

Nota técnica

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum* F. SP. *Apii* ASOCIADO A LA MARCHITEZ DEL APIO EN COSTA RICA

Kenneth Retana^{*}, José Adolfo Ramírez-Coché^{**}, Oscar Castro^{*}, Mónica Blanco-Meneses^{1/*}

Palabras clave: *Apium graveolens*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*; FOA; postulados de Koch; marcadores moleculares.

Keywords: *Apium graveolens*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*; FOA; Koch postulate; molecular markers.

Recibido: 14/06/17

Aceptado: 27/10/17

RESUMEN

Costa Rica produce apio en las provincias de Cartago, Heredia, Alajuela y San José. La producción aproximada es de 25 toneladas métricas anuales. Este cultivo se ve afectado por diferentes patógenos, sin embargo, en los últimos años *Fusarium oxysporum* ha causado serios problemas de marchitez en plantas a nivel productivo. En apio se conocen 4 razas patogénicas de *Fusarium*, definidas a partir de la tolerancia que presentan los cultivares de apio al patógeno. La raza 1 afecta solo el apio amarillo; la raza 2 afecta tanto el apio amarillo como el verde; la raza 3, la menos patogénica, es virulenta únicamente para el apio verde; y la raza 4, es la más agresiva que causa tanto pérdidas en apio verde como amarillo. En Costa Rica se ha descrito la presencia de *Fusarium oxysporum* en apio, pero no se han descrito las razas presentes. Para identificar y describir el patógeno, se aisló el hongo a partir de plantas enfermas provenientes de campo que presentaban los siguientes síntomas: retraso en la tasa de crecimiento, enanismo, amarillamiento,

ABSTRACT

Morphological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* associated to yellow wilt on celery in Costa Rica. Celery is cultivated in provinces of Costa Rica, such as Cartago, Heredia, Alajuela and San José. Total production is approximately 25 metric tons annually. This crop is affected by different pathogens but in the last few years *Fusarium oxysporum* has caused substantial damage at the plantation level. In celery, 4 pathogenic *Fusarium* races are known, they are defined using the tolerance of the celery cultivars to the pathogen. Race 1 affects only yellow celery; race 2 affects both yellow and green celery; race 3, the least pathogenic, is virulent only for green celery; and race 4, is the most aggressive causing losses in green as yellow celery. In Costa Rica only the presence of *Fusarium oxysporum* has been reported. To better identify and describe the pathogen, isolates were obtained from diseased plants that showed a variety of symptoms including: delayed plant

1 Autora para correspondencia. Correo electrónico: monica.blancomeneses@ucr.ac.cr

* Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos.

** Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigaciones Agronómicas.

marchitez en el follaje y reducción, oscurecimiento y daño en el sistema radical. Se realizaron los Postulados de Koch y la descripción morfológica del patógeno, para características tales como la cantidad y presencia o ausencia de macro y microconidios en medio de cultivo de clavel (CLA), además, la apariencia del micelio (color y pigmentación) en medio papa dextrosa agar (PDA). La caracterización molecular se realizó mediante la secuenciación de la región del factor de elongación uno alfa (EF1- α). El resultado tuvo una alta similitud con aislamientos encontrados en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) relacionados a *F. oxysporum* f. sp. *apii* y se sugiere la presencia de las razas 3 y/o 4 en Costa Rica.

growth, dwarfism, yellow and wilting foliage, as well as blackening and damaged root systems. Koch postulates and a morphological description of the pathogen was done based on different characteristics of spore quantity and the presence of macro and microconidia on carnation leaf agar (CLA), as well as colony appearance (color and pigmentations), which were observed on potato dextrose agar (PDA). Molecular characterization was performed by sequencing the elongation factor 1-alpha region (EF-1a). Results matched some isolates found at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) related to *F. oxysporum* f. sp. *apii* and our results further suggested that we are dealing with the presence of race 3 and/or 4 in Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

El apio (*Apium graveolens* L.) pertenece a la familia Apiaceae, es una planta dicotiledónea que se consume en fresco y posee un alto valor nutritivo con aportes de vitaminas A, B y C, y minerales; también posee propiedades diuréticas y depurativas (Guamán 2011). Su centro de origen está localizado en el Mediterráneo (Sendra *et al.* 2011), aunque también se reportan centros secundarios de origen como el Caúcaso y la zona del Himalaya. En Costa Rica se cultiva en zonas como Escazú y San Cristóbal (San José), Alfaro Ruiz (Alajuela), Paraíso, El Guarco y la zona Norte (Cartago). Para el 2001 el MAG (2012) reportó una producción de 24,5 toneladas métricas, sin embargo, no hay datos actualizados sobre la producción de este cultivo. Es una planta bianual que crece a temperaturas entre 16°C a 18°C, pero puede tolerar temperaturas extremas de 7°C hasta 24°C. Puede desarrollarse en suelos arcillosos, limo arcillosos y limosos, con buen drenaje y alta capacidad de retención hídrica (Daugovish *et al.* 2008).

