀) y 90 (CIM₉₀). Las medidas de frecuencia fueron expresadas junto con sus intervalos de confianza al 95%. En el componente analítico se utilizaron medidas estadísticas X^2 y prueba exacta de Fisher, dependiendo de las

características de las tablas de los antifúngicos; para observar y evaluar la asociación o interdependencia entre dos variables aleatorias continuas, mediante el coeficiente de correlación de Spearman (Técnica de Microdilución en caldo vs. Técnica E-test), en todos los casos se utilizaron niveles de significancia del 5%.

8.8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.8.1 Perfil de susceptibilidad por Microdilución y E-test

Las drogas antifúngicas probadas (Tabla 8.2) incluyen dos azoles (Fluconazol, FLC, y voriconazol, VRC), un polieno (anfotericina B, AMB), una equinocandina (caspofungina, CAS) y una alilamina (terbinafina, TRB).

Se observó concordancia de los resultados por la técnica de microdilución y E-test evaluados mediante el coeficiente de correlación de Spearman (0,59) y un $p < 0,05$; mostrando buena correlación únicamente frente a fluconazol.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se muestran en la tabla 8.2. En general todos los antifúngicos muestran CIMs altos. Los aislamientos 111 (*F. equiseti*) de origen animal y 311 (*F. oxysporum*) de origen vegetal no muestran datos frente a algunos antifúngicos porque no se observó crecimiento en las placas a evaluar, incluyendo los controles de crecimiento, comportamiento que llamó la atención debido a la reproducibilidad del comportamiento en la repetición de la prueba con todos los aislamientos.

Tabla 8.2. CIMs de 40 aislamientos de *Fusarium* spp. de diferentes orígenes

Aislamiento		CIMs (µg/ml) Microdilución				CIMs (µg/ml) E- test			
Cepa Nº	Hongo	AMB	FLC	VRC	TRB	AMB	FLC	VRC	CS
108	<i>F. solani</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	0,125	≥ 256	≥ 32	≥ 32
111*	<i>F. equiseti</i>	0,125	*	*	*	≥ 32	≥ 256	1	≥ 32
121	<i>F. sporotrichoides</i>	2	32	1	0,06	≥ 32	≥ 256	3	≥ 32
131	<i>F. equiseti</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	0,5	≥ 256	2	≥ 32
155	<i>F. verticillioides</i>	4	≥ 64	2	0,125	≥ 32	≥ 256	1	≥ 32
156	<i>F. verticillioides</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 256	1	≥ 32
159	<i>F. sporotrichioides</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 256	3	≥ 32
160	<i>F. sporotrichioides</i>	4	16	2	2	≥ 32	96	2	≥ 32
161	<i>F. verticillioides</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 256	1,5	≥ 32
162	<i>F. oxysporum</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 256	1	≥ 32
201	<i>Fusarium</i> sp	2	≥ 64	4	0,5	≥ 32	≥ 256	2	≥ 32
202	<i>F. oxysporum</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 256	0,38	≥ 32
203	<i>F. proliferatum</i>	4	≥ 64	2	0,25	≥ 32	≥ 256	4	≥ 32
204	<i>F. oxysporum</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 256	2	≥ 32
205	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,25	≥ 32	≥ 256	1,5	≥ 32
206	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	2	0,125	≥ 32	≥ 256	2	≥ 32
207	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,25	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32
208	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,25	≥ 32	≥ 256	1,5	≥ 32
209	<i>F. oxysporum</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 256	1,5	≥ 32
210	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	2	0,25	≥ 32	≥ 256	1	≥ 32
302	<i>F. oxysporum</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32
303	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	2	0,125	≥ 32	≥ 256	2	≥ 32
308	<i>F. oxysporum</i>	8	≥ 64	8	0,25	≥ 32	≥ 256	3	≥ 32
309	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,5	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32
310	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,5	2	≥ 256	3	≥ 32
311*	<i>F. oxysporum</i>	*	32	0,5	0,125	*	*	*	*
312	<i>F. oxysporum</i>	2	≥ 64	4	1	1	≥ 256	≥ 32	≥ 32
313	<i>F. oxysporum</i>	2	≥ 64	≥ 16	0,5	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32
314	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	2	0,06	≥ 32	≥ 256	3	≥ 32
315	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,25	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32
401	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,5	≥ 32	≥ 256	4	≥ 32
402	<i>F. solani</i>	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	0,5	≥ 256	≥ 32	≥ 32
403	<i>Acremonium</i>	4	32	0,5	0,03	≥ 32	≥ 256	0,25	≥ 32
404	<i>F. solani</i>	4	≥ 64	8	≥ 16	0,5	≥ 256	≥ 32	≥ 32
405	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,25	≥ 32	≥ 256	1,5	≥ 32
406	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	4	0,25	≥ 32	≥ 256	1,5	≥ 32
407	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	2	0,25	≥ 32	≥ 256	1,5	≥ 32
408	<i>F. oxysporum</i>	4	≥ 64	2	0,25	≥ 32	≥ 256	0,75	≥ 32
409	<i>F. oxysporum</i>	2	≥ 64	4	0,125	≥ 32	≥ 256	≥ 32	≥ 32
410	<i>F. oxysporum</i>	2	≥ 64	2	0,125	≥ 32	≥ 256	2	≥ 32

AMB Anfotericina B; FLC Fluconazol; VRC Voriconazol; TRB Terbinafina; CS Caspofungina

* No crecimiento

El control de calidad de las técnicas de E-test y microdilución fue realizado con cepas de referencia ATCC como se muestra en la tabla 8.3. En todos los ensayos realizados los CIMs para las cepas del control de calidad estuvieron en el rango esperado, resultados que validaron los preparados comerciales para infusión endovenosa.

Tabla 8.3. Control de calidad de prueba de microdilución - CIMs cepas de referencia

Aislamiento	Antifúngico	Resultados CIM M38- A2 (µg/ml)	Rango CIM CLSI (µg/ml)
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Anfotericina B	1	1 - 4
	Fluconazol	64	16 - 128
	Voriconazol	1	0,12 - 1
	Terbinafina	NA	ND
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Anfotericina B	1 - 4	0,5 - 4
	Fluconazol	2	1 - 4
	Voriconazol	0,25	0,03 - 0,25
	Terbinafina	NA	ND

NA: No aplica ND: No determinado

Tabla 8.4. Control de calidad de prueba E-test - CIMs cepas de referencia

Aislamiento	Antifúngico	Resultado CIM E-test (µg/ml)	Rango CIM CLSI (µg/ml)
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Anfotericina B	0,5	0,5 - 2
	Fluconazol	>64	16 - 128
	Caspofungina	0,38	0,25 - 1
	Voriconazol	0,5	0,25 - 1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Anfotericina B	0,25	0,25 - 1
	Fluconazol	0,5 - 1	1 - 8
	Caspofungina	0,38	0,25 - 2
	Voriconazol	0,016	0,016 - 0,064

Las medias geométricas (MGs) y los intervalos de confianza de los antifúngicos se muestran en la tabla 8.5. El antifúngico que presentó mayor actividad farmacológica frente a los aislamientos de *Fusarium* spp. fue terbinafina con $CIM_{50} \leq 0,37 \mu\text{g/mL}$, antifúngico

evaluado únicamente por la técnica de microdilución; seguido de voriconazol con $\text{CIM}_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ por microdilución y $\text{CIM}_{50} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ por E-test.

Terbinafina ha sido reportada en algunos estudios con poca actividad frente a aislamientos de *Fusarium* (Alastruey *et al.*, 2008), sin embargo, otros reportes indican la buena actividad frente a éste antifúngico (Speeleveld *et al.*, 1996). Estos datos dejan ver la variabilidad en el comportamiento de los aislamientos de *Fusarium* frente a éste compuesto.

La actividad fungistática de voriconazol contra *Fusarium* spp. ha sido reportada de forma variable; los resultados obtenidos muestran CIMs altos, lo que concuerda con los resultados de otros autores (Lewis *et al.*, 2005; Sabatelli *et al.*, 2006). Frente a *F. oxysporum* y *F. solani*, muchos estudios muestran CIMs frente a voriconazol con rangos de 0.25 to 8 $\mu\text{g/ml}$ (Espinel-Ingroff *et al.*, 2001). Por otro lado, la actividad *in vitro* de voriconazol ha sido reportada similar o mejor que itraconazol y anfotericina B frente a *Fusarium* spp. (Espinel-Ingroff, 1998).

A pesar de las discrepancias en los datos obtenidos frente a anfotericina B por la técnica de microdilución y E-test con MG de 16,8 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{CIM}_{50} \leq 32 \mu\text{g/mL}$) y MG de 5,4 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{CIM}_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$) respectivamente, los resultados no concuerdan con lo reportado en otras investigaciones donde anfotericina B es la droga más activa frente a diferentes especies de *Fusarium* (Pujol y Guarro 1997; Azor *et al.*, 2007; O Donnell, 2008; Alastruey, 2008). Estas discrepancias observadas frente a anfoterina B por las dos técnicas evaluadas también fueron reportadas por Espinel-Ingroff (2001).

Las CIMs de anfotericina B no son buenos predictores de la respuesta clínica al tratamiento con este antifúngico en pacientes con fusariosis diseminada. Un estudio reveló que en 56 de 73 pacientes con fusariosis diseminada, en quienes falló la terapia con anfotericina B, las CIMs de los aislamientos fueron indiscriminadamente bajos ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$) y altos ($\geq 2 \mu\text{g/mL}$) (Espinel-Ingroff, 2001).

La resistencia primaria a anfotericina B ha emergido en paralelo con el incremento de las infecciones fúngicas invasivas (IFI) causadas por hongos emergentes tales como

Trichosporon beigelii, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, hongos filamentosos del grupo de hialohiphomicosis tales como *Fusarium* sp., *Scopulariosis* sp. y *Scedosporium* sp. y ciertos hongos dematiáceos (Bidart, 2004).

Tabla 8.5. Medias geométricas (MG) e intervalos de confianza.

Antifúngico	MIC (µg/ml) por:							
	NCCLS M38-A2				E-test			
	MG	IC 95%	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MG	IC 95%	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Anfoterina B	5,4	4.2 - 6.9	4	16	16,8	10.2 - 27.9	32	32
Fluconazol	59,4	54.4 - 65.0	64	64	249,4	236.7 - 262.8	256	256
Voriconazol	4,8	3.5 - 6.6	4	16	3,5	2.2 - 5.6	2	32
Terbinafina	0,89	0,44 - 1,79	0,375	16				
Caspofungina					32	32 - 32	32	32

Frente a fluconazol, 35 aislamientos (87,5%) tuvieron CIMs ≥ 64 µg/mL por la técnica de microdilución y 38 aislamientos (95%) tuvieron CIMs ≥ 256 µg/mL por la técnica de E-test mostrando la alta resistencia de los aislamientos de *Fusarium* spp. a este antifúngico. Esta resistencia es universalmente reconocida, donde nuestros resultados confirman los hallazgos de previas investigaciones (Paphitou *et al.*, 2002).

Las CIMs para caspofungina obtenidas por la técnica de E-test fueron altas, CIMs ≥ 64 µg/mL, no mostrando actividad frente a los aislamientos de *Fusarium*. Los datos reportados de la actividad de caspofungina frente a *Fusarium* son limitados, sin embargo, en un estudio realizado por Arikan y colaboradores (2001) también se reportan CIMs altos frente a caspofungina. Estudios realizados de la combinación de caspofungina y anfotericina B muestran una sinergia del 100% contra aislamientos de *F. oxysporum*, pero solo del 25% contra *F. solani* (Arikan *et al.*, 2002).

Las medias geométricas (MGs) y los intervalos de confianza de los antifúngicos por origen de aislamiento se muestran en la tabla 8.6. La mayor actividad farmacológica en todos los orígenes de aislamiento igualmente fue terbinafina seguido de voriconazol. Estos hallazgos muestran que la resistencia observada es propia del género independientemente del origen de aislamiento.

Tabla 8.6. CIMs de *Fusarium* spp. por origen de aislamiento

Origen de aislamiento	Antifúngico	CIM (µg/ml) por:							
		Microdilución NCCLS M38-A2				E-test			
		MG	IC 95%	CIM ₅₀	CIM ₉₀	MG	IC 95%	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Origen animal	Anfoterina B	9,33	4,91 - 17,7	16	16	10,88	2,05 - 57,6	32	32
	Fluconazol	50,7	34,8 - 74,03	64	64	229,5	178,5 - 295,1	256	256
	Voriconazol	7,4	3,00 - 18,2	16	16	2,28	0,99 - 5,26	2	32
	Terbinafina	3,98	0,68 - 23,0	16	16				
	Casposfungina					32	32 - 32	32	32
Origen humano superficial	Anfoterina B	5,65	3,31 - 9,66	4	16	32	32 - 32	32	32
	Fluconazol	64	64 - 64	64	64	256	256 - 256	256	256
	Voriconazol	4,9	2,64 - 9,16	4	16	2,05	0,90 - 4,62	1,75	18
	Terbinafina	0,87	0,20 - 3,73	0,25	16				
	Casposfungina					32	32 - 32	32	32
Origen vegetal	Anfoterina B	4,3	2,63 - 7,08	4	16	16	5,5 - 46,4	32	32
	Fluconazol	64	64 - 64	64	64	256	256 - 256	256	256
	Voriconazol	5,03	2,77 - 9,14	4	16	10,68	3,91 - 29,1	32	32
	Terbinafina	0,46	0,13 - 1,54	0,5	16				
	Casposfungina					32	32 - 32	32	32
Origen humano sistémico	Anfoterina B	4	2,66 - 5,99	4	10	13,92	3,97 - 48,8	32	32
	Fluconazol	59,71	51,0 - 69,8	64	64	256	256 - 256	256	256
	Voriconazol	3,24	1,67 - 6,30	4	12	3,32	0,97 - 11,34	1,75	32
	Terbinafina	0,43	0,10 - 1,86	0,25	16				
	Casposfungina					32	32 - 32	32	32

MG: media geométrica IC 95% intervalo de confianza del 95% CIM: concentración inhibitoria mínima

Las medias geométricas (MGs) y los intervalos de confianza de los antifúngicos por especie identificada se muestran en la tabla 8.7. Teniendo en cuenta la especie identificada, voriconazol es el antifúngico con mayor actividad farmacológica, excepto para *F. solani* y *F. equiseti*, donde anfotericina B es el antifúngico que tiene mayor actividad (Tabla 8.7). Un estudio realizado por Castro y colaboradores (2008) muestra en sus resultados que *F. solani* presenta CIM altos frente a voriconazol. Aunque el bajo número de aislamientos de *F. solani* y *F. equiseti* dificultan la interpretación, estos resultados concuerdan con lo reportado (Paphitou *et al.*, 2002). A diferencia de las otras especies, *F. solani* presenta CIMs altos frente a todos los antifúngicos evaluados.

Estos resultados muestran que no existe asociación entre el perfil de susceptibilidad a los antifúngicos de uso en terapia clínica y el origen de aislamiento de *Fusarium* spp., ejemplo de esto es *F. solani*. identificada en los aislamientos de origen animal y de origen humano sistémico.

Tabla 8.7. CIMs de *Fusarium* por especie identificada

Hongo	Antifúngico	MIC (µg/ml) por:							
		Microdilución NCCLS M38-A2				E-test			
		MG	IC 95%	CIM ₅₀	CIM ₉₀	MG	IC 95%	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>F. solani</i>	Anfoterina B	10,07	1.3 - 73.6	16	16	0.31	0.04 - 2.3	0,5	0,5
	Fluconazol	64	64 - 64	64	64	256	256 - 256	256	256
	Voriconazol	12,69	4.6 - 34.3	16	16	32	32 - 32	32	32
	Caspofungina					32	32 - 32	32	32
<i>F. equiseti</i>	Anfoterina B	16		16	16	0,5		0,5	0,5
	Fluconazol	64		64	64	256		256	256
	Voriconazol	16		16	16	2		2	2
	Caspofungina					32		32	32
<i>F. sporotrichioides</i>	Anfoterina B	5,03	0.3 - 69.9	4	16	32	32 - 32	32	32
	Fluconazol	32	5.7 - 179.0	32	64	184,6	45.2 - 753.6	256	256
	Voriconazol	3,17	0.08 - 114.3	2	16	2,62	1.4 - 4.6	3	3
	Caspofungina					32	32 - 32	32	32
<i>F. verticillioides</i>	Anfoterina B	10,07	1.3 - 73.6	16	16	32	32 - 32	32	32
	Fluconazol	64	64 - 64	64	64	256	256 - 256	256	256
	Voriconazol	8	0.40 - 157.8	16	16	1,14	0.63 - 2.04	1	1,5
	Caspofungina					32	32 - 32	32	32
<i>F. oxysporum</i>	Anfoterina B	4,85	3.6 - 6.4	4	16	24,9	17.4 - 35.6	32	32
	Fluconazol	64	64 - 64	64	64	256	256 - 256	256	256
	Voriconazol	4,72	3.4 - 6.5	4	16	3,7	2.0 - 6.7	2	32
	Caspofungina					32	32 - 32	32	32
<i>Fusarium</i> sp.	Anfoterina B	2		2	2	32		32	32
	Fluconazol	64		64	64	256		256	256
	Voriconazol	4		4	4	2		2	2
	Caspofungina					32		32	32
<i>F. proliferatum</i>	Anfoterina B	4		4	4	32		32	32
	Fluconazol	64		64	64	256		256	256
	Voriconazol	2		2	2	2		4	4
	Caspofungina					32		32	32
<i>Acremonium</i>	Anfoterina B	4		4	4	32		32	32
	Fluconazol	32		32	32	256		256	256
	Voriconazol	0,5		5	5	0,25		0,25	0,25
	Caspofungina					32		32	32

MG: media geométrica IC 95% intervalo de confianza del 95% CIM: concentración inhibitoria mínima

El comportamiento de la cepa identificada como *Acremonium* frente a los antifúngicos evaluados es igual a los resultados obtenidos para las especies de *Fusarium*, lo cual favorece la conducta terapéutica en el paciente cuando los aislamientos son erróneamente identificados.

La resistencia intrínseca a la terapia antifúngica observada en algunos géneros y el desarrollo de resistencia durante el tratamiento en otros, es el comienzo de un problema mayor en el manejo de estas enfermedades (Peréa y Paterson, 2002). Los resultados obtenidos del perfil de susceptibilidad muestran la resistencia natural de las especies de *Fusarium*.

9. DISCUSIÓN GENERAL

Dentro de los hongos filamentosos, *Fusarium* es un microorganismo ubicuo, versátil, capaz de colonizar diferentes hospederos causando enfermedad tanto en plantas como en animales. *Fusarium* está ampliamente distribuido en la naturaleza, es reconocido por su importancia histórica y económica como fitopatógeno, y recientemente como patógeno emergente asociado a enfermedad en los humanos. En el presente estudio se identificaron fenotípicamente y molecularmente aislamientos de *Fusarium* de diferentes orígenes; se caracterizaron molecularmente los aislamientos de origen humano sistémico, se evaluaron factores moduladores de patogenicidad y el perfil de susceptibilidad de aislamientos de *Fusarium* de origen animal, vegetal, humano superficial y sistémico; con el fin de contribuir al entendimiento de *Fusarium* spp. como posible modelo de patógeno multihospedero.

En la identificación morfológica de las muestras de *Fusarium* spp. el 90% (36/40) de los aislamientos fueron identificados claramente hasta nivel de especie por métodos morfológicos, donde el 65% correspondió a *Fusarium oxysporum*, seguido de *F. sporotrichoides* (7,5%), *F. solani* (7,5%), *F. equiseti* (5%) y *F. verticillioides* (5%).

En la identificación molecular por ITS y EF 1a se observó concordancia por los dos marcadores moleculares en el 85% de las veces (34/40). El 62,5% de los aislamientos fue identificado como *F. oxysporum*, el 7,5% como *F. solani*, el 5% como *F. equiseti*, el 7,5% como *F. nelsonii* y 2,5% como *F. verticillioides*. Al comparar los métodos de identificación morfológica y molecular se obtuvo una concordancia en 75% de los aislamientos.

La identificación de hongos filamentosos a nivel de especie por métodos clásicos es dispendiosa, requiere de experiencia y disponibilidad de tiempo ya que se precisa de una clara y rigurosa caracterización morfológica, que en algunos casos no es fácilmente expresada en los medios convencionales para descripción morfológica. Este escenario de identificación constituye un problema al momento de instaurar terapia clínica en el paciente. Sin embargo, a pesar de que la identificación por métodos moleculares puede ser

implementada para diagnóstico, gracias a su mayor rapidez, se debe tener en cuenta la información registrada en las bases de datos, ya que no siempre coincide la identificación morfológica con la identificación molecular. Este comportamiento se observó con las cepas 121 y 159 (*F. sporotrichioides*), donde morfológicamente se evidenció presencia de monofiálides y polifiálides. Otros ejemplos de divergencia entre las dos estrategias de identificación son los casos de las cepas 403 y 406. La cepa 403 morfológicamente corresponde al género *Acremonium* y solo coincidió molecularmente con éste género evaluando la región ITS. La cepa 406 que morfológicamente corresponde a *F. oxysporum* y molecularmente registra como *Acremonium*, *Trichoderma* y *F. solani* por los patrones moleculares evaluados, muestra la mayor discrepancia respecto a la identificación molecular. Estos métodos muestran grados de variación y su utilidad depende en parte de la amplitud y confiabilidad de las bases de datos usadas para la comparación (Arunmozhi *et al.*, 2007). Es importante tener en cuenta que las secuencias reportadas sean registradas por grupos reconocidos con amplia experiencia en la investigación del microorganismo.

La mayoría de métodos moleculares para identificación se basan en técnicas de PCR que utilizan cebadores universales de regiones altamente conservadas del gen RNA ribosomal. Los resultados de la identificación morfológica y molecular mostraron discrepancias en el 25% de los aislamientos, donde el 12,5% de los aislamientos no coincidieron con ningún patrón molecular y el 12,5% coincidieron al menos con un patrón molecular. En este último se encontraron diferencias del 7,5% por las regiones de los espacios transcritos (ITS) y del 5% por factor de elongación 1α respecto a la identificación morfológica. El análisis de las secuencias de ITS no es considerado confiable para la identificación de especies de *Fusarium* porque contiene dos parálogos, con secuencias diferentes, las cuales son fuente de confusión (Alastruey *et al.*, 2008). Por otro lado, para los aislamientos de origen humano sistémico se secuenciaron regiones EF1-2 y EF3-22 y se encontraron diferencias en solo dos de diez aislamientos. Aunque debido al número de cepas evaluadas es difícil establecer qué región es mejor para la identificación, estos resultados sugieren EF1-2 y EF3-22 que serían más convenientes como lo ha sugerido Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2009.

En la identificación molecular, teniendo en cuenta los resultados de los diferentes análisis de los patrones moleculares ITS, EF 1-2 y 3-22, y particularmente el análisis que reúne todos los aislamientos de *Fusarium* de los diferentes orígenes y que resulta más informativo (figura 5.11), se puede concluir que *Fusarium* spp. es un género de hongos filamentosos de alta complejidad y confuso para descifrar; ya que presenta diferentes comportamientos que difícilmente permiten establecer una asociación particular. El comportamiento en el análisis de las relaciones filogenéticas por los diferentes patrones moleculares dejan ver la diversidad de las especies de *Fusarium* tanto en la identificación morfológica como la molecular. Entre los 10 aislamientos que presentaron discrepancias por las dos técnicas de identificación, se observó con algunos aislamientos agrupamientos con secuencias de la misma especie partiendo de la identificación molecular y no respecto a la morfológica. Otros aislamientos mostraron total discrepancia, como la cepa 403 identificada por los tres patrones moleculares evaluados como *Acremonium*, *F. oxysporum* y *F. solani*. Este aislamiento en el análisis filogenético mostró diferentes asociaciones en los cladogramas, pasando entre secuencias de *Acremonium*, *F. solani* y *F. oxysporum*.

Los aislamientos identificados morfológicamente como *F. verticillioides* y *F. proliferatum* y que coincidieron con algún patrón de identificación molecular, se ubicaron en el cladograma con secuencias de la misma especie según el patrón molecular evaluado.

La cepa 406 y 409 mostraron comportamientos particulares al formar clados independientes, ubicándolos entre secuencias de *F. solani*, *Acremonium*, *F. nelsonii*, *F. verticillioides* o totalmente distante de las otras especies.

Estos resultados muestran la dificultad de la identificación molecular y la versatilidad del género *Fusarium*, donde no se establecen asociaciones por origen de aislamiento lo cual se podría asociar con la capacidad multihospedero del género *Fusarium*.

La identificación a nivel de especie es importante en el campo epidemiológico y clínico, y se basa en características morfológicas, método laborioso, donde solo micólogos bien entrenados son capaces de asegurar el diagnóstico a nivel de género y especie. Sin embargo, casi siempre los resultados no son concluyentes y más de la mitad de los aislamientos no se logran identificar hasta especie (Healy *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta estos hallazgos, la variabilidad de especies encontradas en los aislamientos de los diferentes orígenes evaluados y la dificultad al momento de interpretar los resultados, se podría considerar un método polifásico para la identificación, que combine métodos morfológicos y moleculares y en el caso clínico que asegure el manejo de pacientes con infección fúngica (Vandamme *et al.*, 1996; Yli Mattila *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2010). Por otro lado, un método útil para identificación es la quimiotaxonomía, donde se determinan patrones de producción de ácidos grasos, proteínas, carbohidratos o metabolitos secundarios. Esta herramienta ha sido útil para identificación en hongos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y en pocos basidiomycetos (Frisvad *et al.*, 2008). Una aproximación es la evaluación del comportamiento fisiológico, donde el aislamiento 403, identificado como *Acremonium*, muestra un crecimiento diferente comparado con los otros 39 aislamientos de *Fusarium*.

Las especies más frecuentemente reportadas en infecciones de animales y humanos son *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, pero otras especies como *F. verticillioides*, *F. chlamydosporum*, *F. dimerum*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. proliferatum* y *F. sacchari* también han sido reportadas ((Hoog *et al.*, 2003; Dignani y Anaissie, 2004). En este estudio, los aislamientos se identificaron en el 65% como *F. oxysporum* en los diferentes orígenes evaluados y el 7,5% como *F. solani* en los aislamientos de origen animal y humano sistémico. Otras especies encontradas fueron *F. sporotrichioides* (7,5%), *F. verticillioides* (7,5%), *F. equiseti* (5%) y *F. proliferatum* (2,5%). Estos resultados confirman la variedad de cepas implicadas en diferentes hospederos, observándose mayor diversidad en los aislamientos de origen animal. Es importante aclarar que *F. oxysporum* fue la única especie identificada en los aislamientos de origen vegetal, posiblemente porque los aislamientos corresponden a lesiones de haces vasculares, donde ésta especie es la más implicada. Estos resultados muestran la gran diversidad y variabilidad de especies *Fusarium* implicados en los procesos infectivos de animales, plantas y humanos, lo cual dificulta la interpretación de los resultados y muestra la posible adaptación evolutiva a condiciones cambiantes en diferentes tipos de hospederos.

La caracterización molecular por ERIC-PCR y REP-PCR de los aislamientos de *Fusarium* de origen humano sistémico incluyendo los resultados obtenidos por Vega (2009) de los aislamientos de origen animal, humano superficial y vegetal, no muestran formación de conglomerados definidos por origen de aislamiento o por especie identificada, como si se reporta en otros estudios donde hay formación de conglomerados según especie (Alves *et al.*, 2004; Healy *et al.*, 2005; Pounder *et al.*, 2005). Estos resultados apoyan la hipótesis de la variabilidad genética del género *Fusarium* (Healy *et al.*, 2005; Pounder *et al.*, 2005), por su capacidad de variación y de respuesta a cambios ambientales y de hospedero (Rochambeau *et al.*, 2000; Ortoneda *et al.*, 2004). Se encontró un alto grado de diversidad en los aislamientos estudiadas lo cual explicaría la posibilidad de considerar a *Fusarium* spp. como un modelo de patógeno multihospedero.

