



# Diagnóstico de la fusariosis radicular en el cultivo del tomate

*Benito Hernández, Purificación. Hernández Brito,  
Elisa. Servicio de Laboratorios Agroalimentario y Fito-  
patológico del Cabildo de Gran Canaria.*

---

# Introducción

---

La fusariosis radicular o podredumbre del cuello y raíces del tomate es una enfermedad grave, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-licopersici* (FORL). El tomate también se ve afectado por la otra forma especializada de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. (FOL) que causa la fusariosis vascular. Por otro lado, en los últimos años, otra especie del género *Fusarium* spp, *Fusarium solani*, que en un primer momento se consideraba saprófito, se ha demostrado que en determinadas circunstancias ocasiona también podredumbre del pie y lesiones radiculares en esta solanácea.

El tomate es uno de los cultivos de exportación más importante de la isla de Gran Canaria, con una historia de más de 130 años. El Sector tomatero en el Archipiélago genera unos 20.000 puestos de trabajo directos e indirectos, en su mayoría personas de mediana edad y mujeres (FEDEX, 2014).

Actualmente, los problemas fitopatológicos más importantes que continúan afectando al cultivo

del tomate son el TIR (maduración irregular del tomate) y algunas razas denominadas agresivas tanto del virus del PepMV (virus del mosaico del pepino dulce) como del STWV (virus del bronceado del tomate), principalmente.

Otras enfermedades como la fusariosis radicular causada por el FORL, está en regresión en los últimos años debido a la obtención de cultivares de tomate resistente a dicha enfermedad. Sin embargo, en todas las campañas afecta, si no a un número elevado de explotaciones, sí a aquella plantación donde aparece, ya que las pérdidas pueden alcanzar el 25%.

El género *Fusarium* varía ampliamente en características morfológicas y fisiológicas, incluyendo su virulencia, lo que implica problemas en la identificación sobre todo en relación a la especie, al dificultar el establecimiento de unas claves taxonómicas estables y ampliamente aceptadas para el género. Las formas especializadas FORL y FOL son indistinguibles a nivel morfológico, lo que complica su diagnóstico.

---

## Objetivos

---

La dificultad en el diagnóstico de las enfermedades causadas por el género *Fusarium* spp, y, en especial, la complejidad en la identificación morfológica de las dos formas especiales de *Fusarium oxysporum* que afectan al cultivo del tomate,

FORL y FOL, ha llevado a establecer un protocolo de detección e identificación de FORL por PCR que facilita y precisa el diagnóstico de este patógeno.

## Sintomatología de la enfermedad

Los primeros síntomas se localizan en las raíces y en el cuello de la planta. Las primeras presentan coloraciones pardo-rojizas, húmedas y acaban pudriéndose (**Fig. 1**). El cuello de la planta es habitual que manifieste un chancro pardo oscuro que suele extenderse longitudinalmente más por un lado del tallo, adoptando la forma de una llama (**Fig. 2**), pudiendo ascender hasta 30 cm. La necrosis interior de las raíces alcanza a los vasos del tallo, que toman también una coloración parda (**Fig. 3**) a pesar de que no se trata de una enfermedad vascular. Esto se puede apreciar en el corte longitudinal de la base del tallo. Estas alteraciones provocan un marchitamiento de las hojas del ápice y/o un amarilleo de las hojas basales. Estos síntomas de la parte aérea aparecen en los días próximos a la recolección. Finalmente las plantas llegan a morir.



Fig. 1. Necrosis radicular



Fig. 2. Chancro en forma de llama



Fig. 3. Puntos necróticos en vasos

## Muestras

Se analizaron macroscópicamente cuatro muestras de cultivos de tomates que presentaban síntomas de fusariosis radicular.

De porciones de tejido del tallo de la zona fronteriza a las necrosis se realizaron siembras en medios de cultivo PDA-S y PPA semiselectivos y selectivos para *Fusarium* spp. Tras la incubación a 25°C durante 5 días, se confirmó morfológicamente mediante observación microscópica que los aislados obtenidos pertenecían al género *Fusarium* spp.

Posteriormente se realizaron cultivos monospóricos para la obtención de cultivos puros, y se volvieron a observar, comparando las características

morfológicas de micelios y conidias. Así, se pudo determinar que los cuatro aislados de *Fusarium* pertenecían a la especie *Fusarium oxysporum*, si bien, para confirmar si se trataba de FORL o no, y descartar a *Fusarium solani*, se procedió a realizar secuenciación y PCR específica del FORL

## Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método de CTAB (Möler et al., 1992) a partir de micelio crecido en los medios PDA procedentes de cultivos monospóricos.