El apio se ve afectado por patógenos tanto en campo como en su etapa poscosecha. Las principales enfermedades que pueden afectar el cultivo del apio en campo son el mildiu del apio (*Plasmopara nivea* Schr.), la mancha foliar o tizón temprano (*Cercospora apii* Fres.), septoriosis o tizón tardío (*Septoria apii* (Briosi et Car.) Chest., *Septoria apii graveolentis* (Dorg.)) y la esclerotiniosis o podredumbre suave acuosa del tallo (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary) (Guamán 2011). *S. sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani* son enfermedades del suelo que provocan daños leves cuando las condiciones son favorables. Además, existen reportes del fusarium amarillo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* también conocido como FOA) como enfermedad devastadora a nivel de suelo (Puhalla 1984). En el 2016 Lori *et al.* (2016) reportan a FOA como el agente causal de graves problemas en el cultivo de apio en Argentina. En cuanto a pérdidas poscosecha, estas pueden deberse a la pudrición blanda bacteriana (bacterial soft-rot), causada principalmente por *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae*, el moho gris (gray mold), debido a *Botrytis*

cinerea y la pudrición acuosa (watery rot) por *Sclerotinia sclerotiorum* (Casaca 2005, Cerdas y Montero 2004).

Fusarium es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica y que a la vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance (Michielse y Rep 2009). Los principales mecanismos de dispersión del patógeno son los movimientos de suelo infectado, el agua de escorrentía y el uso de almácigo infectado. Este hongo tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo (Lacy *et al.* 1996, Daugovish *et al.* 2008). *Fusarium oxysporum* es un organismo muy amplio a nivel de especie, se han clasificado más de 120 diferentes formas especiales (*formae specialis*). Este término está basado en la infección que produce el patógeno en un hospedante específico. Las formas especiales a su vez se subdividen en razas, las cuales han sido descritas al basarse en la habilidad del patógeno de infectar diferentes haplotipos o variedades en una especie hospedante (Pires da Silva *et al.* 2014).

En apio se conocen 4 razas de FOA y ninguna ha sido descrita como no patogénica. La raza 1 corresponde al patógeno que únicamente afecta al apio amarillo, dentro de los que el “Golden Boy” es uno de los más conocidos. En 1952, se introdujo al mercado un cultivar de apio con alta resistencia al ataque de *F. oxysporum*, denominado como apio verde “Tall Utah 5270”. Con esto se redujo las poblaciones del patógeno, sin embargo, este reapareció en la década de los 70’s lo cual afectó cultivares tanto verdes como amarillos en fincas ubicadas en Estados Unidos y fue identificado como *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* raza 2 (Elmer y Lacy 1987). Esta raza es la más conocida actualmente en U.S.A. y dio cabida al desarrollo del apio Challenger y algunas otras variedades tolerantes. La raza 3 es virulenta únicamente para el apio verde, pero su aparición es menos frecuente y, aunque fue reportada en 1984 en California, se cree que actualmente no

representa riesgo alguno (Puhalla 1984). Por otra parte, la raza 4 fue descrita en el 2015 en California y es reportada como la más agresiva de todas, pues infecta apio tanto verde (todos los cultivares) como amarillo (Epstein *et al.* 2017). En Costa Rica la única descripción que existe sobre este patógeno la hizo el Ministerio de Agricultura y Ganadería en el 2009 e hizo referencia a una búsqueda bibliográfica, por lo que el estudio propiamente en campo no se había realizado.

Cuando el apio se ve afectado por FOA se presentan síntomas en la planta como retraso en el crecimiento, el follaje se torna amarillento y quebradizo, coloraciones naranja-marrón en el tejido vascular de la raíz y en algunos casos se presentan manchas en los peciolo y la corona; en estados avanzados de la enfermedad se da una pudrición blanda de la corona (Elmer y Lacy 1987, Lori *et al.* 2008, Riveros *et al.* 2001, Unda *et al.* 2010).

La identificación de *Fusarium* basada en caracteres morfológicos y moleculares, y el respaldo con el uso de postulados de Koch, son metodologías que llevan a la identificación de agentes causales de enfermedades en plantas de forma más rápida, precisa, objetiva y aplicable.

El objetivo de este estudio fue realizar la caracterización morfológica del patógeno *Fusarium oxysporum* aislado del cultivo de apio, llevar a cabo los postulados de Koch y por medio de la información molecular, identificar la raza o razas que se encuentran presentes en Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal, caracterización de síntomas y aislamiento del agente causal

Se recolectaron 3 muestras de plantas enfermas de apio verde (*Apium graveolens*) variedad Utah-5270 con síntomas visibles como marchitamiento y daño en la base del tallo, provenientes de una finca localizada en El Guarco de Cartago (09°43’57” latitud norte y 83°54’51” longitud oeste). El nivel de infección y daño en la finca alcanzaba más del 80% del área total con

una distribución generalizada, en el área restante se pudo observar la presencia de unos parches escasos aparentemente sanos.