En contraste con las bacterias, pocos hongos son verdaderos patógenos, donde algunas propiedades en los hongos son frecuentemente asociadas con el ciclo de patogénesis y otras son consideradas importantes solo para patógenos específicos (van Burik y Magee, 2001). Estas características incluyen la capacidad de adherencia, colonización, adaptación a las condiciones del hospedero, adquisición de nutrientes y modulación de pH, entre otras.

En este estudio las especies de los cuatro orígenes de aislamiento frente a diferentes condiciones de temperatura, pH y actividad ureasa muestran a *Fusarium* como un microorganismo versátil, capaz de adaptarse a diferentes condiciones, mostrando su habilidad para causar enfermedad en diferentes hospederos.

La temperatura es una de las condiciones que más influye en el desarrollo de la enfermedad y en la expresión de síntomas. A pesar del buen desarrollo de *Fusarium* spp. a 28°C, condición fisiológica teórica de los hongos, se evidenció la capacidad de adaptación de los aislamientos de *Fusarium* según el origen de aislamiento (Figuras 7.1, 7.2, 7.3 y 7.4). Cabe destacar el desarrollo de los aislamientos de origen vegetal a 37°C, posiblemente por la adaptación a diferentes regiones climáticas, lo cual se constituye en una condición favorable al momento de colonizar hospederos humanos y animales. Los aislamientos de origen animal que fueron los de mayor diversidad de especies, también mostraron

diferencias en el comportamiento frente a las tres temperaturas evaluadas. La cepa 159 identificada como *F. sporotrichioides*, mostró un menor desarrollo a 37°C, diferente a los otros aislamientos de la misma especie, lo que podría reflejar que el comportamiento no está definido por especie sino por adaptación evolutiva de algunos aislamientos en relación al hospedero (Figura 7.1). Los aislamientos de origen humano sistémico mostraron un mejor desarrollo a 40°C, hecho que se puede asociar con la capacidad de sobrevivir aún en condición febril del paciente, mostrando la capacidad de termotolerancia de *Fusarium* spp. (Pérez y Carrasco, 2006).

Todos los aislamientos se desarrollaron en un rango de pH ácido a alcalino. El desarrollo de las cepas a pH 4 se asocia con la condición fisiológica requerida por los hongos para desarrollarse de forma saprófita, sin embargo, es importante resaltar el comportamiento de los aislamientos de *Fusarium* spp. a pH 9 (figura 7.6). El aislamiento 403 de origen humano sistémico, identificado como *Acremonium*, mostró diferencias estadísticamente significativas en su desarrollo respecto a los aislamientos de *Fusarium* Hogan y colaboradores (1996), confirman que la capacidad para modular un amplio rango de pH, favorece la supervivencia del patógeno en el hospedero, incrementando su virulencia y habilidad para crecer a pH fisiológico. La evaluación de los aislamientos de *Fusarium* a pH 4, 7 y 9 muestran la adaptabilidad del género en los diferentes pH, lo cual favorece su supervivencia en diferentes ambientes dentro del hospedero.

Dentro de los factores de virulencia asociados a *Fusarium*, se destaca el papel de las enzimas, las cuales le permiten degradar importantes constituyentes de las barreras de protección externa de sus hospederos. Los procesos celulares como la regulación de la actividad enzimática y la síntesis de proteínas están asociados al pH intracelular (Segal, 2006). En este estudio, el 100% de los aislamientos de *Fusarium* de los diferentes orígenes, mostraron actividad ureasa generando un cambio de pH, en el medio de cultivo, entre 7 y 9.

A pesar de la gran diversidad, las variaciones estructurales y el poco conocimiento en la patogénesis de *Fusarium* spp. éstos resultados muestran algunas características del género que permiten hacer una aproximación al modelo multihospedero por su capacidad para

adaptarse a diferentes condiciones. Estudios realizados por Di Pietro y Roncero (2000) describen a *Fusarium oxysporum* como un microorganismo con todas las características patogénicas necesarias para constituir un modelo de patogénesis multihospedero, en plantas y mamíferos, al ser considerado causante de la fusariosis vascular y patógeno oportunista emergente en humanos; además de la resistencia a los antifúngicos de uso clínico (Guarro *et al.*, 1999). Sin embargo, *F.solani*, *F. verticillioides* también son responsables de casos clínicos de fusariosis diseminada en humanos (Gupta *et al.*, 2003), es por esto que la implicación de estas y otras especies como se describen en este estudio muestran la importancia del género para causar enfermedad en distintos hospederos, incluidos vegetales. Por este motivo, los resultados de estos experimentos resultan llamativos, ya que indican cómo no solo *F. oxysporum* sino también otras especies de *Fusarium* son capaces de regular diferentes condiciones para cumplir con los requerimientos fisiológicos necesarios para su desarrollo.

Otra característica destacada en el género *Fusarium* es la resistencia a los antifúngicos de uso clínico (Guarro *et al.*, 1999). Los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* muestran de forma general CIMs altos frente a los antifúngicos evaluados. En este estudio, terbinafina con $CIM_{50} \leq 0,37 \mu\text{g/ml}$ y voriconazol con $CIM_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$ por microdilución y $CIM_{50} \leq 2 \mu\text{g/ml}$ por E-test fueron los antifúngicos que mostraron mayor actividad *in vitro* frente a las especies de *Fusarium*. Datos que muestran variabilidad como lo han reportado diferentes autores (Alastruey *et al.*, 2007; Speeleveld *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2005; Sabatelli *et al.*, 2006).

Anfotericina B por la técnica de microdilución y E-test con MG de $16,8 \mu\text{g/ml}$ ($CIM_{50} \leq 32 \mu\text{g/ml}$) y MG de $5,4 \mu\text{g/ml}$ ($CIM_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$) respectivamente, no mostró la mayor actividad frente a *Fusarium*, como lo reportan varias investigaciones (Pujol y Guarro 1997; Azor *et al.*, 2007; O Donnell, 2008; Alastruey, 2008). Sin embargo, las CIMs de anfotericina B no se consideran buenos predictores de la terapia clínica. Los resultados frente a fluconazol confirmaron la resistencia universal reconocida. Estos resultados muestran que no existe asociación entre el perfil de susceptibilidad a los antifúngicos de uso en terapia clínica y el origen de aislamiento de *Fusarium* spp., ya que *F. solani* fue

identificada en los aislamientos de origen animal y de origen humano sistémico, siendo ésta la especie más resistente respecto a las otras especies del género.

Es importante resaltar la tolerancia de los aislamientos de origen vegetal a antifúngicos de uso en terapia clínica a los cuales no han estado expuestos, lo que se podría inferir en una resistencia natural del género *Fusarium* frente a los antifúngicos.

Las características evaluadas permiten integrar y entender el comportamiento de este género frente a diferentes hospederos, donde la identificación de especies implicadas, la caracterización molecular, el comportamiento frente a diferentes condiciones fisiológicas y la respuesta frente al ataque de sitios diana pueden ser de gran utilidad al momento de evaluar la dinámica de microorganismos patógenos emergentes; además de la utilidad clínica para el manejo de las infecciones causadas, consolidando a *Fusarium* spp. en un modelo para el análisis de patógenos multihospedero.

10 CONCLUSIONES

- La identificación morfológica y molecular mostró la diversidad y variabilidad de especies de *Fusarium* implicadas en procesos infectivos de animales, plantas y humanos, indicando la posible adaptación estructural evolutiva a condiciones cambiantes en los diferentes hospederos.
- Teniendo en cuenta la divergencia entre la identificación morfológica y molecular de especies de *Fusarium*, especialmente especies no *oxysporum*, se debe considerar una estrategia polifásica que combine estos métodos junto con evaluaciones a nivel fisiológico y quimiotaxonómico para precisar la identificación taxonómica.
- *Fusarium oxysporum* fue la especie más representativa de los orígenes humano y vegetal a diferencia del origen animal donde se observó la mayor diversidad de especies.
- La caracterización molecular muestra la formación de conglomerados no definidos por especie ni por origen, estos agrupamientos confirman la variabilidad del género, lo que apoya la capacidad multihospedero de *Fusarium* spp.
- *Fusarium* es un microorganismo versátil, capaz de desarrollarse a diferentes condiciones de temperatura, pH y sustrato, mostrando su habilidad para causar enfermedad en diferentes hospederos.
- No existe asociación entre el perfil de susceptibilidad a los antifúngicos de uso en terapia clínica y el origen de aislamiento de *Fusarium* spp.
- Se confirma la baja actividad *in vitro* de los diferentes antifúngicos evaluados frente a *Fusarium*, siendo *F. solani* la especie más resistente respecto a las otras especies del género.

- Voriconazol a pesar de ser un antifúngico de amplio espectro y el indicado para el tratamiento de fusariosis diseminada presenta valores CIMs altos.
- *Fusarium* spp. posee características patogénicas necesarias para constituir un modelo de patógenos multihospedero.

11. RECOMENDACIONES

- A partir de los resultados obtenidos *in vitro*, en relación a factores moduladores de patogenicidad, se sugiere realizar estudios en modelos animales y vegetales para confirmar la capacidad multihospedero de *Fusarium*, estableciendo pruebas de infección cruzada a partir de los aislamientos de los diferentes orígenes.
- Es importante realizar más estudios de aislamientos animales, para evaluar la diversidad de especies asociadas a este origen, ya que son pocos los reportes en este hospedero.
- Debido a la alta resistencia de *Fusarium* frente a los antifúngicos de uso clásico y a la resistencia que se está generando frente a voriconazol, se sugiere llevar a cabo estudios que permitan evaluar genes de resistencia a antifúngicos.

12 BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G. 1997. Plant Pathology. Harcourt Academic Press.

AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Harcourt Academic Press. 922 pp.

AGUILAR, T. 2002. 50 years of the Revista de Biología Tropical: its contribution to the development of the Geo-Paleontology. Rev. Biol. Trop. 50: 473-476.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., CUENCA-ESTRELLA, M., MONZÓN, A., MELLADO, E. AND RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. 2008. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. Isolates identified by molecular methods. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 61: 805–809.

ALVES, A., HENRIQUES, I., FRAGOEIRO, S., SANTOS, C., PHILLIPS, A. Y CORREIA A. 2004. Applicability of Rep-PCR Renomic Fingerprinting to Molecular Discrimination of Members of the Genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. Plant Pathology 53: 629 - 634.

ARENAS, R. 2006. Micología médica ilustrada. Segunda edición MaGraw-Hill Interamericana.

ARIKAN, S., LOZANO-CHIU, M., PAETZNICK, V. Y., REX, J. 2001. In Vitro Susceptibility Testing Methods for Caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* Isolates Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 327–330

ÁVILA, L., LOPERA, C., RESTREPO, S., CEPERO DE GARCÍA, M. 2007. Biocontrol potential of fungal endophytes isolated from *Espeletia grandiflora* and *E. corymbosa* against bacterial and fungal plant pathogens. Tesis de maestría. Universidad de Los Andes. Bogotá, Colombia.

AZOR, M., GENÉ, J., CANO, J. AND GUARRO, J. 2007. Universal in vitro antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. Antimicrob. Agents Chemother. doi:10.1128/AAC.01618-06.

BALDWIN, B., SANDERSON, M., PORTER, J., WOJCIECHOWSKI, M., CAMPBELL, C. Y DONOGHUE, M. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82: 247 - 277.

BALLESTÉ, R., ARTETA, Z., BARLOCO, A., MIER, C., FERNÁNDEZ, N., MOUSQUÉS, N., XAVIER, B., CABRERA, M.J., COMBOL, A. Y GEZUELE, E. 2006. Evaluación del desempeño diagnóstico del medio de difusión en agar Etest para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos. Revista Médica de Uruguay. 22:128-135.

BIDART, T. 2004. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. Revista Chilena de Infectología, 21 (Supl 1): S13-S19.

BOOTH, C. 1971. The Genus *Fusarium*. CMI. Kew, Surrey. pp. 19 - 31.

BOUTATI, E.I., ANAISSIE, E.J. 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years experience at a cancer centre and implications for management. Blood. 90:999-1008.

BRUIJN, F. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl Environ Microbiol 58: 2180 – 2187.

BUSHELMAN, S., CALLEN, J., ROTH, D., COHEN, L. 1995. Disseminated *Fusarium solani* infection. Acad Dermatol. 32:346-351.

CALADO, NB., SOUSA, F., GÓMEZ, N.O., CARDOSO, FR., ZAROR, LC., MILAN, EP. 2006. *Fusarium* nail and skin infection: a report of eight cases from Natal, Brazil. *Mycopathologia*. Jan. 161:27-31.

Canadian Journal of Botany. ProQuest Biology Journals. 84 (7) 1148.

CARACUEL, Z., CASANOVA, C., RONCERO, M.I., DI PIETRO, A. AND RAMOS.J. 2003. H Response Transcription Factor PacC Controls Salt Stress Tolerance and Expression of the P-Type Na-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum* Eucariotic cell. 1246–1252.

CARRILLO, L. 2003. *Microbiología Agrícola*. Primera edición. Universidad Nacional de Salta. Argentina.

CASTRO, N., CASAS, C., SOPO, L., ROJAS, A., DEL PORTILLO, P., CEPERO, M. & S. RESTREPO. 2008. *Fusarium* species detected in onychomycosis in Colombia. *Mycosis* 52 (4): 350-356.

CHITARRA, G., BREUWER, P., ROMBOUITS, F., ABEE, T., DIJKSTERHUIS, J. 2005. Differentiation inside multicelled macroconidia of *Fusarium culmorum* during early germination. *Fungal Genetics and Biology*. 694–703.

CLEAVELAND, S., LAURENSEN, M. K., TAYLOR, L. H. 2001. Diseases of Humans and Their Domestic Mammals: Pathogen Characteristics, Host Range and the Risk of Emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 356: 991-999

CLSI. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, pa: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COHÉN, C., MD. 2000. Sepsis por *Fusarium* en un Paciente con Anemia Aplásica: Reporte de un caso con Implicaciones Terapéuticas. *Derm. Venez.* 38:10-12.

DASZAK, P. CUNNINGHAM, A. C. Y HYATT, A. 2000 Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.

DE LUCCA, A. 2007. Harmful Fungi in Both Agriculture and Medicine. *Rev. Iberoam. Micol.* 24: 3 - 13.

DI PIETRO, A, GONZÁLEZ, M.I. 2005. Temas de actualidad: *Fusarium oxysporum*: un modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y humanos. *Actualidad Sem.* 37: 6-13.

DI PIETRO, A, MADRID, MP., CARACUEL, Z., DELGADO-JARANA, J., RONCERO, MIG. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4(5): 315–325

DÍAZ, FJ., RESTREPO, MA., ROJAS, W. 2007. Microbiología de las infecciones humanas. Primera Edición. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín, Colombia.

DIGNANI, M., ANAISSIE. 2004. Human Fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (Suppl. 1): 67 - 75.

EDEL, V., STREINBERG, C., AVELANGE, I., LAGUERRE, G. Y ALABOUVETTE C. 1995. Comparison of Three Molecular Methods for the Characterization of *Fusarium oxysporum* Strains. *Phytopathology* 85 (5): 579 - 585.

EISSENBERG, L.G., MOSER, S.A., GOLDMAN, W.E. 1997. Alterations to the cell wall of *Histoplasma capsulatum* yeasts during infection of macrophages or epithelial cells. *Infect Dis.*

ESPINEL-INGROFF, A, BOYLE, K., SHEEHAN, D. 2001. In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literatura. *Mycopathologia* 150: 101–115.

ESPINEL-INGROFF, A. 1998. In Vitro Activity of the New Triazole Voriconazole (UK-109,496) against Opportunistic Filamentous and Dimorphic Fungi and Common and Emerging Yeast Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 198–202.

ESPINEL-INGROFF, A. 2001. Comparisson of the E-Test with the NCCLS M38-P method for antifungal suseptibiliy testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol*. 38: 1360 – 1367.

ESPINEL-INGROFF, AN. 2009. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature. *Revista Iberoamericana de Micología*. 26: 15-22.

FERNÁNDEZ,-C. F. 2004. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(6):355-60.

GEISER, D., JIMENEZ-GASCO, M., KANG, S., MAKALOWSKA, I., VEERARAGHAVAN, N., WARD, T., ZHANG, N., KULDAU, G. Y O'DONNELL, K. 2004. *Fusarium*-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol*. 110: 473 - 479.

GIANI, C. 1997. Usual clinical features of Fingernail infection by *Fusarium oxysporum*. *Mycoses* 40: 455 – 459.

GILROY, S., ROLLER, J., RAWLING, R., GRANATO, P. 2006. Disseminated Fusariosis: an Emerging Opportunistic Infection. *Clinical Microbiology Newsletter*. 28: 174 -175.

GODOY, P., CANO, J., GENÉ, J., GUARRO, J., HÖFLING-LIMA, A. Y LOPES 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.

GOHEL, V., SINGH, A., VIMAL, M., ASHWINI, P., CHHATPAR, HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*. 5: 54-72.

GOLD, S., GARCIA-PEDRAJAS, M., D. MARTINEZ-ESPINOZA. 2001. New (and used) approaches to the study of fungal pathogenicity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 337 – 365.

GRACIA, B., RODRÍGUEZ, E. 2008. Evaluación de la actividad queratinolítica de *Fusarium* aislados de lesiones en plantas, animales y humanos. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

GROENEWALD, S. 2006. Biology, Pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. University of Pretoria etd.

GUARRO, J., PUJOL, I. AND MAYAYO, E. 1999. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1256-1257.

GUEVARA, C. 2003. Determinación de actividad celulítica y establecimiento de un consorcio bacteriano aislado de diferentes regiones y sustratos del país. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Microbiología industrial. Bogota. Colombia.

HAAS, H., EISENDLE, M., TURGEON, B.G. 2008. Siderophores in Fungal Physiology and Virulence. *Annual Reviews Phytopathology.* 46: 149-187.

HATTORI, N., SHIRAI, A., SUGIURA, Y., LI, W., YOKOYAMA, K., MISAWA, Y., OKUZUMI, K., TAMAKI, K. 2005. Onychomycosis caused by *Fusarium proliferatum*. Br Journal of Dermatology, 153:647-9.

HEALY, M., HUONG, J., BITTER, T., LISING, M., FRYE, S., RAZA, S., Herrera R. 2005. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* y *Fusarium solani* en tomates bajo invernaderos. Universidad de Chile. Santiago de Chile.

HILLIS, D., DIXON, T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Quart. Rev. Biol. 66: 411 - 453.

HILMIOGLU-POLAT, S., METIN, DY., INCI, R., DERELI, T., KILINC, I. Y TUMBAY, E. 2005. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey - a prospective study. Mycopathologia, 160:125-8.

HOGAN, L., KLEIN, B., LEVITZ, S. 1996. Virulence Factors of Medically Important Fungi. Clinical microbiology reviews. 9: 469–488.

HOOG, G.S, GUARRO, J, GENE, J, FIGUERAS, M.J. 2003. *Atlas of Clinical Fungi*: centraalbureau Voor schimmelcultures.

IMAI, S. 1991 The effect of the proteolytic enzyme savinase on human plantar skin in vitro. Arch Dermatol Res; 283: 377-381.

ISTIFADAH, N., SALEEBA, J. AND McGEE, P. A. 2006. Isolates of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* in vitro.

JAMES, T. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using six-gene phylogeny. Nature 443: 818 – 822.

KERRIDGE, D., FASOLI, M. Y WAYMAN, F.J. 1988. Drug resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Ann New York Acad Sci. 544:245-259.

KONTOYIANNIS, D. P., LEWIS, R. E. 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Review. Lancet. 359: 1135–44

KUNERT, J. 1988. Utilization of cystine by dermatophytes on glucose-peptone media. Folia Microbiol.33: 188-197.

LESLIE, J. Y SUMMERELL, B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional Publishing, Ames, Iowa. 385 pp.

LEWIS, M., MILLER, A., HAKIZA, G., ERBAUGH, M. GEISER, D. 2002. Diversity of the coffee Wilt Pathogen, *Fusarium xylarioides*, in Uganda. Disponible en: http://www.oired.vt.edu/ipmcrsp/communications/annrepts/annrep02/Uganda/uganda_topic28.pdf

LEWIS, R. E., WIEDERHOLD, N. P. Y KLEPSE, M. E. 2005. In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 49:945-951.

LINARES, M.C., CHARRIEL, G., SOLIS, F., RODRÍGUEZ, F., IBARRA, A., CASAL, M. 2005. Susceptibility of Filamentous Fungi to Voriconazole Tested by Two Microdilution Methods. Journal of clinical microbiology. 43:250–253.

MARASAS, W.F. 1984. Toxigenic *Fusarium* Species identity and Mycotoxicology. Editorial the Pennsylvania State University Press, University Press.

MARQUES VILELA, D., PEREIRA, G. V., FERREIRA SILVA, C., BATISTA, L. R., FREITAS SCHWAN, R. 2010. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). Food Microbiology. 27 1128e-1135.

- MASIÁ CANUTO, M. AND GUTIÉRREZ RODERO, F.** 2002. Antifungal drug Resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis.* 2: 550–63
- McCALLUM, H. Y DOBSON, A.** 1995 Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends Ecol. Evol.* 10: 190-194.
- MITOLA, G., ESCALONA, F., LEDESMA, A.** 2001. Queratinolisis causada por hongos no dermatófitos aislados de una tenería y un matadero en Maracaibo-Venezuela: Revisión de la expresión morfológica. *Kasme.* 29 - 2.
- MONZÓN, A., RODRIGUEZ, J.** 2007. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. En línea: <http://www.seimc.org/control/reviMico/fusarium.html>.
- MORENO, N., SAAVEDRA, A., SÁNCHEZ, E., GARCÍA, P.** 2008. Presentación de casos. Fusariosis como nódulo pulmonar solitario. *Rev.Fac.Med.* 56:257-261.
- MORRIS, J. G. Y POTTER, M.** 1997 Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 435-441.
- MORSE, S. S.** 1995 Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 1: 7-15.
- MURRAY, D. L., KAPKE, C. A., EVERMANN, J. F. Y FULLER, T. K.** 1999 Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *Anim. Conserv.* 2: 241-254.
- NELSON, P., DIGMAN, M., ANAISSIE, E.** 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 479 - 504.
- NELSON, P., TOUSSON, T., MARASAS, W.** 1983. *Fusarium* species, An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park. 193.

NOSANCHUK, J.D., CASADEVALL, A. 2003. Microreview: The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*. 5: 203-223.

O'DONNELL, K., GUEIDAN, C., SINK, S., JOHNSTON, P., CROUS, P., GLENN, A., RILEY, R., ZITOMER, N., COLYER, P., WAALWIJK, C., VAN DER LEE, T., MORETTI, A., KANG, S., KIM, H., GEISER, D., JUBA, J., BAAYEN, R., CROMEY, M., BITHEL, S., SUTTON, D., SKOVGAARD, K., PLOETZ, R., KISTLER, H., ELLIOTT, M., DAVIS, M. & A. SARVER. 2009. A Two-locus DNA Sequence Database for Typing Plant and Human Pathogens Within the *Fusarium oxysporum* Species Complex. *Fungal Genetics and Biology*. 46 (12): 936 - 948.

O'DONNELL, K., KISTLER, H., CIGELNIK & R. PLOETZ. 1998. Multiple Evolutionary Origins of the Fungus Causing Panama Disease of Banana: Concordant Evidence from Nuclear and Mitochondrial Gene Genealogies. 95: 2044 - 2049.

O'DONNELL, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phylogenetic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22: 213 - 220.

O'DONNELL, K., SUTTON, D. A., FOTHERGILL, A., MCCARTHY D., RINALDI, M., BRANDT, M.E., ZHANG, N. AND GEISER, D. 2008. Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and In Vitro Antifungal. *Journal Clinical Microbiology*. DOI:10.1128/JCM.02371-07.

O'DONNELL, K., SUTTON, D.A., RINALDI, M.G., MAGNON, K.C., COX, P.A., REVANKAR, S.G., SANCHE, S., GEISER, D.M., JUBA, J.H, VAN-BURICK, J.A.H., PADHYE, A., ANAISSIE, E.J., FRANCESCONI, A, WALSH, T.J., ROBINSON, J.S. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length

polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 5109 - 5120.
of Clinical Microbiology. 26 (1): 82 - 87.

ORTONEDA, M. 2003. Fongs oportunistes: avaluació de la patògena y la sensibilitat als antifungics. Tesis doctoral. Universitat Rovira y virgili. Tarragona España.

ORTONEDA, M., GUARRO, J., MADRID, M., CARACUEL, Z., RONCERO, M., MAYAYO, E. & A. DI PIETRO. 2004. *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infection and Immunity* 72 (3): 1760 - 1766.

PAPHITOU, N., OSTROSKY-ZEICHNER, L., PAETZNICK, V. L., RODRIGUEZ, J. R., CHEN, E. AND REX J. H. 2002 In Vitro Activities of Investigational Triazoles against *Fusarium* Species: Effects of Inoculum Size and Incubation Time on Broth Microdilution Susceptibility Test Results. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(10): 3298–3300.

PARDO, G., DURAN, O. 1999. Revisión taxonómica del género *Fusarium*. *Revista de investigaciones, Universidad de Pamplona* 3: 313 - 146.

PENG, H. X., SIVASITHAMPARAM, K. Y TURNER, D. W. 1999. Chlamydospore germination and *Fusarium* wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected by physical and chemical factors. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1363-1374.

Peréa y Paterson, 2002

PEREA, S. Y PATTERSON, T. 2002. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. *Clinical Infectious Diseases*. 35:1073-80.

PÉREZ J., CARRASCO, L. 2000. Diagnostico histopatológico de micosis en patología veterinaria. *Revista iberoamericana de micología*. 25(1): 35-40.

PÉREZ J.E. 2005 Aspectos actuales sobre la dermatofitosis y sus agentes etiológicos. Biosalud.14:105-121.

POUNDER, J., WILLIAMS, S., HANSEN, D., HEALY, M., REECE, K. Y WOODS, G. 2005. Repetitive-Sequence-PCR-Based DNA Fingerprinting Using the Diversilab System for Identification of Commonly Encountered Dermatophytes. Journal of Clinical Microbiology 43 (5): 2141 - 2147.

PRADOS, R., SERENA, C., DELGADO, J., GUARRO, J., DI PIETRO, A. 2006 Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on mammalian hosts. Microbes and infection. Elsevier Masson SAS. 8: 2825-2831.

PUJOL, I., GUARRO, J., GENÉ, J AND SALA, J. 1997. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 39:163–167.

RAAD, I., TARRAND, J., HANNA, H., ALBITAR, M., JANSSEN, E., BOKTOUR, M., BODEY, G., MARDANI, M., HACHEM, R., KONTOYIANNIS, D., WHIMBEY, E., ROLSTON, K. 2002. Epidemiology, Molecular Mycology, and Environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. Infection control and hospital epidemiology, 23:532-537.

RADEMAKER, J., LOUWS, F. Y DE BRUIJN, F. 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic Fingerprinting. In Molecular Microbial Ecology Manual, supplement 3, chapter 3.4.3, pp. 1 - 26. Edited by A. **RICHARDSON, M., EDGARD, M., 2000.** Model systems for the study of dermatophyte and non-dermatophyte invasion of human keratin. Revista Iberoamericana de Micología. 115-121.

ROCHAMBEAU, H., FOURNET-HANOCQ, F., KHANG, V.T. 2000. Measuring and managing genetic variability in small population. Ann Zootech 49: 77 - 93.

RODRÍGUEZ TUDELA, J.L., RODERO, L., CÓRDOBA, S. Y CUENCA, E. M. 2000. III Curso Hispano Argentino de Micología Médica Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio. Unidad Micología centro nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España.

ROGER, A., SANDBLOM, O., DOOLITTLE, W. Y PHILIPPE, H. 1999. An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 218 - 233.

RONCERO, M., DI PIETRO, A., RUIZ-ROLDÁN, M., HUERTAS-GONZÁLEZ, M., GARCIA-MACEIRA, F., MÉGLECZ, E., JIMÉNEZ, A., CARACUEL, Z., SANCHO-ZAPATERO, R., HERA, C., GÓMEZ-GÓMEZ, E., RUIZ-RUBIO, M., GONZÁLEZ-VERDEJO, C. & M. PÁEZ. 2000. Papel de Enzimas Líticas de la Pared Celular en la Patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S47 - S53.

