



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Identificación de *Fusarium oxysporum* causando la amarillez y declinación del poroto
(*Phaseolus vulgaris*) en la Región del Maule**

MEMORIA DE TITULO

CAMILA FERNANDA ACEVEDO GONZALEZ

TALCA-CHILE

2021

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

Aprobación: 4,3



Gonzalo Díaz Ulloa

Profesor Guía: Gonzalo Díaz Ulloa

Ing. Agr. Mg. Cs. Dr.

Profesor Asociado

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias



Mauricio Lolas Caneo

Profesor informante: Mauricio Lolas Caneo

Ing. Agr. MS. PhD.

Profesor Asociado

Escuela de Agronomía

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca

Fecha de presentación de Memoria de Título de 21 septiembre de 2021

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, agradecer a mi profesor guía, Sr. Gonzalo Díaz, por la oportunidad de trabajar junto a él, la paciencia y los conocimientos y apoyo brindado en este periodo, permitiéndome desarrollar la investigación a pesar de las adversidades que se presentaron. Continuando reconocer a Paulina González, por la disposición entregada en el trabajo de laboratorio. Agradecer también a todo el equipo del laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad por su empatía y simpatía.

Continuando, reconozco profundamente el apoyo de mi madre, que sin ella esto no podría estar culminando, agradecer las veces que siempre estuvo ahí para entregarme su palabra de aliento, sumar también a mis hermanas que indirectamente estuvieron y están junto a mí.

Finalmente destaco y agradezco a las personas que la Universidad me entrego como amigas, donde logramos forjar amistad verdadera, llena de apoyo y complicidad, permitiendo hacer de la estadía universitaria un gran agrado.

RESUMEN

El poroto común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa de grano cultivada en todo el mundo, para el uso alimenticio tanto para humanos como para el ganado. En Chile, el cultivo del poroto se concentra en la zona centro del país, alcanzando hasta 3.893 ha de las cuales 1.069 ha se ubican en la región del Maule. Recientemente agricultores de la zona de Curepto y Hualañé, reportaron que sus cultivos de poroto presentaron inicialmente una amarillez y senescencia temprana después de 50 días de la siembra hasta presentar síntomas de marchitez y muerte de las plantas, causado posiblemente por un hongo del suelo. El objetivo de este trabajo fue realizar la identificación molecular y morfológica de los aislados de *Fusarium* sp., determinar el efecto de la temperatura *in vitro* y realizar pruebas de patogenicidad. Para ello, se obtuvieron tres aislados de *Fusarium* sp, que previamente fueron aislados desde plantas sintomáticas. Los resultados de la identificación molecular de las secuencias de ADN con los genes beta tubulina (BT) y factor de elongación 1- α (TEF) y las colonias vináceas con producción de micro y macrocondios, permitieron identificar a *Fusarium oxysporum*. Los aislados presentaron un crecimiento micelial entre los 10 y 35 °C, siendo la óptima los 30°C. La prueba de patogenicidad, mostraron que las plantas después de los 40 días de inoculadas con los tres aislados de *F. oxysporum* reprodujeron los síntomas de clorosis y marchitamiento, junto con provocar lesiones necróticas en los tejidos vasculares. Este estudio confirma que *F. oxysporum* es el causante de la marchitez amarilla en los cultivos de poroto en las zonas de Curepto y Hualañé de la Región del Maule, Chile.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a grain legume cultivated throughout the world, for food use for both humans and livestock. In Chile, common bean cultivation is concentrated in the central area, reaching up to 3,893 ha, of which 1,069 ha are localized in the Maule region. Recently, farmers from the Curepto and Hualañé area reported that their common bean crops initially showed yellowing and early senescence 50 days after sowing and developed severe symptoms of wilting and death, possibly caused by a soil fungus. The objective of this work was to carry out the molecular and morphological identification of the isolates of *Fusarium* sp., determine the effect of temperature *in vitro* and perform pathogenicity tests. For this, three *Fusarium* sp. isolates were obtained, which were previously isolated from symptomatic plants. The results of the molecular identification of the DNA sequences with the beta tubulin (BT) and elongation factor 1- α (TEF) genes and cultural and morphological characteristics of vinaceous colonies with production of micro and macroconidia, allowed the identification of *Fusarium oxysporum*. The three isolates showed mycelial growth between 10 and 35°C, being 30°C the optimum temperature. The pathogenicity test showed that the plants after 40 days of inoculation with the three isolates of *F. oxysporum* reproduced the symptoms of chlorosis and wilting, causing necrotic lesions in the vascular tissues. This study confirms that *F. oxysporum* is the causal agent of Fusarium wilt in common bean in Curepto, Maule Region, Chile

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Hipótesis. 11	
1.2 Objetivo general.....	11
1.3 Objetivos específicos.	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Origen y distribución del poroto.....	12
2.2 Descripción de la planta.....	12
2.2.1 Variedades	14
2.3 Valor nutritivo	16
2.4 Enfermedades del poroto.	16
2.4.1 Marchitez o amarilleces del poroto causado por <i>Fusarium</i>	17
2.5 Identificación de las especies.....	19
2.5.1 Identificación morfológica	19
2.5.2 Identificación molecular.	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Ubicación del ensayo	21
3.2 Obtención de los aislados	21
3.3. Identificación molecular	21
3.4 Identificación morfológica	22
3.5 Curvas de temperatura.....	23
3.6 Pruebas de patogenicidad.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.3. Curvas de crecimiento micelial	26

4.4. Patogenicidad en plantas de poroto.....	27
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA.	33

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las leguminosas de grano, el poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) es la especie de mayor importancia para el consumo humano (Voysest, 2000). En la actualidad, la especie está ampliamente distribuida en zonas de los trópicos, sub-trópicos y regiones templadas (Faiguenbaum, 2003). En Chile, se encuentra adaptada desde el extremo norte, Arica (18°28 lat. Sur) hasta la provincia de Chiloé por el sur (42°29 lat. Sur) (Bascur y Tay, 2005). El área de producción comercial se encuentra en la zona centro y centro sur, con una superficie que ha variado entre 10.184 ha (ODEPA, 2011). Sin embargo, se encuentran siembras en pequeñas escalas, limitándose a la producción en la agricultura familiar campesina (AFC), centrando el cultivo en zonas de secano interior y costero, produciendo para mercados locales con rentabilidad variable (INIA, 2017).