Se seleccionaron plantas sintomáticas con 3 edades distintas de crecimiento: 2 semanas después del trasplante, en desarrollo y plantas en cosecha. El material recolectado fue llevado al Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

Se procedió a describir los síntomas con base en las características visuales que presentaba cada planta, esto con ayuda de un estereoscopio, marca Motic SMZ-168 (Hong Kong, China).

Para el aislamiento, los medios de cultivo utilizados fueron: agar-papa-dextrosa al 1,5% (PDA) y V8 (Atlas 2010). El aislamiento del agente causal se realizó al seguir la metodología descrita por French y Hebert (1980) para hongos y bacterias. La desinfección del tallo se llevó a cabo con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1% durante 50 y 20 segundos, respectivamente. Para cada planta se seleccionó un área con síntomas visibles, se rasgó el tejido de manera longitudinal y se extrajo segmentos de la zona de avance provenientes de la parte interna (parte enferma y parte sana). Estos fragmentos se colocaron en los medios de cultivo, se realizaron 3 repeticiones de cada uno y se incubaron en una cámara a temperatura de 25°C y en oscuridad por un periodo de 7 días.

Caracterización morfológica

Los medios de cultivo agar-papa-dextrosa al 1,5% (PDA) y agar-hojas de clavel (CLA por sus siglas en inglés, Carnation Leaf Agar) (Leslie y Summerell 2006) se utilizaron para la caracterización morfológica de los aislamientos. Se colocó un trozo pequeño de micelio de aproximadamente 5 mm² en cada plato con medio de cultivo, proveniente de un aislamiento monospórico de FOA. Los platos se colocaron en una cámara de incubación marca Thermo Scientific a una temperatura de 22°C, por un periodo de 8 días. Posteriormente, se procedió a identificar los caracteres morfológicos como el tamaño y forma de macroconidios; tamaño, presencia o ausencia de microconidios;

formación de clamidosporas y las estructuras de los conidióforos (Riveros *et al.* 2001, Unda *et al.* 2010) con la ayuda de un microscopio marca Olympus modelo BX41BF (Tokio, Japón).

Verificación de los postulados de Koch

Para determinar la capacidad de infección del hongo aislado a partir de material de campo, se llevó a cabo la inoculación del patógeno en plántulas sanas de apio a partir de varios cultivos axénicos (puros). Se implementaron 2 métodos de inoculación con heridas y sin heridas y se mantuvo un testigo absoluto sin heridas y sin inóculo. Se usaron 5 repeticiones para cada método.

Para la inoculación se utilizaron macetas de 350 cc. con suelo estéril, donde se colocaron 4 discos provenientes del medio de cultivo PDA con micelio del hongo, a 3 niveles distintos de profundidad. El suelo inoculado se mantuvo húmedo con un riego diario por 3 días.

Después de este periodo, se procedió a hacer la siembra de plántulas de apio de aproximadamente 35 días en las macetas con el suelo infectado. Para la metodología denominada “con heridas”, a cada plántula que se extrajo de la bandeja inicial de almácigo se le desmoronó un poco el adobe, con el fin de causar algunas heridas en la raíz de la misma. Para la metodología denominada “sin heridas” y para el testigo, se llevó a cabo la siembra directa del almácigo en macetas con suelo infectado y suelo estéril, respectivamente.

Las plantas se evaluaron a los 15 días después de la inoculación (ddi); a los 25 ddi, momento en el cual se sometió a un estrés hídrico a todas las plantas por un periodo de 24 horas; a los 35 ddi y a los 50 ddi hasta la evaluación final.

Los postulados de Koch se verificaron mediante el reaislamiento del hongo a partir del tallo, se siguió el protocolo descrito por French y Hebert (1980). Se utilizaron los medios de cultivo antes mencionados. La identificación del organismo obtenido se realizó mediante la evaluación de las características morfológicas y mediante la observación de las estructuras reproductivas en

el microscopio de luz, marca Olympus modelo BX41BF (Tokio, Japón) con un lente de aumento de 40X y por secuenciación del ADN proveniente del nuevo aislamiento.

Caracterización molecular

La caracterización molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fitoprotección, CIPROC de la Universidad de Costa Rica. Para la extracción de ADN se utilizó el método CTAB con algunas modificaciones (Murray y Thompson 1985). Se trabajó a partir de un pequeña cantidad de micelio de los aislamientos puros y monospóricos de *Fusarium oxysporum*. Se agregó 150 μ l de Buffer de extracción (Sorbitol 2M, Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M y Sodium bisulfite 2M) previo a macerar el tejido y, posteriormente, se agregó 150 μ l de Buffer de lisis (NaCl 5M, Tris HCl 1M, EDTA 0,5M y CTAB 2%). Se aplicó calor (65°C) durante 40 min y se purificó por medio de lavados con chloroformo-isoamyl alcohol (24:1). Se precipitó con acetato de sodio 3M y etanol al 95% frío, y lavados con etanol al 70%. El ADN puro se disolvió en buffer TE (Tris-Cl pH 7.5 y EDTA pH 8) y se guardó a -20°C.