RONCERO, MI., DI PIETRO, A., RUIZ-ROLDÁN, MC., HUERTAS-GONZÁLEZ, MD., GARCÍA-MACEIRA, FI., MÉGLECZ, E., JIMÉNEZ, A., CARACUEL, Z., SANCHO-ZAPATERO, R., HERA, C., GÓMEZ-GÓMEZ, E., RUIZ-RUBIO, M., GÓNZALEZ-VERDEJO, CI., PÁEZ, MJ. 2000. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S47 - S53.

SABATELLI, F. R., PATEL, P. A., MANN, C. A., MENDRICK, C. C., NORRIS, R., HARE, D., LOEBENBERG, T. A., BLACK, Y MCNICHOLAS, P.M. 2006. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2009-2015.

SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S. Y FRISVAD, J., C. 2004. Introduction to food and airborne fungi. Centraalbureau Voor Schimmelcultures – Utrecht. Seventh edition.

SAMUELS, G., NIRENBERG, H., SEIFERT, K. 2001. Perithecial species of *Fusarium*. In: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW, eds. *Fusarium: Paul E. Nelson memorial symposium*. St Paul, Minnesota: APS Press. pp 1–14.

SCHRAG, S. J. Y WEINER, P. 1995 Emerging infectious diseases- what are the relative roles of ecology and evolution? *Trends Ecol. Evol.* 10: 319-324.

SEGAL, B. 2006. *Principles of Molecular Medicine*. Second Edition. Human Press. 920-933.

SPEELEVELD, E., GORDSTS, B., VAN-LANDUYT, H.W., DE-VROEY, C., RAES-WUYTACK, C. 1996. Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs *Mycoses*. 39:37-40.

SUMMERELL, B., LESLIE, J., BACKHOUSE, D., BRYDEN, W. & L. BURGUÉS. 2001. *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. American Phytopathological Societ Press. St. Paul, Minnessota, EEUU. 408 pp.

SUMMERELL, B., SALLEH, B., LESLIE, J. 2003. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease*. 87 (2): 117 - 127.

SUMMERELL, R., RICHARDSON, S., KANE, J. 1988. *Fusarium proliferatum* as

TAPIA, C.V. 2009. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Rev Chil Infect.* 26(2) 144-150.

TOSTI, A., PIRACCINI, B.M., LORENZI, S. 2000. Onychomycosis causated by no dermatophytic molds clinical features and response to treatment of 59 cases. *Journal of American Academic Dermatology* 42:217–24.

VAN BAARLEN, P., van BELKUM, A., SUMMERBELL, R., CROUS, P. & B. THOMMA. 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 239 – 277.

VAN BELKUM, A., SCHERER, S., VAN ALPHEN, L., Y.VERBRUGH H. 1998. Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 275–93.

VAN BURIK, V., J.O-ANNE, H. AND MAGEE, P. 2001. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annual Review of Microbiology.* 55: 743-772.

VANDEN B. H. 1997. Mechanisms of antifungal resistance. *Revista Iberoamericana de micología.* 14:44-49.

VEGA, D. 2009. Identificación y caracterización enzimática y molecular de aislamientos de *Fusarium* spp. de lesiones en animales, humanos y plantas.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKI, J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19: 6823 – 6831.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M. DE BRUJIN, F. Y LUPSKI J. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25 - 40.

WEITZMAN, I., Y SUMMERBELL, R. 1995. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews* 8 (2): 240 – 259.

WENGENACK, N., BINNICKER, M. 2009. Fungal molecular diagnostics. *Clin Chest Med* 30: 391 - 408.

WU, F., DELLA-LATTA, P. 2002. Molecular typing strategies. *Semin. Perinatol.* 26: 357 - 366.

XIANGMING, X. P., NICHOLSON, A. RITIENI. 2007. Effects of fungal interactions among *Fusarium* head blight pathogens on disease development and mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology*. 119: 67–71.

YING, S.H. Y FENG M.G.. 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 323–331

YLI-MATTILA, T., PAAVANEN-HUHTALA, S., BULAT, S. A., ALEKHINA, I. A. and NIRENBERG, H. I. 2002. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex a polyphasic approach. *Mycol. Res.* 106 (6): 655-669.

ZAMBRANO, K., CARBALLO, O., GERAUD, F., CHIRINOS, D., FERNANDÉZ, C.Y MARYS E. 2007. First report of Tomato yellow leaf curl virus in Venezuela. *Plant Dis.* 91: 768.

13. ANEXOS

Anexo 5.1. Identificación morfológica de *Fusarium* spp

Fusarium solani

Cepa 108	Macroconidio			Forma	Apice	Pie	Microconidio			Forma	Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS				Tamaño µm	Promedio	DS		Tamaño µm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla	27,16 x 4,8	24,3 x 4,8	4,1 x 0	Escasos macroconidios ancho, robusto con célula apical redonda, 3 septos	Redondo		9,7 x 4,8	7,8 x 4,5	1,9 x 0,9	Curvados, elipsoidales u ovalados, 0-2 septos	57,2	71,8	25,2	Intercalares, globosas y de pared lisa		Micelio delgado, septado, largas monofiáldes, cabezas mucilaginosas
	21,34 x 4,8						9,7 x 4,8				48,5					
							9,7 x 4,8				95,1					
							9,7 x 4,8				55,3					
							5,8 x 4,8				102,8					
							4,8 x 4,8									
							5,8 x 1,9									
							8,7 x 4,8									
							7,7 x 4,8									
			6,7 x 4,8													
Microcultivo agar PDA	29,1 x 4,8	27,9 x 4,8	3,47 x 0	Abundantes macroconidios ancho con célula apical redonda, 3-4septos	Redondo					No se observan	55,3	61,1	19,7	Intercalares y terminales en cadena de pared lisa	Anverso: amarillo naranja Reverso: amarillo-naranja sin pigmento difusible	Monifiáldes
	24,3 x 4,8										45,6					
	24,3 x 4,8										44,6					
	24,3 x 4,8										67,9					
	34 x 4,8										92,2					
	29,1 x 4,8															
	29,1 x 4,8															
	31 x 4,8															
	24,3 x 4,8															
30,1 x 4,8																
Microcultivo agar Avena	14,6 x 3,8	19,4 x 4,4	5,1 x 0,5	Macroconidios ancho con célula apical redonda, 3-4septos	Redondo		6,7 x 4,8	9,1 x 4,4	1,6 x 0,5	Curvados, elipsoidales u ovalados, 0-2 septos	74,7	65,0	14,3			Micelio delgado, septado, largas monofiáldes, cabezas mucilaginosas
	11,6 x 4,8						9,7 x 3,8				50,4					
	14,6 x 4,8						9,7 x 4,8				61,1					
	23,3 x 4,8						12,6 x 4,8				97,0					
	22,3 x 3,8						8,7 x 4,8				67,9					
	21,3 x 4,8						7,7 x 3,8				64,0					
	21,3 x 4,8						7,7 x 3,8				63,1					
	26,2 x 3,8						8,7 x 4,8				53,4					
							9,7 x 3,8				53,4					
			9,7 x 4,8													
Agar CLA (10 días)	24,3 x 4,8	31,7 x 4,6	4,5 x 0,4	Abundantes macroconidios con célula apical redonda, 3-4septos	Redondo		9,7 x 3,8	10,4 x 4,17	3 x 0,4	Curvados, elipsoidales u ovalados, 0-1 septos	27,2	25,7	2,1	Intercalares y terminales en cadena de pared lisa		Micelio delgado, septado, largas monofiáldes, cabezas mucilaginosas
	35,9 x 4,8						7,7 x 3,8				24,3					
	27,2 x 4,8						9,7 x 3,8									
	33 x 4,8						9,7 x 3,8									
	35,9 x 3,8						9,7 x 4,8									
	32 x 4,8						8,7 x 3,8									
	33 x 4,8						10,6 x 4,8									
	28,1 x 3,8						10,6 x 3,8									
	38,8 x 4,8						8,7 x 3,8									
29,1 x 4,8			18,4 x 4,8													
Agar CLA (15 días)	34 x 4,8	31,8 x 4,8	2,5 x 0	Macroconidios con célula apical redonda, 3-4septos, algunos desarrollo de pie	Redondo	Si	17,4 x 3,8	11,4 x 4,37	5,4 x 0,3	Curvados, elipsoidales u ovalados, 0-1 septos						Fiáldes no se observan
	33 x 4,8						20,3 x 4,8									
	33 x 4,8						9,7 x 4,8									
	29,1 x 4,8						7,7 x 4,8									
	35,9 x 4,8						7,7 x 4,8									
	29,1 x 4,8						14,5 x 4,8									
	29,1 x 4,8						5,8 x 4,8									
	31 x 4,8						7,7 x 4,8									
Agar CLA (21 días)	16,5 x 4,8	26,6 x 4,3	8,7 x 0,5	Abundantes macroconidios con célula apical redonda, 3-4septos			11,6 x 4,8	11 x 4,6	1,2 x 0,4	Curvados, elipsoidales u ovalados de 0-1 septos	48,5	48,5				Fiáldes no se observan
	20,4 x 4,8						9,7 x 4,8									
	19,4 x 4,8						11,6 x 4,8									
	19,4 x 4,8						10,6 x 4,8									
	20,4 x 4,8						13,5 x 3,8									
	24,3 x 3,8						10,6 x 3,8									
	34 x 3,8						9,7 x 4,8									
	38,8 x 3,8						9,7 x 4,8									
	34 x 3,8						10,6 x 4,8									
38,8 x 3,8			11,6 x 4,8													

<i>Fusarium equiseti</i>																										
Cepa 111	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones										
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS													
Microcultivo agar Cla	25,2 x 3,9	23,8 x 3,8	4,4 x 0	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado	16 x 3,9	18,1 x 3,8	1,4 x 0	Ovalada, 1 septo																
	28,1 x 3,9																									
	16,5 x 3,9																									
	23,3 x 3,9																									
	19,4 x 3,9																									
	18,4 x 3,9																									
	24,3 x 3,9																									
	29,1 x 3,9																									
	24,3 x 3,9																									
29,1 x 3,9																										
Microcultivo agar PDA	35,9 x 3,9	25,6 x 3,2	4,7 x 0,4	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado					23,3	23,3		Intercalares	Anverso: blanco algodonoso Reverso: blanco sin pigmento difusible	Monofálides										
	29,1 x 2,9																									
	21,3 x 3,9																									
	24,3 x 2,9																									
	18,4 x 2,9																									
	24,3 x 2,9																									
	26,2 x 3,9																									
	23,3 x 2,9																									
	28,1 x 2,9																									
25,2 x 2,9																										
Microcultivo agar Avena	24,3 x 3,9	26,6 x 3,8	2,6 x 0	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado					8,7	9,2	0,7	Intercalares		Monofálides										
	29,1 x 3,9																									
	32 x 3,9																									
	24,3 x 3,9																									
	24,3 x 3,9																									
	29,1 x 3,9																									
	26,2 x 3,9																									
	24,3 x 3,9																									
	26,2 x 3,9																									
26,2 x 3,9																										
Agar CLA (10 días)	38,8 x 3,9	30,7 x 3,8	5,9 x 0	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado								Intercalares en cadena												
	38,8 x 3,9																									
	36,9 x 3,9																									
	31 x 3,9																									
	33 x 3,9																									
	24,3 x 3,9																									
	24,3 x 3,9																									
	29,1 x 3,9																									
	26,2 x 3,9																									
24,3 x 3,9																										
Agar CLA (15 días)	38,8 x 3,9	35 x 3,8	5,6 x 0	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado	17 x 3,9	17,7 x 3,8	1,4 x 0	Ovalada, 1 septo				Intercalares en cadena												
	38,8 x 3,9										16 x 3,9															
	36,9 x 3,9										19 x 3,9															
	31 x 3,9																									
	33 x 3,9																									
	23,3 x 3,9																									
	39,8 x 3,9																									
	38,8 x 3,9																									
Agar CLA (21 días)							13 x 3,9	12,6 x 3,8								Se observa solo micelio, septado (3 montajes realizados)										

<i>Fusarium sporotrichioides</i>																
Cepa 121	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							6,8 x 1,9	7,5 x 2,1	1,1 x 0,4	Piriformes, elipsoidales de 0-1 septo	38,8	34,0	6,9			Monofiálides y polifiálides, muñones
							7,8 x 1,9				29,1					
							6,8 x 1,9									
							8,7 x 2,9									
							6,8 x 1,9									
							9,7 x 2,9									
							5,8 x 1,9									
							6,8 x 1,9									
							7,8 x 1,9									
						8,7 x 1,9										
Microcultivo agar PDA	22,3 x 4,9	25,7 x 4,8	4,8 x 0	Delgados con curva dorsal,	Curvado y ahusado		13 x 3,9	10 x 3,5	1,8 x 0,5	Piriformes, elipsoidales de 0-1 septo					Anverso: amarillo rojizo algodonosos Reverso: amarillo-rojizo con pigmento rojo difusible a la 3a semana	Poca esporulación
	29,1 x 4,9						12 x 2,9									
							9,7 x 2,9									
							8,7 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
							9,7 x 3,9									
Microcultivo agar Avena							9,7 x 2,9	9,8 x 2,7	0,8 x 0,4	Piriformes, elipsoidales de 0-1 septo				Intercalares en cadena	No se observan estructuras claras	
							11 x 2,9									
							9,7 x 1,9									
							11 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
Agar CLA (10 días)							9,7 x 2,9	9 x 3	0,9 x 0,3	Piriformes de 0-1 septo	29,1	24,3	8,4		Micelio grueso y delgado, monofiálides y polifiálides	
							7,8 x 2,9				29,1					
							8,7 x 2,9				14,6					
							9,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							9,7 x 2,9									
							9,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
Agar CLA (15 días)							6,8 x 1,9	6,8 x 2,3	0,8 x 0,5	Pequeños 0 - 1 septos (lágrimas)	9,7	11,8	2,0	Intercalares	Monofiálides y polifiálides, muñones	
							5,8 x 1,9				14,6					
							6,8 x 1,9				9,7					
							6,8 x 2,9				11,6					
							5,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 1,9				11,6					
							7,8 x 2,9				10,7					
							8,7 x 2,9				11,6					
							6,8 x 1,9				14,6					
			6,8 x 1,9			14,6										
Agar CLA (21 días)							8,7 x 2,9	8,8 x 2,9	0,9 x 0	Pequeños 0 - 1 septos (lágrimas)				Intercalares y en cadenas		
							8,7 x 2,9									
							9,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							9,7 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							11 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
			7,8 x 2,9													

<i>Fusarium equiseti</i>															
Cepa 131	Macroconidio						Microconidio			Fialide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom			
Microcultivo agar Cla	29,1 x 2,9	32 x 3	3,4 x 0,3	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado									
	29,1 x 2,9														
	38,8 x 2,9														
	29,1 x 2,9														
	31 x 2,9														
	31 x 2,9														
	34 x 2,9														
34 x 3,9															
Microcultivo agar PDA	24,3 x 2,9	26,8 x 2,9	5,5 x 0	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado									Anverso: blanco amarillo algodonosos Reverso: salmón sin pigmento difusible.
	24,3 x 2,9														
	20,4 x 2,9														
	31 x 2,9														
	34 x 2,9														
Microcultivo agar Avena	29,1 x 1,9	27,8 x 3,3	3,3 x 0,8	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado									
	24,3 x 1,9														
	25,2 x 3,9														
	26,2 x 2,9														
	32 x 3,9														
	29,1 x 2,9														
	24,3 x 3,9														
	32 x 3,9														
24,3 x 3,9															
Agar CLA (10 días)	41,7 x 2,9	35,2 x 3,4	3,8 x 0,6	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado									
	34 x 2,9														
	34,9 x 3,9														
	34,9 x 3,9														
	30,1 x 2,9														
	39,8 x 2,9														
	38,8 x 4,9														
	34 x 3,9														
30,1 x 2,9															
34 x 3,9															
Agar CLA (15 días)	48,5 x 2,9	41,5 x 2,9	8,6 x 0	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado	Ahusada y elongada	Prominente y elongado	13 x 2,9	13,5 x 2,9	1,3 x 0	Ovalada, 1 septo				Intercalares	
	26,2 x 2,9														
	43,7 x 2,9														
	35,9 x 2,9														
	43,7 x 2,9														
	29,1 x 2,9														
	39,8 x 2,9														
	51,4 x 2,9														
48,5 x 2,9															
48,5 x 2,9															
Agar CLA (21 días)	42,7 x 1,9	30,8 x 1,9	8,5 x 0	Muy largos y delgados con dorso ventral pronunciado, rugosos	Ahusada y elongada	Prominente y elongado									
	34 x 1,9														
	29,1 x 1,9														
	38,8 x 1,9														
	19,4 x 1,9														
	17,5 x 1,9														
	24,3 x 1,9														
	38,8 x 1,9														
34,9 x 1,9															
29,1 x 1,9															

<i>Fusarium verticillioides - Fisarium proliferatum</i>																
Cepa 155	Macroconidio						Microconidio			Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones	
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom				DS
Microcultivo agar Cla							4,9 x 1,9	6,2 x 2,	0,6 x 0,3	Ovales, pequeños de base truncada, 0 septos	48,5	46,0	6,6			Monofiálides en pares y forma de orejas de conejo
							6,8 x 1,9				53,4					
							6,8 x 1,9				43,7					
							5,8 x 1,9				48,5					
							5,8 x 1,9				35,9					
							6,8 x 1,9									
							5,8 x 1,9									
							6,8 x 1,9									
							6,8 x 2,9									
Microcultivo agar PDA	20,4 x 2,9	18,1 x 2,9	2,02 x 0	Escasos, largos y delgados	Curvado		7,8 x 1,9	6,4 x 2,1	0,7 x 0,4	Ovales, pequeños de base truncada, 0 septos	29,1	24,0	2,7	Anverso: naranja violeta algodonoso Reverso: blanco violeta sin pigmento difusible		Monofiálides en pares y forma de orejas de conejo
	17,5 x 2,9						6,8 x 1,9				29,1					
	16,5 x 2,9						5,8 x 1,9				22,3					
							6,8 x 1,9				29,1					
							7,8 x 2,9				29,1					
							5,8 x 2,9				27,2					
							5,8 x 1,9				25,2					
							5,8 x 1,9				25,2					
							6,8 x 1,9				23,3					
Microcultivo agar Avena	24,3 x 4,9	24,3 x 4,8					9,7 x 1,9	9,7 x 2,4	0,5 x 0,7	Ovales, pequeños de base truncada, 0 septos	24,3	20,9	4,8			
							7,8 x 2,9				17,5					
							8,7 x 1,9									
							9,7 x 3,9									
							15 x 2,9									
							11 x 1,9									
							6,8 x 1,9									
Agar CLA (10 días)							5,8 x 1,9	7,2 x 2,4	1 x 0,5	Pequeños con base truncada, 0 septos	31,0	27,0	4,2		Monofiálides en pares y forma de orejas de conejo. Se observó una cabeza mucilaginoso	
							6,8 x 2,9				24,3					
							6,8 x 2,9				33,0					
							6,8 x 1,9				34,0					
							7,8 x 1,9				26,2					
							6,8 x 2,9				27,2					
							9,7 x 2,9				24,3					
							7,8 x 1,9				24,3					
							6,8 x 2,9				22,3					
Agar CLA (15 días)							5,8 x 2,9	7,9 x 2,9	1,9 x 0	Pequeños con base truncada, 0 septos	24,3	22,3	1,9		Monofiálides en pares y forma de orejas de conejo, largas cadenas de microconidios	
							4,9 x 2,9				24,3					
							6,8 x 2,9				24,3					
							9,7 x 2,9				21,3					
							7,8 x 2,9				22,3					
							6,8 x 2,9				20,4					
							11 x 2,9				19,4					
							11 x 2,9				22,3					
							7,8 x 2,9									
Agar CLA (21 días)	20,4 x 2,9	18,1 x 2,9	2,0 x 0	Rugosos			6,8 x 2,9	8,1 x 3	1,2 x 0,3	Pequeños con base truncada, 0 septos	24,3	26,7	3,4			
	17,5 x 2,9						8,7 x 2,9				29,1					
	16,5 x 2,9						11 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
							7,8 x 3,9									
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
			6,8 x 2,9													

<i>Fusarium verticillioides</i>																
Cepa 156	Macroconidio						Microconidio						Clamidospora	Color de colonia	Observaciones	
	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Tamaño μm	Prom				DS
Microcultivo agar Cla	14,6 x 2,9	14,6 x 2,9		Escasos, largos y delgados, 3 septos	Curvado		7,8 x 2,9	8 x 2,7	1,1 x 0,4	Pequeños con base truncada, 0 septos	24,3	27,2	2,7			Monofialides orejas de conejo cadenas de microconidios
							8,7 x 2,9				29,1					
							5,8 x 2,9				24,3					
							6,8 x 2,9				29,1					
							8,7 x 2,9				29,1					
							8,7 x 1,9									
							9,7 x 1,9									
							7,8 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
Microcultivo agar PDA	31 x 2,9	31 x 2,9		Escasos, largos y delgados, 3 septos	Curvado		5,8 x 1,9	6,7 x 2,1	1,5 x 0,4	Pequeños con base truncada, 0 septos	21,3	21,4	1,7			Anverso: naranja violeta algodonoso Reverso: violeta sin pigmento difusible
							6,8 x 1,9				19,4					
							5,8 x 2,9				19,4					
							5,8 x 1,9				19,4					
							5,8 x 1,9				21,3					
							6,8 x 1,9				24,3					
							7,8 x 1,9				23,3					
							6,8 x 1,9				22,3					
							5,8 x 1,9				21,3					
							11 x 2,9				22,3					
Microcultivo agar Avena							13 x 1,9	11,6 x 3	2,5 x 0,5	Pequeños con base truncada, 0 septos	19,4	21,5	1,3			Monifialides
							15 x 3,9				21,3					
							12 x 2,9				21,3					
							11 x 2,9				22,3					
							11 x 3,9				19,4					
							12 x 2,9				21,3					
							16 x 2,9				22,3					
							12 x 2,9				22,3					
							12 x 2,9				23,3					
							5,8 x 2,9				22,3					
Agar CLA (10 días)							4,9 x 2,9	7,4 x 2,9	1,6 x 0,4	Pequeños con base truncada, 0 septos	20,4	27,8	6,2			Se observan cadenas de microconidios, no septos y fiálides en forma de orejas de conejo
							5,8 x 2,9				19,4					
							6,8 x 2,9				24,3					
							5,8 x 2,9				23,3					
							7,8 x 2,9				29,1					
							9,7 x 2,9				34,0					
							9,7 x 1,9				38,8					
							7,8 x 2,9				29,1					
							8,7 x 3,9				33,0					
							7,8 x 2,9				27,2					
Agar CLA (15 días)	19,4 x 3,9	19,4 x 3,4	0 x 0,6	Escasos, largos y delgados, 3 septos	Curvado		6,8 x 2,9	8,4 x 3,1	1,7 x 0,4	Pequeños con base truncada, 0 septos	21,3	27,4	7,6			Monofialides en forma de orejas de conejo, cadenas de microconidios
	19,4 x 2,9						8,7 x 2,9				19,4					
							7,8 x 2,9				24,3					
							9,7 x 2,9				15,5					
							4,9 x 2,9				29,1					
							9,7 x 2,9				29,1					
							9,7 x 2,9				25,2					
							8,7 x 2,9				38,8					
							11 x 3,9				35,9					
							7,8 x 2,9				34,9					
Agar CLA (21 días)	24,3 x 1,9	35,9 x 2,7	8,1 x 0,4	Escasos, largos y delgados, 3 septos	Curvado		12 x 2,9	8,7 x 3	1,7 x 0,3	Pequeños con base truncada, 0 septos	24,3	17,2	6,5			Monofialides en forma de orejas de conejo
	29,1 x 1,9						9,7 x 2,9				11,6					
	27,2 x 2,9						8,7 x 2,9				10,7					
	38,8 x 2,9						7,8 x 2,9				11,6					
	29,1 x 2,9						8,7 x 2,9				24,3					
	46,6 x 2,9						9,7 x 2,9				11,6					
	41,7 x 2,9						11 x 2,9				29,1					
	44,6 x 2,9						7,8 x 2,9				14,6					
	43,7 x 2,9						5,8 x 2,9				16,5					
	34 x 2,9						6,8 x 3,9				17,5					

<i>Fusarium sporotrichioides</i>																		
Cepa 159	Macroconidio						Microconidio						Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Tamaño μm	Prom	DS					
Microcultivo agar Cla	14,6 x 3,9	14,6 x 3,8		Mesoconidios			9,7 x 3,9	7,3 x 3,4	1,7 x 0,5	Piriformes, ovales, fusoides de 0-1 septo	9,7	9,5	1,7	Muchas clamidosporas intercalares		Polifiálides, muñones		
					4,9 x 3,9			8,7										
					5,8 x 2,9			7,8										
					7,8 x 2,9			11,6										
					4,9 x 3,9													
					6,8 x 3,9													
					7,8 x 2,9													
					8,7 x 2,9													
					7,8 x 2,9													
					9,7 x 3,9													
Microcultivo agar PDA							7,8 x 1,9	7,2 x 2,9	1,7 x 0,6	Piriformes, ovales, fusoides de 0-1 septo	9,7	8,2	2,4		Anverso: amarillo rojizo algodonosos Reverso: amarillo-rojizo con pigmento rojo difusible a la 3a semana	Polifiálides, muñones		
				4,9 x 1,9			9,7											
				5,8 x 2,9			8,7											
				5,8 x 2,9			10,7											
				5,8 x 2,9			5,8											
				9,7 x 3,9			4,9											
				7,8 x 2,9														
				6,8 x 3,9														
				8,7 x 2,9														
				9,7 x 2,9														
Microcultivo agar Avena							7,8 x 3,9	8,3 x 3,5	1,9 x 0,5	Piriformes, ovales, fusoides de 0-1 septo	9,7	8,1	2,8			Polifiálides, muñones		
				12 x 2,9			5,8											
				8,7 x 2,9			4,9											
				5,8 x 3,9			8,7											
				8,7 x 3,9			11,6											
				9,7 x 3,9														
				11 x 3,9														
				5,8 x 3,9														
				6,8 x 2,9														
				7,8 x 2,9														
Agar CLA (10 días)							6,8 x 3,9	7,4 x 2,9	3 x 1,1	Piriformes, ovales, fusoides de 0-1 septo	14,6	19,6	3,1			Monofiálides (no lo forma <i>F. nelsonii</i>) y polifiálides, muñones, apariencia orejas de conejo (no lo forma <i>F. nelsonii</i>)		
				5,8 x 2,9			19,4											
				7,8 x 2,9			25,2											
				8,7 x 2,9			22,3											
				7,8 x 2,9			19,4											
				7,8 x 2,9			17,5											
				12 x 2,9			19,4											
				9,7 x 3,9			19,4											
				8,7 x 3,9														
Agar CLA (15 días)	15,5 x 2,9	17,3 x 2,9	1,4 x 0	Abundantes mesoconidios			9,7 x 2,9	9,4 x 3,0	0,7 x 0,3	Piriformes, ovales, fusoides de 0-1 septo	27,2	14,3	6,4	Intercalares		Monofiálides y polifiálides, muñones, apariencia orejas de conejo (no lo forma <i>F. nelsonii</i>)		
	19,4 x 2,9				8,7 x 2,9			9,7										
	17,5 x 2,9				9,7 x 2,9			11,6										
	17,5 x 2,9				8,7 x 2,9			9,7										
	15,5 x 2,9				9,7 x 2,9			9,7										
	19,4 x 2,9				11 x 2,9			24,3										
	17,5 x 2,9				9,7 x 2,9			14,6										
	17,5 x 2,9				9,7 x 2,9			9,7										
	17,5 x 2,9				9,7 x 2,9			11,6										
	15,5 x 2,9				7,8 x 3,9			14,6										
Agar CLA (21 días)							8,7 x 2,9	8,1 x 2,9	1 x 0	Piriformes, ovales, fusoides de 0-1 septo				Intercalares		Polifiálides, muñones		
				7,8 x 2,9														
				9,7 x 2,9														
				7,8 x 2,9														
				6,8 x 2,9														
				7,8 x 2,9														
				9,7 x 2,9														
				8,7 x 2,9														
				7,8 x 2,9														
				6,8 x 2,9														