# Materiales y métodos

## Primers y amplificación de ADN

Los primers utilizados para determinar *Fusarium* spp. son EF1 y EF2 mediante la amplificación de un fragmento del gen TEF-1 $\alpha$ . El fragmento que amplifica es de 600-700 pb (tabla 1). En cambio, la pareja de primer Sprl genera un fragmento de 947 pb específico para amplificar *Fusarium oxysporum* f.sp radicis-lycopersici (FORL).

Las condiciones del termociclador para EF1/EF2 fueron de 1 ciclo a 94 °C 1 min, seguido de 35 ciclos de 35 s a 95 °C , 1 min a 55 °C y 90 s a 72 °C y una etapa final de extensión de 72 °C durante 5 min. Para los primers Sprl-f /Sprl-r las condiciones utilizadas fueron: desnaturalización inicial de 94 °C 5 min, seguido por 45 ciclos a 94

°C 1 min, 61 °C 1 min y 72 °C 2 min, y una etapa final de extensión de 72 °C durante 5 min.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ l, conteniendo 2  $\mu$ l de muestra de DNA, 10  $\mu$ l KOD Hot Start Master Mix, 0,6  $\mu$ l de cada primer forward y reverse, y 6,8  $\mu$ l agua de PCR. La reacción fue llevada a cabo en un MasterCycler personal (Eppendorf).

5  $\mu$ l del producto de PCR de cada reacción fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 1. Primers utilizados para la identificación de *Fusarium* spp. y *Fusarium oxysporum radicis-lycopersici*.

Primer	Sentido	Secuencia (5'-3')	Tamaño
TEF	Forward	GTGCAGACTGTCGATGTG	600-700 bp
	Reverse	GAACCACAACAGGCACGT	
Sprl	Forward	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC	947pb
	Reverse	GGAAGTACCAGTGATCATGTT	

## Secuenciación

La secuenciación de ADN del producto de amplificación del gen TEF-1 $\alpha$  fue purificado usando el kit Real Clean Gel/PCR Spin (Valencia,

España). La secuenciación fue realizada a través del servicio Macrogen y analizada en el BLAST.

# Resultados

Cuatro muestras procedentes de diversos cultivos de tomates fueron analizadas morfológica y molecularmente. A partir de la sintomatología y caracterización morfológica de los aislados fúngicos obtenidos, se pudo determinar que los aislados pertenecían al género *Fusarium* spp. y/o la especie *Fusarium oxysporum* (**tabla 2**). Sin embargo,

en algunos casos fue difícil precisar la especie mediante el análisis macroscópico y microscópico; no obstante, es importante determinarla puesto que permite conocer si el hongo es el agente causal de la enfermedad o si está presente en el cultivo como saprófito. Y es por lo que se requiere el uso de técnicas moleculares.

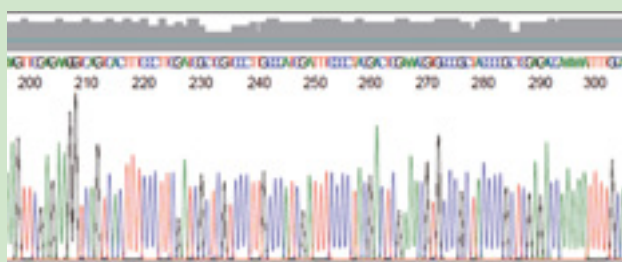


Figura 4. Presentación de un cromatograma de la secuencia de nucleótidos del Factor de elongación (EF)

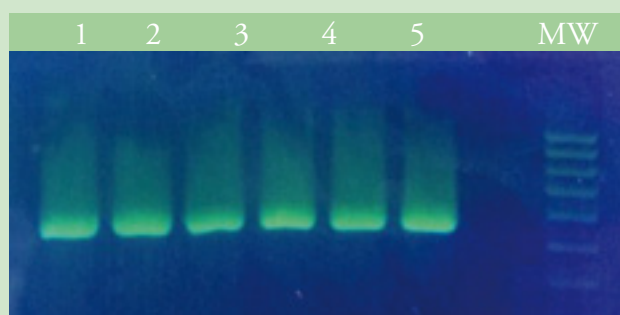


Fig. 5. Determinación mediante PCR convencional de *Fusarium* spp. 1-4, muestras procedentes de cultivos de tomate a analizar; 5, blanco; MW, marcador de peso molecular.

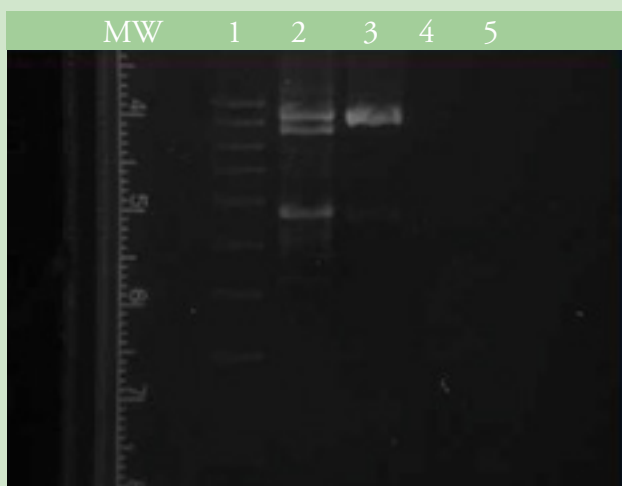


Fig. 6. Productos de PCR en electroforesis en gel de agarosa usando los primer *sprl* para determinar *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) en aislados de cultivos de tomates. Muestras 1-2, FORL; 3, F.Ox; 4, *F. solani*; 5, blanco; MW, marcador de peso molecular.

La secuenciación del producto de PCR amplificado con el primer TEF 1- $\alpha$  (**Fig. 4 y Fig. 5**) determinó las especies de las cuatro muestras analizadas (**Tabla 2**). Esta técnica fue útil para conocer la especie de las muestras 1 y 4, *F. oxysporum* y *F. solani* respectivamente, y para confirmar el diagnóstico morfológico de las muestras 2 y 3.

A pesar de que actualmente se considera a TEF 1- $\alpha$  como el gen esencial en análisis multigénicos, debido al alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas, no es posible determinar mediante secuenciación la forma especial del género *Fusarium* spp.

Tabla 2. Identificación de aislados de *Fusarium* basados en el análisis morfológico, secuenciación de la región del gen TEF 1- $\alpha$  y ensayos de PCR específica de la especie FORL

Nº de muestra	Diagnóstico macro y microscópico	Identificación TEF 1- $\alpha$	Primer específico <i>sprl</i>	Diagnóstico final
1	F.spp.	<i>F. oxysporum</i>	FORL	FORL
2	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	FORL	FORL
3	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	--	<i>F. oxysporum</i>
4	F. spp.	<i>F. solani</i>	--	<i>F. solani</i>

---

# Resultados

---

Sin embargo, debido a que el grado de patogenicidad influye en función de la forma especial del hongo que actúe -como es el caso de FORL y FOL-, consideramos que es interesante determinar en las cuatro muestras estudiadas si el agente causal implicado en producir las enfermedades fue FORL. Para ello, realizamos PCR específica de FORL con los primer Sp<sub>1</sub>.

Los resultados determinan que las muestras 1 y 2 son FORL (**Fig. 6**). Por tanto, el diagnóstico final que pudimos determinar complementando las técnicas moleculares con el análisis sintomático y morfológico es el descrito en la tabla 2.

---

# Conclusión

---

Es importante realizar secuenciación de aquellas especies que no se puedan determinar o de las que se tenga duda a nivel macroscópico y microscópico, ya que determinará si ese hongo está causando la enfermedad o no.

Poder determinar mediante PCR la forma especial del agente causal tiene gran valor puesto que precisa el análisis y permite realizar un estudio

sobre qué hongos son los que más incidencia tienen para crear variedades resistentes al patógeno y determinar aquéllas que no muestran resistencia a dicho patógeno.

---

# Bibliografía

---

- Ayşegül Çolak, Mehmet Biçici. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. radicles-lycopersici and races of *F. oxysporum* f. sp. lycopersici of tomato in protected tomato-growing areas of the eastern Mediterranean region of Turkey. Turk J Agric For (2013) 37: 457-467
- Blancard, D., 2011. Enfermedades del tomate. Ed. Mundi-Prensa.
- Carbonell, C., Cifuentes, D., Tello, J. y Cenis, J.L., 1994: Diferenciación de *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici y F.o. f. sp. radicles-lycopersici y su detección en planta mediante marcadores RAPD. Bol. San. Veg. Plagas, 20: 919-926
- Nugroho PA, Setyabudi FM, Saleh B and Rahayu ES. Fumonisin-Producing *Fusarium* from Maize G rains in Tretep, Indonesia. Journal of Food Science and Engineering 3 (2013) 534-540
- Möler, E.M, Bahnweg, G, Sandermann, H and Geiger, H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infect plant tissues. Nucleic Acids Research, 1992, vol. 20, No. 22 6115-6116.
- Sampietro DA, Marín P, Iglesias J, Presello DA, Vattuone MA, Catalan CA, Gonzalez Jaen MT. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. Fungal Biol. 2010 Jan;114(1):74-81.