La amplificación del ADN se realizó con el marcador molecular para el factor de elongación 1 α , el cual es utilizado para diferenciar especies de *Fusarium* spp.; con los cebadores EF1 [5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'] y EF2 [5'- GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'] (Nitschke *et al.* 2009). Estos amplifican un fragmento de 650 pares de bases. Para realizar la PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) se utilizó una mezcla de reacción de 25 μ l (16,25 μ l de agua nanopura estéril; 2,5 μ l de Buffer 10X; 2,5 μ l de dNTP's 2mM; 2,5 μ l de cada cebador 10 μ M; 0,25 μ l de Dream Taq 5u/ μ l y 1 μ l de ADN a una concentración de 10 ng/ μ l⁻¹). Las condiciones del perfil térmico fueron, predesnaturalización a 96°C durante 2 min, posteriormente, 35 ciclos de desnaturalización a 96°C por 1 min, anillamiento a 50°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, y finalmente, una

extensión de 72°C por 10 min en un termociclador Master Cycler Pro, marca Eppendorf. Posterior a la amplificación, los productos de PCR se separaron mediante la electroforesis (Enduro™ Power Supplies, Labnet International, Inc. y NyxTechnik) en geles de agarosa al 0,8% a 90 V durante 25 min. Se visualizó en una cámara de fotodocumentación (Kodak Electrophoresis documentation and Analysis System, Fisher Scientific).

Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima Exonucleasa I (Exo I, Fermentas), utilizando 15 μ l de producto de PCR, 1,5 μ l de Exo I y 3 μ l de FastAP Buffer. Se incubó a 37°C por 15 min y a 85°C por 15 min en el termociclador. Los productos de la PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc., en Seoul, Corea del Sur. Las secuencias bidireccionales se alinearon con el programa BioEdit (Hall 1999). Se realizó un BLAST para determinar la especie de *Fusarium* presente en la página web del National Center of Biotechnology Information (NCBI) y Fusarium ID (Geiser *et al.* 2004). Para comparar la similitud del aislamiento proveniente de Cartago, Costa Rica se realizó un análisis filogenético con el Programa Mega 6.06 (Tamura *et al.* 2013) y se utilizó accesiones provenientes del NCBI. Se usaron las accesiones FJ985267 de FOA (O'Donnell *et al.* 2009), KX619206 y KX619204 de FOA raza 1, KX619157 y KX619169 de FOA raza 2, FJ985371 de FOA raza 3 y KX619220 y KX619224 de FOA raza 4 (Epstein *et al.* 2017); además, como grupo externo se utilizó la accesión GU170560 de *Fusarium foetens* (Migheli *et al.* 2010). Las secuencias fueron analizadas con los programas Neighbor Joining, Maximum Likelihood, Maximum Parsimony y UPGMA del Mega 6.06.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de síntomas observados a nivel de campo

En la finca que se visitó en Cartago, se pudieron observar diversos síntomas a nivel de campo, entre estos, el retraso en la tasa de crecimiento y enanismo (Figura 1A); amarillamiento

y marchitez en el follaje, los cuales iniciaron en el follaje externo y luego en las hojas internas (Figura 1B). En la base del tallo de plantas cercanas a la cosecha, se observó un orificio necrosado que aumentó en tamaño con la edad de la planta, el cual podría ser colonizado por organismos secundarios del suelo, si la planta permanece en el suelo (Figura 1C); esto, además, podría ocasionar un daño mayor en el tallo. Asimismo, hubo reducción, oscurecimiento y daño en el sistema

radical (Figura 1C). Al realizar un corte longitudinal en las raíces, se observó un enrojecimiento de los conductos vasculares con coloraciones naranja-marrón (Figura 1D). La sintomatología descrita y observada en campo coincide con lo que mencionan Elmer y Lacy (1987) y Lori *et al.* (2008), quienes describieron que *Fusarium oxysporum* provoca estos síntomas en el apio variedad “dulce” (Tall Utah 5270), misma variedad que se cultiva en Costa Rica.



Fig. 1. Síntomas observados en campo y en laboratorio provenientes de plantas de apio colectadas en Cartago, Costa Rica. A y B. Síntomas externos en las plantas enfermas. C y D. Síntomas internos en las plantas enfermas.

Caracterización del patógeno asociado al daño

Caracterización morfológica

En cada uno de los aislamientos en medio sintético PDA, se observó el crecimiento de colonias de apariencia algodonosa y de color

blanquecino-rosado en los primeros estados de desarrollo (Figura 2A). Posteriormente, conforme el micelio se desarrolló, se tornó de un color levemente púrpura en el centro del mismo. Por el reverso del plato petri se observó un color morado oscuro hacia el centro y de un tono más claro hacia el borde externo (Figura 2B).