Cepa 160	<i>Fusarium sporotrichioides</i>															
	Macroconidio						Microconidio				Fialide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Tamaño μm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla	19,4 x 2,9	17,3 x 2,9	1,4 x 0	Mesoconidios, fusoides		No forma	8,7 x 2,9	8,1 x 2,8	1,3 x 0,3	Piriformes, redondos de 0-1 septo	9,7	12,9	5,6	Intercalares y terminales		polifiálides, muñones
	17,5 x 2,9						9,7 x 2,9				19,4					
	17,5 x 2,9						5,8 x 2,9				9,7					
	15,5 x 2,9						9,7 x 1,9									
	19,4 x 2,9						8,7 x 2,9									
	17,5 x 2,9						5,8 x 2,9									
	17,5 x 2,9						8,7 x 2,9									
	15,5 x 2,9						7,8 x 2,9									
	17,5 x 2,9						7,8 x 2,9									
	15,5 x 2,9						8,7 x 2,9									
Microcultivo agar PDA							9,7 x 2,9	8,8 x 2	1,2 x 0,3	Piriformes de 0-1 septo	9,7	10,7	1,0	Intercalares	Anverso: amarillo rojizo algodonosos Reverso: amarillo-rojizo con pigmento rojo difusible a la 3a semana	Polifiálides, muñones
							7,8 x 2,9				11,6					
							12 x 2,9				11,6					
							7,8 x 3,9				10,7					
							9,7 x 2,9				11,6					
							8,7 x 2,9				9,7					
							7,8 x 2,9				9,7					
							8,7 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
Microcultivo agar Avena							6,8 x 2,9	7,8 x 3	1,1 x 0,3	Piriformes de 0-1 septo	11,6	11,7	1,4	Intercalares		Polifiálides
							6,8 x 3,9				11,6					
							9,7 x 2,9				9,7					
							7,8 x 2,9				11,6					
							8,7 x 2,9				12,6					
							9,7 x 2,9				14,6					
							7,8 x 2,9				11,6					
							6,8 x 2,9				11,6					
							7,8 x 2,9				12,6					
							6,8 x 2,9				9,7					
Agar CLA (10 días)							7,8 x 2,9	7,9 x 2,9	0,8 x 0	Piriformes de 0-1 septo	9,7	11,8	3,7			Polifiálides, muñones
							7,8 x 2,9				9,7					
							9,7 x 2,9				9,7					
							8,7 x 2,9				19,4					
							8,7 x 2,9				9,7					
							7,8 x 2,9				11,6					
							6,8 x 2,9				7,8					
							7,8 x 2,9				9,7					
							7,8 x 2,9				14,6					
							6,8 x 2,9				16,5					
Agar CLA (15 días)							9,7 x 3,9	9,5 x 3,1	1,2 x 0,4	Piriformes de 0-1 septo	15,5	15,3	0,8	intercalares amarillas con puntos.		Polifiálides, muñones
							9,7 x 3,9				14,6					
							12 x 2,9				16,5					
							9,7 x 2,9				14,6					
							7,8 x 2,9				15,5					
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							11 x 2,9									
							11 x 2,9									
Agar CLA (21 días)							9,7 x 2,9	8 x 3,1	1,5 x 0,4		9,7	10,1	2,6	Terminales e intercalares		Polifiálides, muñones
							7,8 x 2,9				14,6					
							5,8 x 2,9				8,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
							8,7 x 3,9				7,8					
							9,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							5,8 x 2,9									

<i>Fusarium verticillioides</i>															
Cepa 161	Macroconidio						Microconidio			Fialide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom			
Microcultivo agar CLA							11 x 2,9	9,2 x 2,4	2,3 x 0,6	Gordos, ovalados con base truncada, 0-1 septos	19,4	27,2	12,2		Monofialides orejas de conejo, cadenas de microconidios
							6,8 x 1,9				24,3				
							9,7 x 2,9				24,3				
							8,7 x 3,9				19,4				
							15 x 2,9				48,5				
							6,8 x 1,9								
							7,8 x 1,9								
							11 x 1,9								
							7,8 x 1,9								
							8,7 x 1,9								
Microcultivo agar PDA							5,8 x 2,9	6,2 x 2,7	0,8 x 0,6	Gordos, ovalados con base truncada, 0-1 septos	20,4	22,2	4,8	Anverso: morado algodonoso Reverso: morado sin pigmento difusible	Monofialides, orejas de conejo
							6,8 x 2,9				16,5				
							6,8 x 2,9				24,3				
							5,8 x 1,9				24,3				
							5,8 x 2,9				31,0				
							4,9 x 2,9				19,4				
							6,8 x 3,9				19,4				
							7,8 x 2,9								
							5,8 x 1,9								
							5,8 x 1,9								
Microcultivo agar Avena							5,8 x 2,9	6,5 x 2,5	1,2 x 0,5	Gordos, ovalados con base truncada, 0-1 septos	19,4	24,3	5,3	Buscar cadenas	
							4,9 x 2,9				24,3				
							6,8 x 1,9				20,4				
							5,8 x 2,9				35,9				
							6,8 x 2,9				26,2				
							4,9 x 1,9				17,5				
							6,8 x 1,9				21,3				
							7,8 x 2,9				24,3				
							7,8 x 1,9				24,3				
							8,7 x 2,9				29,1				
Agar CLA (10 días)							8,7 x 2,9	9,7 x 3,7	3,2 x 0,6	Gordos, ovalados con base truncada, 0-1 septos	29,1	26,9	4,3	Monofialides orejas de conejo	
							9,7 x 2,9				27,2				
							13 x 3,9				24,3				
							17 x 4,9				19,4				
							9,7 x 3,9				25,2				
							9,7 x 2,9				29,1				
							7,8 x 3,9				27,2				
							6,8 x 3,9				35,9				
							6,8 x 3,9				27,2				
							8,7 x 3,9				24,3				
Agar CLA (15 días)	17,5 x 2,9	30,4 x 2,9	9,6 x 0	Largas y delgadas de pared delgada,	Curvada y ahusada	forma de pie o muesca	9,7 x 1,9	11 x 2,9	1 x 0,7	Gordos, ovalados con base truncada, 0-1 septos	29,1	25,5	4,6		Monofialides, orejas de conejo
	30,1 x 2,9						13 x 1,9				19,4				
	19,4 x 2,9						9,7 x 3,9				29,1				
	24,3 x 2,9						12 x 2,9				24,3				
	19,4 x 2,9						12 x 2,9								
	43,7 x 2,9						9,7 x 2,9								
	38,8 x 2,9						11 x 1,9								
	34 x 2,9						12 x 2,9								
	37,8 x 2,9						12 x 3,9								
	38,8 x 2,9						12 x 3,9								
Agar CLA (21 días)	24,3 x 2,9	25,7 x 2,9	4,5 x 0				6,8 x 2,9	9,7 x 2,9	1,8 x 0,4	Gordos, ovalados con base truncada, 0-1 septos	22,3	23,1	3,3		Monofialides
	31 x 2,9						7,8 x 1,9				24,3				
	27,2 x 2,9						9,7 x 2,9				19,4				
	20,4 x 2,9						12 x 2,9				22,3				
							8,7 x 2,9				29,1				
							9,7 x 2,9				21,3				
							12 x 2,9								
							8,7 x 2,9								
							12 x 2,9								
							12 x 3,9								

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 162	Macroconidio						Microconidio			Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones	
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom				DS
Microcultivo agar Cla							5,8 x 1,9	6,8 x 2,6	1 x 0,4	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	9,7	9,3	1,0			Cortas monofialides y cabezas mucilaginosas
							6,8 x 1,9				11,6					
							5,8 x 2,9				9,7					
							7,8 x 1,9				8,7					
							8,7 x 2,9				8,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
							5,8 x 2,9				8,7					
							7,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				7,8					
							5,8 x 2,9				8,7					
Microcultivo agar PDA							3,9 x 1,9	6,1 x 2,5	1,5 x 0,5	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	14,6	11,7	5,0	Terminales e intercalares	Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	Cortas monofialides
							9,7 x 2,9				11,6					
							5,8 x 2,9				11,6					
							5,8 x 1,9				13,6					
							5,8 x 1,9				14,6					
							5,8 x 2,9				22,3					
							7,8 x 2,9				4,9					
							4,9 x 1,9				9,7					
							5,8 x 2,9				5,8					
							5,8 x 2,9				8,7					
Microcultivo agar Avena							7,8 x 2,9	9 x 3,5	1,7 x 0,6	Abundantes, ovales, elipsoidales y arrañados, 0 septos, se observan 2 vacuolas	14,6	14,7	3,8			Fiálides gordas y cortas
							8,7 x 2,9				20,4					
							8,7 x 2,9				14,6					
							7,8 x 2,9				14,6					
							6,8 x 2,9				9,7					
							9,7 x 3,9									
							9,7 x 4,9									
							11 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
							13 x 3,9									
Agar CLA (10 días)							6,8 x 3,9	6,9 x 3,7	1,7 x 0,4	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	9,7	9,4	2,7			Fiálides gordas y cortas, cabezas mucilaginosas
							11 x 3,9				8,7					
							5,8 x 2,9				7,8					
							6,8 x 2,9				12,6					
							5,8 x 3,9				9,7					
							5,8 x 3,9				8,7					
							4,9 x 3,9				14,6					
							6,8 x 3,9				7,8					
							7,8 x 3,9				9,7					
							8,7 x 3,9				4,9					
Agar CLA (15 días)							5,8 x 3,9	6,4 x 3,5	0,6 x 0,5	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	9,7	10,6	2,1			Fiálides gordas y cortas, cabezas mucilaginosas
							6,8 x 2,9				10,7					
							5,8 x 3,9				12,6					
							6,8 x 3,9				14,6					
							5,8 x 3,9				9,7					
							6,8 x 2,9				6,8					
							7,8 x 2,9				9,7					
							5,8 x 3,9				10,7					
							6,8 x 2,9				11,6					
							5,8 x 3,9				9,7					
Agar CLA (21 días)							9,7 x 3,9	8,5 x 3,9	1,5 x 0	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	9,7	11,2	4,2			Fiálides gordas y cortas, cabezas mucilaginosas
							12 x 3,9				7,8					
							6,8 x 3,9				6,8					
							7,8 x 3,9				9,7					
							6,8 x 3,9				10,7					
							7,8 x 3,9				11,6					
							8,7 x 3,9				14,6					
							9,7 x 3,9				15,5					
							7,8 x 3,9				19,4					
							8,7 x 3,9				5,8					

Fusarium sp.																	
Cepa 201	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones	
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apíce	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS				
Microcultivo agar Cla	19,4 x 1,9	19 x 1,9					6,8 x 2,9	7,3 x 3,2	1,2 x 0,4		16,5	16,7	5,1			Ausencia de macroconidios. Mancha circular como fotolibro	
							8,7 x 2,9				20,4						
							8,7 x 2,9				15,5						
							7,8 x 2,9				14,6						
							5,8 x 2,9				20,4						
							6,8 x 2,9				9,7						
							8,7 x 2,9				14,6						
							5,8 x 3,9				14,6						
							7,8 x 3,9				12,6						
							5,8 x 3,9				28,1						
Microcultivo agar PDA							6,8 x 2,9	7,08 x 3,59	1,03 x 0,65							Anverso: blanco algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	
							6,8 x 3,9										
							6,8 x 3,9										
							7,8 x 4,9										
							5,8 x 3,9										
							8,7 x 2,9										
							8,7 x 3,9										
							6,8 x 3,9										
							6,8 x 2,9										
							5,8 x 2,9										
Microcultivo agar Avena	14,6 x 3,9	9,4 x 2,6	3,1 x 0				13 x 3,9	7,57 x 3,69	2,37 x 0,41	Curvadas, popochas, largas							
	13,6 x 3,9						7,8 x 3,9										
	19,4 x 3,9						6,8 x 2,9										
							7,8 x 2,9										
							5,8 x 3,9										
							6,8 x 3,9										
							5,8 x 3,9										
							6,8 x 3,9										
							11 x 3,9										
							4,9 x 3,9										
Agar CLA (10 días)							8,7 x 2,9	8,05 x 3,59	0,65 x 0,47								
							7,8 x 3,9										
							8,7 x 3,9										
							8,7 x 2,9										
							7,8 x 3,9										
							7,8 x 3,9										
							8,7 x 3,9										
							7,8 x 3,9										
							6,8 x 2,9										
Agar CLA (15 días)							8,7 x 2,9	7,18 x 3,59	1,66 x 0,65		14,6	14,8	4,4				
							9,7 x 3,9				20,4						
							4,9 x 2,9				9,7						
							6,8 x 3,9				14,6						
							7,8 x 3,9										
							6,8 x 2,9										
							5,8 x 3,9										
							4,9 x 4,9										
							7,8 x 3,9										
							8,7 x 2,9										
Agar CLA (21 días)							8,7 x 2,9	7,47 x 3,3	2,1 x 0,5		6,8	9,1	2,0			Tubos germinativos	
							9,7 x 3,9				10,7						
							9,7 x 3,9				9,7						
							4,9 x 2,9										
							3,9 x 2,9										
							5,8 x 3,9										
							7,8 x 3,9										
							7,8 x 2,9										
							6,8 x 2,9										
							9,7 x 2,9										

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 202	Macroconidio						Microconidio				Fíalide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							3,9 x 1,9	4,7 x 2,8	1,5 x 0,5	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas				Intercalares y terminales		
							4,9 x 2,9									
							3,9 x 2,9									
							4,9 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							2,9 x 1,9									
							4,9 x 2,9									
							7,8 x 3,9									
							2,9 x 2,9									
						5,8 x 2,9										
Microcultivo agar PDA							3,9 x 3,9	6,6 x 3,8	1,5 x 0,6	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas				Terminales e intercalares	Anverso: morado rosado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	
							6,8 x 3,9									
							4,9 x 3,9									
							7,8 x 4,9									
							8,7 x 4,9									
							5,8 x 2,9									
							6,8 x 3,9									
							6,8 x 2,9									
							7,8 x 3,9									
						7,8 x 3,9										
Microcultivo agar Avena							7,8 x 2,9	6,9 x 3,2	1,6 x 0,6	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	9,7	10,7	2,6			Cortas monofialides
							6,8 x 2,9				11,6					
							5,8 x 2,9				9,7					
							11 x 4,9				7,8					
							7,8 x 2,9				14,6					
							5,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							4,9 x 2,9									
						7,8 x 3,9										
Agar CLA (10 días)							4,9 x 3,9	5,8 x 3,9	1,0 x 0,7	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	6,8	6,8	0,0	Intercalares		Escasas, cortas, monofialides
							7,8 x 3,9				6,8					
							6,8 x 2,9									
							4,9 x 3,9									
							4,9 x 3,9									
							5,8 x 2,9									
							4,9 x 4,9									
							5,8 x 4,9									
							6,8 x 3,9									
						5,8 x 4,9										
Agar CLA (15 días)																
Agar CLA (21 días)							5,8 x 3,9	8,5 x 3,7	2,5 x 0,6	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	3,9	6,5	3,0	Terminales		Cortas, monofialides
							6,8 x 2,9				6,8					
							6,8 x 3,9				10,7					
							9,7 x 4,9				4,9					
							8,7 x 3,9									
							14 x 3,9									
							8,7 x 2,9									
							6,8 x 3,9									
							6,8 x 2,9									
						12 x 3,9										

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 202	Macroconidio						Microconidio				Fíalide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							3,9 x 1,9	4,7 x 2,8	1,5 x 0,5	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas				Intercalares y terminales		
							4,9 x 2,9									
							3,9 x 2,9									
							4,9 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							2,9 x 1,9									
							4,9 x 2,9									
							7,8 x 3,9									
							2,9 x 2,9									
						5,8 x 2,9										
Microcultivo agar PDA							3,9 x 3,9	6,6 x 3,8	1,5 x 0,6	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas				Terminales e intercalares	Anverso: morado rosado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	
							6,8 x 3,9									
							4,9 x 3,9									
							7,8 x 4,9									
							8,7 x 4,9									
							5,8 x 2,9									
							6,8 x 3,9									
							6,8 x 2,9									
							7,8 x 3,9									
						7,8 x 3,9										
Microcultivo agar Avena							7,8 x 2,9	6,9 x 3,2	1,6 x 0,6	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	9,7	10,7	2,6			Cortas monofialides
							6,8 x 2,9				11,6					
							5,8 x 2,9				9,7					
							11 x 4,9				7,8					
							7,8 x 2,9				14,6					
							5,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							4,9 x 2,9									
						7,8 x 3,9										
Agar CLA (10 días)							4,9 x 3,9	5,8 x 3,9	1,0 x 0,7	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	6,8	6,8	0,0	Intercalares		Escasas, cortas, monofialides
							7,8 x 3,9				6,8					
							6,8 x 2,9									
							4,9 x 3,9									
							4,9 x 3,9									
							5,8 x 2,9									
							4,9 x 4,9									
							5,8 x 4,9									
							6,8 x 3,9									
						5,8 x 4,9										
Agar CLA (15 días)																
Agar CLA (21 días)							5,8 x 3,9	8,5 x 3,7	2,5 x 0,6	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas	3,9	6,5	3,0	Terminales		Cortas, monofialides
							6,8 x 2,9				6,8					
							6,8 x 3,9				10,7					
							9,7 x 4,9				4,9					
							8,7 x 3,9									
							14 x 3,9									
							8,7 x 2,9									
							6,8 x 3,9									
							6,8 x 2,9									
						12 x 3,9										

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 204	Macroconidio						Microconidio			Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones	
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom				DS
Microcultivo agar Cla							2,9 x 1,9	4,4 x 2,3	1,4 x 0,5	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas. Morfología muy variada	9,7	9,1	1,7			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas y tubos germinativos
							1,9 x 1,9				10,7					
							6,8 x 2,9				7,8					
							3,9 x 2,9				9,7					
							3,9 x 2,9				9,7					
							4,9 x 2,9				9,7					
							4,9 x 1,9				10,7					
							5,8 x 1,9				4,9					
							4,9 x 1,9				9,7					
							3,9 x 1,9				8,7					
Microcultivo agar PDA							15 x 3,9	9,3 x 4,2	3,9 x 0,6	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas. Morfología muy variada						Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: morado sin pigmento sifusible
							13 x 3,9									
							15 x 3,9									
							4,9 x 2,9									
							5,8 x 3,9									
							9,7 x 4,9									
							13 x 3,9									
							5,8 x 4,9									
							6,8 x 4,9									
							5,8 x 4,9									
Microcultivo agar Avena							5,8 x 3,9	6,4 x 3,1	2,5 x 0,7	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas. Morfología muy variada	6,8	7,8	2,6			Escasas, cortas, monofialides,
							9,7 x 2,9				5,8					
							4,9 x 2,9				6,8					
							2,9 x 1,9				4,9					
							6,8 x 2,9				9,7					
							5,8 x 2,9				12,6					
							11 x 3,9				7,8					
							8,7 x 1,9									
							3,9 x 3,9									
							4,9 x 3,9									
Agar CLA (10 días)							9,7 x 3,9	6,5 x 3,4	1,5 x 0,9	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas. Morfología muy variada						
							7,8 x 3,9									
							5,8 x 4,9									
							4,9 x 2,9									
							4,9 x 4,9									
							6,8 x 1,9									
							5,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
Agar CLA (15 días)	15,5 x 3,9	11 x 2,91	2,4 x 0,5	Entre cortas y medio largas, relativamente delgadas y con pared delgada	Curvada	puntiagudo	7,8 x 2,9	7,5 x 3,2	2,1 x 0,5	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas. Morfología muy variada	5,8	7,6	3,9			Escasas, cortas, monofialides,
	17,5 x 4,9						5,8 x 2,9				6,8					
	20,4 x 3,9						4,9 x 2,9				15,5					
							4,9 x 2,9				4,9					
							6,8 x 2,9				6,8					
							7,8 x 2,9				5,8					
							6,8 x 2,9									
							8,7 x 3,9									
							11 x 3,9									
							11 x 3,9									
Agar CLA (21 días)							11 x 2,9	10,1 x 3,8	2,3 x 0,5	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas. Morfología muy variada	3,9	7,5	3,8	Terminales e intercalares		
							6,8 x 3,9				3,9					
							7,8 x 3,9				9,7					
							15 x 3,9				8,7					
							12 x 3,9				14,6					
							11 x 4,9				4,9					
							9,7 x 2,9				4,9					
							11 x 3,9				9,7					
							7,8 x 3,9									
							11 x 3,9									

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 205	Macroconidio						Microconidio				Fialide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla	24,3 x 2,9	23 x 2,7	2,1 x 0,4	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	5,8 x 1,9	5,5 x 1,9	0,6 x 0	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas. Morfología muy variada	11,6	13,6	4,5	Intercalares		Escasas, cortas, monofialides,
	24,3 x 2,9						5,8 x 1,9				19,4					
	19,4 x 2,9						5,8 x 1,9				8,7					
	26,2 x 2,9						4,9 x 1,9				14,6					
	21,3 x 2,9						4,9 x 1,9									
	25,2 x 1,9						5,8 x 1,9									
	24,3 x 2,9						4,9 x 1,9									
	23,3 x 2,9						5,8 x 1,9									
	24,3 x 1,9						6,8 x 1,9									
21,3 x 2,9			4,9 x 1,9													
Microcultivo agar PDA							5,8 x 1,9	6,4 x 1,9	0,94 x 0	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	7,4	2,2		Anverso: morado algodonoso Reverso: blanco sin pigmento difusible	Monofialides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							6,8 x 1,9				9,7					
							7,8 x 1,9				9,7					
							5,8 x 1,9				6,8					
							5,8 x 1,9				4,9					
							4,9 x 1,9									
							5,8 x 1,9									
							6,8 x 1,9									
							7,8 x 1,9									
Microcultivo agar Avena							9,7 x 2,9	8,1 x 2,4	1,6 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	8,1	2,3			Monofialides cortas
							8,7 x 2,9				4,9					
							5,8 x 1,9				11,6					
							5,8 x 1,9				7,8					
							7,8 x 1,9				9,7					
							9,7 x 2,9				8,7					
							9,7 x 2,9				4,9					
							8,7 x 1,9				5,8					
							8,7 x 2,9				8,7					
Agar CLA (10 días)	19,4 x 3,9	13 x 2,26	0,6 x 0,5	Escasos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	9,7 x 3,9	7,7 x 3,8	1,9 x 0,7	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	4,9	1,0			Escasas monofialides cortas
	18,4 x 2,9						5,8 x 4,9				4,9					
	19,4 x 3,9						6,8 x 2,9				3,9					
							5,8 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							6,8 x 4,9									
							5,8 x 3,9									
							11 x 3,9									
							9,7 x 3,9									
Agar CLA (15 días)	20,4 x 2,9	12 x 1,94	3,1 x 0,5	Escasos, rectos a escasamente curvados, ahusados	ahusado	puntiagudo	6,8 x 3,9	7,2 x 3,7	1,8 x 0,6	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	8,4	3,3			Monofialides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
	14,6 x 2,9						8,7 x 3,9				11,6					
	19,4 x 3,9						4,9 x 3,9				7,8					
							6,8 x 3,9				9,7					
							7,8 x 3,9				6,8					
							4,9 x 2,9				5,8					
							5,8 x 2,9				4,9					
							9,7 x 4,9				14,6					
							9,7 x 2,9				5,8					
Agar CLA (21 días)	19,4 x 3,9	19 x 3,8					5,8 x 2,9	7,2 x 3,4	2,9 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	14,6	9,3	3,6	Intercalares		Monofialides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							13 x 2,9				3,9					
							4,9 x 2,9				3,9					
							7,8 x 2,9				9,7					
							4,9 x 2,9				8,7					
							8,7 x 3,9				8,7					
							4,9 x 3,9				14,6					
							12 x 3,9				10,7					
							5,8 x 3,9				8,7					
						4,9 x 3,9			9,7							

<i>Fusarium oxysporum</i>																			
Cepa 206	Macroconidio						Microconidio				Fíalide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones			
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apíce	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS						
Microcultivo agar Cla	19,4 x 3,9	19 x 3,8			ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	7,4 x 3,2	2,4 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	12,0	4,5			Monofíalides cortas y falsas cabezas mucilaginosas			
							5,8 x 2,9				4,9								
							4,9 x 3,9				7,8								
							5,8 x 3,9				7,8								
							6,8 x 2,9				14,6								
							12 x 2,9				16,5								
							12 x 2,9				14,6								
							7,8 x 3,9				19,4								
							6,8 x 2,9				13,6								
							5,8 x 2,9				9,7								
Microcultivo agar PDA							7,8 x 3,9	7,3 x 3,7	2 x 0,6	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	8,7	1,4			Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco sin pigmento difusible			
							6,8 x 2,9				7,8								
							4,9 x 3,9												
							6,8 x 2,9												
							9,7 x 3,9												
							12 x 3,9												
							5,8 x 4,9												
							6,8 x 2,9												
							5,8 x 3,9												
							6,8 x 3,9												
Microcultivo agar Avena							5,8 x 2,9	7,8 x 3,4	1,9 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						No es fácil evaluar morfología en PDA Y avena			
							6,8 x 3,9												
							9,7 x 3,9												
							12 x 2,9												
							9,7 x 2,9												
							7,8 x 3,9												
							6,8 x 3,9												
							5,8 x 3,9												
							6,8 x 2,9												
							6,8 x 2,9												
Agar CLA (10 días)	26,2 x 3,9	29 x 3,3	6,5 x 0,5	Escasos, rectos a escasamente curvados, ahusados	ahusado	puntiagudo	7,8 x 3,9	7,3 x 3,4	1,3 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	27,2	19,4	4,3			Monofíalides cortas y falsas cabezas mucilaginosas			
	19,4 x 3,9						6,8 x 3,9				6,8 x 3,9						18,4		
	34,9 x 2,9						5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						19,4		
	34 x 2,9						7,8 x 2,9				7,8 x 2,9						19,4		
	32 x 2,9						8,7 x 3,9				8,7 x 3,9						14,6		
							9,7 x 2,9				9,7 x 2,9						19,4		
							7,8 x 3,9				7,8 x 3,9						22,3		
							5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						24,3		
							6,8 x 3,9				6,8 x 3,9						14,6		
							5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						14,6		
Agar CLA (15 días)	24,3 x 3,9	24 x 3,2	4,8 x 0,5	Escasos, rectos a escasamente curvados, ahusados	ahusado	puntiagudo	11 x 2,9	8,9 x 3,3	1,4 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.									
	19,4 x 2,9						8,7 x 2,9				8,7 x 2,9								
	29,1 x 2,9						6,8 x 3,9				6,8 x 3,9								
							9,7 x 3,9				9,7 x 3,9								
							11 x 2,9				11 x 2,9								
							8,7 x 2,9				8,7 x 2,9								
							7,8 x 3,9				7,8 x 3,9								
							6,8 x 3,9				6,8 x 3,9								
							9,7 x 2,9				9,7 x 2,9								
							9,7 x 2,9				9,7 x 2,9								
Agar CLA (21 días)	29,1 x 3,9	29 x 3,4	6,8 x 0,5	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	9,7 x 2,9	8,5 x 3,2	4 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	14,6	10,5	3,9			Monofíalides cortas y falsas cabezas mucilaginosas			
	29,1 x 2,9						16 x 3,9				16 x 3,9						8,7		
	34,9 x 3,9						6,8 x 2,9				6,8 x 2,9						9,7		
	37,8 x 2,9						5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						6,8		
	29,1 x 2,9						3,9 x 2,9				3,9 x 2,9						5,8		
	14,6 x 3,9						6,8 x 3,9				6,8 x 3,9						13,6		
	29,1 x 2,9						15 x 3,9				15 x 3,9						11,6		
	29,1 x 3,9						5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						12,6		
							8,7 x 2,9				8,7 x 2,9						4,9		
							6,8 x 2,9				6,8 x 2,9						16,5		