A nivel nacional, la superficie agrícola plantada al año 2009/2010 corresponde a 7.189 hectáreas (ODEPA, 2020), distribuidas entre las regiones de Coquimbo y La Araucanía, pero como se mencionó recientemente, se encuentran siembras en pequeñas escalas y en huertos caseros a través de casi todo el país (ODEPA, 2007). El poroto es una planta anual perteneciente a la familia de las leguminosas, es una especie altamente polimórfica que presenta una gran variación en cuanto a hábito de crecimiento, color de la flor, tamaño, forma y color de sus vainas y semilla. Por esto existe un gran número de variedades sembradas en la zona centro sur, que se agrupan según su hábito de crecimiento, para consumo y según su comercialización. Dentro de estas clasificaciones encontramos las variedades más importantes según el uso, para grano seco (Burros argentinos y tórtola Diana), Porotos en tabla o consumo var. Apolo y Cristal Bayo, porotos para granados var. Coscorrón y Frutilla, incluyendo variedades de exportación var. Arroz y Negro Nagel (INIA, 1977).

Durante el cultivo anual del poroto comercial, la producción se expone a una diversidad de enfermedades que afectan a las plantas incluyendo raíces, tejido vascular, brotes, hojas, flores y vainas asociados a diversos agentes infecciosos como hongos, bacterias y virus entre otros (Schwartz et al., 2005).

Durante el ciclo de cultivo, el poroto normalmente es afectado por una o más enfermedades entre las cuales destacan: las que afectan al sistema radical producidas por hongos, parte aérea como los mosaicos causados por virus y las manchas o "halos" causados por bacterias, disminuyendo los rendimientos y la calidad de la cosecha del poroto (France, 1983).

En general los hongos son los patógenos más importantes que afectan al sistema radical del poroto, al ser parte de la flora del suelo, por lo cual es más fácil que se contamine la semilla recién sembrada. Los géneros más comunes son; *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina* entre otros (France, 1983; Schwartz et al., 2005; Latorre 2018).

El género *Fusarium* sp. se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, afectando a más de 80 cultivos de importancia comercial, el marchitamiento por *Fusarium*, causado por el hongo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, es uno de los principales patógenos que afectan su producción (Leitao et al., 2020). El marchitamiento o amarilleces del poroto causado por *Fusarium oxysporum* y las plantas afectadas, se caracterizan por desarrollar marchitez y amarillamiento de brotes y hojas (Hagedorn, 2005; Latorre, 2018). En la zona basal de la planta de poroto con amarilleces presentan severos daños del sistema radical y corona, provocando necrosis en las raíces principales y secundarias, provocando un crecimiento retardado de la planta y disminución en el crecimiento y desarrollo (Latorre, 2018).

Recientemente pequeños agricultores productores de porotos en la zona de Hualañé y Curepto en la Región del Maule, han reportado un incremento de la ocurrencia de plantas de porotos, en terrenos donde el cultivo de poroto es casi un monocultivo, que desarrollan una coloración amarilla de los brote y hojas, que posteriormente produce la marchitez completa de las plantas de porotos afectadas. Por lo tanto, a continuación, se plantea la hipótesis y objetivos del presente estudio:

1.1 Hipótesis.

La marchitez y amarillez de plantas de poroto es causada por un hongo del suelo, que pertenece al género *Fusarium*, atacando al sistema radical y sistema vascular de las plantas de poroto.

1.2 Objetivo general.

- Identificar y caracterizar a la especie de *Fusarium* sp. asociado a la marchitez y amarillez del poroto en la Región del Maule.

1.3 Objetivos específicos.

- Identificar morfológica y molecularmente aislados de *Fusarium* sp. asociados a la marchitez y amarillez del poroto
- Determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial de aislados de *Fusarium* sp. asociados a la marchitez y amarillez del poroto
- Determinar la patogenicidad de aislados de *Fusarium* sp. en plantas de poroto

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origen y distribución del poroto

El frejol o poroto como es conocido en Chile, de nombre científico *Phaseolus vulgaris* L. pertenece a la familia Fabaceae (=Leguminosa). Es una especie vegetal originario de América Central y Sudamérica (Cordillera de los Andes), siendo una de las tres más importantes leguminosas cultivadas para el consumo humano mundial (Schwartz et al., 2005). Los granos suelen ser comúnmente consumida en México, América Central y en la mayor parte de América del Sur.

En Chile el área de cultivo más importante del poroto abarca desde Coquimbo a Malleco. Sin embargo, se encuentran siembras en pequeñas escalas y en huertos caseros a través de casi todo el país. Los principales países productores son la India, Myanmar y Brasil ocupando un 45% de la producción total.

Chile ha sido un importador neto, en cifras que van desde las 2.000 toneladas en 2007 a 13.400 toneladas en 2013. El 2014 comenzó a descender la importación y según los expertos es posible que recuperemos la autosuficiencia, debido al alto precio alcanzado por el poroto tórtola, lo que genera un gran incentivo para cultivarlo (ODEPA, 2021).

2.2 Descripción de la planta

El poroto es una planta anual herbácea que presenta variaciones en cuanto a hábito de crecimiento, color de la flor, tamaño, forma y color de sus vainas y semillas. Su sistema radical está compuesto por una raíz pivotante de la cual nacen múltiples raíces secundarias las que se subdividen a su vez hasta llegar a los pelos radiculares absorbentes. Como todas las leguminosas, las raíces presentan nódulos bacterianos de forma esférica.

Sus tallos son herbáceos de altura variable, el tamaño de las plantas se encuentra determinado por la forma y posición del tallo. Si este termina en una inflorescencia terminal, se le llama hábito determinado y si termina en una guía, su hábito de crecimiento es indeterminado (Figura 2.1). Las variedades de hábito determinado son de menor tamaño y poseen un menor número de nudos que las de hábito indeterminado (Schwartz et al., 2005; Giaconi, 1988). Posee inflorescencias dispuestas en racimo terminales o axilares, el color de la flor va desde color morado a blanco, existiendo tonalidades intermedias entre estos colores (Figura 2.1).



Figura 2.1. Plantas de porotos mostrando brotes y hojas (estado trifoliadas) desarrolladas, junto con guías en inicios de floración en el campo. Fuente: G.A. Díaz

El fruto del poroto es una vaina alargada con dos suturas. La sección transversal de la vaina puede ser plana o redondeada. Existen de color verde, amarillo y blanco, también pueden presentar puntos o estrías de color rojo a morado. La semilla está constituida por un embrión cubierta por el episperma o testa (Giaconi, 1988; Schwartz et al., 2005). El endosperma es incipiente u los órganos de reserva lo constituyen las hojas primarias del embrión. Los cotiledones forman la parte voluminosa de la semilla, son los encargados de almacenar proteínas y carbohidratos (Figura 2.2). La testa presenta variedad de colores, entre ellos, blancos, amarillos, rosa, gris, café, purpura o negra.