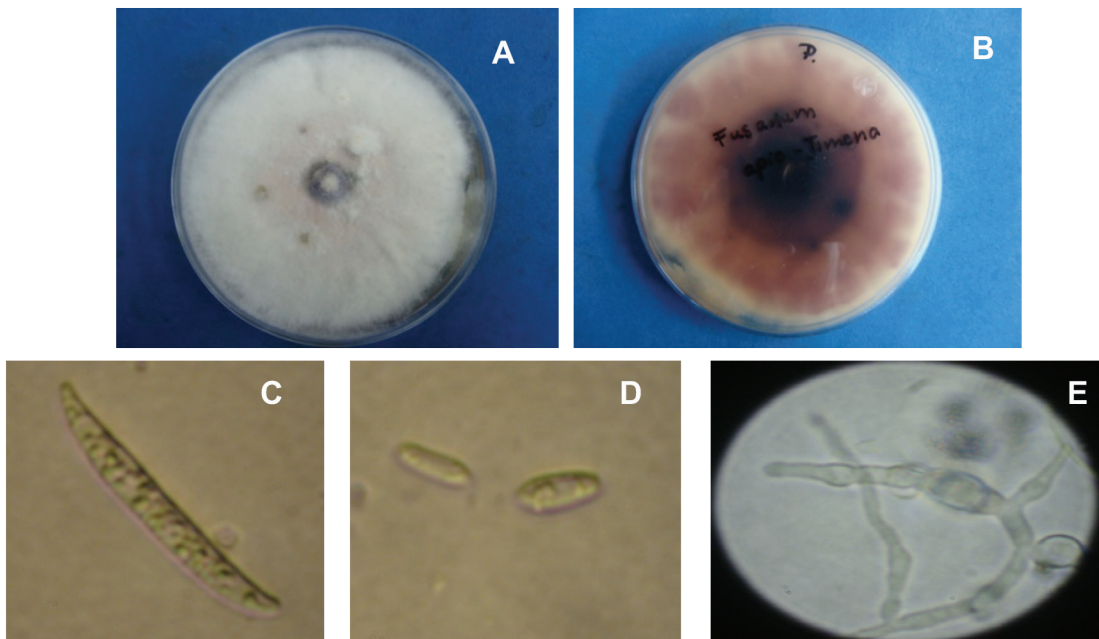


Fig. 2. Crecimiento de las colonias (A y B) y características morfológicas de los macro (C), microconidios (D) y clamidósporas (E) del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* aislados de plantas de apio.

En el medio de crecimiento CLA se dio una producción abundante de macro y microconidios. En el caso de los primeros, estos presentaron la forma típica de los macroconidios de *Fusarium*, aunque con algunas diferencias entre ellos, puesto que unos son un poco más cortos y otros menos curvos. En promedio cada uno tenía de 5 a 6 septos, con una célula apical redondeada (roma) y una célula basal levemente mellada (“barely notched”) (Figura 2C). En el caso de los microconidios se observó más comúnmente la forma oval, la mayoría sin septos y que se forman sobre monofilíides cortas (Figura 2D). En la Figura 2E se puede observar clamidosporas de tipo verrugosas en cadena, encontradas en el medio de clavel. Esto también fue observado por Correll *et al.* (1986) para la descripción de FOA.

Secuenciación a partir de marcadores específicos

A partir del ADN extraído de los aislamientos de FOA provenientes de plantas de apio,

se realizó la secuenciación para los fragmentos del factor de elongación 1α . Una única secuencia se introdujo en el NCBI bajo el número de acceso: KX672005, pues no existió variación en las secuencias provenientes de la finca de Cartago. Esta secuencia es un importante agregado a los datos que se encuentran en GenBank, pues constituye un marcador proveniente de un patógeno que puede ser caracterizado tanto por sus características morfológicas como moleculares y cuyo resultado fue verificado por postulados de Koch.

El fragmento correspondiente al EF- 1α se comparó con la secuencias reportadas por Epstein *et al.* (2017) y O’Donnell *et al.* (2009). En la colección de O’Donnell *et al.* (2009) se trabajó con 2 aislamientos provenientes de FOA, sin embargo, solo uno de ellos es catalogado como raza 3. Por otra parte, Epstein *et al.* (2017) logra encontrar mutaciones específicas que diferencian las razas de FOA en apio, de acuerdo con el análisis de 10 genes. Con la región del EF- 1α , se logran diferenciar las razas existentes.