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 207	Macroconidio						Microconidio				Fialide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							6,8 x 1,9	6,8 x 2,2	1,9 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	10,7	13,1	6,8			Monofialides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							3,9 x 1,9				29,1					
							8,7 x 2,9				16,5					
							8,7 x 1,9				15,5					
							9,7 x 1,9				16,5					
							5,8 x 2,9				8,7					
							6,8 x 1,9				5,8					
							7,8 x 2,9				8,7					
							4,9 x 1,9				7,8					
							4,9 x 1,9				11,6					
Microcultivo agar PDA							5,8 x 2,9	6,4 x 3,3	1,1 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	10,1	8,5		Anverso: blanco algodonoso Reverso: blanco sin pigmento	Pocas monofialides cortas
							7,8 x 3,9				24,3					
							7,8 x 2,9				4,9					
							6,8 x 2,9				5,8					
							6,8 x 2,9				26,2					
							4,9 x 3,9				8,7					
							7,8 x 3,9				2,9					
							4,9 x 2,9				2,9					
							5,8 x 2,9				3,9					
							5,8 x 3,9				9,7					
Microcultivo agar Avena							3,9 x 2,9	6,01 x 2,8	1,4 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	9,5	2,2			Monofialides cortas
							7,8 x 3,9				11,6					
							7,8 x 2,9				7,8					
							5,8 x 2,9				7,8					
							4,9 x 2,9				6,8					
							5,8 x 2,9				9,7					
							4,9 x 1,9				8,7					
							6,8 x 2,9				6,8					
							4,9 x 1,9				11,6					
							7,8 x 2,9				12,6					
Agar CLA (10 días)							5,8 x 2,9	6,1 x 3,3	0,9 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	9,5	3,4			Monofialides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							6,8 x 2,9				11,6					
							5,8 x 2,9				10,7					
							4,9 x 3,9				10,7					
							4,9 x 2,9				17,5					
							5,8 x 3,9				7,8					
							6,8 x 2,9				5,8					
							5,8 x 3,9				6,8					
							6,8 x 2,9				6,8					
							7,8 x 3,9				7,8					
Agar CLA (15 días)							5,8 x 2,9	6,4 x 3,2	1,6 x 0,6	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	8,6	2,2	Terminales		Monofialides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							5,8 x 2,9				11,6					
							6,8 x 2,9				9,7					
							4,9 x 3,9				7,8					
							4,9 x 2,9				9,7					
							6,8 x 1,9				6,8					
							8,7 x 3,9				7,8					
							9,7 x 3,9				11,6					
							5,8 x 3,9				9,7					
							4,9 x 2,9				4,9					
Agar CLA (21 días)							6,8 x 2,9	7,6 x 2,9	2 x 0	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	10,1	3,5			Monofialides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							9,7 x 2,9				7,8					
							11 x 2,9				6,8					
							6,8 x 2,9				14,6					
							9,7 x 2,9				9,7					
							4,9 x 2,9				5,8					
							5,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
							9,7 x 2,9				17,5					
							5,8 x 2,9				9,7					

Fusarium oxysporum																			
Cepa 208	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones			
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS						
Microcultivo agar Cla	19,4 x 2,9	22 x 3,1	4,2 x 0,4	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 1 septos	ahusado	puntiagudo	5,8 x 2,9	8 x 3	1,7 x 0,3	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	8,7	9,8	2,2			Monofiálides cortas			
	19,4 x 2,9						7,8 x 2,9				9,7						9,7		
	29,1 x 2,9						9,7 x 2,9				9,7						7,8		
	19,4 x 2,9						5,8 x 2,9				8,7						8,7		
	22,3 x 3,9						9,7 x 2,9				5,8 x 2,9						6,8		
							5,8 x 2,9				8,7 x 3,9						14,6		
							7,8 x 2,9				9,7 x 2,9						11,6		
							9,7 x 2,9				6,8 x 2,9						9,7		
																	10,7		
Microcultivo agar PDA	19,4 x 2,9	21 x 3,4	2,1 x 0,6	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, 2-3 septos	Curvado		6,8 x 3,9	7,3 x 3,2	1,8 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco rosado sin pigmento difusible			
	22,3 x 3,9						5,8 x 2,9				4,9 x 2,9								
							5,8 x 2,9				7,8 x 2,9								
							6,8 x 2,9				9,7 x 3,9								
							9,7 x 3,9				11 x 2,9								
							7,8 x 3,9				6,8 x 2,9								
							6,8 x 2,9												
Microcultivo agar Avena							6,8 x 3,9	7,3 x 3,2	1,8 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	13,6	7,2	3,5			Monofiálides cortas			
							5,8 x 2,9				4,9 x 2,9						9,7		
							4,9 x 2,9				5,8 x 2,9						8,7		
							7,8 x 2,9				6,8 x 2,9						3,9		
							6,8 x 2,9				9,7 x 3,9						6,8		
							9,7 x 3,9				11 x 2,9						2,9		
							11 x 2,9				7,8 x 3,9						3,9		
							7,8 x 3,9				6,8 x 2,9						3,9		
							6,8 x 2,9										8,7		
																	7,8		
Agar CLA (10 días)	24,3 x 2,9	20 x 3,6	3,6 x 0,9	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 2,9	7,4 x 3,7	1,5 x 0,4	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	8,7	9,7	1,4			Monofiálides cortas y falsas cabezas mucilaginosas			
	20,4 x 2,9						5,8 x 3,9				5,8 x 3,9						11,6		
	19,4 x 3,9						6,8 x 3,9				5,8 x 3,9						9,7		
	15,5 x 4,9						9,7 x 3,9				9,7 x 3,9						10,7		
							7,8 x 3,9				7,8 x 3,9						11,6		
							6,8 x 3,9				6,8 x 3,9						7,8		
							5,8 x 3,9				7,8 x 3,9						8,7		
							7,8 x 3,9				9,7 x 2,9						9,7		
							9,7 x 2,9										9,7		
Agar CLA (15 días)	20,4 x 2,9	20 x 2,9		Largas, medio curvadas, 3 septos	ahusado		7,8 x 2,9	7,4 x 3,7	1,5 x 0,4	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	8,5	2,0			Monofiálides cortas y falsas cabezas mucilaginosas			
							5,8 x 3,9				5,8 x 3,9						11,6		
							6,8 x 3,9				9,7 x 3,9						9,7		
							5,8 x 3,9				7,8 x 3,9						10,7		
							9,7 x 3,9				6,8 x 3,9						6,8		
							7,8 x 3,9				5,8 x 3,9						6,8		
							5,8 x 3,9				7,8 x 3,9						6,8		
							9,7 x 2,9				9,7 x 2,9						9,7		
																	7,8		
Agar CLA (21 días)	19,4 x 2,9	22 x 3,1	4,2 x 0,4	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 1 septos	ahusado	puntiagudo	5,8 x 2,9	8,1 x 3	1,7 x 0,3	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	8,7	8,9	0,8			Monofiálides cortas y falsas cabezas mucilaginosas			
	19,4 x 2,9						7,8 x 2,9				9,7 x 2,9						9,7		
	29,1 x 2,9						9,7 x 2,9				9,7 x 2,9						9,7		
	19,4 x 2,9						5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						8,7		
	22,3 x 3,9						9,7 x 2,9				8,7 x 3,9						7,8		
							5,8 x 2,9				7,8 x 2,9								
							8,7 x 3,9				9,7 x 2,9								
							7,8 x 2,9												
							9,7 x 2,9												

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 209	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apíce	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							9,7 x 2,9	6,9 x 2,8	1,8 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	10,4	2,9	Terminales		Monofiálides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							4,9 x 2,9				10,7					
							5,8 x 2,9				14,6					
							5,8 x 2,9				14,6					
							6,8 x 2,9				11,6					
							7,8 x 2,9				10,7					
							9,7 x 2,9				9,7					
							4,9 x 1,9				8,7					
							5,8 x 1,9				8,7					
							7,8 x 3,9				4,9					
Microcultivo agar PDA							7,8 x 2,9	8,3 x 3,2	2,1 x 0,4	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	10,4	3,9	Intercalares terminales	Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	Monofiálides cortas
							6,8 x 2,9				9,7					
							11 x 3,9				11,6					
							12 x 3,9				14,6					
							8,7 x 2,9				6,8					
							7,8 x 2,9				6,8					
							5,8 x 3,9				16,5					
							4,9 x 2,9				14,6					
							9,7 x 2,9				8,7					
							9,7 x 2,9				9,7					
Microcultivo agar Avena							7,8 x 2,9	6,9 x 3,4	0,8 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	14,6	15,1	2,8			Monofiálides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							6,8 x 3,9				14,6					
							5,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 3,9				15,5					
							7,8 x 3,9				19,4					
							6,8 x 2,9				14,6					
							5,8 x 3,9				13,6					
							7,8 x 2,9				15,5					
							5,8 x 3,9				14,6					
							7,8 x 2,9				19,4					
Agar CLA (10 días)							6,8 x 3,9	7,2 x 3,9	0,8 x 0	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	10,7	3,5			Monofiálides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							6,8 x 3,9				11,6					
							7,8 x 3,9				2,9					
							8,7 x 3,9				6,8					
							6,8 x 3,9				11,6					
							6,8 x 3,9				10,7					
							5,8 x 3,9				13,6					
							6,8 x 3,9				13,6					
							7,8 x 3,9				14,6					
							7,8 x 3,9				9,7					
Agar CLA (15 días)							12 x 3,9	7,7 x 3,7	1,9 x 0,6		9,7	9,5	1,4			Monofiálides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							5,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				10,7					
							4,9 x 3,9				6,8					
							9,7 x 4,9				11,6					
							7,8 x 3,9				9,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
							8,7 x 3,9				9,7					
							7,8 x 3,9				9,7					
							6,8 x 3,9				7,8					
Agar CLA (21 días)	29,1 x 3,9	29 x 3,8		Curvada, larga y delgada	ahusada		5,8 x 2,9	6,6 x 3,1	1,4 x 0,4	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	9,5	3,2			Monofiálides cortas y falsas cabezas mucilaginosas
							4,9 x 2,9				10,7					
							6,8 x 3,9				16,5					
							5,8 x 3,9				5,8					
							7,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
							9,7 x 2,9				7,8					
							4,9 x 2,9				4,9					
							6,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				10,7					

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 210	Macroconidio						Microconidio				Fialide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño µm	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla	24,3 x 2,9	22 x 2,9	2,2 x 0	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 2,9	7,3 x 3,1	1,4 x 0,4	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	9,7	3,5	Intercalares		Monofálides cortas
	25,2 x 2,9						6,8 x 3,9				6,8					
	23,3 x 2,9						9,7 x 2,9				11,6					
	19,4 x 2,9						7,8 x 2,9				11,6					
	23,3 x 2,9						4,9 x 3,9				14,6					
	19,4 x 2,9						5,8 x 2,9				4,9					
	21,3 x 2,9						6,8 x 2,9				6,8					
	21,3 x 2,9						6,8 x 2,9									
Microcultivo agar PDA							6,8 x 2,9	8,8 x 3,1	1,9 x 0,4	Ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	8,7	10,4	1,3		Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	Monofálides cortas
							7,8 x 2,9				12,6					
							9,7 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
							8,7 x 3,9				9,7					
							14 x 3,9				11,6					
							7,8 x 2,9				11,6					
							8,7 x 2,9				9,7					
Microcultivo agar Avena	19,4 x 2,9	21 x 2,9	2,2 x 0				13 x 1,9	7,4 x 2,9	2,9 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	11,2	5,6			Monofálides cortas, pocas largas
	23,2 x 2,9						4,9 x 2,9				10,7					
	19,4 x 2,9						12 x 2,9				15,5					
							6,8 x 2,9				8,7					
							9,7 x 2,9				12,6					
							4,9 x 2,9				19,4					
							4,9 x 2,9				2,9					
							6,8 x 3,9				19,4					
Agar CLA (10 días)	18,4 x 4,9	18 x 4,8		Medio larga, delgada	Ahusada		6,8 x 3,9	7,6 x 3,5	1,2 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	7,4	2,0			Monofálides cortas, cabezas mucilaginosas
							7,8 x 3,9				6,8					
							8,7 x 3,9				9,7					
							9,7 x 3,9				9,7					
							5,8 x 2,9				5,8					
							6,8 x 2,9				7,8					
							7,8 x 3,9									
							6,8 x 3,9									
Agar CLA (15 días)							4,9 x 2,9	6,4 x 3,1	1,9 x 0,4	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	9,5	2,6			Monofálides cortas y popochas
							6,8 x 3,9				12,6					
							7,8 x 3,9				9,7					
							5,8 x 2,9				11,6					
							4,9 x 2,9				8,7					
							7,8 x 2,9				9,7					
							5,8 x 2,9				8,7					
							4,9 x 2,9				11,6					
Agar CLA (21 días)							4,9 x 2,9	6,9 x 3,1	1,8 x 0,4	Abundantes, ovales y elipsoidales, 0 septos, se observan 2 vacuolas. Morfología muy variada.	11,6	10,2	4,0			Monofálides cortas, cabezas mucilaginosas
							5,8 x 2,9				17,5					
							7,8 x 2,9				2,9					
							9,7 x 2,9				10,7					
							5,8 x 3,9				8,7					
							5,8 x 3,9				9,7					
							7,8 x 2,9				8,7					
							4,9 x 2,9				11,6					
			7,8 x 2,9													
			9,7 x 2,9													

<i>Fusarium oxysporum</i>																								
Cepa 302	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones								
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS											
Microcultivo agar Cla	19,4 x 2,9	14,2 x 1,9	2,2 x 0	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	7,8 x 3,2	1,6 x 0,4	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	7,0	1,6			Monofíalides cortas								
Microcultivo agar PDA						puntiagudo	6,8 x 2,9	8,2 x 2,7	1,9 x 0,6	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						Anverso: morado claro algodonoso Reverso: morado sin pigmento difusible								
Microcultivo agar Avena	24,3 x 1,9	15,2 x 1,3	1,7 x 0,6	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	10,7 x 2,9	9,4 x 3,0	1,5 x 0,7	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.				Terminales intercalares		Muchos tubos germinales								
	21,3 x 1,9																							
	24,3 x 2,9																							
Agar CLA (10 días)	29,1 x 2,9	30,5 x 3,5	4,4 x 0,5	Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	4,8 x 2,9	8,4 x 3,2	2,2 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	8,0	2,4			Monofíalides cortas, pocas largas								
	26,2 x 2,9																							
	38,8 x 2,9																							
	29,1 x 3,9																							
	29,1 x 3,9																							
	27,2 x 3,9																							
	34 x 3,9																							
Agar CLA (15 días)	30,1 x 2,9	30,1 x 2,9		Largo curvado, 3 septos	Ahusado	puntiagudo	7,8 x 2,9	10,5 x 3,2	1,6 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	7,8	7,8		Intercalares y terminales		Monofíalides cortas								
Agar CLA (21 días)	31 x 2,9	31 x 2,9		Largo curvado, 3 septos	Ahusado	puntiagudo	8,7 x 3,9	9,3 x 3,3	1,6 x 0,8	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.				Intercalares y terminales										

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 303	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							6,8 x 2,9	7,8 x 3,0	1,5 x 0,3	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	9,6	1,2			Monofíalides cortas
							7,8 x 2,9				8,7					
							9,7 x 2,9				10,7					
							7,7 x 2,9				9,7					
							5,8 x 2,9				11,6					
							6,8 x 2,9				8,7					
							9,7 x 2,9				7,8					
							8,7 x 2,9				9,7					
							9,7 x 3,9				10,7					
							5,8 x 2,9				8,7					
Microcultivo agar PDA	20,4 x 3,9	17,9 x 3,9	3,4 x 0	Largo curvado, 3 septos	Ahusado	puntiagudo	9,7 x 2,9	6,9 x 3,0	1,9 x 0,3	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						Anverso: blanco algodonoso Reverso: blanco sin pigmento difusible
	15,5 x 3,9						4,8 x 3,9									
							5,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
							10,7 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
Microcultivo agar Avena	19,4 x 3,9	13,6 x 2,6	2,4 x 0	Largo curvado, 3 septos	Ahusado	puntiagudo	8,7 x 2,9	10 x 3,1	3,1 x 0,4	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	27,2	21,6	4,7			Monofíalides
	21,3 x 3,9						7,8 x 3,9				26,2					
	24,3 x 3,9						5,8 x 3,9				21,3					
							10,7 x 2,9				15,5					
							13,6 x 2,9				24,3					
							10,7 x 2,9				19,4					
							6,8 x 2,9				14,6					
							15,5 x 2,9				17,5					
							10,7 x 2,9				26,2					
											24,3					
Agar CLA (10 días)							11,6 x 3,9	9,3 x 3,8	2,0 x 0,3	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	19,4	26,5	6,2			Monofíalides cortas, pocas largas
							8,7 x 3,9				29,1					
							12,6 x 3,9				31,0					
							9,7 x 3,9									
							8,7 x 3,9									
							11,6 x 3,9									
							6,8 x 3,9									
							8,7 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
							6,8 x 2,9									
Agar CLA (15 días)	56,3 x 3,9	61,4 x 3,9	5,2 x 0	Largo curvado, 3 septos	Ahusado	puntiagudo	7,8 x 3,9	7,9 x 3,6	1,7 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	25,2	27,2	1,6			Monofíalides cortas, pocas largas
	58,2 x 3,9						9,7 x 3,9				27,2					
	67,9 x 3,9						7,8 x 3,9				27,2					
	63,1 x 3,9						6,8 x 2,9				29,1					
							11,6 x 2,9									
							6,8 x 3,9									
							6,8 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
							5,8 x 2,9									
							8,7 x 3,9									
Agar CLA (21 días)							7,8 x 3,9	8,3 x 2,6	1,4 x 0,5	Abundantes, arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	24,3	26,7	3,4			Monofíalides cortas, pocas largas
							8,7 x 3,9				29,1					
							7,8 x 3,9									
							9,7 x 3,9									
							10,7 x 2,9									
							8,7 x 3,9									
							7,7 x 3,9									
							6,8 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							8,7 x 3,9									

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 308	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla	29,1 x 2,9	36,1 x 2,9	4,1 x 0	Bastantes, largos, rectos a escasamente curvados, 3 septos	Ahusado	Puntiagudo	9,7 x 2,9	8,5 x 3,3	1,1 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	16,5	16,5		Monofálides		
	34 x 2,9						7,8 x 2,9									
	38,8 x 2,9						6,8 x 2,9									
	40,7 x 2,9						9,7 x 3,9									
	29,1 x 2,9						7,8 x 2,9									
	37,8 x 2,9						8,7 x 2,9									
	38,8 x 2,9						9,7 x 3,9									
	38,8 x 2,9						7,8 x 3,9									
	36,9 x 2,9															
36,9 x 2,9																
Microcultivo agar PDA	36,9 x 2,9	38,2 x 2,8	2,6 x 0,3	Bastantes, largos, rectos a escasamente curvados, 3 septos	Ahusado	Puntiagudo	5,9 x 2,9	7,6 x 3,2	1,6 x 0,6	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.				Anverso: blanco morado Reverso: blanco morado sin pigmento difusible		
	36,9 x 1,9						7,8 x 2,9									
	38,8 x 2,9						9,7 x 2,9									
	43,7 x 2,9						9,7 x 4,9									
	36,9 x 2,9						5,8 x 3,9									
	38,8 x 2,9						8,7 x 2,9									
	40,7 x 2,9						5,8 x 2,9									
	36,9 x 2,9						6,8 x 2,9									
	38,8 x 2,9						7,8 x 2,9									
34 x 2,9			8,7 x 2,9													
Microcultivo agar Avena	34 x 2,9	34,6 x 2,9	5,7 x 0	Bastantes, largos, rectos a escasamente curvados, 3 septos	Ahusado	Puntiagudo	5,8 x 2,9	9,7 x 2,9	2,4 x 0	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						
	24,3 x 2,9						7,8 x 2,9									
	38,8 x 2,9						9,7 x 2,9									
	36,9 x 2,9						14,6 x 2,9									
	26,2 x 2,9						11,6 x 2,9									
	34,9 x 2,9						7,8 x 2,9									
	36,9 x 2,9						9,7 x 2,9									
	34 x 2,9						10,7 x 2,9									
	36,9 x 2,9						9,7 x 2,9									
43,7 x 2,9			9,7 x 2,9													
Agar CLA (10 días)	40,7 x 3,9	59,5 x 3,9	8,8 x 0	Bastantes, largos, rectos a escasamente curvados, 3 septos	Ahusado	Puntiagudo					4,9	4,9		Monofálides		
	60,1 x 3,9															
	72,8 x 3,9															
	60,1 x 3,9															
	50,4 x 3,9															
	60,1 x 3,9															
	67,9 x 3,9															
	61,1 x 3,9															
	58,2 x 3,9															
63,1 x 3,9																
Agar CLA (15 días)	38,8 x 3,9	47,3 x 3,9	10,1 x 0	Bastantes, largos, rectos a escasamente curvados, 3-5 septos	Ahusado	Puntiagudo					14,6	11,0	3,1	Monofálides		
	41,7 x 3,9												9,7			
	39,8 x 3,9												8,7			
	43,7 x 3,9															
	41,7 x 3,9															
	46,6 x 3,9															
	53,4 x 3,9															
	72,8 x 3,9															
	43,7 x 3,9															
51,4 x 3,9																
Agar CLA (21 días)	53,4 x 3,9	48,4 x 3,9	3,9 x 0	Bastantes, largos, rectos a escasamente curvados, 3-5 septos	Ahusado	Puntiagudo										
	48,5 x 3,9															
	54,3 x 3,9															
	48,5 x 3,9															
	46,6 x 3,9															
	39,8 x 3,9															
	49,5 x 3,9															
	48,5 x 3,9															
	46,6 x 3,9															
48,5 x 3,9																

<i>Fusarium oxysporum</i>																			
Cepa 309	Macroconidio						Microconidio			Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones				
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom				DS			
Microcultivo agar Cla							6,8 x 2,9	7,8 x 2,6	2,3 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	9,7	0,0	Terminales intercalares		Mopnofiálides cortas			
							4,8 x 2,9				9,7								
							9,7 x 2,9												
							10,7 x 2,9												
							11,6 x 2,9												
							5,8 x 2,9												
							6,8 x 2,9												
							8,7 x 1,9												
Microcultivo agar PDA	14,6 x 2,9	14,6 x 2,9		Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	4,8 x 1,9	6,5 x 2,6	1,5 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.				Abundantes, terminales e intercalares	Anverso: morado algodonoso Reverso: morado sin pigmento difusible				
											6,8 x 1,9								
											7,8 x 2,9								
											5,8 x 2,9								
											9,7 x 2,9								
											5,8 x 2,9								
											4,8 x 1,9								
											6,8 x 2,9								
Microcultivo agar Avena							5,8 x 1,9	7,2 x 2,6	1,8 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	6,1	1,1	Terminales.		Mopnofiálides cortas, muchos tubos germinativos			
							4,8 x 1,9				6,8								
							5,8 x 2,9				6,8								
							6,8 x 2,9												
							7,8 x 2,9												
							4,8 x 1,9												
							9,7 x 2,9												
							7,8 x 2,9												
Agar CLA (10 días)							8,7 x 2,9			Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0-2 septos. Morfología muy variada.						Mopnofiálides cortas			
							9,7 x 2,9	7,2 x 2,9	1,4 x 0		11,6	10,5	4,0						
							7,8 x 2,9				14,6								
							4,8 x 2,9				9,7								
							8,7 x 2,9				5,8								
							5,8 x 2,9				14,6								
							6,8 x 2,9				17,5								
							8,7 x 2,9				9,7								
Agar CLA (15 días)	25,2 x 2,9	25,2 x 2,9		Cortos y medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	7,6 x 3,1	1,1 x 0,4	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0-2 septos. Morfología muy variada.	7,8	10,1	5,4	Terminales e intercalares		Mopnofiálides cortas			
											7,8 x 2,9						19,4		
											8,7 x 2,9						6,8		
											6,8 x 2,9						9,7		
											7,8 x 3,9						4,9		
											7,8 x 3,9						12,6		
											6,8 x 2,9						11,6		
											7,8 x 2,9						18,4		
Agar CLA (21 días)							5,8 x 2,9			Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0-2 septos. Morfología muy variada.	4,9					Mopnofiálides cortas			
							9,7 x 2,9	9,5 x 3,4	1,9 x 0,7		9,7	7,8	1,9						
							10,7 x 2,9				8,7								
							9,7 x 2,9				4,9								
							9,7 x 2,9				7,8								
							11,6 x 3,9				4,9								
							5,8 x 4,8				9,7								
							7,8 x 3,9				5,8								
						9,7 x 2,9			7,8										
						11,6 x 2,9			8,7										
						7,8 x 3,9			9,7										

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 310	Macroconidio						Microconidio			Forma	Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS		Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							6,8 x 2,9	8,9 x 3,3	1,6 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	7,6	2,1			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
							11,6 x 2,9				4,9					
							7,8 x 2,9				6,8					
							11,6 x 2,9				5,8					
							7,8 x 3,9				7,8					
							9,7 x 3,9				8,7					
							7,8 x 3,9				9,7					
							8,8 x 3,9				11,6					
							8,7 x 2,9				8,7					
							8,7 x 2,9				5,8					
Microcultivo agar PDA	19,4 x 2,9	12,9 x 1,9	2,8 x 0,6	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	8,7 x 1,9	8,3 x 2,8	1,6 x 0,3	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.				Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible		
	19,4 x 2,9						5,8 x 2,9									
	14,6 x 3,9						7,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
							11,6 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							9,7 x 2,9									
Microcultivo agar Avena							6,8 x 2,9	8,6 x 3,2	1,6 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						
							11,6 x 3,9									
							7,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							6,8 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							10,7 x 2,9									
							8,7 x 3,9									
							7,8 x 2,9									
Agar CLA (10 días)							9,7 x 3,9	9,2 x 3,7	2,5 x 0,4	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	8,3	2,9			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
							14,6 x 3,9				4,9					
							9,7 x 3,9				11,6					
							9,7 x 3,9				12,6					
							5,8 x 3,9				5,8					
							5,8 x 2,9				5,8					
							7,8 x 3,9				6,8					
							9,7 x 3,9				8,7					
							10,7 x 3,9				9,7					
							8,7 x 2,9				11,6					
Agar CLA (15 días)							7,8 x 2,9	9,7 x 3,0	2,4 x 0,3	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	13,6	9,7	3,4			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
							9,7 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				7,8					
							14,6 x 2,9				4,9					
							12,6 x 2,9				11,6					
							7,8 x 2,9				12,6					
							7,8 x 2,9				4,9					
							9,7 x 3,9				6,8					
							10,7 x 2,9				13,6					
							9,7 x 2,9				11,6					
Agar CLA (21 días)							7,8 x 2,9	8,8 x 3,0	1,3 x 0,3	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	10,1	2,7			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
							9,7 x 2,9				8,7					
							8,7 x 2,9				7,8					
							9,7 x 2,9				13,6					
							10,7 x 3,9				11,6					
							8,7 x 2,9				8,7					
							7,8 x 2,9				4,9					
							10,7 x 2,9				11,6					
							6,8 x 2,9				13,6					
							7,8 x 2,9				10,7					