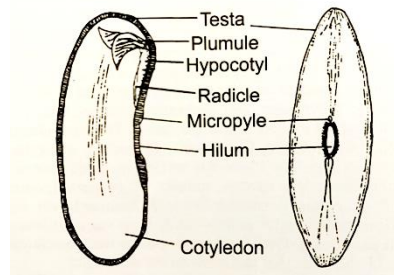


Figura 2.2. Morfología de semilla de poroto y sus estructuras. Fuente: Schwartz et al., 2005 (American Phytopathological Society Press)

2.2.1 Variedades

Según el hábito de crecimiento de las plantas de porotos puede ser clasificadas en cuatro categorías que se resumen y detallan en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Clasificación según hábito de crecimiento de plantas de poroto común y descripción. (Schwartz et al., 2005).

Hábito de crecimiento	Descripción
Tipo I	*Hábito determinado
	Yema terminal reproductiva
	Tallo y ramas erectos o postrados
	Guía terminal ausente o pequeña
	Vainas distribuidas a lo largo del tallo
Tipo II	*Hábito indeterminado
	Brote terminal vegetativo
	*Tallos y ramas erectos
	Guía terminal ausente o media
	Vainas distribuidas a lo largo del tallo
Tipo III	Hábito indeterminado
	Yema terminal vegetativa
	*Tallo y ramas postrados con poco o sin habilidad para escalar
	Guía terminal pequeña o larga
	*Vainas distribuidas principalmente en la porción basal
Tipo IV	Hábito indeterminado
	Yema terminal vegetativa
	Tallo y ramas entrelazadas con gran capacidad de escalada
	Guía terminal larga o muy larga
	*Vainas distribuidas a lo largo del tallo o principalmente en la parte superior

Las características clave de la clasificación del hábito de crecimiento están marcadas con un asterisco.

El poroto es una especie altamente polimórfica, gracias a esta condición existe un gran número de variedades de poroto clasificándose en tres grupos (Giaconi, 1988):

- Según su hábito de crecimiento: guiadoras, semi-guiadoras, arbustivas o enanas.
- Según su consumo, como poroto en: tabla o verde, granados o grano seco.
- Según su comercialización: para consumo interno o para exportación.

Dentro de las variedades de porotos cultivados en Chile existen variedades tradicionales y variedades creadas y mejoradas por el INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias), dentro de las variedades de mayor importancia tenemos poroto amarillo, poroto angelito, poroto apolo, poroto arroz, poroto tórtola o zorzal, Toloza y blanco español (Tay, 2020).



Figura 2.3. Cultivo de poroto variedad Zorzal de hábito de crecimiento tipo III (indeterminado).
Fuente: G.A. Díaz.

2.3 Valor nutritivo

El poroto posee el doble de proteínas que se encuentran en el trigo y tres veces las del arroz. Es rico en micronutrientes, aminoácidos y vitaminas del grupo B, elementos claves de una dieta saludable, son bajos en grasas, no contienen gluten y poseen una alta fibra soluble (Giaconi, 1988; Tay, 2020). Para muchos países de Latinoamérica son considerados como una de las fuentes más importantes de proteínas en la dieta, su contenido proteico fluctúa entre un 20% a un 25%, cerca de 60% de hidratos de carbono y además minerales tales como calcio, fósforo y hierro entre otros (SOCIEDAD QUÍMICA Y MINERA DE CHILE – SOQUIMICH, 1985).

2.4 Enfermedades del poroto.

Las enfermedades del poroto y como de otro cultivo, necesitan para su inicio y desarrollo, la interacción de los tres componentes como son: Hospedero susceptible, fitopatógeno virulento y condiciones medioambientales favorables, que forman el denominado triángulo de la enfermedad (Díaz y Lolás., 2016).

Diversas enfermedades son las que atacan al poroto, las cuales son manifestadas con el ataque de las partes vegetativas de la planta, como lo son hojas, tallos, vainas y semillas. Sin embargo, las enfermedades que registran mayor incidencia son las provocadas por hongos (micosis) y por esto el mayor impacto económico en las leguminosas disminuyendo los rendimientos o la calidad de la cosecha (Latorre,2008). La diversidad de enfermedades que afectan a las plantas (raíces, tejido vascular, brotes, hojas, flores y vainas) incluyen a diversos agentes fitopatógenos como hongos, bacterias y virus entre otros (Schwartz et al., 2005). Es más basados en el último compendio de enfermedades del poroto, se describen 73 enfermedades, siendo causadas 32 por hongos, seguido por 26 por virus, 6 por nemátodos, 5 por bacterias, y 4 fitoplasmas (Schwartz et al., 2005). Sin embargo, los fitopatógenos que causan mayores enfermedades y generan mayor impacto a los productores son los hongos (Schwartz et al., 2005; Latorre 2018).

Los hongos son considerados los patógenos más importantes que afectan al sistema radical del poroto, al ser parte de la flora del suelo, por lo cual es más fácil que se contamine la semilla recién sembrada. Los géneros más comunes son; *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina* entre otros (France, 1983; Schwartz et al., 2005; Latorre 2018).

2.4.1 Marchitez o amarilleces del poroto causado por *Fusarium*

El género *Fusarium* spp. se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, afectando a más de 80 cultivos de importancia comercial, destacando la especie *Fusarium oxysporum*. El marchitamiento por *Fusarium* es una importante enfermedad en porotos cultivados en E.E.U.U, Brasil, España y Grecia (Alves-Santos et al., 2002; Schwartz et al., 2005).

Un ejemplo de la importancia de *Fusarium* a nivel mundial, es la enfermedad de Panamá o marchitamiento por *Fusarium* del plátano, causado por la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que ha producido una devastación de plantaciones de plátano afectadas con la enfermedad en Asia, E.E.U.U., Centro y Sudamérica y Australia (Pegg et al., 2019).

Cabe destacar que, en *Fusarium*, así como en otras especies se utiliza el concepto *formae speciales* (f. sp.) (forma especial), termino asociado al rango de hospedero donde las especies de *Fusarium* puede atacar. Actualmente, en *F. oxysporum* se mantienen 53 *formae speciales* que poseen un único hospedero, de los 106 *formae speciales* descritos (Edel-Hermann y Lecomte, 2019). En el caso del poroto se denomina *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Edel-Hermann y Lecomte, 2019; Leitao et al., 2020).

El marchitamiento por *Fusarium* o amarilleces del poroto causado por *F. oxysporum* es una de las más importantes enfermedades que afecta al poroto a nivel mundial (Hagedorn, 2005). La sintomatología en plantas afectadas, incluyen una clorosis, marchitez general y amarillamiento de brotes y hojas (Hagedorn, 2005; Latorre, 2018). En la zona basal de las plantas de poroto con amarilleces presentan severos daños del sistema radical y corona, provocando necrosis en las raíces principales y secundarias, provocando un crecimiento retardado de la planta y disminución en el crecimiento y desarrollo (Latorre, 2018). Es común que la infección se desarrolle en los tejidos vasculares de las plantas (Figura 2.4) (Hagedorn, 2005; Batista et al., 2017).