En la Figura 3 se puede observar el análisis filogenético. A partir del árbol generado por el método Maximum Likelihood se muestra como el aislamiento proveniente de Cartago, Costa Rica se agrupa con las razas 1, 3 y 4. Como describe Puhalla (1984) y Epstein *et al.* (2017); FOA raza 1 es capaz de infectar únicamente el apio amarillo, en esta investigación el aislamiento fue realizado a partir de plantas de apio verde Tall Utah-5270, por lo tanto podría concluirse que la raza 1 no podría encontrarse en esta plantación por un aspecto de especificidad de las razas con respecto al hospedante. Por otra parte, la raza 3, infecta apio verde, sin embargo, se considera la menos agresiva y la mayoría de las variedades de

apio comercial son tolerantes a la misma, contrario a lo que se observó en Cartago, donde las plantas sufren la aparición de síntomas de forma rápida hasta que se marchitan completamente y mueren. Finalmente, la raza 4 solo se encuentra en California y es la más agresiva de todas las razas. Así pues, si en Costa Rica la presencia de la raza 4 se confirma, se deberían tomar serias medidas de combate para evitar altas pérdidas en este cultivo. Por otro lado, los aislamientos de la raza 2, para el EF1a se agrupan de forma separada con el resto de las accesiones. Esta es la raza más común identificada en EE.UU. (Awuah *et al.* 1986, Epstein *et al.* 2017), sin embargo, existen actualmente muchas variedades tolerantes a la misma.

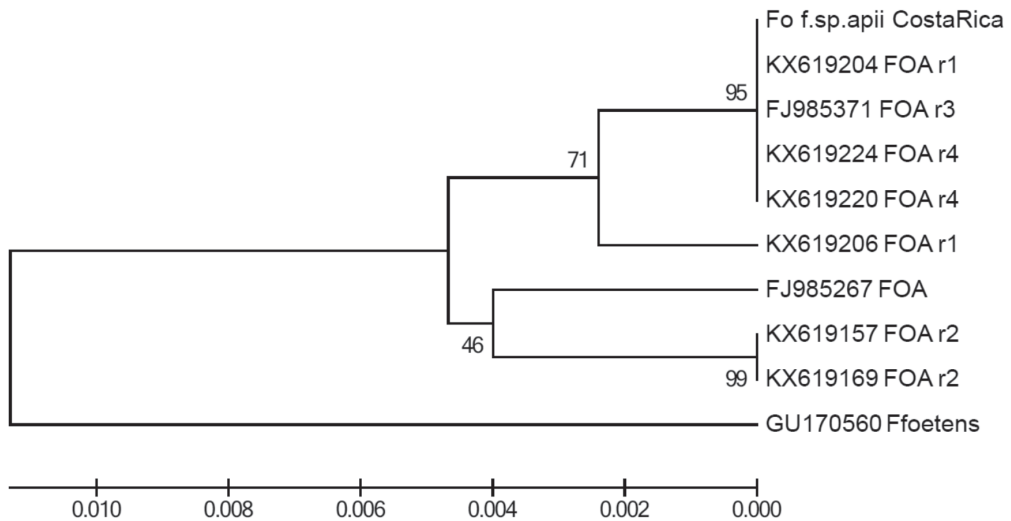


Fig. 3. Análisis filogenético utilizando Mega 6.06 con idénticos resultados para Maximum likelihood, Minimum parsimony, UPGMA, Neighbor Joining y Minimum evolution; con 1500 repeticiones para el bootstrap. Se comparó el aislamiento obtenido en Cartago, Costa Rica con aislamientos provenientes de USA de las diferentes razas reportadas para el patosistema apio/ Fusarium. De grupo externo se utilizó *Fusarium foetens*.

Resultados obtenidos con la verificación de los postulados de Koch

En todas las inoculaciones realizadas a partir del aislamiento de FOA se obtuvo un 100% de infección tanto en la metodología denominada “con heridas” como en la denominada “sin

heridas”. En el caso del testigo, no se observó ningún daño en las plantas.

En las evaluaciones realizadas durante los primeros 15 días no se observó síntomas de infección en ninguna de las metodologías y al compararlas con el testigo, se observó poco crecimiento de las plantas inoculadas (Figuras 4A,

4B, 5A y 5B). Al someter las plantas a un estrés hídrico, a los 30 días se pudo observar senescencia y marchitez en el follaje en las plantas tratadas bajo ambas metodologías (Figuras 4C y 5C). A los 35 ddi, se presentó mayor senescencia en las plantas inoculadas e inclusive se dio la muerte de las mismas (Figura 4D y 5D).

El periodo de incubación obtenido fue menor al que reporta Lori *et al.* 2008, quienes indican que la manifestación de los síntomas se observó a los 50 días después del trasplante. En este ensayo de inoculación dirigida no se observó la pudrición en la corona, que es un síntoma común en plantas en campo.