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 311	Macroconidio						Microconidio			Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones	
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pic	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom				DS
Microcultivo agar Cla	18,4 x 2,9	17,9 x 3,4	4,6 x 0,6	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	7,8 x 3,2	1,2 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	9,7	2,3	Intercalares		Mopnofálides cortas
	24,3 x 2,9						9,7 x 2,9				9,7					
	14,6 x 3,9						6,8 x 3,9				8,7					
	14,6 x 3,9						5,8 x 2,9				5,8					
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 3,9									
							9,7 x 3,9									
							7,8 x 2,9									
Microcultivo agar PDA	19,4 x 3,9	21,9 x 3,9	3,2 x 0	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	10,7 x 2,9	9,9 x 3,6	2,2 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	10,7	5,0	Intercalares	Anverso: morado algodonoso Reverso: morado rosado sin pigmento difusible.	Mopnofálides cortas
	17,5 x 3,9						9,7 x 2,9				14,6					
	19,4 x 3,9						5,8 x 2,9				9,7					
	25,2 x 3,9						9,7 x 3,9				13,6					
	22,3 x 3,9						8,7 x 3,9				9,7					
	25,2 x 3,9						9,7 x 3,9				6,8					
	24,3 x 3,9						14,6 x 3,9				9,7					
							11,6 x 3,9				6,8					
Microcultivo agar Avena	19,4 x 2,9	14,6 x 1,9	2,8 x 0	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 2,9	8,1 x 3,2	1,5 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	13,6	11,3	4,9			Mopnofálides cortas
	24,3 x 2,9						8,7 x 3,9				3,9					
	19,4 x 2,9						10,7 x 3,9				16,5					
							6,8 x 3,9				4,9					
							7,8 x 2,9				16,5					
							6,8 x 2,9				14,6					
							10,7 x 2,9				5,8					
							7,8 x 2,9				14,6					
Agar CLA (10 días)	21,3 x 2,9	12,6 x 1,9	2,8 x 0	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	6,9 x 3,2	1,2 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	12,6	9,7	2,5			Monofálides cortas, cabezas mucilaginosas
	16,5 x 2,9						6,8 x 2,9				13,6					
	21,3 x 2,9						8,7 x 3,9				6,8					
							4,8 x 2,9				7,8					
							5,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 3,9				5,8					
							5,8 x 2,9				10,7					
							7,8 x 3,9				11,6					
Agar CLA (15 días)	18,4 x 2,9	17,7 x 3,4	4,8 x 0,6	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	8,5 x 3,3	2,4 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	6,9	2,1	Intercalares		Mopnofálides cortas
	24,3 x 2,9						9,7 x 2,9				9,7					
	13,6 x 3,9						6,8 x 3,9				8,7					
	14,6 x 3,9						5,8 x 2,9				5,8					
							8,7 x 2,9				4,9					
							7,8 x 3,9				8,7					
							9,7 x 3,9				9,7					
							14,6 x 3,9				5,8					
Agar CLA (21 días)											9,7	9,7	0,0	Terminales e intercalares		Solo se observa micelio
											9,7					

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 312	Macroconidio						Microconidio			Forma	Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS		Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							9,7 x 3,9	8,8 x 3,2	2,3 x 0,8	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	7,8	1,4			Mopnofálides cortas
							7,8 x 2,9				8,7					
							6,8 x 1,9									
							5,8 x 1,9									
							10,7 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							13,6 x 3,9									
							8,7 x 3,9									
							9,7 x 3,9									
						6,8 x 3,9										
Microcultivo agar PDA							6,8 x 3,9	7,6 x 3,5	1,7 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	7,5	2,1	Intercalares	Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	Mopnofálides cortas
							5,8 x 3,9				6,8					
							4,8 x 3,9				3,9					
							9,7 x 2,9				9,7					
							7,8 x 2,9				5,8					
							9,7 x 3,9				4,9					
							6,8 x 2,9				9,7					
							9,7 x 3,9				7,8					
							6,8 x 3,9				8,7					
						7,8 x 2,9			7,8							
Microcultivo agar Avena	19,4 x 3,9	19,4 x 3,9		Medio largo, recto a escasamente curvado, ahusado, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 3,9	7,7 x 3,2	1,8 x 0,6	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	10,7	9,7	2,4	No se observan		Mopnofálides cortas
							5,8 x 2,9				14,6					
							6,8 x 3,9				7,8					
							5,8 x 1,9				7,8					
							8,7 x 3,9				8,7					
							10,7 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				8,7					
							9,7 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
			6,8 x 3,9													
Agar CLA (10 días)	28,1 x 2,9	24,4 x 2,7	4,0 x 0,4	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	9,3 x 2,9	1,8 x 0	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						
	24,3 x 2,9						10,7 x 2,9									
	19,4 x 1,9						8,7 x 2,9									
	21,3 x 2,9						9,7 x 2,9									
	30,1 x 2,9						9,7 x 2,9									
	23,3 x 2,9						10,7 x 2,9									
							11,6 x 2,9									
							5,8 x 2,9									
							10,7 x 2,9									
			8,7 x 2,9													
Agar CLA (15 días)	19,4 x 3,9	15,2 x 2,6	3,5 x 0	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	8,7 x 2,9	9,1 x 3,5	1,8 x 0,7	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	10,7	11,4	6,6			Mopnofálides cortas
	26,2 x 3,9						9,7 x 2,9				3,9					
	24,3 x 3,9						7,8 x 4,8				7,8					
							12,6 x 3,9				6,8					
							11,6 x 2,9				10,7					
							7,8 x 3,9				16,5					
							9,7 x 3,9				23,3					
							7,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
			8,7 x 3,9													
Agar CLA (21 días)							9,7 x 3,9	9,2 x 3,3	1,8 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.				Terminales e intercalares		
							8,7 x 2,9									
							12,6 x 3,9									
							11,6 x 3,9									
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
							6,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							7,8 x 2,9									
			9,7 x 3,9													

<i>Fusarium oxysporum</i>																			
Cepa 313	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones			
	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS						
Microcultivo agar Cla	21,3 x 2,9	23,9 x 2,8	5,9 x 0,7	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	10,7 x 1,9	10,4 x 3,2	2,5 x 0,6	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.									
	23,3 x 1,9						6,8 x 2,9												
	19,4 x 1,9						14,6 x 3,9												
	16,5 x 2,9						9,7 x 2,9												
	31 x 1,9						14,6 x 2,9												
	14,6 x 2,9						7,8 x 2,9												
	31 x 3,9						10,7 x 2,9												
	29,1 x 2,9						9,7 x 3,9												
28,1 x 2,9			8,7 x 3,9																
24,3 x 3,9			10,7 x 3,9																
Microcultivo agar PDA	27,2 x 2,9	26,6 x 3,2	4,7 x 0,5	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	8,7 x 1,9	8,8 x 3,1	2,7 x 0,7	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.									
	29,1 x 3,9						4,8 x 2,9												
	28,1 x 2,9						5,8 x 3,9												
	23,3 x 2,9						7,8 x 2,9												
	30,1 x 2,9						10,7 x 3,9												
	34 x 3,9						8,7 x 2,9												
	18,4 x 2,9						10,7 x 3,9												
	26,2 x 2,9						14,6 x 3,9												
20,4 x 3,9			8,7 x 1,9																
29,1 x 2,9			7,8 x 2,9																
Microcultivo agar Avena	24,3 x 1,9	25,5 x 2,3	1,5 x 0,6	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 2,9	9,8 x 3,2	2,2 x 0,6	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.				Intercalares terminales (+++)					
	27,2 x 1,9						8,7 x 1,9												
	25,2 x 2,9						10,7 x 3,9												
							7,8 x 3,9												
							10,7 x 3,9												
							14,6 x 3,9												
							8,7 x 2,9												
							7,8 x 2,9												
Agar CLA (10 días)	44,6 x 3,9	39,4 x 3,9	3,2 x 0	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	14,6 x 3,9	11,4 x 3,7	3,1 x 0,4	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	6,3	1,8		Monofíalides cortas				
	38,8 x 3,9						10,7 x 2,9							6,8					
	38,8 x 3,9						16,5 x 2,9							5,8					
	36,9 x 3,9						9,7 x 3,9							6,8					
	34,9 x 3,9						11,6 x 3,9							5,8					
	44,6 x 3,9						12,6 x 3,9							8,7					
	40,7 x 3,9						14,6 x 3,9							9,7					
	38,8 x 3,9						9,7 x 3,9							5,8					
36,9 x 3,9			7,8 x 3,9						4,9										
38,8 x 3,9			6,8 x 3,9						3,9										
Agar CLA (15 días)	20,4 x 3,9	28,5 x 3,7	5,7 x 0,4	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3-4 septos	ahusado	puntiagudo	8,7 x 2,9	8,8 x 3,0	1,5 x 0,3	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.									
	24,3 x 3,9						9,7 x 3,9												
	25,2 x 3,9						7,8 x 2,9												
	30,1 x 2,9						12,6 x 2,9												
	34,9 x 3,9						7,8 x 2,9												
	24,3 x 3,9						8,7 x 2,9												
	32 x 3,9						8,7 x 2,9												
	24,3 x 3,9						7,8 x 2,9												
38,8 x 3,9			7,8 x 2,9																
31 x 2,9																			
Agar CLA (21 días)	34 x 3,9	36,7 x 3,9	2,6 x 0	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	9,7 x 3,9	8,6 x 3,2	0,8 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.				Intercalares					
	38,8 x 3,9						7,8 x 2,9												
	34 x 3,9						9,7 x 3,9												
	38,8 x 3,9						8,7 x 2,9												
	36,9 x 3,9						7,8 x 2,9												
	38,8 x 3,9						7,8 x 2,9												
	35,9 x 3,9						8,7 x 2,9												
	38,8 x 3,9						7,8 x 2,9												
32 x 3,9			9,7 x 3,9																
38,8 x 3,9			8,7 x 2,9																

<i>Fusarium oxysporum</i>																								
Cepa 314	Macroconidio						Microconidio			Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones									
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom				DS								
Microcultivo agar Cla	17,5 x 2,9	17,5 x 2,9		Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	9,7 x 3,9	10,7 x 3,9	2,6 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.														
Microcultivo agar PDA							8,7 x 3,9	8,7 x 3,5	0,9 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.					Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible									
Microcultivo agar Avena							6,8 x 1,9	6,8 x 2,3	0,7 x 0,9	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.														
Agar CLA (10 días)							7,8 x 3,9	9,1 x 3,6	1,4 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.														
Agar CLA (15 días)							10,7 x 3,9	9,6 x 3,3	1,3 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	4,9	1,4			Monofíalide corta								
																		3,9						
Agar CLA (21 días)							7,8 x 4,8	8,9 x 4,6	1,2 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.														

<i>Fusarium oxysporum</i>																			
Cepa 315	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones			
	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS						
Microcultivo agar Cla	19,4 x 3,9	19,4 x 3,9		Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	6,8 x 3,6	2,3 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	8,5	2,0			Monofialides cortas			
	19,4 x 3,9						5,8 x 2,9				6,8						9,7		
							6,8 x 2,9				9,7						11,6		
							7,8 x 3,9				8,7						8,7		
							11,6 x 3,9				7,8						7,8		
							10,7 x 3,9				5,8 x 3,9						6,8		
							5,8 x 3,9				6,8 x 3,9						8,7		
							6,8 x 3,9				10,7 x 3,9						9,7		
							5,8 x 3,9				5,8 x 3,9						10,7		
Microcultivo agar PDA	20,4 x 3,9	18,9 x 3,9	2,1 x 0	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	7,8 x 3,4	1,3 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	3,9	8,1	2,3	Terminales e intercalares	Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco rosado sin pigmento difusible	Monofialides cortas			
	17,5 x 3,9						7,8 x 3,9				9,7						4,9		
							6,8 x 3,9				9,7						9,7		
							8,7 x 2,9				9,7 x 3,9						9,7		
							9,7 x 3,9				7,8 x 3,9						8,7		
							7,8 x 3,9				6,8 x 2,9						11,6		
							5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						7,8		
							8,7 x 2,9				8,7 x 2,9						7,8		
							9,7 x 3,9				9,7 x 3,9						7,8		
Microcultivo agar Avena	19,4 x 2,9	18,2 x 2,9	2,4 x 0	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 2,9	7,8 x 3,1	2,3 x 0,8	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	9,0	2,9	Terminales e intercalares		Monofialides cortas			
	14,6 x 2,9						10,7 x 3,9				9,7						6,8		
	19,4 x 2,9						11,6 x 3,9				6,8						6,8		
	19,4 x 2,9						6,8 x 2,9				8,7						8,7		
							6,8 x 1,9				4,9						4,9		
							5,8 x 1,9				10,7 x 2,9						13,6		
							10,7 x 2,9				5,8 x 2,9						13,6		
							7,8 x 2,9				7,8 x 2,9						9,7		
							4,8 x 3,9				4,8 x 3,9						6,8		
Agar CLA (10 días)	20,4 x 3,9	13,6 x 2,6	2,2 x 0,6	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	5,8 x 2,9	7,8 x 3,2	1,9 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	7,2	3,0			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas			
	20,4 x 3,9						6,8 x 2,9				4,9						4,9		
	24,3 x 2,9						7,8 x 2,9				6,8						14,6		
							6,8 x 2,9				4,9 x 2,9						6,8		
							4,9 x 2,9				6,8 x 2,9						4,9		
							9,7 x 3,9				9,7 x 3,9						9,7		
							9,7 x 3,9				9,7 x 3,9						4,9		
							8,7 x 2,9				8,7 x 2,9						6,8		
							10,7 x 3,9				10,7 x 3,9						7,8		
Agar CLA (15 días)	20,4 x 2,9	24,3 x 3,4	5,5 x 0,7	Medio largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	9,7 x 3,9	8,3 x 3,3	3,0 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	14,6	10,3	3,9	Terminales e intercalares		Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas			
	28,1 x 3,9						7,8 x 2,9				16,5						5,8		
							10,7 x 3,9				5,8						5,8		
							5,8 x 2,9				15,5 x 3,9						10,7		
							5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						7,8		
							6,8 x 2,9				6,8 x 2,9						6,8		
							5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						10,7		
							7,8 x 3,9				7,8 x 3,9						14,6		
							6,8 x 2,9				6,8 x 2,9						9,7		
Agar CLA (21 días)							9,7 x 3,9	7,9 x 3,0	1,5 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	7,0	2,4			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas			
							7,8 x 2,9				5,8						9,7		
							8,7 x 2,9				7,8 x 3,9						10,7		
							7,8 x 3,9				9,7 x 2,9						7,8		
							6,8 x 2,9				6,8 x 2,9						9,7		
							5,8 x 1,9				5,8 x 1,9						6,8		
							9,7 x 2,9				9,7 x 2,9						5,8		
							7,8 x 2,9				7,8 x 2,9						4,9		
							5,8 x 2,9				5,8 x 2,9						3,9		

<i>Fusarium oxysporum</i>																	
Cepa 401	Macroconidio						Microconidio				Fláide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones	
	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS				
Microcultivo agar Cla							7,8 x 2,9	8,7 x 2,6	1 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	14,2	5,9			Monofálide corta	
							9,7 x 2,9				8,7						
							8,7 x 1,9				19,4						
							6,8 x 2,9				7,8						
							9,7 x 2,9										
							8,7 x 2,9										
							7,8 x 1,9										
							8,7 x 2,9										
							9,7 x 1,9										
							9,7 x 2,9										
Microcultivo agar PDA							6,8 x 3,9	6,4 x 2,6	1,8 x 0,6	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	24,3	16,4	6,4		Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco rosado sin pigmento difusible	Monofálide corta	
							9,7 x 2,9				11,6						
							8,7 x 2,9				15,5						
							3,9 x 2,9				7,8						
							6,8 x 2,9				29,1						
							6,8 x 1,9				19,4						
							4,8 x 1,9				12,6						
							4,8 x 2,9				14,6						
							5,8 x 1,9				11,6						
							5,8 x 1,9				17,5						
Microcultivo agar Avena							5,8 x 1,9	6,1 x 2,1	1 x 0,4	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	12,6	11,8	2,4			Monofálide corta	
							4,8 x 1,9				11,6						
							6,8 x 1,9				9,7						
							7,8 x 2,9				12,6						
							6,8 x 1,9				14,6						
							6,8 x 1,9				16,5						
							4,8 x 1,9				11,6						
							6,8 x 2,9				10,7						
							4,8 x 1,9				9,7						
							5,8 x 1,9				8,7						
Agar CLA (10 días)							8,7 x 2,9	7,1 x 2,8	1,6 x 0,3	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas	
							6,8 x 2,9										
							5,8 x 1,9										
							4,8 x 2,9										
							5,8 x 2,9										
							9,7 x 2,9										
							8,7 x 2,9										
							7,8 x 2,9										
							6,8 x 2,9										
							8,7 x 2,9	7,8 x 3,8	1,1 x 0,5		Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						
						6,8 x 2,9											
						6,8 x 3,9											
						7,8 x 3,9											
						5,8 x 3,9											
						9,7 x 3,9											
						7,8 x 3,9											
						7,8 x 3,9											
						7,8 x 3,9											
						8,7 x 4,8											
Agar CLA (21 días)							10,7 x 4,8	8,1 x 4,2	2 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.						Monofialides cortas	
							9,7 x 3,9										
							6,8 x 3,9										
							6,8 x 3,9										
							5,8 x 3,9										
							5,8 x 3,9										
							9,7 x 4,8										
							5,8 x 3,9										
							5,7 x 3,9										
							10,7 x 4,8										

<i>Fusarium solani</i> / <i>Fusarium proliferatum</i>																
Cepa 402	Macroconidio						Microconidio				Fláide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							6,8 x 4,8	6,7 x 4,5	1,4 x 0,5	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	38,8	54,0	14,7			Conidióforos ramificados, Monofálides largas
							5,8 x 4,8				38,8					
							5,8 x 4,8				67,9					
							6,8 x 4,8				77,6					
							7,8 x 4,8				48,5					
							7,8 x 4,8				58,2					
							4,8 x 4,8				48,5					
							9,7 x 3,9									
							5,8 x 3,9									
							5,8 x 3,9									
Microcultivo agar PDA							5,8 x 4,8	6 x 4,8	1,1 x 0	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	67,9	55,3	12,1		Anverso: blanco algodonoso Reverso: blanco sin pigmento difusible	Conidióforos ramificados, Monofálides largas
							8,7 x 4,8				58,2					
							5,8 x 4,8				67,9					
							5,8 x 4,8				43,7					
							4,8 x 4,8				34,0					
							6,8 x 4,8				67,9					
							5,8 x 4,8				58,2					
							5,8 x 4,8				43,7					
							4,8 x 4,8				48,5					
							5,8 x 4,8				63,1					
Microcultivo agar Avena							7,8 x 4,8	8,2 x 4,8	1,2 x 0	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	48,5	50,6	17,0			Conidióforos ramificados, Monofálides largas
							6,8 x 4,8				58,2					
							8,7 x 4,8				43,7					
							7,8 x 4,8				38,8					
							6,8 x 4,8				29,1					
							9,7 x 4,8				53,4					
							10,7 x 4,8				82,5					
							7,8 x 4,8									
							8,7 x 4,8									
							7,8 x 4,8									
Agar CLA (10 días)							9,7 x 4,8	9,5 x 5,1	0,8 x 0,5	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	77,6	57,2	13,3			Conidióforos ramificados, Monofálides largas
							9,7 x 5,8				48,5					
							7,8 x 4,8				67,9					
							9,7 x 4,8				67,9					
							10,7 x 5,8				58,2					
							9,7 x 4,8				38,8					
							9,7 x 5,8				48,5					
							8,7 x 4,8				58,2					
							9,7 x 4,8				38,8					
							9,7 x 4,8				67,9					
Agar CLA (15 días)	29,1 x 4,8	37,8 x 4,9	4,6 x 0,4	Amplio, recto y robusto	Redondo	Algunos desarrollados	10,7 x 4,8	10,1 x 1,9	1,2 x 0,5	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	48,5	48,5	0,0			Conidióforos ramificados, Monofálides largas
	38,8 x 4,8						11,6 x 5,8				48,5					
	40,7 x 4,8						10,7 x 4,8									
	34,9 x 4,8						9,7 x 4,8									
	38,8 x 4,8						11,6 x 5,8									
	38,8 x 4,8						9,7 x 4,8									
	43,6 x 5,8						8,7 x 4,8									
							7,8 x 3,9									
							9,7 x 3,9									
							10,7 x 4,8									
Agar CLA (21 días)																

Acremonium sp.																
Cepa 403	Macroconidio						Microconidio				Fíalide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							3,9 x 1,9	4,1 x 1,9	0,9 x 0	Pequeños, cilíndricos, elipsoidales	14,6	16,9	6,5			Falzas cabezas mucilaginosas pequeñas, fíalides en punzón
							2,9 x 1,9				14,6					
							3,9 x 1,9				11,6					
							3,9 x 1,9				9,7					
							4,8 x 1,9				29,1					
							5,8 x 1,9				19,4					
							4,8 x 1,9				19,4					
							3,9 x 1,9									
							2,9 x 1,9									
							3,9 x 1,9									
Microcultivo agar PDA							3,9 x 1,9	4,2 x 1,9	1,1 x 0	Pequeños, cilíndricos, elipsoidales	14,6	9,8	3,0		Anverso: blanco algodonoso compacto Reverso: blanco sin pigmento difusible. Crecimiento restringido	Falzas cabezas mucilaginosas pequeñas, fíalides en punzón
							2,9 x 1,9				9,7					
							4,8 x 1,9				11,6					
							5,8 x 1,9				9,7					
							3,9 x 1,9				14,6					
							2,9 x 1,9				8,7					
							2,8 x 1,9				7,8					
							3,9 x 1,9				6,8					
							2,9 x 1,9				5,8					
							5,8 x 1,9				8,7					
Microcultivo agar Avena																
Agar CLA (10 días)							3,9 x 1,9	3,6 x 1,9	0,7 x 0	Pequeños, cilíndricos, elipsoidales	7,8	11,6	9,1			Falzas cabezas mucilaginosas pequeñas
							3,9 x 1,9				14,6					
							2,9 x 1,9				4,9					
							2,9 x 1,9				1,9					
							3,9 x 1,9				25,2					
							3,9 x 1,9				26,2					
							4,8 x 1,9				4,9					
							2,9 x 1,9				2,9					
							2,9 x 1,9				8,7					
											19,4					
Agar CLA (15 días)																
Agar CLA (21 días)																

<i>Fusarium solani</i>																
Cepa 404	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							5,8 x 3,9	8,9 x 3,4	2 x 0,5	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	77,6	92,2	20,6			Monofiálides largas
							11,6 x 2,9				106,7					
							9,7 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							8,7 x 3,9									
							5,8 x 3,9									
							7,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							11,6 x 2,9									
Microcultivo agar PDA							10,7 x 4,8	8,7 x 4,8	1,1 x 0	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	72,8	48,0	18,9		Anverso: amarillo rosado algodonoso Reverso: amarillo-rosado con pigmento difusible	Conidióforos ramificados, Monofiálides largas, cabezas mucilaginosas
							9,7 x 4,8				67,9					
							7,8 x 4,8				72,8					
							8,7 x 4,8				34,0					
							9,7 x 4,8				38,8					
							8,7 x 4,8				63,1					
							7,8 x 4,8				38,8					
							8,7 x 4,8				24,3					
							8,7 x 4,8				29,1					
							6,8 x 4,8				38,8					
Microcultivo agar Avena							5,8 x 3,9	8,9 x 3,4	2 x 0,5	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	77,6	92,2				Monofiálides largas
							11,6 x 2,9				106,7					
							9,7 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							8,7 x 3,9									
							5,8 x 3,9									
							7,8 x 2,9									
							8,7 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							11,6 x 2,9									
Agar CLA (10 días)							12,6 x 3,9	9,4 x 4,5	1,5 x 0,5	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos	72,8	61,1	13,9			Conidióforos ramificados, Monofiálides largas, cabezas mucilaginosas
							7,8 x 3,9				87,3					
							8,7 x 3,9				58,2					
							9,7 x 4,8				48,5					
							8,7 x 3,9				63,1					
							9,7 x 4,8				67,9					
							10,7 x 4,8				48,5					
							7,8 x 4,8				38,8					
							8,7 x 4,8				58,2					
							9,7 x 4,8				67,9					
Agar CLA (15 días)							8,7 x 4,8	7,8 x 3,9	1,9 x 0,3	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos				Intercalares		
							6,8 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
							6,8 x 3,9									
							12,6 x 3,9									
							6,8 x 3,9									
							6,8 x 3,9									
							5,8 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
Agar CLA (21 días)							11,6 x 4,8	10,8 x 4,9	1,2 x 0,4	Ovales, elipsoidales, fusiformes, 0-1 septos				Intercalares		
							8,7 x 4,8									
							11,6 x 4,8									
							11,6 x 5,8									
							10,7 x 4,8									
							9,7 x 4,8									
							11,6 x 4,8									

Cepa 405	Macroconidio						Microconidio				Fláide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla							6,8 x 1,9	7,3 x 2,1	1,8 x 0,4	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	7,8	10,8	4,6			Monofálides cortas
							4,8 x 1,9				9,7					
							9,7 x 1,9				10,7					
							4,8 x 1,9				13,6					
							5,8 x 1,9				11,6					
							9,7 x 1,9				11,6					
							7,8 x 1,9				14,6					
							6,8 x 2,9				3,9					
							8,7 x 1,9				19,4					
							7,8 x 2,9				4,9					
Microcultivo agar PDA							8,7 x 4,8	6,9 x 3	1,5 x 1,2	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	14,6	8,2	3,6		Anverso: morado algodonoso Reverso: morado rosado sin pigmento difusible.	Monofálides
							6,8 x 1,9				3,9					
							5,8 x 2,9				6,8					
							9,7 x 3,9				4,9					
							6,8 x 2,9				11,6					
							7,8 x 4,8				11,6					
							5,8 x 1,9				4,9					
							4,8 x 1,9				5,8					
							5,8 x 1,9				8,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
Microcultivo agar Avena							9,7 x 4,8	8,5 x 3,6	1,4 x 0,6	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	9,3	5,8			Monofálides
							8,7 x 2,9				5,8					
							7,8 x 2,9				7,8					
							7,8 x 3,9				8,7					
							10,7 x 3,9				19,4					
							8,7 x 3,9									
							7,8 x 2,9									
							9,7 x 3,9									
							8,7 x 3,9									
							5,8 x 2,9									
Agar CLA (10 días)	27,2 x 2,9	26 x 3,7	2,7 x 0,4	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 3,9	9,5 x 3,3	3,3 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	8,8	3,1			Monofálides
	21,3 x 3,9						8,7 x 3,9				6,8					
	26,2 x 3,9						8,7 x 2,9				6,8					
	25,2 x 3,9						8,7 x 3,9				6,8					
	29,1 x 3,9						10,7 x 2,9				10,7					
	29,1 x 3,9						16,5 x 2,9				15,5					
	24,2 x 3,9						5,8 x 2,9				8,7					
							5,8 x 2,9				6,8					
							8,7 x 2,9				12,6					
							13,6 x 3,9				6,8					
Agar CLA (15 días)	33,9 x 4,8	34,6 x 4,4	4,4 x 0,5	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	5,8 x 3,9	7,9 x 4,4	2 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	8,9	0,9			Monofálides cortas, cabezas mucilaginosas
	32,9 x 4,8						10,7 x 4,8				8,7					
	32 x 4,8						9,7 x 4,8				7,8					
	31 x 3,9						6,8 x 3,9				9,7					
	31 x 3,9						6,8 x 4,8				8,7					
	42,7 x 4,8						5,8 x 3,9				9,7					
	38,8 x 3,9						10,7 x 4,8				7,8					
							9,7 x 4,8									
							6,8 x 3,9									
							5,8 x 3,9									
Agar CLA (21 días)							5,8 x 3,9	7,4 x 3,8	1,4 x 0,3	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	8,9	1,3			Monofálides cortas, cabezas mucilaginosas
							7,8 x 3,9				7,8					
							6,8 x 3,9				8,7					
							8,7 x 3,9				10,7					
							9,7 x 3,9				8,7					
							8,7 x 3,9				9,7					
							5,8 x 3,9				10,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
							7,8 x 3,9				8,7					
							5,8 x 3,9				7,8					