La producción de la raíz por *Fusarium* es una de las enfermedades del poroto más prevalente en el mundo. La Enfermedad se presenta comúnmente en Brasil, Colombia, Perú, Ecuador, Chile, Venezuela, Costa Rica y México. La gravedad del daño de este patógeno al poroto depende de la aparición de otros factores como los estreses. Por lo general, este patógeno por sí solo causa un daño leve, particularmente si las plantas están creciendo vigorosamente. Las plantas infectadas rara vez mueren, pero si se debilitan y se observan atrofiadas (Abawi y Pastor, 1990).



Figura 2.4. Planta de poroto que muestra un menor desarrollo y presenta hojas cloróticas asociada al daño vascular (necrosis vascular) asociado a *Fusarium* sp. en Curepto, Región del Maule. Fuente G.A. Díaz

Según Beckman, la pudrición seca radicular o marchitez vascular es una enfermedad que afecta una gran variedad de cultivos de importancia económica en todo el mundo (Beckman, 1987). El hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas en ausencia de sus anfitriones, y si se encuentra cerca de una planta hospedera, la infección puede iniciar principalmente en las raíces, en partes aéreas de la planta, por encima del suelo o a través del aire o el agua (Ma et al., 2013).

El hongo *Fusarium oxysporum* ataca la raíz principal, la cual presenta una coloración o café rojizos, la enfermedad es notoria en plántulas o al estado de formación de vaina, se ve favorecida por altas temperaturas, sobre 25°C.

Una vez que el hongo coloniza las raíces obstruyen los tejidos conductores de agua, alcanzado el cuello de la planta, las raicillas o pelos radicales, se desintegran y en su reemplazo forman nuevas raicillas para ayudar en la obtención de agua y nutrientes.

Al tener una infección temprana, las plántulas se marchitan totalmente y al infectarse tardíamente el hongo es capaz de cesar el crecimiento, presentando hojas cloróticas causando la muerte de la planta. El hongo reduce el número y tamaño de los granos provocando una reducción en la producción del cultivo del poroto.

Fusarium oxysporum es capaz de sobrevivir en restos y/o desechos vegetales, por esto la importancia de realizar una correcta rotación de cultivo. La propagación de la enfermedad ocurre a través de esporas diseminadas por las herramientas de labranza, maquinaria agrícola o por el agua de riego. No existe control químico adecuado para combatir esta enfermedad, pero se recomienda para el mono cultivo del poroto, cumplir una óptima rotación de cultivos, sembrar en suelos con buen drenaje, evitando excesos de humedad.

En la actualidad, no se han llevado a cabo estudios que hayan determinado la incidencia de marchitez por *Fusarium* en plantaciones de porotos en zonas productivas en la Región del Maule (Figura 2.5).



Figura 2.5. Alta incidencia de marchitez por *Fusarium* en una plantación de poroto en zona de Curepto, Región del Maule, Chile.

2.5 Identificación de las especies.

2.5.1 Identificación morfológica

La identificación de las especies de *Fusarium*, se realiza inicialmente en base a sus características culturales y morfológicas que poseen las colonias en medios de cultivos. Para especies de *Fusarium* se deben considerar ciertos puntos clave como poseer medios de cultivos libres de factores externos que puedan alterar el reconocimiento. Esto se puede lograr mediante la utilización de medios para el aislamiento y transferir una porción de una sola hifa para establecer una colonia.

Para realizar un reconocimiento morfológico, se deben emplear al menos tres criterios morfológicos básicos, los cuales son morfológicos de las colonias en medios de cultivos estándar, características de esporangios y características de oosporas (Bush et al., 2006; Jeffers, 2006).

2.5.2 Identificación molecular.

La PCR ha permitido significativos avances en la detección e identificación de microorganismos logrando altos niveles de especificidad a través del diseño de repartidores de oligonucleótidos. La disponibilidad de estas nuevas herramientas dio lugar a numerosos estudios que tuvo como objetivo identificar y delinear diferentes especies de *Fusarium* (Crawford et al., 1996; Cooke et al., 2000; Kroon et al., 2004).

Otros desarrollos significativos que han facilitado el uso de información de secuencias de ADN son el desarrollo de algoritmos y software de bioinformática, especialmente para analizar y manipular grandes cantidades de datos de secuencias de ADN, un marco sólido fue erigido que permite a los investigadores analizar y comparar muchas secuencias de ADN diferentes para revelar relaciones evolutivas entre diferentes especies y permiten el diseño de cebadores específicos para PCR (Drenth et al., 2006). Recientes trabajos han propuesto la utilización de genes como beta tubulina, factor de elongación, rpb2 para lograr una identificación a nivel de especie lo más preciso en cuanto a las especies de *Fusarium* (Lombard et al., 2019).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del ensayo

El estudio se realizó en el Laboratorio de Patología Frutal, adjunto a la Facultad de Ciencias Agrarias, ubicado en el Campus Talca de la Universidad de Talca. Chile. El material vegetal se obtuvo de dos campos localizados en Curepto, Región del Maule, que presentaron una alta incidencia de plantas con amarilleces y marchitamiento (15 a 45% de incidencia).

3.2 Obtención de los aislados

Se utilizaron plantas enfermas de menor tamaño con notorios síntomas de clorosis, daños necróticos, amarillez y marchitez (Figura 2.5) se extrajeron trozos de muestra desde el cuello y raíces de las plantas de porotos, las muestras tomadas se aislaron en un medio de cultivo APD (2%) e incubadas por 7 días a 20 °C.

3.3. Identificación molecular

Para la identificación molecular de los 3 aislados (Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3) de *Fusarium* sp., se procedió a la extracción de ADN, tomando 50 mg de micelio desde cultivos de 7 días de edad en medio de cultivo APD (2%). El micelio cosechado se colocó en un mortero y se agregó nitrógeno líquido para facilitar la molienda física con un pistilo, donde se agregaron buffers y tiempos de incubación siguiendo el protocolo del kit de extracción Plant Genomic DNA Miniprep (SigmaAldrich, MO, USA). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Thermo Fisher Scientific, Veriti™ 96-Well, Singapore). Cada reacción contenía 6 µl de buffer; 2,4 µl de dNTP de 10mM, 12 µl de cada partidor, 24 µl de Mg⁺ de 25mM, 1,56 µl de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 164,4 µl de H₂O UL y 2 µl de ADN. El patrón de termo ciclado como de los partidores de los genes beta tubulina (BT) y factor de elongación 1-alfa (TEF) utilizados fueron siguiendo lo indicado previamente por Lombard et al. (2019). La integridad de la amplificación del producto de PCR se determinó mediante gel de agarosa al 2 % en Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X), teñido con RedGel (Biotium Inc., Hayward, Canadá) mediante una fuente de poder de accionada con la corriente eléctrica (60 v x 60 min). La visualización de la migración de los productos PCR obtenidos fue mediante un trans-iluminador con fuente de luz UV modelo (ECX-26.M de 312 nm, Alemania).