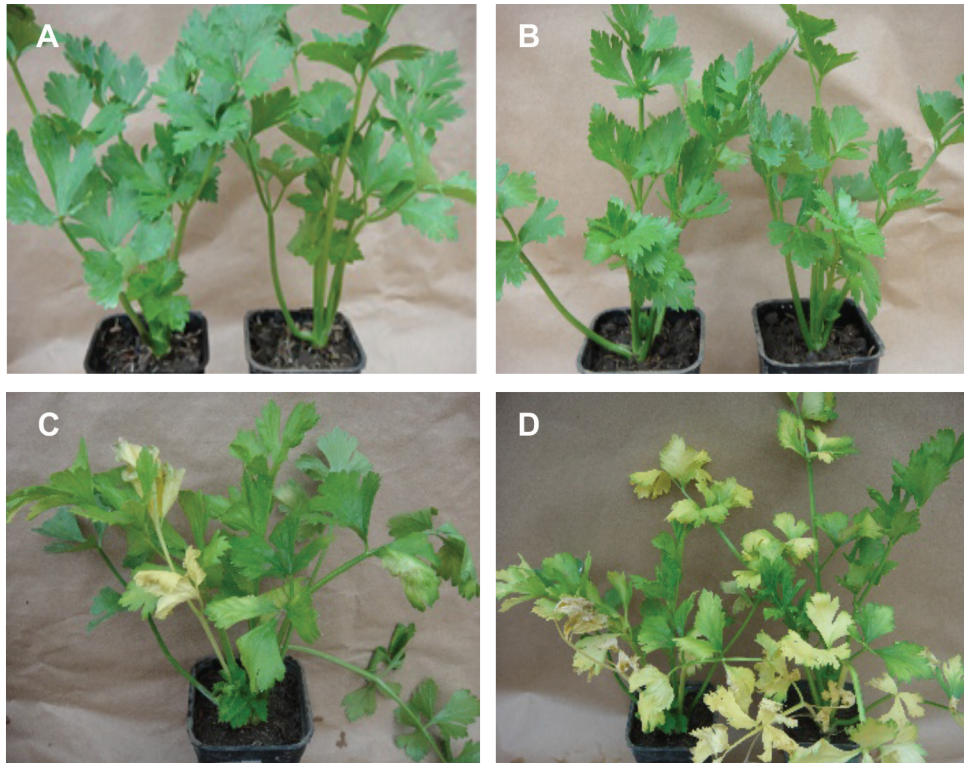


Fig. 4. Severidad de los daños provocados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* en plántulas de apio con heridas en el sistema radical. A. 8 días. B. 15 días. C. 30 días. D. 35 días, después de la inoculación.



Fig. 5. Severidad de los daños provocados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* en plántulas de apio sin heridas en el sistema radical. A. 8 días. B. 15 días. C. 30 días. D. 35 días, después de la inoculación.

Con base en estos resultados, se observa cómo la infección del patógeno se puede favorecer por la presencia de heridas o aberturas naturales en el sistema radical, sin embargo, de acuerdo con los resultados se puede rescatar que el patógeno presenta mecanismos para invadir el tejido por sí solo y sin ayuda de heridas. La inducción de estrés hídrico durante el desarrollo de los tratamientos indica que el desarrollo del hongo en los tejidos se favorece si existe una condición de estrés en la planta. Lo anterior coincide con lo mencionado por Hausbeck (2011), quien indica que la incidencia y severidad de la enfermedad provocada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* varía con el nivel de estrés que se presenta en las plantas tanto en campo como en invernadero. Se debe tener en cuenta que estos resultados son preliminares, ya que no se contó con un diseño

experimental que permitiera encontrar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, puesto que el objetivo principal era la verificación de los postulados de Koch.

Se necesita realizar una investigación más amplia en diferentes plantaciones de apio que se ven afectadas por FOA en Costa Rica. De esta forma, será posible verificar si la raza 4 o la raza 1 están establecidas en estas poblaciones y son las responsables de los daños reportados en los últimos años. Otro punto importante será determinar qué tan virulentas son las razas al compararlas con razas de FOA de otras latitudes. Esta información se considera de suma importancia, puesto que las empresas de semilla del país importan actualmente material reportado como tolerante, pero hasta el momento se desconoce la respuesta que estas van a presentar con el FOA de

Costa Rica. Se debe determinar la acción de los fungicidas que son utilizados en este momento contra FOA y las razas presentes en el país.

Finalmente el ensayo permitió generar un diagnóstico inicial sobre el problema que representa *F. oxysporum* f. sp. *apii* en el cultivo de apio en Cartago, Costa Rica, lo que incluye un resultado preliminar sobre la raza que sería posible encontrar en el país. A partir del aislamiento del patógeno se logró realizar la identificación y caracterización morfológica y molecular, además de verificar la presencia del agente causal mediante los postulados de Koch.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento al productor de la zona de Cartago, por facilitar la toma de las muestras de plantas de apio sintomáticas para los análisis morfológicos y moleculares. A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por facilitar esta investigación como parte del proyecto 813-B1-006.