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 406	Macroconidio						Microconidio				Fíalide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla	23,3 x 2,9	25,2 x 3	3,8 x 0,3	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	5,8 x 2,9	6,9 x 2,6	1,2 x 0,6	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	9,5	2,5			Monofíalide corta
	29,1 x 2,9						5,8 x 1,9				4,9					
	24,3 x 2,9						5,8 x 1,9				9,7					
	25,2 x 2,9						6,8 x 2,9				10,7					
	19,4 x 2,9						8,7 x 1,9				6,8					
	19,4 x 2,9						7,8 x 2,9				8,7					
	24,3 x 2,9						5,8 x 2,9				7,8					
	29,1 x 2,9						6,8 x 3,9				10,7					
	29,1 x 3,9						8,7 x 2,9				12,6					
	29,1 x 2,9						7,8 x 1,9				11,6					
Microcultivo agar PDA	19,4 x 2,9	22,5 x 2,9	2,2 x 0	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 2,9	7,9 x 2,8	0,9 x 0,3	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	10,7	4,5			Anverso: morado algodonoso Reverso: morado rosado sin pigmento difusible.
	23,3 x 2,9						7,8 x 1,9				7,8					
	24,3 x 2,9						8,7 x 2,9				14,6					
	23,3 x 2,9						7,8 x 2,9				22,3					
							9,7 x 2,9				7,8					
							6,8 x 2,9				8,7					
							7,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				7,8					
							6,8 x 2,9				8,7					
							8,7 x 2,9				9,7					
Microcultivo agar Avena	19,4 x 2,9	19,4 x 2,9		Largo, recto a escasamente curvado, ahusado, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 1,9	8,2 x 2,4	1,1 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	10,4	2,0			Monofíalides
							8,7 x 1,9				11,6					
							9,7 x 2,9				8,7					
							6,8 x 2,9				14,6					
							6,8 x 1,9				7,8					
							8,7 x 1,9				9,7					
							9,7 x 2,9				8,7					
							7,8 x 1,9				11,6					
							6,8 x 2,9				9,7					
							8,7 x 2,9				11,6					
Agar CLA (10 días)							7,8 x 1,9	8,7 x 3,3	2,5 x 0,7	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	15,5	11,9	5,1			Monofíalides
							5,8 x 2,9				21,3					
							14,6 x 2,9				9,7					
							9,7 x 3,9				14,6					
							6,8 x 3,9				5,8					
							6,8 x 3,9				6,8					
							7,8 x 2,9				9,7					
							9,7 x 3,69				11,6					
							9,7 x 3,9									
							8,7 x 2,9									
Agar CLA (15 días)							10,7 x 3,9	8,5 x 3,6	1,6 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	16,5	11,6	2,9			Monofíalides cortas, cabezas mucilaginosas
							7,8 x 3,9				15,5					
							7,8 x 2,9				9,7					
							10,7 x 3,9				11,6					
							7,8 x 3,9				6,8					
							6,8 x 2,9				11,6					
							10,7 x 3,9				9,7					
							7,8 x 3,9				9,7					
							6,8 x 2,9				11,6					
							8,7 x 3,9				13,6					
Agar CLA (21 días)							8,7 x 3,9	8,5 x 3,7	1,1 x 0,4	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	8,7	9,4	1,1			Monofíalides cortas, cabezas mucilaginosas
							7,8 x 3,9				9,7					
							8,7 x 3,9				8,7					
							10,7 x 2,9				7,8					
							8,7 x 3,9				9,7					
							6,8 x 2,9				10,7					
							7,8 x 3,9				10,7					
							8,7 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
							9,7 x 3,9									

Cepa 407	Fusarium oxysporum												Clamidospora	Color de colonia	Observaciones	
	Macroconidio			Microconidio			Fiálide									
Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS				
Microcultivo agar Cla	21,3 x 2,9			Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 2,9	6,9 x 3	1,2 x 0,3	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	10,7	10,3	3,5			Monofialide corta
	19,4 x 2,9						7,8 x 3,9				7,8					
	25,2 x 2,9						8,7 x 2,9				4,9					
	19,4 x 2,9						4,8 x 2,9				17,5					
	24,2 x 2,9						5,8 x 2,9				9,7					
	25,2 x 2,9						6,8 x 2,9				9,7					
	24,2 x 2,9						6,8 x 2,9				8,7					
	28,1 x 2,9						5,8 x 2,9				8,7					
	24,2 x 2,9						7,8 x 2,9				10,7					
	25,2 x 2,9						6,8 x 2,9				14,6					
Microcultivo agar PDA							6,8 x 3,9	7,3 x 3,1	1,2 x 0,4	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	10,0	4,3		Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	Monofialides
							7,8 x 3,9				14,6					
							4,8 x 2,9				10,7					
							7,8 x 2,9				9,7					
							8,7 x 2,9				7,8					
							5,8 x 2,9				7,8					
							6,8 x 2,9				6,8					
							7,8 x 2,9				4,9					
							8,7 x 2,9				19,4					
							7,8 x 2,9				6,8					
Microcultivo agar Avena							6,8 x 2,9	8,2 x 3	1,8 x 0,8	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	10,2	2,8			Monofialides
							7,8 x 2,9				14,6					
							9,7 x 2,9				11,6					
							7,8 x 2,9				11,6					
							5,8 x 1,9				7,8					
							5,8 x 1,9				9,7					
							7,8 x 2,9				8,7					
							10,7 x 3,9				14,6					
							10,7 x 4,8				7,8					
							9,7 x 2,9				8,7					
Agar CLA (10 días)	24,3 x 3,9	26,2 x 3,5	4,2 x 0,6	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	14,6 x 4,8	10,6 x 4,3	2,6 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	7,8	7,7	1,8			Monofialides
	19,4 x 4,8						8,7 x 3,9				8,7					
	31 x 3,9						14,6 x 3,9				4,9					
	19,4 x 3,8						9,7 x 4,8				9,7					
	24,3 x 3,9						7,8 x 3,9				6,8					
	28,1 x 2,9						8,7 x 3,9				9,7					
	29,1 x 2,9						7,8 x 3,9				4,9					
	29,1 x 2,9						9,7 x 3,9				7,8					
	29,1 x 2,9						11,6 x 4,8				8,7					
	28,1 x 2,9						12,6 x 4,8									
Agar CLA (15 días)				Largo, recto a escasamente curvado, ahusado, 3 septos	ahusado	puntiagudo	7,8 x 3,9	8,6 x 3,8	1,9 x 0,3	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	7,3	2,1			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
							8,7 x 3,9				7,8					
							10,7 x 3,9				5,8					
							9,7 x 3,9				4,9					
							5,8 x 2,9				3,9					
							7,8 x 3,9				5,8					
							9,7 x 3,9				7,8					
							11,6 x 3,9				8,7					
							8,7 x 3,9				9,7					
							5,8 x 3,9				8,7					
Agar CLA (21 días)	23,3 x 3,9	27,7 x 3,4	2 x 0,5	Largo, recto a escasamente curvado, ahusado, 3 septos	ahusado	puntiagudo	8,7 x 3,9	8,3 x 4,2	0,9 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	8,7	7,8	1,0			Monofialides cortas
	29,1 x 3,9						9,7 x 4,8				6,8					
	29,1 x 2,9						7,8 x 4,8				7,8					
	25,2 x 2,9						8,7 x 3,9									
	27,2 x 2,9						7,8 x 3,9									
	29,1 x 3,9						6,8 x 3,9									
	27,2 x 2,9						8,7 x 3,9									
	29,1 x 3,9						7,8 x 4,8									
	29,1 x 2,9															
	29,1 x 3,9															

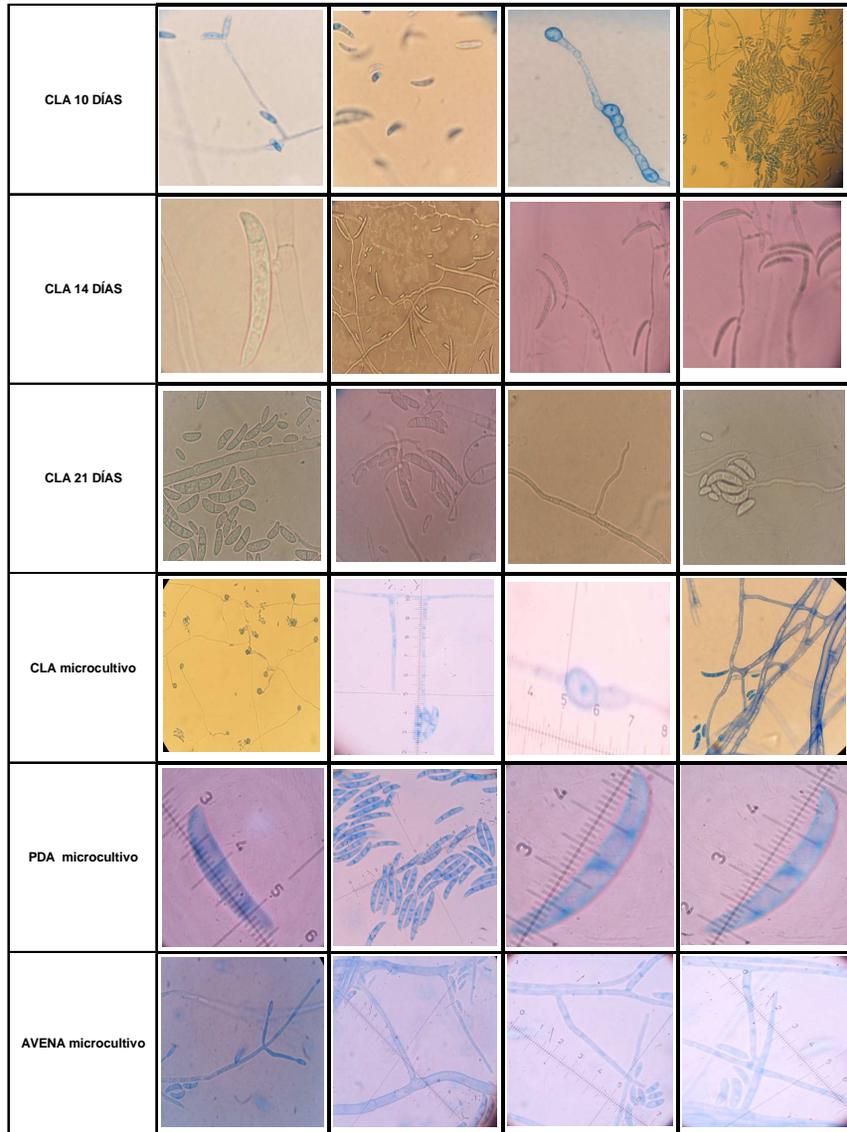
Cepa 408	Macroconidio						Microconidio				Fiálide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño μm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla	19,4 x 2,9	23,7 x 2,9	4 x 0,4	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	6,6 x 3,1	1,2 x 0,4	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	9,7				Monofialide corta
	29,1 x 1,9						7,8 x 2,9				9,7					
	24,3 x 2,9						5,8 x 2,9				11,6					
	19,4 x 1,9						5,8 x 2,9				10,7					
	19,4 x 2,9						4,8 x 2,9				8,7					
	19,4 x 2,9						5,8 x 2,9				5,8					
	29,1 x 1,9						6,8 x 2,9				9,7					
	27,2 x 2,9						5,8 x 2,9				11,6					
	24,3 x 2,9						7,8 x 3,9				8,7					
	25,2 x 2,9						7,8 x 3,9				10,7					
Microcultivo agar PDA							7,8 x 2,9	7,9 x 3,1	1,8 x 0,4	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	22,3	16,6	4,8		Anverso: morado algodonoso Reverso: morado rosado sin pigmento difusible.	Monofialides
							6,8 x 2,9				29,1					
							10,7 x 3,9				14,6					
							9,7 x 2,9				15,5					
							6,8 x 2,9				19,4					
							5,8 x 3,9				15,5					
							6,8 x 2,9				14,6					
							10,7 x 2,9				19,4					
							6,8 x 2,9				15,5					
							7,8 x 2,9									
Microcultivo agar Avena							7,8 x 2,9	7,3 x 3,2	1,4 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	13,6	9,9	2,5			Monofialides
							6,8 x 2,9				9,7					
							6,8 x 2,9				9,7					
							7,8 x 2,9				9,7					
							5,8 x 3,9				9,7					
							10,7 x 3,9				14,6					
							6,8 x 2,9				5,8					
							5,8 x 3,9				7,8					
							6,8 x 2,9				8,7					
							7,8 x 2,9				9,7					
Agar CLA (10 días)	24,3 x 2,9	24,3 x 2,9		Largo, recto a escasamente curvado, ahusado, 3 septos	ahusado	puntiagudo	8,7 x 2,9	8,8 x 3,3	1,9 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	9,7	3,0			Monofialides
							10,7 x 3,9				4,9					
							6,8 x 3,9				3,9					
							7,8 x 2,9				9,7					
							9,7 x 3,9				6,8					
							9,7 x 2,9				14,6					
							5,8 x 2,9				7,8					
							7,8 x 3,9				9,7					
							8,7 x 2,9				6,8					
							12,6 x 2,9				6,8					
Agar CLA (15 días)	24,3 x 3,9	24,3 x 3,9		Largo, recto a escasamente curvado, ahusado, 3 septos	ahusado	puntiagudo	8,7 x 2,9	8,6 x 3,4	1,2 x 0,5	Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	7,4	2,5	Intercalares		Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
							6,8 x 3,9				6,8					
							7,8 x 2,9				4,9					
							9,7 x 3,9				2,9					
							8,7 x 2,9				9,7					
							7,8 x 3,9				10,7					
							8,7 x 2,9				8,7					
							10,7 x 3,9				9,7					
											8,7					
											5,8					
Agar CLA (21 días)	24,3 x 3,9	22,1 x 3,4	3,1 x 0,5	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	8,7 x 2,9			Arriñonadas, ovoides, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	9,9	1,7			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
	25,2 x 3,9						7,8 x 3,9				11,6					
	19,4 x 2,9						8,7 x 3,9				8,7					
	19,4 x 2,9						5,8 x 2,9				7,8					
							9,7 x 3,9				11,6					
							10,7 x 2,9									
							11,6 x 3,9									
							8,7 x 3,9									
							7,8 x 3,9									
							8,7 x 2,9									

<i>Fusarium oxysporum</i>																
Cepa 409	Macroconidio						Microconidio				Fláide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS			
Microcultivo agar Cla	24,3 x 1,9	26,9 x 2,8	5,3 x 0,5	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	10,7 x 2,9	10,6 x 2,7	3,2 x 0,6	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	19,4	12,2	3,2			Monofialíde corta
	29,1 x 1,9						12,6 x 2,9				9,7					
	31 x 2,9						11,6 x 2,9				10,7					
	23,3 x 2,9						6,8 x 1,9				11,6					
	25,2 x 3,9						5,8 x 1,9				9,7					
	24,3 x 2,9						8,7 x 1,9				12,6					
	38,8 x 2,9						11,6 x 2,9				9,7					
	19,4 x 2,9						8,7 x 2,9				16,5					
	29,1 x 2,9						16,5 x 3,9				10,7					
	25,2 x 2,9						12,6 x 2,9				11,6					
Microcultivo agar PDA	20,4 x 2,9	21,3 x 3,4	1,4 x 0,7	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 1,9	7,8 x 2,8	3,5 x 0,8	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	6,8	8,1	3,5		Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	Monofialídes
	22,3 x 3,9						6,8 x 1,9				4,9					
							5,8 x 1,9				6,8					
							4,8 x 1,9				3,9					
							3,9 x 2,9				8,7					
							7,8 x 2,9				4,9					
							9,7 x 3,9				7,8					
							5,8 x 2,9				13,6					
							15,5 x 3,9				13,6					
							11,6 x 3,9				10,7					
Microcultivo agar Avena							12,6 x 2,9	9 x 2,5	2,8 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	13,6	11,3	2,5			Monofialídes
							11,6 x 2,9				14,6					
							9,7 x 2,9				8,7					
							5,8 x 1,9				11,6					
							5,8 x 1,9				11,6					
							6,8 x 1,9				6,8					
							7,8 x 2,9				10,7					
							6,8 x 2,9				13,6					
							9,7 x 1,9				12,6					
							13,6 x 2,9				8,7					
Agar CLA (10 días)	29,1 x 2,9	36,7 x 3,1	7,3 x 0,4				7,8 x 2,9	9,3 x 3,2	1,4 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	14,6	2,7			Monofialídes
	35,9 x 2,9						9,7 x 3,9				9,7					
	29,1 x 2,9						9,7 x 3,9				11,6					
	38,8 x 2,9						11,6 x 3,9				11,6					
	38,8 x 2,9						8,7 x 2,9				12,6					
	48,5 x 3,9						9,7 x 2,9				7,8					
							9,7 x 2,9				15,5					
							8,7 x 2,9				8,7					
							6,8 x 2,9				14,6					
							10,7 x 2,9				14,6					
Agar CLA (15 días)	38,8 x 3,9	30,7 x 2,6	7,4 x 0				7,8 x 2,9	8,3 x 3,6	1,6 x 0,6	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	5,8	9,6	3,1			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
	53,3 x 3,9						6,8 x 3,9				9,7					
	48,5 x 3,9						11,6 x 3,9				11,6					
							8,7 x 3,9				8,7					
							6,8 x 2,9				8,7					
							5,8 x 4,8				14,6					
							8,7 x 2,9				9,7					
							8,7 x 3,9				11,6					
							9,7 x 3,9				5,8					
							7,8 x 2,9									
Agar CLA (21 días)	56,3 x 2,9	44,9 x 2,9	9,9 x 0				7,8 x 2,9	8,3 x 3,2	1 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	14,6	15,5	2,8			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas
	32 x 2,9						6,8 x 3,9				9,7					
	44,6 x 2,9						8,8 x 2,9				14,6					
	46,5 x 2,9						9,7 x 3,9				11,6					
							7,8 x 2,9				7,8					
							8,7 x 2,9				14,6					
											7,8					
											7,8					
											9,7					
											10,7					

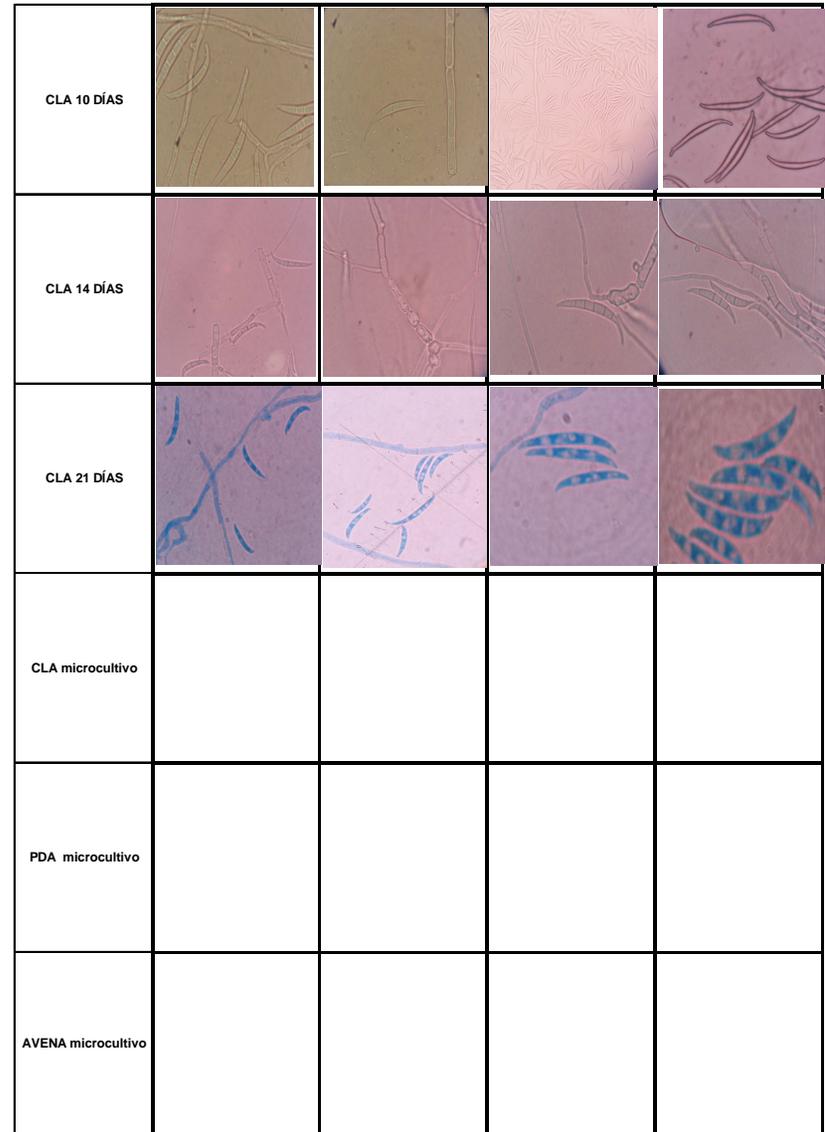
<i>Fusarium oxysporum</i>																			
Cepa 410	Macroconidio						Microconidio				Fialide			Clamidospora	Color de colonia	Observaciones			
	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Apice	Pie	Tamaño µm	Promedio	DS	Forma	Tamaño	Prom	DS						
Microcultivo agar Cla	19,4 x 2,9	21,8 x 2,7	2,8 x 0,5	Largos, rectos a escasamente curvados, ahusados, 3 septos	ahusado	puntiagudo	6,8 x 2,9	10,4 x 2,7	2,7 x 0,4	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	4,9	9,2	4,4			Monofialide corta			
	24,3 x 2,9						9,7 x 2,9				6,8						6,8		
	19,4 x 1,9						9,7 x 2,9				4,9						4,9		
	24,3 x 2,9						7,8 x 2,9				9,7						9,7		
							10,7 x 2,9				4,9						4,9		
							10,7 x 1,9				19,4						19,4		
							14,6 x 2,9				9,7						9,7		
							14,6 x 2,9				10,7						10,7		
Microcultivo agar PDA							3,9 x 1,9	6,9 x 2,4	1,8 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	9,7	11,8	3,3	Terminales	Anverso: blanco morado algodonoso Reverso: blanco morado sin pigmento difusible	Monofialides			
							5,8 x 1,9				10,7						10,7		
							6,8 x 1,9				7,8						7,8		
							6,8 x 1,9				14,6						14,6		
							5,8 x 1,9				19,4						19,4		
							7,8 x 2,9				11,6						11,6		
							9,7 x 2,9				9,7						9,7		
							5,8 x 2,9				13,6						13,6		
Microcultivo agar Avena							5,8 x 1,9	6,3 x 2,8	1,1 x 0,7	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	3,9	8,2	2,3			Monofialides			
							6,8 x 1,9				7,8						7,8		
							6,8 x 3,9				9,7						9,7		
							5,8 x 3,9				11,6						11,6		
							4,8 x 2,9				10,7						10,7		
							5,8 x 2,9				6,8						6,8		
							8,7 x 2,9				7,8						7,8		
							6,8 x 2,9				5,8						5,8		
Agar CLA (10 días)							9,7 x 3,9	7,1 x 3,5	2,4 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	14,6	10,5	2,0			Monofialides			
							6,8 x 2,9				9,7						9,7		
							4,8 x 2,9				10,7						10,7		
							10,7 x 3,9				9,7						9,7		
							5,8 x 3,9				12,6						12,6		
							5,8 x 2,9				11,6						11,6		
							4,8 x 3,9				9,7						9,7		
							6,8 x 2,9				8,7						8,7		
Agar CLA (15 días)							6,8 x 2,9	7,8 x 3,5	1,8 x 0,5	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	12,6	8,8	2,4			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas			
							4,8 x 2,9				7,8						7,8		
							7,8 x 3,9				9,7						9,7		
							8,7 x 3,9				4,9						4,9		
							9,7 x 3,9				7,8						7,8		
							10,7 x 3,9				9,7						9,7		
							8,7 x 3,9				5,8						5,8		
							6,8 x 2,9				8,7						8,7		
Agar CLA (21 días)							6,8 x 2,9	7,4 x 3,2	1,3 x 0,4	Arriñonadas, ovales, elipsoidales, 0 septos. Morfología muy variada.	11,6	10,3	2,6			Monofialides cortas, cabezas mucilaginosas			
							4,8 x 2,9				7,8						7,8		
							7,8 x 3,9				14,6						14,6		
							8,7 x 2,9				11,6						11,6		
							7,8 x 2,9				13,6						13,6		
							6,8 x 2,9				9,7						9,7		
							8,7 x 3,9				7,8						7,8		
							7,8 x 2,9				6,8						6,8		
						9,7			9,7										
						9,7			9,7										

Anexo 5.2 Fotos identificación morfológica.

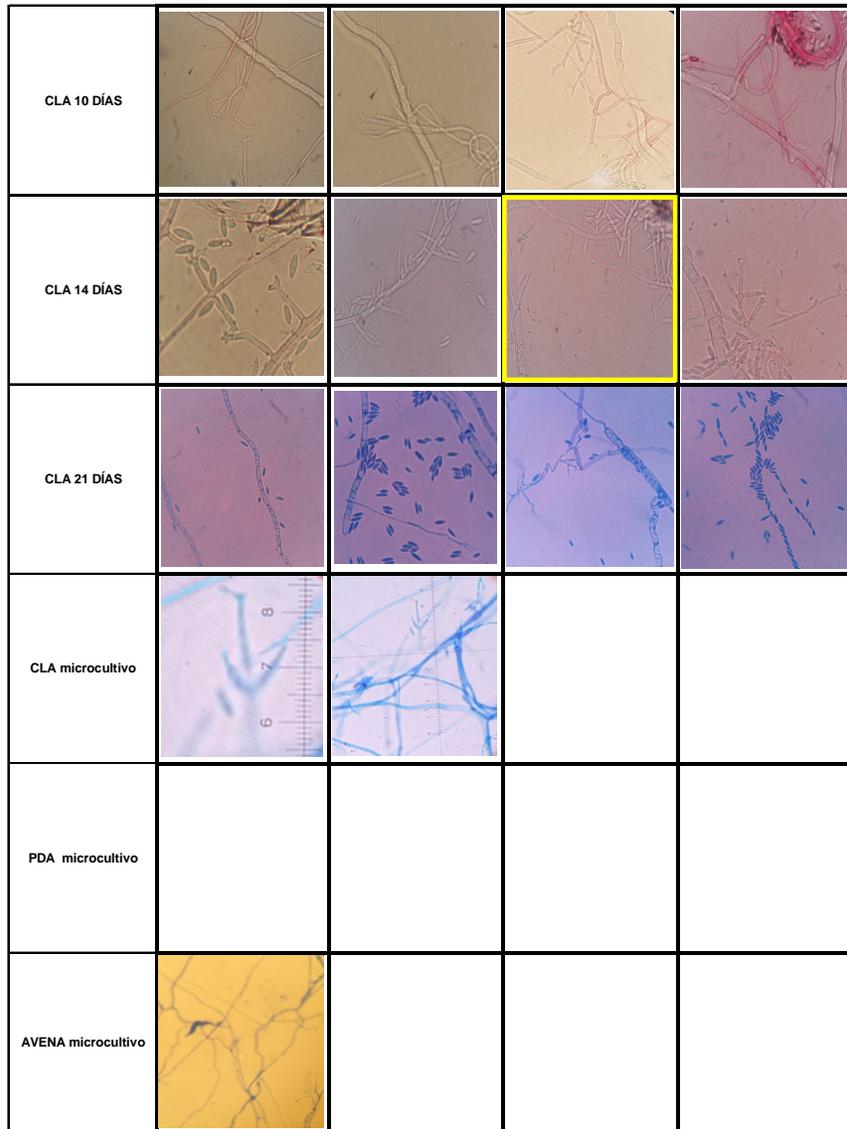
Cepa 108 *Fusarium solani*



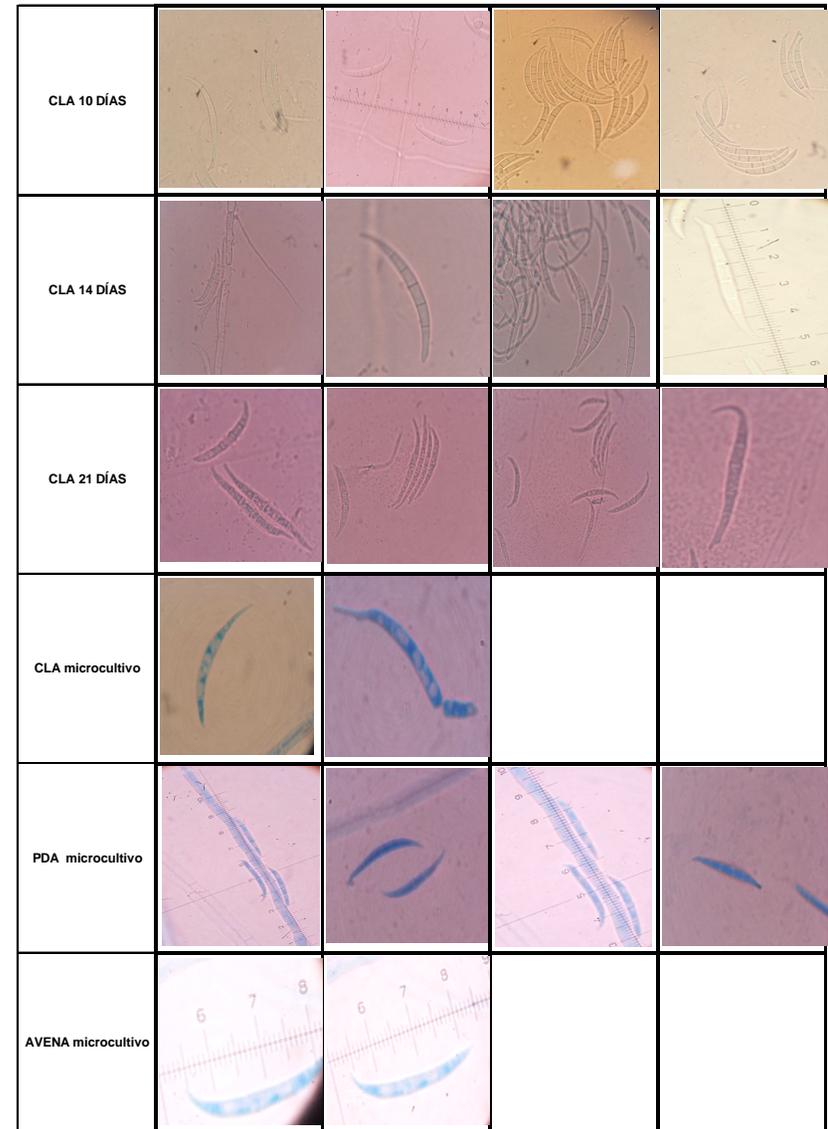
Cepa 111 *Fusarium equiseti*



Cepa 121 *F. sporotrichioides*



Cepa 131 *Fusarium equiseti*



Cepa 155 *Fusarium verticillioides*/ *F. proliferatum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 156 *Fusarium verticillioides*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 159 *Fusarium sporotrichioides*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 160 *Fusarium sporotrichioides*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 161 *Fusarium verticillioides*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 162 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

		<i>Cepa 201 Fusarium sp</i>				<i>Cepa 202 Fusarium oxysporum</i>				
CLA 10 DÍAS						CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS						CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS						CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo						CLA microcultivo				
PDA microcultivo						PDA microcultivo				
AVENA microcultivo						AVENA microcultivo				

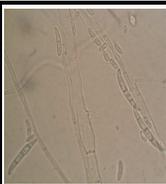
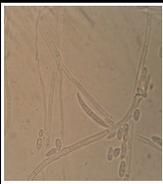
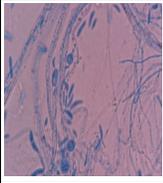
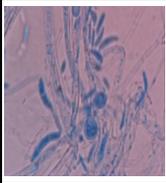
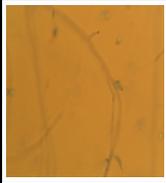
<i>Cepa 203 Fusarium proliferatum</i>					<i>Cepa 204 Fusarium oxysporum</i>				
CLA 10 DÍAS					CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS					CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS					CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo					CLA microcultivo				
PDA microcultivo					PDA microcultivo				
AVENA microcultivo					AVENA microcultivo				

<i>Cepa 205 Fusarium oxysporum</i>					<i>Cepa 206 Fusarium oxysporum</i>				
CLA 10 DÍAS					CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS					CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS					CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo					CLA microcultivo				
PDA microcultivo					PDA microcultivo				
AVENA microcultivo					AVENA microcultivo				

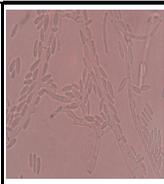
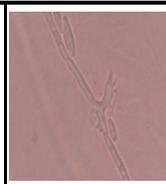
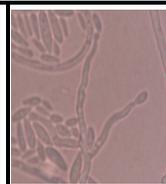
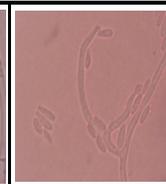
<i>Cepa 207 Fusarium oxysporum</i>					<i>Cepa 208 Fusarium oxysporum</i>				
CLA 10 DÍAS					CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS					CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS					CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo					CLA microcultivo				
PDA microcultivo					PDA microcultivo				
AVENA microcultivo					AVENA microcultivo				

<i>Cepa 209 Fusarium oxysporum</i>					<i>Cepa 210 Fusarium oxysporum</i>				
CLA 10 DÍAS					CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS					CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS					CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo					CLA microcultivo				
PDA microcultivo					PDA microcultivo				
AVENA microcultivo					AVENA microcultivo				

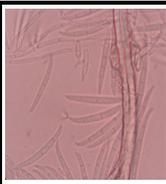
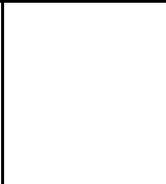
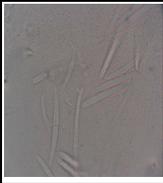
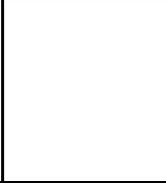
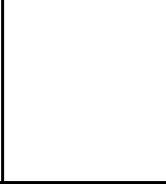
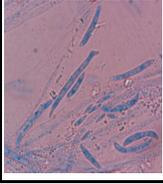
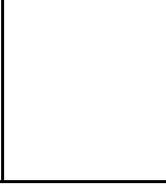
Cepa 302 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

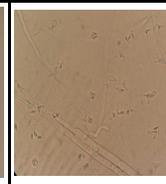
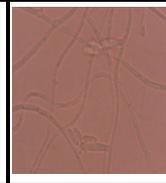
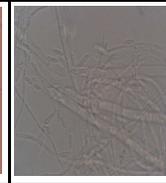
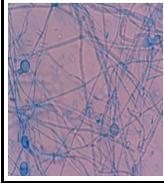
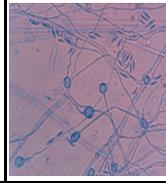
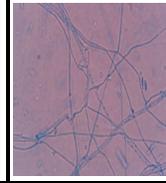
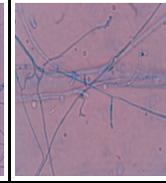
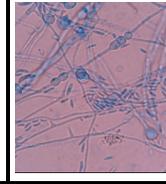
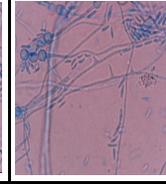
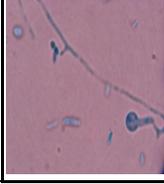
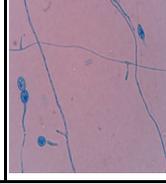
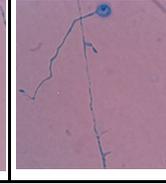
Cepa 303 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

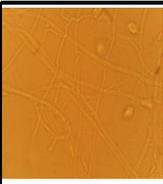
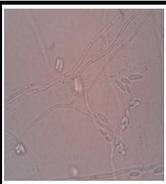
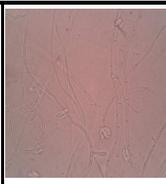
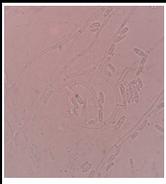
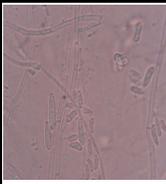
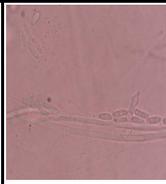
Cepa 308 Fusarium oxysporum

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

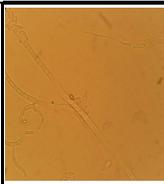
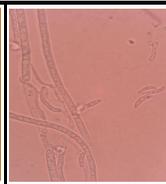
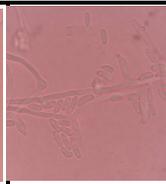
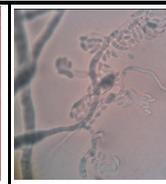
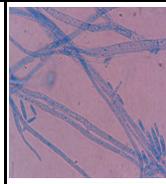
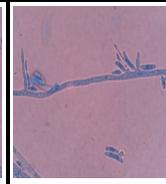
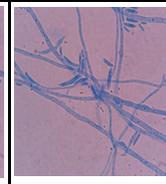
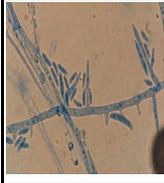
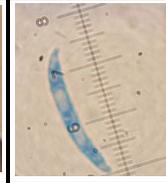
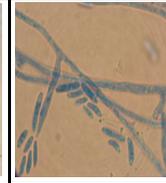
Cepa 309 Fusarium oxysporum

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

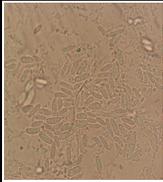
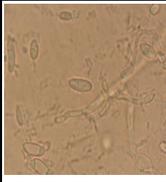
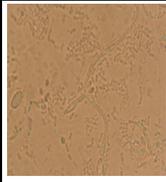
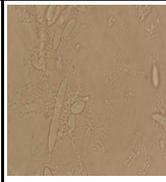
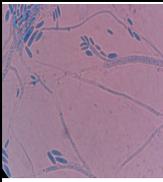
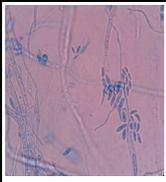
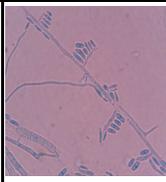
Cepa 310 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

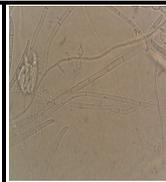
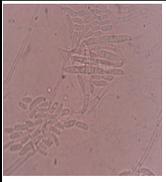
Cepa 311 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

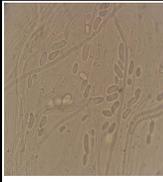
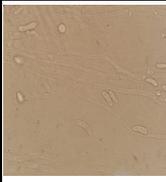
Cepa 312 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

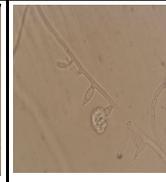
Cepa 313 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 314 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 315 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 401 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 402 *Fusarium solani*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

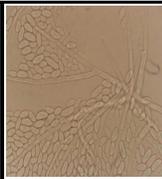
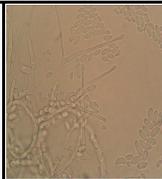
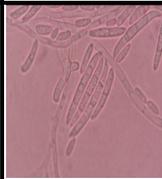
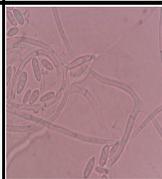
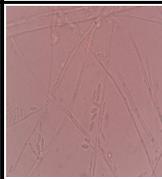
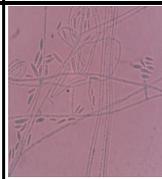
Cepa 403 Acremonium

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

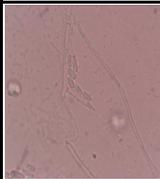
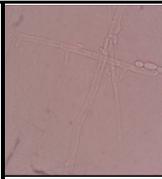
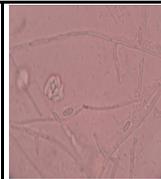
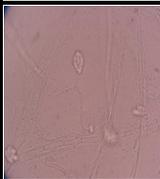
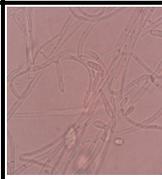
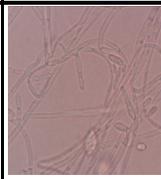
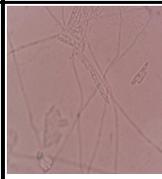
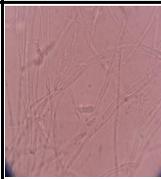
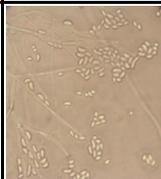
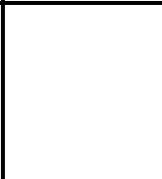
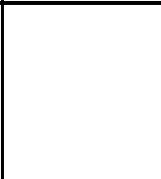
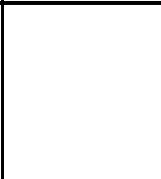
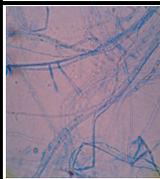
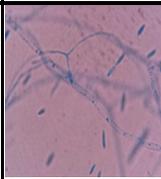
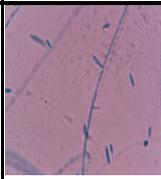
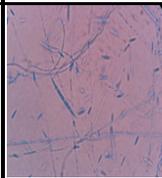
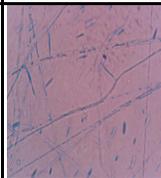
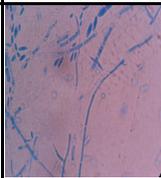
Cepa 404 Fusarium solani

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 405 Fusarium oxysporum

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 406 Fusarium oxysporum

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

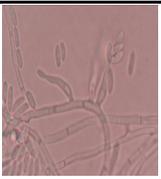
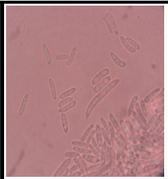
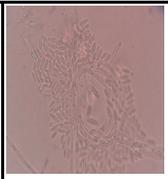
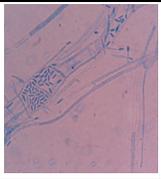
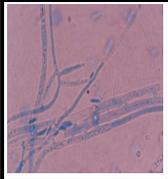
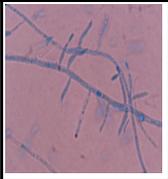
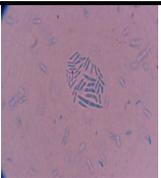
Cepa 407 Fusarium oxysporum

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

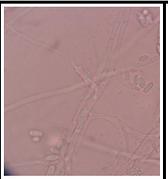
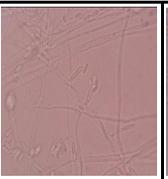
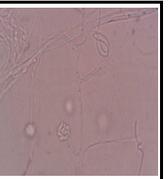
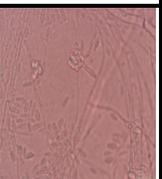
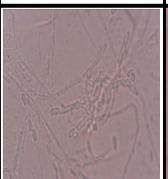
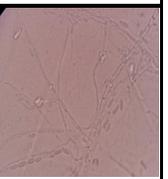
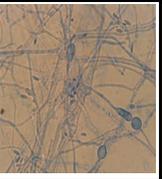
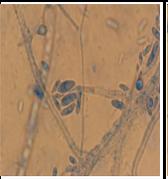
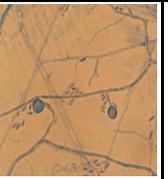
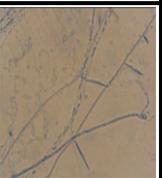
Cepa 408 Fusarium oxysporum

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 409 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Cepa 410 *Fusarium oxysporum*

CLA 10 DÍAS				
CLA 14 DÍAS				
CLA 21 DÍAS				
CLA microcultivo				
PDA microcultivo				
AVENA microcultivo				

Anexo 5.3. Protocolo de extracción de ADN.

1. Sembrar el hongo en medio PDA más cloranfenicol por 8 días.
2. Tomar el micelio del hongo del medio PDA e inocularlo en caldo extracto de malta para la producción de biomasa por 8 días en agitación.
3. Recuperar la biomasa por medio de filtración al vacío utilizando papel filtro.
4. Colocar el filtrado en frascos para liofilizar y congelar por un día a -20°C .
5. Liofilizar por 24 horas o hasta que el micelio quede totalmente seco.
6. Macerar el micelio hasta convertirlo en polvo muy fino.
7. Tomar 100mg del polvo y colocarlo en un eppendorf nuevo.
8. Adicionar 1000 μl de buffer de lisis (2% CTAB, 3% SDS, 250mM NaCl, 200mM Tris-HCl pH 8.5, 25mM EDTA pH 8.0).
9. Homogenizar por inversión y luego por vortex.
10. Añadir 80 μl de β -mercaptoetanol en cámara de flujo.
11. Homogenizar por vortex.
12. Incubar las muestras a 65°C por 2 horas, homogenizar por inversión cada 10 min.
13. Centrifugar a 13000 rpm. 5 min, tomar el sobrenadante y repartirlo en dos tubos eppendorf nuevos.
14. Agregar 400 μl de fenol cloroformo isoamil alcohol (25:24:1)(dependiendo de los volúmenes), mezclar por inercion y por vortex.
15. Centrifugar a 13000 rpm. 5min, tomar el sobrenadante de los dos eppendorf y colocarlos en un eppendorf nuevo.
16. Adicionar un volumen igual de Cloroformo isoamil alcohol (24:1) \approx 600 μl .
17. Centrifugar a 13000 rpm. 5 min a T° ambiente.
18. Recuperar el sobrenadante en un eppendorf nuevo, Adicionar un volumen igual de isopropanol frío (-20°C). Mezclar suave por inversión y ver aparición de mota blanca.
19. Dejar a -20°C toda la noche.
20. Centrifugar a 13000 rpm 10 min.
21. Descartar sobrenadante y dejar los eppendorf boca abajo sobre una toalla de papel absorbente.

22. Lavar el pellet con 200 μ l de etanol al 70 % frío (-20°C). Mezclar bien y centrifugar 13000 rpm 5 min
23. Descartar el sobrenadante y dejar los eppendorf boca abajo sobre una toalla de papel absorbente hasta que se seque.
24. Agregar 100 μ l de buffer TE (0.1mM Tris- HCl, 10mM EDTA).
25. Colocar a 4°C y resuspender (Almacenar a -20°C).

Anexo 5.4. Kit de limpieza Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

Purificación de DNA por centrifugación

Preparación del corte de Gel

- Realizar la electroforesis de los DNA a purificar.
- Cortar la banda de DNA que se desea purificar con cuchilla estéril.
- Colocar el pedazo de gel en un eppendorf de 1,5 ml (nuevo) previamente marcado.
- Pesar en mg el pedazo de gel en una balanza analítica.
- Adicionar 10 µl de la solución de unión a la membrana (Membrane Binding Solution) por cada 10 mg de gel.
- Colocar en Vortex e incubar de 50°C – 65°C hasta que se disuelva totalmente.

Unión de DNA

- Insertar una SV minicolumna en el tubo de colección previamente marcados.
- Transferir la mezcla del gel disuelto al la SV minicolumna e incubar 1min a T° ambiente.
- Centrifugar a 16.000 x g por 1min.
- Descartar sobrenadante y reinsertar la SV minicolumna en el tubo de colección.

Lavado

- Adicionar 700 µl de solución de lavado de membrana (Membrane Wash Solution)
- Centrifugar a 16.000 x g por 1min.
- Descartar sobrenadante y reinsertar la SV minicolumna en el tubo de colección.
- Adicionar 500 µl de solución de lavado de membrana (Membrane Wash Solution)
- Centrifugar a 16.000 x g por 5min.
- Descartar sobrenadante y reinsertar la SV minicolumna en el tubo de colección.
- Centrifugar a 16.000 x g por 1min, con la tapa de la centrifuga abierta para permitir la evaporación de los residuos de etanol.

Elución

- Transferir la SV minicolumna a un eppendorf de 1,5 ml (nuevo) previamente marcado.
- Adicionar 50 µl de agua libre de nucleasa (Nuclease- Free Water). Incubar 1min a T° ambiente.
- Centrifugar a 16.000 x g por 1min.
- Descartar la SV minicolumna y almacenar el DNA a 4°C o -20°C.

Anexo 7.1. Análisis de varianza de aislamientos de *Fusarium* spp. a diferentes temperaturas.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ABCT28	Inter-grupos	759729,288	39	19480,238	45,236	1,1094510 E-40
	Intra-grupos	34450,953	80	430,637		
	Total	794180,241	119			
ABCT37	Inter-grupos	3348516,767	39	85859,404	173,009	3,6501267 E-63
	Intra-grupos	39701,700	80	496,271		
	Total	3388218,467	119			
ABCT40	Inter-grupos	7130124,297	39	182823,700	5592,393	2,9446620 E-123
	Intra-grupos	2615,320	80	32,692		
	Total	7132739,617	119			

Anexo 7.2. Agrupamientos Duncan de *Fusarium* spp. a diferentes temperaturas.

Cepa	ABC	Agrupamientos Duncan ABCT 28																	
403	543,13	a																	
210	594,00		b																
203	602,30		b																
308	604,60		b	c															
402	616,63		b	c															
209	621,10		b	c															
204	628,70		b	c	d														
303	631,00		b	c	d														
314	641,37			c	d														
207	641,97			c	d														
302	664,30				d	e													
108	681,20						e	f											
							e												
310	687,40					e	f	g											
161	689,40					e	f	g	h										
313	690,57					e	f	g	h										
311	690,63					e	f	g	h										
309	693,10					e	f	g	h										
131	694,10					e	f	g	h										
202	711,40						f	g	h	i									
312	715,10						f	g	h	i	j								
406	716,97						f	g	h	i	j								
409	724,67							g	h	i	j	k							
111	728,37								h	i	j	k							
407	734,37									i	j	k							
404	743,60									i	j	k	l						
408	744,37									i	j	k	l						
201	751,10										j	k	l	m					
410	753,90										j	k	l	m					
205	760,70											k	l	m	n				
405	778,43												l	m	n	o			
206	782,27												l	m	n	o			
315	785,90													m	n	o			
401	796,00														n	o			
160	808,27															o	p		
121	809,80															o	p		
162	837,20																p	q	
156	838,30																p	q	
208	844,20																p	q	
155	855,40																	q	
159	862,70																		q
Sig.		1,000	,061	,059	,063	,139	,080	,067	,055	,101	,054	,072	,050	,075	,066	,109	,061	,187	

Cepa	ABC	Agrupamientos Duncan ABCT 37																									
159	34,5000	a																									
161	269,9000		b																								
403	341,3000			c																							
155	346,6000			c																							
108	401,4000				d																						
111	412,9000				d	e																					
156	415,9000				d	e																					
402	427,2000				d	e																					
160	432,6333				d	e																					
408	437,2000				d	e																					
131	443,5333					e																					
404	483,9333						f																				
401	492,0000						f	g																			
406	511,7000						f	g	h																		
210	513,5000						f	g	h																		
162	526,1000							g	h	i																	
209	541,3000								h	i	j																
207	543,3000								h	i	j																
203	548,4000								h	i	j																
407	548,7333								h	i	j																
409	561,6000									i	j																
405	568,6000										j																
204	606,9000											k															
121	621,6000											k															
202	671,2000												l														
303	685,6000													m													
410	687,0000														m												
205	701,6000															m	n										
314	706,3000																m	n	o								
201	708,6000																	m	n	o	p						
208	714,0667																		m	n	o	p	q				
310	729,7000																				n	o	p	q	r		
308	731,5000																					n	o	p	q	r	
313	746,5000																						o	p	q	r	
311	748,6000																							p	q	r	
312	751,9000																								q	r	
206	753,0000																								q	r	
302	757,4333																									r	
309	760,5000																									r	
315	875,1000																										r
Sig.																											s
		1,000	1,000	,772	,088	,146	,143	,090	,082	,091	,196	,421	,074	,178	,156	,055	,056	,067	,155	1,000							

Anexo 7.3. Comparación de los aislamientos de *Fusarium* spp. a diferentes temperaturas.

CEPA	Anova	Grupos Duncan ^a		
	Sig.	a1 ≤abc	b2	c3 ≥abc
108	0	40	37	28
111	0	40	37	28
121	0	40	37	28
131	0	40	37	28
155	0	40	37	28
156	0	40	37	28
159	0	37	40	28
160	0	40	37	28
161	0	40	37	28
162	0	40	37	28
201	0	40	37	28
202	0	40	37	28
203	0	40	37	28
204	0	40	37	28
205	0	40	37	28
206	0	40	37	28
207	0	40	37	28
208	0	40	37	28
209	0	40	37	28
210	0	40	37	28
302	0	40	28	37
303	0	40	28	37
308	0	40	28	37
309	0	40	28	
			37	
310	0	40	28	
			37	
311	0	40	28	37
312	0	40	28	
			37	
313	0	40	28	
314	0	40	28	
			37	
315	0	40	28	37
401	0	37	40	28
402	0	37	40	28
403	0	37	40	28
404	0	37	28	40
405	0	37	40	
			28	
406	0	37	40	28
407	0	37	40	28
408	0	37	40	28
409	0	37	40	28
410	0	37	28	40

Anexo 7.4. Análisis de varianza de aislamientos de *Fusarium* spp. a diferentes pH.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ABCpH4	Inter-grupos	1054500,943	39	27038,486	817,857	6,48549 E-90
	Intra-grupos	2644,813	80	33,060		
	Total	1057145,756	119			
ABCpH7	Inter-grupos	1219882,190	39	31279,031	1168,192	4,33894 E-96
	Intra-grupos	2142,047	80	26,776		
	Total	1222024,237	119			
ABCpH9	Inter-grupos	1266821,317	39	32482,598	557,260	2,80054 E-83
	Intra-grupos	4663,187	80	58,290		
	Total	1271484,504	119			

Anexo 7.6. Comparación de los aislamientos de *Fusarium* spp. a diferentes pH.

CEPA	Anova	Grupos Duncan ^a		
	Sig.	a1 ≤abc	b2	c3 ≥abc
108	0	4	7	9
111	0	4	7	9
121	0	4	7	9
131	0	4	7	9
155	0	4	7	9
156	0	4	7	9
159	0	4	7	9
160	0	4	7	9
161	0	4	7	9
162	0	4	7	9
201	0	4	7	9
202	0	4	7	9
203	0	4	7	9
204	0	4	7	9
205	0	4	7	9
206	0	4	7	9
207	0	4	7	9
208	0	4	7	9
209	0	4	7	9
210	0	4	7	9
302	0	4	7	9
303	0	4	7	9
308	0	4	7	9
309	0	4	7	9
310	0	4	7	9
311	0	4	7	9
312	0	4	7	9
313	0	4	7	9
314	0	4	7	9
315	0	4	7	9
401	0	4	7	9
402	0,081	9	4	
		4	7	
403	0,236	7		
		9		
		4		
404	0	4	9	
			7	
405	0	4	7	9
406	0	4	7	9
407	0	4	7	9
408	0	4	9	
			7	
409	0	4	7	9
410	0,004	4	7	
			9	

Anexo 7.7. Análisis de varianza de aislamientos de *Fusarium* spp. en caldo urea.

ANOVA

pH	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17,596	39	,451	10,208	2,59328 E-18
Intra-grupos	3,536	80	,044		
Total	21,132	119			

Anexo 7.8. Agrupamientos Duncan de *Fusarium* spp. en caldo urea.

Cepa	ABC	Agrupamientos Duncan pH					
160	7,100	a					
313	7,550	b					
208	7,680	b					
131	7,820	b					
121	7,833	b					
159	7,860	b	c				
204	8,207		c	d			
210	8,210		c	d			
205	8,400			d	e		
207	8,470			d	e	f	
203	8,473			d	e	f	
314	8,527			d	e	f	
315	8,527			d	e	f	
311	8,533			d	e	f	
407	8,550			d	e	f	
111	8,557			d	e	f	
162	8,563			d	e	f	
309	8,570			d	e	f	
209	8,573			d	e	f	
202	8,583			d	e	f	
312	8,603			d	e	f	
406	8,607			d	e	f	
401	8,613			d	e	f	
410	8,617			d	e	f	
310	8,650				e	f	
302	8,660				e	f	
408	8,667				e	f	
206	8,673				e	f	
308	8,683				e	f	
201	8,687				e	f	
409	8,697				e	f	
161	8,707				e	f	
108	8,720				e	f	
303	8,737				e	f	
402	8,740				e	f	
404	8,747				e	f	
156	8,763				e	f	
405	8,763				e	f	
155	8,770				e	f	
403	8,843					f	
Sig.		1,000	,112	,056	,055	,090	,087