Los productos PCR obtenidos de los tres aislados de *Fusarium* sp. para los genes BT y TEF fueron enviados para ser purificados y secuenciados a Macrogen (Geumcheongu, Corea del Sur). Las secuencias fueron editadas usando el software ProSeq v.2.91 (Oxford University, UK, Oxford) y alineadas usando Clustal X 2.0 (Conway Institute, DU, Irlanda). Después de obtener las secuencias de consenso, se realizó una búsqueda en BLAST con secuencias del género *Fusarium* disponibles en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se consideró una identidad a nivel de especie entre un rango de 99 a 100% de similitud con las especies depositadas en la base de datos del GenBank.

3.4 Identificación morfológica

Para la identificación morfológica se utilizaron cultivos puros de los aislados previamente identificados como Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3 de 10 días de crecimiento en medio de cultivo APD (2%) bajo régimen de luz/oscuridad de 12/12h en placas de Petri de 88 mm de diámetro. Desde los cultivos de cada aislado se tomaron estructuras de micelio formado, se analizaron las muestras sobre un portaobjeto con agua estéril para facilitar la descripción y medición de las conidias bajo una lupa estereoscópica (5X). Se obtuvo alrededor de 40 conidias que fueron comparados con especies de *Fusarium* reportadas por Lombard et al. (2019) (Figura 3.1).



Figura 3.1. Cultivo de 10 días de incubación de *Fusarium* sp. aislado Be-8.1 en medio de cultivo APD (2%).

3.5 Curvas de temperatura

Cultivos puros de los aislados Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3 de *Fusarium* sp. de 7 días de crecimiento en medio APD (2%) se utilizaron para estudiar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial. Con este propósito, se tomó un trozo de agar de 5 mm de crecimiento activo de cada aislado y fue colocado al centro de una placa de Petri con medio APD fresco para ser incubados a temperaturas de 0°, 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35° y 40°C por 7 días. El largo y ancho de los crecimientos se midieron con un pie de metro electrónico.

3.6 Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad para los aislados Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3 de *Fusarium* sp. se realizaron en plantas de porotos sanas de las variedades Curi INIA y Torcaza que se mantuvieron bajo invernadero en condiciones de temperatura entre 18 y 28° con una humedad del 85% por al menos 90 días. Las plantas se cultivaron en macetas (turba, perlita y tierra). Se inocularon plantas de 30 días de edad con 200 µl de suspensión de conidios de 10⁶ conidios/ml sobre una herida superficial realizada en raíces de las plantas (cercanas al cuello). Las plantas controles fueron tratadas con agua destilada estéril.

4. RESULTADOS.

4.1. Identificación morfológica

Los cultivos puros produjeron un crecimiento micelial flocosa y abundante crecimiento aéreo y colonia inversa de color vinaceo a vinaceo oscuro (reverso). En los cultivos puros desde 10 a 14 días, se observaron estructuras reproductivas, Las microconidias fueron hialinas, unicelulares, ovales a elipsoides de 4,5 a 10,9 μm de longitud x 2,2 a 3,3 μm de ancho. Los macroconidias fueron hialinas, fusiforme, con células basales del pie en forma puntiaguda y apicales ahusadas, de 2 a 5 septas de 28,6 a 47,6 μm de longitud x 2,2 a 3,6 μm de ancho (Figura 4.1).



Figura 4.1. Colonia de *Fusarium oxysporum* aislado Be-8.1 obtenida en medio de cultivo APD (2%) después de 14 días de incubación a 20°C, donde se observaron microconidias (flechas negras) y macroconidias (flechas rojas).

4.2. Identificación molecular

La identificación molecular de *Fusarium* sp. se realizó exitosamente obteniendo ADN de los genes TEF y BT por PCR convencional siguiendo los patrones de Lombard et al. (2019). Las secuencias de los tres aislados Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3 obtuvieron un largo de 607 pb. El análisis NCBI BLAST mostró una similitud del 99 al 100% con secuencias TEF para la especie *Fusarium oxysporum* strain cepa CPC 25822 mediante Blast (Figura 4.2).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Be-11.3 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	Fusarium oxysporum	1095	1095	100%	0.0	100.00%	607	MW419127.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Be-8.1 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	Fusarium oxysporum	1095	1095	100%	0.0	100.00%	607	MW419126.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Curi-3.1 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	Fusarium oxysporum	1095	1095	100%	0.0	100.00%	607	MW419125.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain CPC 25822 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds	Fusarium oxysporum	1089	1089	100%	0.0	99.84%	616	MH485034.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum voucher VPRI 10408 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	Fusarium oxysporum	1089	1089	100%	0.0	99.84%	650	EU035597.1

Figura 4.2. Análisis y comparación de secuencias utilizando Blast del TEF (Herramienta de búsqueda de alineamiento básico de secuencias del National Center for Biotechnology Information; NCBI) que muestra las secuencias chilenas de *Fusarium* aislados Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3, obteniendo 99% identidad con *Fusarium oxysporum* strain CPC 25822.

En el caso del gen tub2, los aislados Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3 obtuvieron un largo de 544 pb y lograron una similitud del 100% con la especie *Fusarium oxysporum* strain CPC 25822 para el gen BT mediante Blast (Figura 4.3).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain CPC 25822 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	Fusarium oxysporum	982	982	100%	0.0	100.00%	552	MH485125.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Be-11.3 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	Fusarium oxysporum	982	982	100%	0.0	100.00%	544	MW419130.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Be-8.1 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	Fusarium oxysporum	982	982	100%	0.0	100.00%	544	MW419129.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Curi-3.1 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	Fusarium oxysporum	982	982	100%	0.0	100.00%	544	MW419128.1

Figura 4.3. Análisis y comparación de secuencias utilizando Blast del gen BT (Herramienta de búsqueda de alineamiento básico de secuencias del National Center for Biotechnology Information; NCBI) que muestra las secuencias chilenas de *Fusarium* aislados Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3, obteniendo 100% identidad con *Fusarium oxysporum* strain CPC 25822.

4.3. Curvas de crecimiento micelial

Los aislados de *F. oxysporum* mostraron un rango de crecimiento de temperatura entre los 5° y 35°C (Figura 4.4). La temperatura óptima obtenida para los tres aislados estudiados fue a los 30°C (Figura 4.4). Dos de los aislados, Be-8.1 y Curi-3.1, alcanzaron un crecimiento radial sobre los 80 mm de diámetro, Sin embargo, el aislado Be-11-3, presentó un menor crecimiento micelial entre las temperaturas óptimas. Ninguno de los aislados mostró crecimiento a los 7 días de incubación a 0, 5 y 40°C.

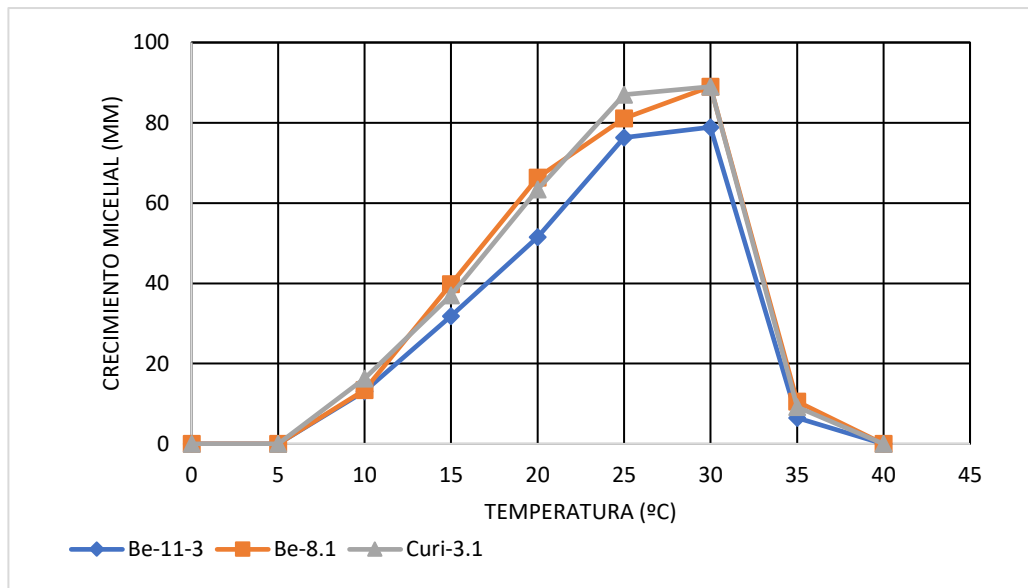


Figura 4.4. Curva del crecimiento micelial *in vitro* de los aislados Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3 de *Fusarium oxysporum* después de 7 días de incubación a diferentes temperaturas (0 a 40°C) en medio de cultivo APD (2%).

4.4. Patogenicidad en plantas de poroto

Las pruebas de patogenicidad para los aislados Curi-3.1, Be-8.1 y Be-11-3 realizadas en plantas sanas de porotos de las variedades Torcaza INIA y Curi INIA, se observaron y se midió la lesión necrótica formada por el punto de inoculación, a los 90 días (Figura 4.5). Las plantas después de 45 días inoculadas con cepas de *Fusarium oxysporum* mostraron lesiones vasculares necróticas, marchitamiento y clorosis, mientras que las plantas de control no presentaron síntomas y se mantuvieron sanas. La variedad Curi INIA presenta una menor susceptibilidad al ataque de los aislados de *F. oxysporum*, mostrando un rango de lesiones necróticas de 13,2 a 15,8 mm de longitud post inoculación, mientras que la variedad Torcaza INIA presenta una mayor susceptibilidad frente a todos los aislados generando una lesión necrótica de mayor tamaño, con rango de 21,3 a 43,2 mm (Figura 4.5). Se observa que el aislado Be-11 presenta un menor daño necrótico, pero aun esta sobre los 20 mm, siendo menos resistente que el cultivar Curi INIA. (Figura 4.5).

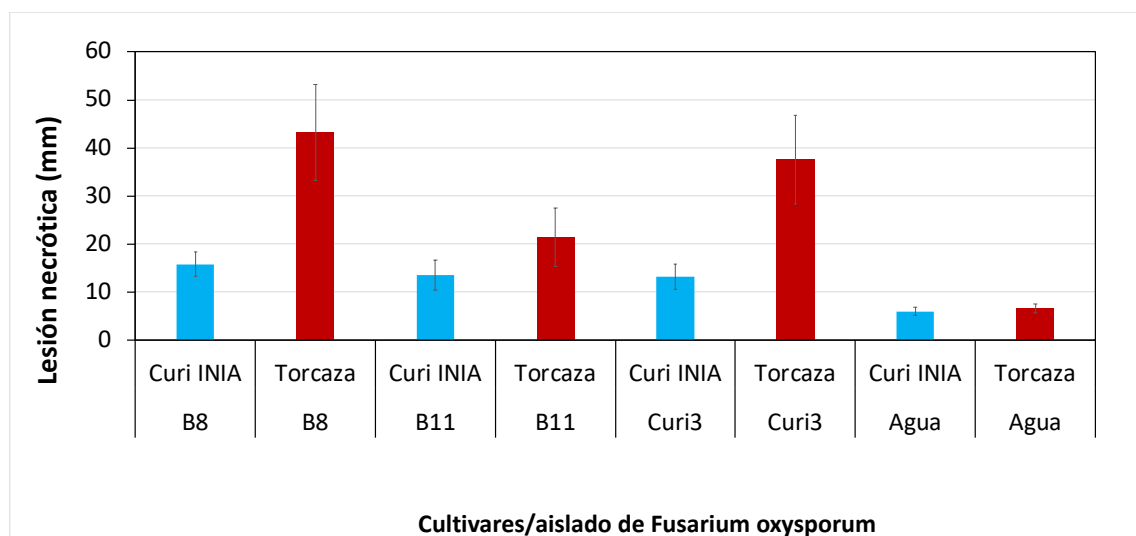


Figura 4.5. Prueba de patogenicidad en plantas de poroto cvs Curi-INIA y Torcaza-INIA inoculadas con los aislados FL-B8, FL-B11 y FL-Curi3 de *Fusarium oxysporum* después de 3 meses.

Se evaluó la sintomatología presentada por el cultivar Torcaza INIA a un tiempo de 30 días, mostrando síntomas de clorosis y amarillamiento de hojas en la parte basal, como en la parte aérea de las plantas inoculadas con los aislados de *F. oxysporum* (Figura 4.6). Los tres aislados presentan daños en el sistema radical, y cuellos de la planta, observado necrosis de tejido en las raíces.

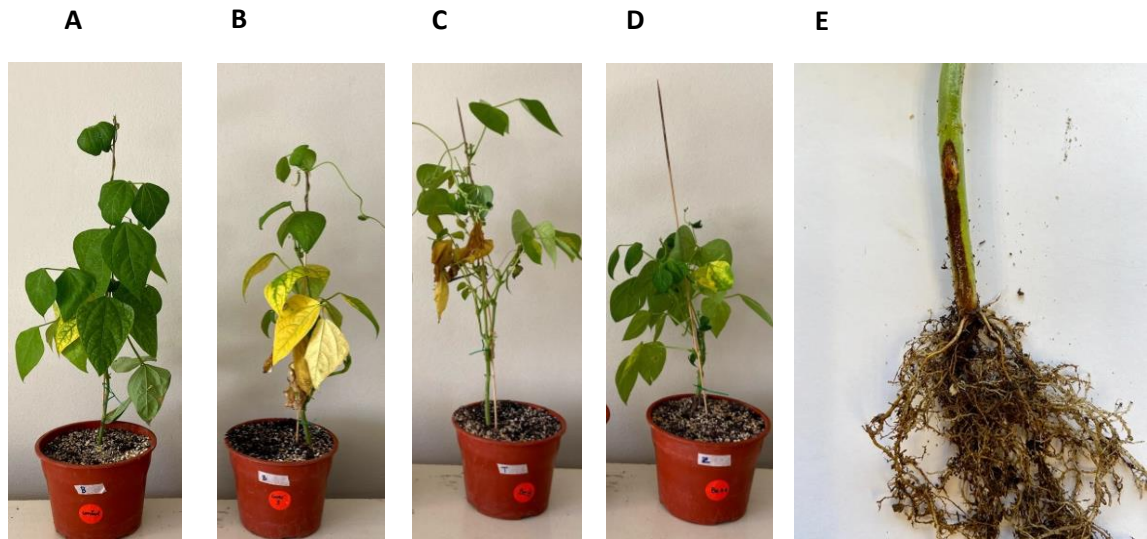


Figura 4.6. Plantas de poroto cv. Torcaza INIA sujeta a pruebas de patogenicidad con *Fusarium oxysporum* 30 días pos-inoculación. A, Planta control inoculada en la herida en el cuello con agua estéril (40 μ l) con normal desarrollo de brotes y vainas. Plantas heridas en el cuello e inoculadas con suspensión conidial (40 μ l de 10^6 conidia/ml) de *Fusarium oxysporum* aislados FL-Curi-3 (B), FL-Be-8 (C), y Be-11 (D) desarrollaron menor crecimiento con síntomas de clorosis y amarillez de hojas. E, Planta de poroto inoculada mostrando lesión necrótica en la zona del cuello y sistema radical.

5. DISCUSIÓN.

En base a los estudios realizados en el presente trabajo se aisló e identificó mediante caracteres morfología y moleculares, junto con las pruebas de patogenicidad a *Fusarium oxysporum* como la especie fúngica asociada a la amarillez (clorosis) y marchitez que afecta al cultivo de porotos en la Región del Maule, Chile.

En Chile, esta especie fungosa ha sido previamente identificada causando problemas considerables en plantas de tomate (Sepúlveda-Chavera et al., 2014) y arándanos (Moya-Elizondo et al., 2019). Recientemente, se determinaron incidencias entre un 15 y 45% de plantas con amarilleces, menor desarrollo y marchitez en dos campos de Curepto, Región del Maule (Díaz et al., 2021). La alta incidencia de la enfermedad está asociada a la susceptibilidad de las variedades, el monocultivo en las plantaciones de poroto y protección del cultivo en productores pequeños de la Región. Cabe destacar que los aislados caracterizados de *F. oxysporum* en el presente estudio se obtuvieron desde esta zona de Curepto, confirmando lo obtenido por Díaz et al. (2021).

Las características culturales y morfológicas obtenidas en el presente estudio concuerdan con descripciones de *F. oxysporum* realizadas previamente por Pavloc et al. (2016), y Lombard et al. (2019), al obtener colonias de color vináceo a violeta de crecimiento algodonosos. Las esporas observadas incluyeron microcondias hialinas, unicelulares de tamaño ovoide a elipsoide con un tamaño desde los 4.5 a 10.9 μm de longitud. Las macrocondias se observaron hialinas fusiformes de forma puntiagudas y apicales ahusadas, de 2 a 5 septos de 28,6 a 47,6 μm de largo x 2,2 a 3,6 μm de ancho, mostrando dimensiones similares al estudio realizado por Pavlovic et al. (2016). El presente trabajo, concuerda con el trabajo de Hafizi (2013), quien caracterizó *F. oxysporum* con macroconidias con tabiques de 3 a 7 septos con un largo de 35,7 a 48,8 μm , de color y pigmentación de la colonia de violeta pálidos a violeta oscuro.

La identificación morfológica de *F. oxysporum* se ratificó por medio de la identificación molecular, al comparar las secuencias de la región TEF y BT del ADN nuclear, de los aislados utilizados, con patrones de Lombard et al. (2019). En este sentido, los tres aislados de *F. oxysporum* obtuvieron un largo promedio de 607 pb y lograron una alta similitud (99 al 100%), para las secuencias de los aislados chilenos obtenidos desde lesiones en el cuello del tallo de las plantas de poroto. Cabe indicar que, para el estudio realizado por Pavlovic et al. (2016), los aislados secuenciaron en ambas direcciones, el gen TEF amplificado generaron un tamaño

similar, entre 440-651 pb de longitud. A su vez, estas secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias en el banco GeneBank, mostrando un 100% de homología *F. oxysporum*.

En relación con el efecto de la temperatura, el trabajo actual demostró la capacidad de crecimiento micelial que poseen los diferentes aislados de *F. oxysporum*, indicando que la temperatura es un factor crítico en el desarrollo y crecimiento del hongo. Según Rishbeth (1957) y Peng y col (1999), observaron que el crecimiento de patógenos del marchitamiento por *Fusarium* sp suele ser mayor a 28°C y se inhibe por encima de 33°C y por debajo de 17°C. Sin embargo, en este estudio logramos comprobar que el patógeno es capaz de desarrollarse y crecer a temperaturas bajas, sobre los 5°C, y mayores a 30°C, dejando en evidencia que, los resultados obtenidos referente a los análisis de temperatura, fueron levemente superiores según cifras señaladas por los autores. Además, se indica que existe una variabilidad de crecimiento a distintas condiciones. La temperatura del suelo y del aire sobre los 28° C favorecen el desarrollo de *F. oxysporum*. La virulencia del patógeno aumenta por el uso de nutrientes amoniacales y se ve disminuido por el uso de nitratos como fuente de nitrógeno por no producir acidificación del suelo (Bernal, 2010).

Los resultados demostraron que, la variedad Curi-INIA tiene una mayor resistencia al ataque de los aislados estudiados, por lo tanto, la respuesta del cultivar se clasificó como resistente a la lesión necrótica formada por el ataque. Mientras tanto, la variedad Torcaza-INIA mostró una susceptibilidad en la sintomatología mostrando debilitamiento de raíz y amarillez de la parte aérea de la planta. Según Edel y Lecomte (2019), estudiaron que *F. oxysporum* causa marchitamiento vascular, donde penetra las raíces llegando a los vasos de xilema, para así ir colonizando hacia la parte aérea, provocando un amarillamiento progresivo de los brotes. Este tipo de síntoma es el más común encontrado según el comité de estandarización de los nombres comunes para las enfermedades de las plantas. Por otra parte, Jarvis y Shoemaker (1978), llegó a la conclusión que el patógeno causa la pudrición progresiva en las raíces y tejidos hipocótilo-corticales sin llegar al sistema vascular. Sin embargo, los síntomas arrojados por las investigaciones realizadas en Francia y España, los autores asocian el ataque como una lesión necrótica que produce amarillos y no permite el crecimiento normal de la planta bajando el rendimiento de producción de vainas y provocando una disminución considerable de los rendimientos en productores con poco acceso a tecnologías en la producción de poroto.

Finalmente, el estudio demuestra la presencia de *F. oxysporum* en porotos durante el periodo de crecimiento, asociados al marchitamiento y amarillez de cultivo del poroto, infectando la zona basal del tallo y raíces, y así, provocar necrosis vasculares en los tejidos de la planta, hasta llegar a producir una marchitez y posterior muerte de las plantas de poroto (Schwartz et al., 2005). El

control de la marchitez es muy difícil, sobre todo cuando las condiciones ambientales son favorables al hongo. Se disemina por medio del agua de superficie, implementos agrícolas, insectos, semilla y plántulas contaminadas. Se debe evitar sembrar en suelos en donde haya ocurrido la enfermedad, es importante la rotación de cultivos, especialmente con gramíneas, con el fin de reducir el inóculo, aislar los focos y desinfectar las herramientas cuando aparezcan pocas plantas enfermas se deben arrancar,

6. CONCLUSIONES.

Basado en las condiciones del presente trabajo se concluyó que:

A través de la identificación morfológica y molecularmente, se identificó a la especie *Fusarium oxysporum*.

Los aislados de *F. oxysporum* presentaron un crecimiento entre los 10 y 35 °C, con un óptimo de 30°C para el crecimiento micelial *in vitro*.

Los aislados de *F. oxysporum* fueron patogénicos en plantas de poroto provocando los síntomas de clorosis, amarillez y marchitez, confirmando así, que la especie *F. oxysporum* es el causante de la amarillez y marchitamiento del poroto en la Región del Maule.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Abaw, G. S. and Pastor Corrales, M. A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 114p.

Alves-Santos F. M., Cordeiro-Rodrigues L., Sayagués J. M., Martín-Domínguez R., García-Benavides P., Crespo M. C., Díaz-Minguez J. M. y Eslava A. P. 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. British Society for Plant Pathology 51: 605-611.

Bascur, G. y J. Tay. 2005. Colecta, caracterización y utilización de la variabilidad genética en germoplasma chileno de poroto (*Phaseolus vulgaris* L). Agricultura Técnica (Chile) 65(2):135-146.

Bernal, R. 2011. Enfermedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión. Hemisferio Sur SRL 181: 1-71.

Bush, E., Stromberg, E., Hong, C., Richardson, P. y Kong, P. 2006. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. Plant Health Progress. doi/pdf/10.1094/PHP-2006-0621-01-RS.

CHILE, SOCIEDAD QUÍMICA Y MINERA DE CHILE (SOQUIMICH). 1985. Agenda del Salitre. Santiago, Chile. Universitaria. 1056 p

Crawford, A.R., Bassam, B.J., Drenth, A., MacLean, D.J. y Irwin, J.A.G. 1996 Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. Mycological Research 100, 437–443.

Díaz, G., Cabeza R., Amigo, R. Llanccamil, E., Montenegro, O., Gonzalez, P., Valdez, A., Lolas M. and Ferrada E.E. 2021, Severe outbreak of *Fusarium* with on common beans (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Fusarium oxysporum* in the Maule Region, central Chile. Plant Disease. First look: doi/10.1094/PDIS-12-20-2758-PDN.

Díaz G., y Lolas M., 2016. Boletín técnico no. 16. Centro de Pomáceas. Universidad de Talca. Talca, Chile. 11 p. Recuperado en: <http://pomaceas.otalca.cl/wp-content/uploads/2016/06/enfermedades-pre-y-pos-cosecha.pdf> Consultado el: 31 de octubre de 2020.

Drenth, A., Wagels, G., Smith, B., Sendall, B., O'Dwyer, C., Irvine, G. y Irwin, J. A. G. 2006, Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology* 35, 147-159.

Edel-Hermanns V y Lecomie C., 2018, Current Status of *Fusarium oxysporum* *Formae Speciales* and Races. University of Bourgogne Franche-Comté. Francia.

Faiguenbaum, H. 2003. Labranza, siembra y producción de los principales cultivos de Chile. pp. 251-252. Impresora y Editora Ograma S.A., Santiago, Chile. 760p.

González J. 2017. Producción de poroto y garbanzo en el secano costero del Valle del Maraquito: línea base productiva, económica y comercial. *Boletín INIA* N° 390. 90p

Giacconi, V. 1988. Cultivo de hortalizas. 7° ed. Santiago, Chile. Universitaria 308p.

Guglielmetti H., Tay J., Paredes M., Miranda O., Rojas C., Rodríguez N., Pardo F., Cardenas B., Caballeros C. y Hetz E., 1977 *Boletín técnico* no. 9. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chillan, Chile. Recuperado en : <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boltec/NR15843.pdf>
Consultado en diciembre 2019.

Hafizi, R., Salleh, B., y Latiffah, Z. 2012. Morphological and characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated whit Crown disease of oil palm. School of Biological Sciences, University Sains Malaysia, Penang, Malaysia.

Hagedorn, 2005. Page: 15 in: *Compendium of Bean Diseases*. Edited by Schwartz, H.F., Steadman, J.R., Hall, R., and Foster, R.L. Second Edition. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 109p.

Jarvis, W.R. and Shoemaker, R.A. 1978. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology* 68:1679-1680.

Latorre, B.A. 2018. *Compendio de las enfermedades de las plantas*. Primera edición. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 733 p.

Leitao T. S, Malosetti M., Song Q., van Eeuwijk F., Rubiales D. and Vaz P. M. C. Germplasm Reveals New Sources of Resistance Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* and Resistance-

Associated Candidate Genes. 2020. The American Phytopathological Society (APS). USA, St. Paul.

Lombard L., Sandoval-Denis M., Lamprecht S.C. y Crous P. W. Epitypification of *Fusarium oxysporum* clearing the taxonomic chaos. 2019. *Persoonia* 43, 1-47.

Oficina de estudios y políticas agrarias. Ministerio de Agricultura. Chile (ed) 2013, Cultivo de poroto en perspectiva, Santiago, Chile: ODEPA. 1-5p.

Voyses, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): legado de variedades de América Latina 1930-1999. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 195p.

Somma, M. y Querci, M. 2006. Agarose gel electrophoresis (Session 5). The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. (M Querci, M Jermini & G Van den Eede, Ed.). European Commission DG-JRC: 12p.

Schwartz, H.F., Steadman, J.R., Hall, R., and Foster, R.L. 2005. Compendium of Bean Diseases. Second Edition. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 109p.