LITERATURA CITADA

- Atlas, M. 2010. Handbook of microbiological media. Cuarta Edición. USA. ASM Press-CRC Press. 2036 p.
- Awuah, RT; Lorbeer, JW; Ellerbrock, LA. 1986. Occurrence of *Fusarium* yellows of celery caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* race 2 in New York and its control. *Plant Disease* 70:1154-1158.
- Casaca, AD. 2005. Guías Tecnológicas de Frutas y Verduras, PROMOSTA. Secretaría de Agricultura y Ganadería, Honduras. 11 p.
- Cerdas, MM; Montero, ME. 2004. Guía técnica del manejo poscosecha de apio y lechuga para el mercado fresco. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica (en línea). Consultado 20 jun. 2017. Disponible en http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_apio_lechuga_I.pdf
- Correll, JC; Puhalla, JE; Schneider, RW. 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. *Phytopathology* 76:396-400.
- Daugovish, O; Smith, R; Cahn, M; Koike, S; Smith, H; Aguiar, J; Quiros, C; Cantwell, M; Takele, E. 2008. Celery production in California. The Regents Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. Publication 7220:4 p. (en línea). Consultado 20 jul. 2017. Disponible en <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/7220.pdf>
- Elmer, WH; Lacy, ML. 1987. Effects of crop residues and colonization of plant tissues on propagule survival and soil populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* race 2. *Phytopathology* 77:381-387.
- Epstein, L; Kaur, S; Chang, P; Carrasquilla-Garcia, N; Lyu, G; Cook, D; Subbarao, K; O'Donnell, K. 2017. Races of the celery pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* are polyphyletic. *Phytopathology* 107:463-473.
- French, ER; Hebert, TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica. Editorial IICA. 289 p.
- Geiser, DM; Jimenez-Gasco, MM; Kang, S; Makalowska, I; Veeraraghavan, N; Ward, TJ; Zhang, N; Kulda, GA; O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110:473-479.
- Guaman, JM. 2011. Evaluación agronómica del cultivo del apio (*Apium graveolens* L.) a la aplicación foliar de tres bioestimulantes en tres dosis, en Tumbaco provincia Pichincha. Universidad Estatal de Bolívar. Tesis Lic. 141 pp. (en línea). Consultado 20 jun. 2017. Disponible en <http://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/997/1/038.pdf>
- Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 41:95-98.
- Hausbeck, M. 2011. Pest management in the future: A Strategic Plan for the Michigan Celery Industry. Department of Plant Pathology, Michigan State University. 73 p.
- Lacy, ML; Berger, RD; Gilbertson, RL; Little, EL. 1996. Current challenges in controlling diseases of celery. *Plant Disease* 80:1084-1091.
- Leslie, J; Summerell, BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa, U.S.A. Blackwell Publishing. 388 p.
- Lori, GA; Malbran, I; Mourellos, CA; Wolcan, SM. 2016. First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Apii* Race 2 Causing *Fusarium* Yellows on Celery in Argentina. *Plant Disease* 100(5):1020.
- Lori, GA; Wolcan, SM; Larran, S. 2008. *Fusarium* yellows of celery caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* in Argentina. *Journal of Plant Pathology* 90(2):173-178.
- MAG. 2009. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica, 2009 (en línea). Consultado 20 jun. 2017. Disponible en https://www.sfe.go.cr/LabDiagnostico/Lista_de%20enfermedades_de_los_cultivos_de_CR.pdf
- MAG. 2012. Guía técnica del manejo poscosecha de apio y lechuga para al mercado fresco (en línea). Consultado 20 jun. 2017. Disponible en http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_apio_lechuga_I.pdf

- Michielse, C; Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology 10(3):311-324.
- Migheli, Q; Balmas, V; Harak, H; Sanna, S; Scherm, B; Aoki, T; O'Donnell, K. 2010. Molecular Phylogenetic Diversity of Dermatologic and Other Human Pathogenic Fusarial Isolates from Hospitals in Northern and Central Italy. Journal of Clinical Microbiology 48(4):1076-1084.
- Murray, M; Thompson W. 1985. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8(19):4321-4325.
- Nitschke, E; Nihlgard, M; Varrelmann, M. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, applying restriction fragment analysis of polymerase chain reaction-amplified translation elongation factor 1 α gene fragment. Phytopathology 99:921-929.
- O'Donnell, K; Gueidan, C; Sink, S; Johnston, R; 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; Bithell, S; Sutton, D; Skovgaard, K; Ploetz, R; Kistler, H; Elliott, M; Davis, M; Sarver B. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genetics and Biology 46:936-948.
- Pires da Silva, F; Vechiato, M; Harakava, R. 2014. EF-1 α gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. Tropical Plant Pathology 39(1):064-073.
- Puhalla, J. 1984. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* in California and their genetic interrelationships. Can. J. Bot. 62:546-550.
- Riveros, B; Muñoz, G; Gonzalez, L; Rojas, L; Alvarez, M; Hinrichsen R. 2001. Comparación entre análisis morfológicos y de ADN para la identificación de especies de *Fusarium* aislados de melón (*Cucumis melo* L.). Agricultura Técnica 61(3):281-293.
- Sendra, N; Tonelli, B; Ali, S. 2011. El cultivo del apio. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. Argentina. 14 p.
- Tamura, K; Stecher, G; Peterson, D; Filipski, A; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729.
- Unda, F; Agüero, J; Fariñas, M; Martínez-Martínez, L. 2010. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 29(4):282-285.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr