

Detección Mediante PCR de *Fusarium oxysporum* *f. sp. lycopersici* raza 3 en el Cultivo de Tomate en República Dominicana.

Rosa María Méndez Bautista, M.Sc *

Juan.T. Camejo MSc. y Deisy Pérez PhD.

* Fitopatóloga - Investigadora CENTA-IDIAF

rmendez@idiaf.gov.do

▫

46ta Reunión Anual

Sociedad Caribeña de Cultivos Alimenticios

Boca Chica- República Dominicana 2010



INTRODUCCION

Importancia del Cultivo

- El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las hortalizas de mayor importancia económica en Rep. Dominicana.
- Es una fuente de vitamina C, E, y caroteno; en minerales y oligoelementos como el potasio (K).
- Acción preventiva contra algunos cánceres por la cantidad de licopeno, que contiene.
(lucie@republica-dominicana-live.com)





Cont, Importancia del Cultivo

Siembra anual en R.D.: aproximadamente 10,000 Ha.

Principales áreas de producción: Azua y Peravia.

La siembra del tomate aporta a la economía del país

Mas de 4,000 mil parceleros de Reforma Agraria
80 mil empleos directos e indirectos, en campo e
industrias del Sur, Suroeste y del Norte-noroeste
Beneficiarios: más de 500 mil personas.

Expectativa al 2009: una producción de 5 millones de
quintales y la generación de más de 600 millones de pesos.

Fuentes: 2009 El Nuevo Diario

www.panoramadiario.com

Cont. Importancia del Cultivo

- Promedio anual de la producción mundial en los últimos años sobrepasa los 110 millones de toneladas.
- Crecimiento sostenido de consumo en los últimos 15 años: 2.5%.
- Principales productores a nivel mundial: China, Estados Unidos, Turquía, Italia, Egipto e India, (FAO 2007).



Importancia de la enfermedad

- La marchites vascular del tomate conocida como Fusariosis, es una enfermedad de distribución mundial, producida por el hongo *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* (Fol).
- La Fusariosis constituye una de las principales causas de pérdidas en áreas hortícola del país.
- Fol es un hongo muy agresivo, se puede encontrar en cultivo de campo abierto y protegido, en regiones de clima cálido, como también en zonas templadas.
- Es de difícil diagnosis por la variabilidad patogénica del hongo.

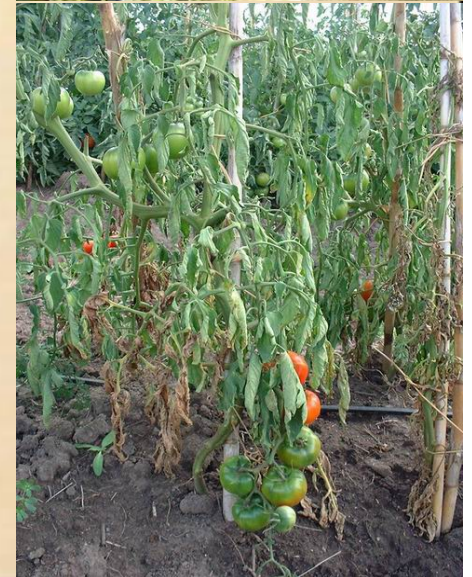


Cont. Importancia

➤ *F. oxysporum* es uno de los patógenos que aparece con mayor frecuencia causando daños severos en etapa al semillero y al cultivo de tomate.

➤ Es más severo que los demás hongos vasculares, tiene la capacidad de provocar importantes daños en condiciones favorables.

➤ La presencia de éste patógeno puede destruir cuello y la raíz de la planta y en consecuencia reduce considerablemente los rendimientos del cultivo.



Desarrollo de la enfermedad

- El hongo sobrevive en el suelo, penetra en la planta por las raíces, causa obstrucción de los tejidos vasculares y necrosis de tallo.
- Produce toxinas que son transportadas a la hojas, las cuales se tornan amarillas y/o naranjadas.
- En cultivo con daño en la base del tallo, el agua procedente de las raíces no alcanza las hojas superiores, se seca y decolora el tejido interno, las hojas se marchitan y la planta muere.



Agrios G. 1997 y J.F. Leslie 2003.

Sintomatología

En etapa de semillero:

Adelgazamiento a nivel del cuello,
Marchites y muerte de Plántulas.

Plantas adultas en campo

Clorosis y amarillamiento de las nervaduras y
hojas inferiores. Achaparramiento; marchites
y necrosis de hojas y tallos jóvenes; desfoliación
y desprendimiento de frutos y muerte de la planta.
El interior del tallo se torna color café.



OBJETIVO

En el país, los estudios de identificación racial son escasos.

Determinar mediante PCR, la raza de *Fusarium oxysporum lycopersici* f. sp. presente en muestras de tomate con síntomas característicos de la marchitez vascular o fusariosis.



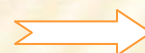
MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la temporada de siembra del año 2009, se recibieron en el Laboratorio de Fitopatología del CENTA – IDIAF, plantas de tomate provenientes de plantaciones de la Provincia de Azua, Región Sur del país.



Caracterización Fenotípica de los Aislados

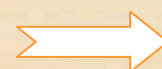
➤ Preparación de medios de cultivo (PDA, Agar -carnection) y siembra de tejido enfermo en placas de petrix incubadas a 28 °C



➤ Caracteres culturales (crecimiento de la colonia, color y forma del micelio)



➤ Morfología de estructuras reproductivas (micro y macroconidias, clamidosporas)



Criterios taxonómicos (Barnet, CMI)

Identificación de los Aislados Utilizando Marcadores IGS y Primers CNL12 y CNS1

Extracción de ADN a partir del micelio del hongo.



Amplificación por PCR de la región IGS - CNL12 y CNS1



Visualización de los resultados y análisis del producto amplificado.

Amplificación por la Técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

- Se utilizaron Marcadores IGS y los iniciadores de ADN fueron CNL12 y CNS1, amplificados en un termociclador PTC - 200
- Secuencias de iniciadores **Fwd 5' ggaagtaaaagtcgtaacaagg 3'**
rev_3' tcctccgcttattgatatgc 5'
- Los productos de la PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.
- La Visualización del producto se realizó en un transluminador.

RESULTADOS

Visualización de los resultados

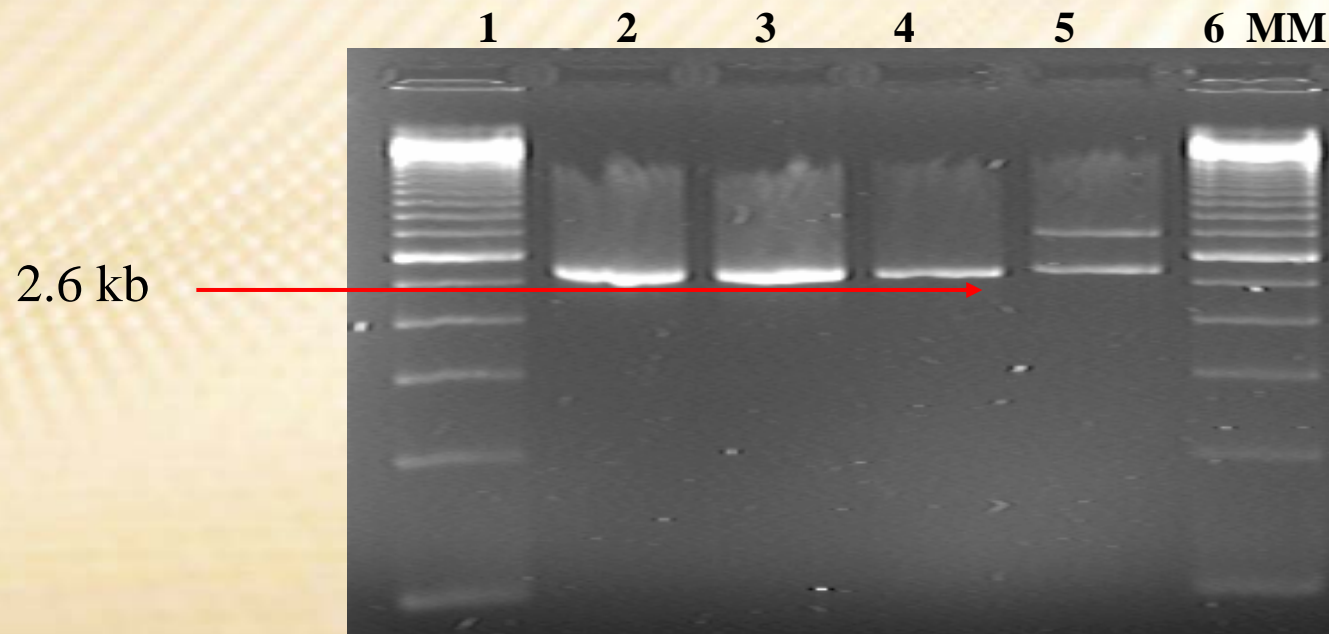


Fig.1 Representación de los IGS de *Fusarium oxysporum* f.s.p *lycopersici* raza 3. Las líneas 2, 3 y 4 (MT1, MT2 y MT3) son positivas para Fol raza 3. Las líneas 1 y 6 representa los marcadores de 1 Kb.

CONT. RESULTADOS

Identificación de los Aislamientos Utilizando Marcadores IGS, CNL12 y CNS1

De acuerdo al análisis mediante la técnica de PCR, los resultados obtenidos muestran que tres de los aislados del hongo (MT1, MT2, MT3), se corresponden con *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici raza3*.

CONCLUSIONES



- Los caracteres fenotípicos fueron suficientes para identificar taxonómicamente a *Fusarium oxysporum*.
- La secuencia nucleotídica de la región IGS, CNL12 y CNS1 del ADN nuclear permitió identificar mediante la prueba molecular PCR, la forma especial del hongo.
- Los los aislados MT1, MT2 y MT3, se corresponden con *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici.raza3*
- Este es el primer reporte de la presencia de dicho patógeno asociado al cultivo de tomate en la Rep. Dominicana.

RECOMENDACIONES

- Continuar con la identificación de las especies razas del género *Fusarium* en el cultivo de tomate.
- Aumentar el número de aislados y extender el estudio a otras regiones del país.
- Establecer una metodología que permita realizar un diagnóstico diferencial entre las especies de *Fusarium*.



AGRADECIMIENTOS

- Equipo de Biología Molecular PV - CENTA.
- Grupo GemBio del CICY, México.
- CENTA - IDIAF



INSTITUTO
DOMINICANO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y
FORESTALES

GRACIAS

*Rosa María Méndez Bautista, M.Sc **

Juan.T. Camejo MSc. y Deisy Perez PhD.

*** Fitopatóloga - Investigadora CENTA-IDIAF**

rmendez@idiaf.gov.do

