

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGIA**



**“RAZAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* AISLADAS DE
TOMATE (*Solanum lycopersicum*) PROVENIENTE DE COSTA
CENTRAL DEL PERÚ”**

Presentada por:

MEDALI HEIDI HUARHUA ZAQUINAULA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE
EN FITOPATOLOGÍA**

**Lima –Perú
2018**

AGRADECIMIENTO

A Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT) por haber contribuido en gran parte del desarrollo de esta investigación durante las capacitaciones realizadas en sus instalaciones.

A mi asesor Mg. Sc. Liliana Aragón por patrocinar la presente investigación, por la orientación y apoyo incondicional durante el desarrollo de mi tesis, por su amistad y confianza puesta en mi persona.

Al Dr. Arie Tsutomu, director del Laboratorio de Fitopatología en TUAT – Japón. Por su generosidad al brindarme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio y poder desarrollar parte de la tesis.

Al Mg.sc. Walter Apaza, director de la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología en UNALM por permitir usar sus instalaciones y equipos para el desarrollo de la tesis.

Al Bgo. Juan Flores por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo.

Al Departamento de Fitopatología por brindarme el soporte necesario para concluir con la Maestría.

Al MINEDU por la Subvención Económica y financiamiento para el Proyecto de Investigación.

A los miembros de jurado Mg.sc. Andrés Casas y Dr. Raúl Blas por sus aportes en la mejora de esta investigación y por su motivación constante.

A Akai Kotaro, Seong Mi, Hasegawa Ryo, Tsuzuki Rin, Ayukawa Yu, Reiko, Nanako y todo el laboratorio de Fitopatología en TUAT, por su amistad, guía y orientación brindada en la TUAT.

A Cledy Ureta por sus consejos, ánimos y apoyo en diferentes los diferentes momentos.

Al personal del laboratorio e invernadero de la Clínica de Diagnóstico y Valeria por la colaboración brindada en el desarrollo de la presente investigación.

DEDICATORIA

A Dios, por ser siempre mi guía.

A mis padres Felipe y Antonia por brindarme su amor.

A mis hermanos Daniel y Alexa, por estar unidos en todo momento.

A mi prima Acely y Yadhira, por su apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISION DE LITERATURA	3
2.1.	Características generales del Tomate.....	3
2.1.1.	Clasificación Taxonómica	3
2.1.2.	Descripción del tomate	3
2.1.3.	Fuentes de resistencia de cultivares de tomate a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	4
2.2.	<i>Fusarium</i>	6
2.2.1.	<i>Fusarium oxysporum</i>	6
2.2.2.	Características morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i>	6
2.2.3.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	7
2.2.4.	Parasitismo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	7
2.2.5.	Condiciones favorables para su desarrollo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	9
2.2.6.	Razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	9
2.2.7.	Técnicas de detección de razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en tomate 10	
2.2.8.	Análisis filogenético	12
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1.	Ubicación del experimento	13
3.2.	Patógeno.....	13
3.3.	Identificación morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i>	14
3.4.	Extracción de ADN.....	14
3.4.1.	Preparación de los aislados para la extracción de ADN.....	14
3.4.2.	Procedimiento de extracción de ADN.....	14
3.4.3.	Evaluación de la calidad de ADN.....	15
3.4.4.	Evaluación de la cantidad de ADN.....	15
3.5.	Reacción en cadena de la polimerasa	15
3.5.1.	PCR de la Región del Espacio Intergénico (IGS) del ADN r.....	16
3.5.2.	Análisis filogenético	16

3.5.3.	PCR para detección de genes SIX (genes de Avirulencia).....	16
3.5.4.	Purificación del producto de PCR	17
3.5.5.	Secuenciamiento	17
3.5.6.	PCR para detección de genes de la poligalagturonasa	18
3.5.7.	Electroforesis para la PCR.....	18
3.6.	Prueba de patogenicidad	19
3.6.1.	Preparación del inóculo de <i>Fusarium</i>	19
3.6.2.	Conteo de bud cell en cámara de Neubauer	19
3.6.3.	Prueba de la patogenicidad para la determinación de las razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	20
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	23
4.1.	Identificación Morfológica	23
4.2.	Extracción de ADN.....	29
4.3.	Reacción de la cadena de la polimerasa.....	30
4.3.1.	PCR de la región Intergénica del ADN r (IGS).....	30
4.3.2.	Análisis Filogenético de la Región IGS	31
4.3.3.	PCR para detección de genes de Avirulencia (gen SIX).....	34
4.3.4.	PCR para detección de genes de la poligalacturonasa de <i>Fusarium oxysporum</i> 37	
4.4.	Prueba de patogenicidad	39
V.	CONCLUSIONES.....	44
VI.	RECOMENDACION	45
VII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	46
VIII.	ANEXO	53

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Aislamientos de <i>F. oxysporum</i> obtenidos del cultivo de Tomate que fueron empleados para el estudio.	14
Tabla 2: Primer para la detección de la región del espacio intergénico (IGS) del ADN ribosomal en <i>F. oxysporum</i>	16
Tabla 3: Primer para la detección de genes SIX en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	17
Tabla 4: Primeros específicos para razas y formas especiales en <i>F. oxysporum</i> a partir de regiones de la poligalacturonasa (Hirano & Arie, 2006).	18
Tabla 5: Escala de evaluación en grados para la severidad por síntomas externos de plantas diferenciales de tomates causados por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	21
Tabla 6: Esquema de evaluación en grados para la severidad de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> a nivel de síntomas ocasionados en el cilindro vascular en el cultivo de tomate.	22
Tabla 7: Características de la colonia de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> brindados por la clínica de Diagnóstico de Fitopatología crecidos en medio PDA.	24
Tabla 8: Mediciones de las estructuras de los ocho aislamientos HEI, identificados como <i>Fusarium oxysporum</i>	27
Tabla 9: Resultados del análisis BLAST de las secuencias nucleotídicas de los genes de avirulencia (SIX4, SIX3, SIX1) del aislamiento HEI 11.	36
Tabla 10 . Comparación del aislamiento HEI 11 con respecto a la evaluación de la identificación de <i>F. oxysporum</i> (razas Fol) en base a los resultados de la PCR con conjuntos de primers específicos realizados por Hirano y Arie (2006).	38
Tabla 11: Identificación de la raza del aislamiento HEI 11 inoculados en cultivares diferenciales (Ponderosa, Momotaro, Momotaro 8 y Ponderosa).	41

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Contabilización de bud cell de <i>F. oxysporum</i> en la cámara de Neubauer.	20
Figura 2. Escala de evaluación en grados para la severidad por síntomas externos de en el cultivo de tomate causados por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	21
Figura 3. Colonia HEI 1 en medio PDA (A: colonia evaluada sobre de superficie, B: colonia evaluada bajo la superficie).	24
Figura 4. Colonia HEI 2 en medio PDA (C: colonia evaluada sobre de superficie, D: colonia evaluada bajo la superficie); colonia HEI 3 en medio PDA (E: colonia evaluada sobre de superficie, F: colonia evaluada bajo la superficie); colonia HEI 5 en medio PDA (G: colonia evaluada sobre de superficie, H: colonia evaluada bajo la superficie).	25
Figura 5. Colonia HEI 6 en medio PDA (I: colonia evaluada sobre de superficie, J: colonia evaluada bajo la superficie); colonia HEI 9 en medio PDA (K: colonia evaluada sobre de superficie, L: colonia evaluada bajo la superficie); colonia HEI 10 en medio PDA (M: colonia evaluada sobre de superficie, N: colonia evaluada bajo la superficie).	26
Figura 6. Colonia HEI 11 en medio PDA (O: colonia evaluada sobre de superficie, P: colonia evaluada bajo la superficie).	27
Figura 7. Características de estructuras de las colonias aisladas. A-B: Clamidospora; D-E: microconidioforo; F: Microconidias; G: Célula pie en macroconidias; H-I: macroconidias con 3 a 4 septas.	28
Figura 8. M: λ DNA Hind loader; Línea 1,2,3,5,6,9,10,11, aislamientos evaluados HEI 1, HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, HEI11, respectivamente; Línea R1, R2, R3, Razas 1,2,3 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ; respectivamente.	29
Figura 9. Identificación de <i>F. oxysporum</i> , mediante PCR de la región IGS empleando los primer FIGS11/FIGS12. M: Marcador; 1,2,3,5,6,9,10,11 son aislamientos HEI de Perú.	30
Figura 10: Análisis filogenético de espacios intergénicos (IGS) de secuencias nucleotídicas de <i>F. oxysporum</i> donde se observa la agrupación en clados pertenecientes a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	33
Figura 11: Producto de PCR obtenido a partir de ADN obtenido de micelio puro con los primer SIX 4F1/SIX 4 R1. Línea R1: Raza1, Línea R2: Raza 2, Línea R3: Raza 3, controles positivos; Línea 1,2,3,5,6,9,10,11 Aislamientos de Perú; Línea C: control negativo.	34
Figura 12: Producto de PCR obtenido a partir de ADN obtenido de micelio puro con los primer SIX 3 F1/R2. Línea R1: Raza1, Línea R2: Raza 2, Línea R3: Raza 3, controles positivos; Línea 1,2,3,5,6,9,10,11 Aislamientos de Perú.	35
Figura 13: Producto de PCR obtenido a partir de ADN obtenido de micelio puro con los primer P12 F2/P 12 R1/. Línea R1: Raza1, Línea R2: Raza 2, Línea R3: Raza 3, controles positivos; Línea 1,2,3,5,6,9,10,11 Aislamientos de Perú.	35
Figura 14. Electroforesis de productos de PCR usando juego de primers Uni (672 bp), sp13 (445 bp), sp23 (518bp) para el aislamiento HEI 11.	38
Figura 15. Síntomas presentados en la segunda semana de evaluación en la prueba de patogenicidad de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en el cultivo de tomate, A: Amarillamiento de hojas basales; B: Decoloración en venaciones; C: Epinastia.	39

Figura 16. Síntomas presentados a la tercera semana de evaluación, en la prueba de patogenicidad de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en el cultivo de tomate, A: Marchitez; B: Muerte total de la planta.	40
Figura 17. Síntomas presentados a la cuarta semana de evaluación, en la prueba de patogenicidad de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en el cultivo de tomate, A: daño a nivel de cuello y B-C: decoloración vascular.	40
Figura 18: Sintomatología evaluada en el cultivar ponderosa a la cuarta semana de inoculación con los aislamientos. Testigo, no existe daño a nivel de cuello; Raza 1, un ligero daño y muerte total de la planta y HEI 11, daño a nivel de cuello y un ligero amarillamiento en hojas basales.....	41
Figura 19. Severidad del aislamiento HEI 11 y controles positivos de las tres razas (R1, R2 y R3) de Fol frente a cuatro cultivares diferenciales de tomate.	42

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Secuencias obtenidas del NCBI para la elaboración del árbol Filogenético y secuencias de las regiones intergénicas (IGS) de los aislamientos HEI.....	53
Anexo 2 : secuencia de la región de AVR1 se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los Primer SIX 4 F1/R1, usando el programa GENETIX-MAC and ENZYME X y analizados con el programa Blast del NCBI.	72
Anexo 3: secuencia de la región de AVR2 se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los Primer SIX3 F1/R2, usando el programa GENETIX-MAC and ENZYME X y analizados con el programa Blast del NCBI.	74
Anexo 4: secuencia de la región de AVR3 se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los Primer P12 R1/ F1, usando el programa GENETIX-MAC and ENZYME X y analizados con el programa Blast del NCBI.	76
Anexo 5: Temperatura en la primera y segunda evaluación de la inoculación de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> en el cultivo de tomate.	78
Anexo 6: Datos de evaluación de síntomas a nivel del cuello y síntomas vasculares del aislamiento HEI 11 y controles positivos de razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (R1, R2 y R3).....	79
Anexo 7: Análisis de variancia para la severidad en grados del aislamiento HEI 11 en los cuatro cultivares diferenciales de tomate.	82

RESUMEN

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Fol) causa la marchitez vascular solo en tomate. Aunque, las especies de *Fusarium* pueden ser identificadas por características morfológicas, los tipos patogénicos o formas especiales y razas de *Fusarium oxysporum* (Fo) no se pueden. Por lo que, la presente investigación planteó como objetivo: Implementar un método molecular para la detección e identificación de razas de Fol presentes en la costa peruana. La metodología inicio con la evaluación morfológica de ocho aislamientos de *Fusarium* aislados de tomate, seguido de los análisis filogenéticos basados en los espacios Intergénicos del ADN r (IGS); además, se realizó la detección de genes de avirulencia (AVR1 =SIX4, AVR2=SIX3 y AVR3=SIX1) y fragmentos de los genes endo (*pg1*) y exo (*pgx4*) poligalacturonasa del patógeno. La prueba de patogenicidad fue realizada en cultivares diferenciales de tomates (Ponderosa, Momotaro, Momotaro 8 y Block) para confirmación de presencia de razas de Fol. Los resultados obtenidos con estas técnicas moleculares y pruebas de patogenicidad, mostraron que solo un aislamiento, HEI 11, fue patogénico y pertenece a Fol raza 1.

Palabras Claves: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Tomate, Razas, genes SIX.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Fol) causes wilt symptoms on tomato. Although *Fusarium* species can be identified by morphological characteristics, *Fusarium oxysporum* pathogenic types or special forms and races can not. Therefore, the objective was to implement a molecular method to detect and identify Fol races present in the Peruvian coast. Morphological evaluation of eight *Fusarium* isolates from tomato were done followed by phylogenetic analysis based on the intergenic spaces (IGS) of DNA r. In addition, avirulence genes (AVR1 = SIX4, AVR2 = SIX3 and AVR3 = SIX1) and fragments of the endo (*pg1*) and exo (*pgx4*) polygalacturonase genes of the pathogen were detected. Pathogenicity tests were carried out on tomato differential cultivars (Ponderosa, Momotaro, Momotaro 8 and Block) to confirm the presence of Fol races. Results obtained with these molecular techniques and pathogenicity tests, showed that only HEI 11 isolate was pathogenic and belongs to Fol race 1.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Tomato, races, SIX gen.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) originario de América del Sur, principalmente de Perú, Chile, Ecuador y Bolivia, fue domesticado en México e introducido a Europa a mitad del siglo XVI. Actualmente, se ha convertido en uno de los cultivos hortícolas de gran importancia y de mayor consumo mundial.

En el año 2017 la producción nacional de tomate alcanzó 21.5 mil toneladas en el mes de diciembre, siendo Ica el mayor productor (61.9 %) seguido de Arequipa (16.9%) y Lima (8.9 %) (MINAGRI, 2018) sembrándose principalmente cultivares de crecimiento determinado con fines de industrialización y para consumo en fresco. Sin embargo, la rentabilidad de este cultivo se ve afectada por diversos factores, entre ellos los problemas patológicos.

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* fue descrito por primera vez en Europa en el siglo XIX; es uno de los patógenos más importantes en el cultivo de tomate y se encuentra presente en varias decenas de los países, repartidos por todos los continentes. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ha sido agrupado en tres razas fisiológicas (raza 1, raza 2 y raza 3) acorde a su capacidad de infectar a un grupo de cultivares diferenciales. Su sintomatología se manifiesta en la marchitez que comienza con amarillamiento de los brotes y hojas, infectando a través de las raicillas e invadiendo el xilema, finalmente extendiéndose a través de la planta. Sus daños fluctúan en función a la raza y a las variedades cultivadas.

Si bien, especies de *Fusarium* son tradicionalmente diferenciadas por características morfológicas sobre medios selectivos. Es casi imposible identificar formas especiales y razas de *Fusarium oxysporum*, usando características morfológicas.

Por ello, Por ello, el empleo de plantas diferenciales como son; ponderosa, Momotaro, Momotaro 8 y Block, han sido muy útiles para la identificación de estas formas especiales. Actualmente la detección molecular basada en PCR usando conjunto de primers específicos han jugado un rol muy importante asociados al propósito de diferenciación de formas especiales y razas de *Fusarium oxysporum*.

Por lo expuesto, se planteó como objetivos a) Implementar un método molecular de detección para identificar razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el Perú; b) Identificar las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causantes de la marchitez vascular en el cultivo de tomate proveniente de la costa del Perú.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Características generales del Tomate

2.1.1. Clasificación Taxonómica

Carolus Linnaeus en 1753 colocó al tomate dentro del género *Solanum* como *Solanum lycopersicum* L. Sin embargo, Philip Miller en 1754 segregó un nuevo género, *Lycopersicon*, y colocó al tomate como *Lycopersicon esculentum* nombre comúnmente aceptado y aún válido (Taylor, 1986; citado por Heuvelink, 2005). Recientes estudios de características morfológicas e información molecular de genoma nuclear y cloroplastos, mostró que el tomate es grupo hermano de la papa (*Solanum tuberosum* L.) (Kimura & Sinha, 2008). Por lo que actualmente, el tomate es colocado en el género *Solanum* y se nombra *Solanum lycopersicum* por Linnaeus y la palabra *Lycopersicon* ahora se utiliza como uno de los nombres de las secciones de *Solanum* (Kimura & Sinha, 2008).

2.1.2. Descripción del tomate

El tomate cultivado, *Solanum lycopersicum*, pertenece a la familia de las Solanaceas. Es una especie diploide, con $2n= 24$ cromosomas, en la cual existen numerosos mutantes monogénicos, algunos de los cuales son muy importantes para la selección (Blancard, 2011).

Según su hábito de crecimiento, las variedades de tomates pueden ser determinadas e indeterminadas (CATIE, 1990). Las variedades de hábito determinado o compacto, son del tipo arbustivo, de porte bajo, compacta y la producción de frutos se concentra en un periodo relativamente corto, poseen inflorescencias apicales. Las variedades de hábito indeterminado o ilimitado, tienen inflorescencias laterales y su crecimiento vegetativo es continuo, donde se mantiene la dominancia de una yema vegetativa en el ápice de las ramas. La floración, fructificación y cosecha se extienden por periodos muy largos (CATIE, 1990; Fornaris, 2007).

Las variedades de tomate para industrializar son de crecimiento determinado, son frutos de maduración uniforme y concentrada, en forma de pera o ciruela, redondos-alargado, acorazonados o cilíndricos, piel dura y alto contenido de sólidos solubles. Por otro lado, las variedades de tomate para mesa y los tomatillos (“Cherry”) tienen por lo general hábito indeterminado y las plantas necesitan de tutores que conduzcan su crecimiento (CATIE, 1990).

2.1.3. Fuentes de resistencia de cultivares de tomate a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Los largos periodos de coevolución entre plantas y microorganismos han permitido un complejo mecanismo de ataque y defensa que involucra el sistema de inmunidad innata de plantas y factor de virulencia del patógeno. El primer nivel de defensa de la planta, llamada inmunidad basal, le permite el reconocimiento de moléculas microbiales conservadas, pero puede ser suprimida por factores de virulencia microbiales conocidas como “efectores”. La planta responde a esta supresión mediante un segundo nivel de defensa, Inmunidad basada en genes de resistencia (R), los cuales reconocen al efector, para activar y restaurar la resistencia a través de la respuesta inmune dirigida al efector (Birch *et al.*, 2008; Chisholm *et al.*, 2006; Houterman *et al.*, 2007).

En el tomate los genes R contra la marchitez de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* son llamados genes I (por la inmunidad) (González *et al.*, 2012); Takken y Rep citado por González *et al.* (2012) confirmaron la existencia de los genes de avirulencia en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y determinaron que la ruptura de la resistencia mediada por el gen I, es causada por la pérdida o mutación en estos genes de avirulencia del patógeno.

Por lo que, la lucha genética se basa en la búsqueda de resistencia, generalmente monogénicas dominantes, procedentes de especies silvestres afines de las especies cultivadas. El tomate es una de las especies modelos para la utilización de resistencia monogénica en las variedades cultivadas (Blancard, 2011).

Las dos especies que han aportado hasta ahora más genes de resistencia en las variedades cultivadas son *Lycopersicon pimpinellifolium* y *L. peruvianum* (Blancard, 2011).

En 1940, Bohn y Tucker reportaron el descubrimiento de altos niveles de resistencia a la raza 1 en *Lycopersicon pimpinellifolium*. Esta resistencia es dominada por un gen dominante (I) que fue incorporado rápidamente en los cultivares comerciales (Bohn y Tucker, 1940).

Se han identificado varios genes de resistencia polimórfica (R) en el conjunto de genes del tomate que confieren resistencia frente a un subconjunto de razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Estos son I (inmunidad): I-1, I-2 y I-3 (Houterman, Cornelissen, & Rep, 2008)

El Gen I e I1, procedente de *Lycopersicon pimpinellifolium* (“PI 79532”) y localizado en el cromosoma 7, protege contra la raza 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pero es superada por la raza 2 y raza 3. Este gene reconoce la proteína de avirulencia AVR1 (Blancard, 2011; González *et al.*, 2012; Tello & LaCasa, 1988).

El Gen I-2, procedente de una hibridación natural entre *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium* (“PI126915”) y se confiere por dos genes los cuales se asemeja al gen I1, localizado en el cromosoma 11; reconoce la proteína de avirulencia AVR2 y confiere resistencia a la raza 1 y raza2 y parece que esta resistencia está gobernada por dos genes dominantes, uno aportando resistencia a la raza 1 y el otro a la raza 2. Aparentemente estos dos genes están unidos muy estrechamente, ya que los intentos por separarlos han fallado. No existen líneas que sean susceptibles a la raza 1 pero resistentes a la raza 2. Si una línea es resistente a la raza 2 es resistente a la raza 1 (Blancard, 2011; González *et al.*, 2012; Tello & LaCasa, 1988).

El Gen I-3, procedente de *L. pennellii* (“LA716”) controlada por un gen dominante “I-3” localizado en el cromosoma 7 y reconoce la proteína de avirulencia AVR 3, que confiere resistencia a la raza 1, raza 2 y raza 3 de Fol (Blancard, 2011; González *et al.*, 2012; Pérez-Almeida *et al.*, 2016).

2.2. *Fusarium*

Fusarium es un género de los Hyphomycetes (subdivisión Deuteromycotina), forma orden Moniliales, ubicada dentro de la forma de la familia Tuberculariaceae. La fase teleomorfa pertenece a los Hypocreales (Ascomycetes). *Fusarium* es una de las formas de géneros más grandes de esta familia y de los más difíciles taxonómicamente, de todos los grupos fungosos (Windels, 1992).

2.2.1. *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum es uno de los hongos más comunes de suelo, siendo cosmopolita cuyo comportamiento son de dos tipos; el primero, como un saprofito común de suelos que puede competir con saprofitos obligados con algunos hongos que infecten raíces para colonizar tejido vegetal muerto; y el segundo, se comporta como un importante hongo vascular sobre muchas especies de plantas a nivel del mundo (Senthilkumar *et al.*, 2011).

Esta especie se caracteriza por invadir tejidos epidermales de la raíz, y se extiende a los haces vasculares produciendo micelio y/o esporas en los vasos y mata a la planta por taponamiento de vasos y/o produce toxinas químicas (Beckman, 1987 mencionado por Arie *et al.*, 2007).

2.2.2. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum*

La morfología de *Fusarium oxysporum* sobre PDA varía ampliamente. El micelio puede ser algodonoso, aéreo, abundante y a veces escaso con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar (Garcés de Granada *et al.*, 2001). En algunos aislamientos se produce en una masa central de esporas abundantes macroconidias de tonalidades anaranjado pálido a violeta pálido y pequeños esclerotes de colores marrones claros, a oscuros. *F. oxysporum* usualmente produce en el agar una pigmentación violeta claro a oscuro, pero algunos aislamientos no producen pigmentación en absoluto. Algunos aislamientos de *F. oxysporum* mutan rápidamente a forma pionnotal (cultivo que carece de micelio aéreo) o a una colonia micelial plana “húmeda” con apariencia de amarillo a naranja cuando es cultivado en PDA (Sheifert, 1996 mencionado por Leslie y Summerell, 2006).

Este patógeno produce tres tipos de conidias asexuales : las **microconidias**, que tienen de una a dos células, son las conidias que el hongo produce con mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones, y son éstas que se encuentran más frecuentes en el interior de las plantas; las **macroconidias**, conidias típicas de *Fusarium*, constituidas de 3 a 5 células que se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos, aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de las plantas que han sido destruidas por el patógeno y por lo común se forman en grupos similares a los esporodocios; y las **clamidosporas**, que están constituidas por una o dos células, son redondas y de pared gruesa. Las clamidosporas sobreviven en el suelo durante más tiempo (Agrios, 1996).

2.2.3. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans es el agente causal de la marchitez vascular en el cultivo de tomate (Carbonell *et al.*, 1994).

La denominación más común infra específica actual usada dentro de *Fusarium* es forma especial o formas especiales (f. sp.) esta división infra específica es reconocida en el código internacional de botánica (Leslie & Summerell, 2006).

Las diferencias fisiológicas de por sí pueden ser muy usadas para distinguir formas especiales, pero en *Fusarium* la forma especial es prácticamente siempre definido en términos de patogenicidad de plantas dirigidas hacia un hospedante o un grupo del hospedante, usualmente relacionados. Actualmente, existen más de 120 formas especiales que han sido reportadas. Tal es el caso de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que causa la enfermedad de la marchitez solamente sobre tomate. Además, las formas especiales a su vez pueden ser subdivididas en razas, distinguidas por su especificidad patogénica, pero esta vez hacia un conjunto particular de líneas, variedades o cultivares del hospedante; para esta forma especial se han identificado tres razas fisiológicas (Arie, 2010; Leslie & Summerell, 2006).

2.2.4. Parasitismo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

El hongo entra por el tejido cortical de la raíz e hipocotíleo y se desarrolla por la vía de los agujeros causados por la emergencia de las raíces secundarias y adventicias respectivamente (Jarvis & Shoemaker, 1978). Después de la inoculación, se observan numerosas hifas sobre la superficie de la cabellera radicular, horas después se ve la penetración de la hifas dentro

de las células epidermales de la pared externa de las cabellera de las raíces, no hay una estructura especializada de penetración; sin embargo, las hifas penetrantes poseen una constricción y forma una pared a la altura del punto de penetración (Olivain & Alabouvette, 1999).

Después de la penetración del patógeno dentro de las células epidérmicas, se da la colonización del hongo en los espacios intercelulares, que podrían pasar de células a células por la digestión de la pared celular, pero no suele ser muy común; la continuidad del crecimiento fúngico fue evidente a través de la corteza del cilindro vascular hacia los vasos del xilema (Olivain & Alabouvette, 1999). Así mismo, durante la colonización existen reacciones de defensa en la corteza como: depósito globular osmiofílico que ataca a las hifas en los espacios intercelulares, cierre de papilas que limitan la penetración del hongo dentro de células y producción extensa de material opaco de electrones en las células que presentan hifas degeneradas. La reacción de la defensa también fue observada en el xilema, los vasos aparecieron cerrados con material granular denso en electrones, en invasiones muy intensas se observan reacciones a nivel del endodermo, las células se deforman, distorsionan y colapsaban creando una barrera física difícil para para que el hongo cruce. La desorganización de las células se observan en el cilindro vascular y en la corteza, lo que indica el crecimiento necrotrófico del patógeno, finalmente a los 24 días después de la inoculación se muestran síntomas secundarios típicos (Olivain & Alabouvette, 1999) .

Las plantas adultas sufren síntomas parecidos a las plántulas. Así, hojas viejas presentan amarillamientos unilaterales, es decir que afectan a folíolos que se encuentran situados de un lado de las hojas y de un sector del limbo, características de las enfermedades vasculares, la decoloración vascular puede extenderse varios centímetros. El hongo puede ser aislado alrededor de 1 a 2 cm de la decoloración (Jarvis & Shoemaker, 1978). Las hojas tienden a secarse totalmente pero no se caen, seguido estos síntomas secundarios alcanzan a los demás folíolos y se generalizan al final en toda la planta, llegando a secarse totalmente y morir (Blancard, 2011). La infección de la planta en condiciones comerciales usualmente no se marchita hasta que se dé la primera fructificación completa (Jarvis & Shoemaker, 1978).

2.2.5. Condiciones favorables para su desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* es más severo en suelo cuya temperatura está en los 27°C y 28°C por lo que ataca en periodos calurosos del año y es fácilmente dispersado por medio de microconídias (Jarvis & Shoemaker, 1978).

Le favorecen los suelos arenosos y ácidos. Así también, la baja higrometría del suelo, los días cortos, la escasa intensidad luminosa. Así también, los tejidos vegetales carentes de fósforo, nitrógeno y calcio; los ataques por los nemátodos de forman agallas y los suelos asfixiantes sensibilizan al cultivo de tomate y favorece el desarrollo del hongo (Blancard, 2011).

2.2.6. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

El sistema de nomenclatura de raza fisiológicas fue introducido por primera vez por investigadores que evaluaron al patógeno *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa silvestre (Black *et al.*, 1953). Esto es un sistema racional y conveniente, porque las razas de patógenos son numerosas tanto como la relación de su virulencia a genes resistentes del hospedante (Gabe, 1975)

F. oxysporum es un habitante común de suelo, muchas veces inofensivo. Sin embargo, la patogenicidad y la especificidad al hospedante de las líneas clonales ha evolucionado y ocasiona enfermedades vasculares en cultivos tales como plátano, algodón, cucurbitáceas, melón y tomate (Houterman *et al.*, 2008). Cada raza de estos hongos ha definido estrictamente la especificidad al hospedante. Los aislamientos de *F. oxysporum* que causan enfermedad de marchitez solo en tomate (*Solanum lycopersicum*) son clasificados como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Inami *et al.*, 2012). Así tres razas fisiológicas son conocidas hasta ahora, designadas como raza1, raza2 y raza3 (Arie, 2010; Blancard, 2011; Inami *et al.*, 2012).

Durante la infección de tomate el hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* secreta muchas proteínas únicas, llamadas proteínas SIX, “proteínas secretadas en el xilema (SIX)”. Algunas de estas proteínas promueven la virulencia hacia el tomate, entre ellas se han encontrado proteínas de avirulencia que pueden desencadenar la resistencia a enfermedades en el cultivo de tomate (Lievens *et al.*, 2009). Se conocen tres proteínas descritas como:

AVR1 (SIX4), AVR2 (SIX 3) y AVR3 (SIX 1), que actualmente son contrarrestadas por los genes I de tomate; estas proteínas promueven la colonización del hospedante por la supresión de mecanismos de resistencia basales y el conjunto de estas proteínas determinan la virulencia del patógeno hacia un hospedante en particular (González, 2012).

La Raza 1: Es la raza más antigua descrita en 1886 en Inglaterra, está ampliamente presente en muchas zonas productoras (Blancard, 2011) y la denominaron la raza común, raza inespecífica (Gabe, 1975). Posee los genes de avirulencia AVR1 (= SIX 4), AVR2 (=SIX 3) y AVR3 (=SIX 1). Es avirulento sobre líneas de tomate con gen I/I-1(Rep *et al.*, 2003).

La Raza 2: Fue primero reportado en Ohio en 1945 (Lievens *et al.*, 2009). Inicialmente se describía a la raza 2 que poseían dos genes de avirulencia AVR2 y AVR3 y carecía del gen AVR1, la raza 2 es capaz de producir virulencia a líneas de tomate que contienen genes I/I-1 pero avirulento en líneas de tomate con gen I2. Actualmente, se ha reportado un nuevo biotipo de raza 2 que lleva el AVR1 truncado por un transposón (avr1) (Houterman *et al.*, 2009, 2008; Kashiwa *et al.*, 2016; Rep *et al.*, 2003).

La Raza 3: Es la raza más reciente, con un área de distribución más limitada. Descrita en 1978 en Australia y reportado en el 2003 en el norte de América; actualmente se encuentra distribuido en México, Japón y Brasil (Blancard, 2011; Lievens *et al.*, 2009). La raza 3 posee un intacto gen AVR3 igual al de las otras razas. Sin embargo, existe una mutación en el gen AVR 2 (avr2), lo cual le causa una pérdida en la función de avirulencia. Inicialmente se pensaba que no poseía el gen de avirulencia AVR1 (Houterman *et al.*, 2008); pero en investigaciones actuales manifiestan que la presencia de este gen es silenciado por el transposón Hormin (Houterman *et al.*, 2009; Rep *et al.*, 2004). La raza 3 es capaz de producir virulencia a líneas de tomate que contienen los genes “I” y “I-2” (Blancard, 2011).

2.2.7. Técnicas de detección de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate

A. Variedades diferenciales en tomate para identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Para identificar razas fisiológicas de una forma especial se utilizan cultivares diferenciales. Este conjunto de líneas de tomates diferenciales deben tener genes de resistencia o susceptibilidad a las razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Negrete, 2013); tal es el caso

de los cultivares: Ponderosa (i, i2, i3; semillas de Noguchi, Saitama, Japón) que es susceptible a todas las razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; Momotaro (I, i2, i3; Takii Co., Kyoto, Japón) que es resistente a la raza 1 pero susceptible a la raza 2 y raza 3; Walter (I, I2, i3; Mie, Japón) que es resistente a la raza 1 y raza 2, pero susceptible a la raza 3 y Block (I, I2, I3; semilla Sakata, Yokohama, Japón) es resistente a todas las razas (Balogun *et al.*, 2008; Kashiwa *et al.*, 2016).

B. Método de detección por PCR para identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Alguna de las técnicas para determinar la diversidad genética del género *Fusarium* son: Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), repeticiones de secuencias simples (SSR) y secuenciamiento por porciones o genes completos (Alanis-martínez *et al.*, 2015; Balogun *et al.*, 2008; Inami *et al.*, 2012; Rodríguez-molina *et al.*, 2003).

F. oxysporum es un complejo que comprende formas especiales morfológicamente indistinguibles, los cuales pueden ser patogénicos o no patogénicos. Por lo que, ahora los marcadores moleculares han comenzado a ser muy eficientes para el propósito de estudio de diversidad genética y para la identificación de especies, subespecies y formas especiales de fitopatógenos (Alanis-martínez *et al.*, 2015; Arie, 2010; Balogun *et al.*, 2008).

En la actualidad, investigaciones emplean juegos de primers específicos para determinar razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, una de ellas se basa en el empleo de primers diseñados a partir de secuencias nucleotídicas parciales de genes de la endopoligalacturonasa (pg 1) y exopoligalacturonasa (pgx4) de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *radicis-lycopersici* los cuales son: uni, sp13, sp23, sprl (Balogun *et al.*, 2008; Çolak & Bıçlıcı, 2013; Hirano & Arie, 2006). Mientras que otros se basan en primer diseñados a partir de genes de proteínas SIX: SIX 4, SIX 3 y SIX 1, presentes en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Hirano & Arie, 2006; Inami *et al.*, 2012; Martínez & Soto, 2010).

2.2.8. Análisis filogenético

La variación genética en hongos es promovida por la reproducción sexual vía procesos de apareamiento, éstos pueden jugar un rol importante en la generación de nuevas razas patogénicas y/o resistencia a fungicidas. Las variaciones fenotípicas en *F. oxysporum* es muy amplia, pero nunca se ha observado una etapa sexual en estas especies; sin embargo, se han descrito genes de tipo de apareamiento y se ha desarrollado métodos basados en la PCR para la determinación de estos tipos de apareamientos (Arie, 2010).

Tres linajes evolutivos fueron encontrados en aislamientos de Fol basados en el análisis filogenético de la región del espacio intergénico del ADN ribosómico (rDNA-IGS). Cada linaje se compone de aislamientos estrechamente relacionados, que pertenecen principalmente a un único o un grupo de compatibilidad vegetativa estrechamente relacionada (VCG) y un único tipo de apareamiento (MAT). Linaje A1, se compone de los aislamientos que son VCG 0031 y MAT1-1; linaje A2, son aislamientos de VCG 0030 y / o 0032 y MAT1-1, y linaje A3, pertenecen a aislamientos VCG 0033 y MAT1-2. Los aislamientos, raza 1 y la raza 2, pertenecen a los linajes A1 o A2, y la raza 3 pertenecen al linajes A2 o A3, y no existe una correlación entre la raza y linaje (Arie, 2010).

Actualmente, se ha reportado que el mecanismo evolutivo en especies de *F. oxysporum* involucra cromosomas pequeños de transferencia horizontal que transporta genes relacionados a la patogenicidad como los SIX. Estos elementos activos móviles en el genoma de *F. oxysporum* contribuyen a la emergencia de Fol y su diversidad en la patogenicidad (Arie, 2010; Inami *et al.*, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

El presente experimento se realizó en las instalaciones del laboratorio e invernadero de la Universidad de Agricultura y Tecnología de Tokio (TUAT) y en los laboratorios e invernaderos de la especialidad de Fitopatología en la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

3.2. Patógeno

Ocho aislamientos fueron empleados para la investigación: HEI 1, HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, HEI 11, brindados por la clínica de Diagnóstico de Fitopatología y como controles positivos, se emplearon las razas diferenciales de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* MAFF 305121 (Raza 1), JCM 12575 (raza 2) y Ch12-1A (raza 3), provistos por la Universidad de Agricultura y Tecnología de Tokio (Tabla 1).

Para la obtención de cultivos monospóricos los aislamientos almacenados en tubos fueron sembrados en medio PDA, a los 7 días de crecimiento de la colonia, se tomó una porción de 0.5cm² y se colocó en un tubo que contenía 10 ml de agua destilada estéril, se agitó en el vortex por un minuto y se procedió a contabilizar un número de 10 a 20 conidias por campo visual de 10 X, luego se tomó una gota y se extendió sobre un medio agar agua, a las 18 horas se evaluó la germinación de las conidias, las cuales fueron seleccionadas y repicadas en medios PDA para sus respectivas evaluaciones morfológicas.

Tabla 1: Aislamientos de *F. oxysporum* obtenidos del cultivo de Tomate que fueron empleados para el estudio.

Nombre del aislamiento	Localización	Fecha de recolección
HEI 1	ICA	11-2013
HEI 2	Cachiche-ICA	12-2013
HEI 3	Majes-Arequipa	06-2013
HEI 5	Subtanjalla-Ica	12-2014
HEI 6	Mala-Ica	03-2016
HEI 9	Ica	12-2014
HEI 10	Ica	03-2012
HEI 11	Ica	04-2016
MAFF 305121 (Raza 1)	TUAT	Kawabe <i>et al.</i> (2005)
JCM 12575 (Raza 2)	TUAT	Inami <i>et al.</i> (2012)
Ch12-1A (Raza 3)	TUAT	Inami <i>et al.</i> (2012)

3.3. Identificación morfológica de *Fusarium oxysporum*

Se realizó la caracterización morfológica para la identificación del género y especie de *F. oxysporum* para lo cual se tomó en cuenta el desarrollo en medio PDA como la pigmentación y características determinantes de estructuras como: formación de microconidias, macroconidias, clamidosporas (Sheifert, 1996 mencionados por Leslie y Summerell, 2006; Booth, 1970) y las medidas de estas estructuras fueron comparadas con descriptores empleados por Booth (1970) y Hoog (2000).

3.4. Extracción de ADN

3.4.1. Preparación de los aislados para la extracción de ADN

Los once aislamientos se sembraron en placas Petri con medio PDA y se incubaron a 25°C durante 3-5 días.

3.4.2. Procedimiento de extracción de ADN

El método empleado para la extracción de ADN fue adaptado de Saitoh *et al.* (2006) citado por Balogun *et al.* (2008), la cual se explica a continuación:

A partir de cada aislamiento, se realizó un corte para obtener una porción de 5mm de agar con micelio en crecimiento activo, los cuales fueron depositados en tubos de 1.5 ml, se les adicionó 500 ul de buffer lisis y con apoyo de un molidor se procedió a triturar el micelio, se maceró por un periodo de 10 minutos, luego se agregó fenol: cloroformo: isoamyl alcohol (25:24: 1= v: v: v) y se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm. A continuación, se recuperó la fase acuosa superior, a la cual se añadió 2ul de ARN y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Enseguida se añadió un volumen similar al colectado de iso propanol y se colocó a -20°C por 15 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura de ambiente y se descartó el sobrenadante; luego se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el etanol y se dejaron secar al vacío. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 30 ul de agua ultra pura y almacenado a -30°C.

3.4.3. Evaluación de la calidad de ADN

Para comprobar la calidad del ADN extraído, se realizó la electroforesis en gel de agarosa. Para lo cual, se tomó 5 ul de cada muestra y se mezcló con 1 ul de tampón de carga (Loading Dye Solution), la mezcla se cargó en el gel de agarosa al 0.8% (p/v) y se dejó correr en tampón TAE 0.5X, a 135 voltios, durante 30 minutos. Concluido el tiempo, se procedió a teñir el gel con bromuro de etidio (0.5 ug/ml) durante 15 min. Tras la tinción se colocó el gel en un transiluminador de luz UV para visualizar la integridad del ADN.

3.4.4. Evaluación de la cantidad de ADN

Para la cuantificación del ADN total se empleó la espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 260nm (A260), posteriormente se ajustó a un rango de concentración de 50 a 100 ng/ul con agua ultra pura.

3.5. Reacción en cadena de la polimerasa

El ensayo de PCR se llevó a cabo empleando primers para amplificar la región del espacio intergénico (IGS) del ADN ribosomal del genoma y determinar la especie (Inami *et al.*, 2014). Así mismo, se emplearon primers que permitieron evaluar los genes específicos de patogenicidad para la determinación de las razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; genes directamente involucrados en la interacción patógeno y hospedante, denominados genes SIX (secretado en el xilema) (Inami *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2015) y los genes endo (pg1)

y exo (pgx4) poligalacturonasa del patógeno (Balogun *et al.*, 2008; Baysal *et al.*, 2009; Çolak & Bıçlı, 2013; Hirano & Arie, 2006).

3.5.1. PCR de la Región del Espacio Intergénico (IGS) del ADN r

Para la identificación de la especie *F. oxysporum* se llevó a cabo mediante el empleo de iniciadores FIGS 11 / FIGS12 (Tabla 2), que amplifica la porción parcial de la región IGS de alrededor de 600bp (Inami *et al.*, 2014).

El proceso de amplificación se llevó a cabo en el termociclador (TaKaRa PCR termal cycler) cuyas condiciones fueron; incubación a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de segunda desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 61°C por 30 segundos, y elongación a 72°C por 30 segundos; y una extensión final a 72°C por 7 minutos (Inami *et al.*, 2012).

Tabla 2: Primer para la detección de la región del espacio intergénico (IGS) del ADN ribosomal en *F. oxysporum*.

Especie	Nombre	Sentido	Secuencia 5' - 3'	Región de gen en estudio
<i>Fusarium oxysporum</i>	FIGS11	F	GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG	Región IGS del ADNr
	FIGS12	R	GCAAAATTCAATAGTATGGC	

3.5.2. Análisis filogenético

Las secuencias nucleotídicas de la región IGS fueron arregladas con el programa GENETIX-MAC and ENZYME X y alineadas con secuencias de otros *F. oxysporum* y como grupo externo se empleó a *Gibberella fujikuroi* (FGSC 7610), obtenidas de la base de datos del NCBI (Anexo 1). Para la construcción del árbol filogenético se empleó el software MEGA 7 por el método de Neighbor-Joining (NJ) (Inami *et al.*, 2012).

3.5.3. PCR para detección de genes SIX (genes de Avirulencia)

Se llevó a cabo la detección de los genes SIX en los aislamientos identificados como *F. oxysporum*. Para ello, se utilizaron los primers SIX4F1/SIX 4R1, SIX3- F1/SIX3-R2 Y P12-F2/P12-R1 diseñados para amplificar AVR1, AVR2 y AVR3 respectivamente (Tabla 3).

El proceso de amplificación se llevó a cabo en el termociclador cuyas condiciones fueron; incubación a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de segunda desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 61°C por 30 segundos, y elongación a 72°C por 30 segundos; y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Tabla 3: Primer para la detección de genes SIX en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Espece	Nombre	Sentido	Secuencia 5' - 3'	Región de gen en estudio
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	P12-F2	F	CCCCGAATTGAGGTGAAG	AVR 3
	P12-R1	R	AATAGAGCCTGCAAAGCATG	AVR 3
	SIX3-F1	F	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT	AVR2
	SIX3-R2	R	GGCAATTAACCACTCTGCC	AVR2
	SIX4-F1	F	ACTCGTTGTTATTGCTTCGG	AVR1
	SIX4-R1	R	CGGAGTGAAGAAGAAGCTAA	AVR1

3.5.4. Purificación del producto de PCR

Una vez extraído el producto de PCR y amplificado con los primer respectivos, se realizó la purificación del producto empleando un protocolo de Wizard SV Gel and PCR Clean up system; seguido se realizó la reacción de calidad de ADN usando el método de S_Te P descrito por Adam, 2017. Por último, se empleó el Kit ciclo de secuenciación Big Dye Terminator v 3.1 (Inami *et al.*, 2012).

3.5.5. Secuenciamiento

Para tener la secuencia completa se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los primers “Forward” y “Reverse”, usando el programa GENETIX-MAC and ENZYME X obteniéndose la secuencia casi completa.

La identificación se determinó en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.5.6. PCR para detección de genes de la poligalacturonasa

Se procedió a identificar la presencia de una región diferente a los genes SIX que también permitiera corroborar los datos obtenidos por las otras regiones. Para ello, se empleó la metodología propuesta por Hirano y Arie (2006) que diseñó primers específicos a partir de regiones de genes de la exopoligalacturonasa (pgx4) y endopoligalacturonasa (pg1) (Tabla 4).

El proceso de amplificación se llevó a cabo en el termociclador cuyas condiciones fueron; incubación a 94°C por 5 minutos; 45 ciclos de segunda desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 61°C por 1 minuto, y elongación a 72°C por 2 minutos; y una extensión final a 72°C por 10 minutos (Çolak & Bıçlıcı, 2013).

Tabla 4: Primeros específicos para razas y formas especiales en *F. oxysporum* a partir de regiones de la poligalacturonasa (Hirano & Arie, 2006).

Nomb.	Secuencia 5' - 3'	Región de gen en estudio	Fo/Fol
Unif	ATCATCTTGTGCCAACTTCAG	nt 170–190 of Saitama ly1 pg1	Fo.
Unir	GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA	nt 841–820 of Saitama ly1 pg1	
Sip13f	GTCAGTCCATTGGCTCTCTC	nt 896–915 of Saitama rly pgx4	Fol.
Sip13r	TCCTTGACACCATCACAGAG	nt 1340–1321 of Saitama rly pgx4	1 y 3
Sip23 f	CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA	nt 240–260 of Saitama ly1 pg1 nt	Fol.
Sip23r	GCAACAGGTCGTGGGGAAAA	757–738 of Saitama ly1 pg1	2 y 3

3.5.7. Electroforesis para la PCR

Todos los productos obtenidos a partir de la amplificación por PCR con los diferentes primers fueron evaluados por la metodología mencionada en el ítem 3.4.3. en la cual solo se varió el porcentaje del gel de agarosa a un 1.2%, además se incluyó uno o dos pocillos para los marcadores de peso molecular (Gen Ruler 100 pb ADN ladder Plus o de 1Kb DNA ladder) como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados.

3.6. Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad fue realizada en el invernadero de la Clínica de Diagnóstico, bajo dos condiciones climáticas; en los meses de marzo a abril y en los meses de mayo a junio. Para el cual, se usaron los aislamientos que dieron positivo a la prueba molecular.

3.6.1. Preparación del inóculo de *Fusarium*

Se utilizó caldo papa dextrosa estéril (PDB: papa 200g, dextrosa 15g, y agua destilada 1000 ml) dispensados a un volumen de 40 ml en frascos de Erlenmeyer (capacidad 100 ml). Luego se procedió a colocar en el caldo una pequeña porción ($\leq 0.5 \text{ cm}^2$) de PDA con micelio de cada uno de los aislamientos a evaluar y los controles positivos. Este caldo con el inóculo se mantuvo en agitación a 120 rpm a temperatura ambiente durante 5 días para producción de las bud cell (esporas), que fueron usadas como inóculo (Balogun *et al.*, 2008; Inami *et al.*, 2012). Terminando el período de incubación, se filtró la solución con ayuda de una gasa en tubos de 50 ml, inmediatamente se procedió a un centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, después de este tiempo se eliminó el sobrenadante y se quedó con el precipitado, donde se encontraron las bud cell, a esta suspensión se le agregó 10 ml de agua destilada y se homogenizó en vortex (Balogun *et al.*, 2008).

3.6.2. Conteo de bud cell en cámara de Neubauer

A partir de la suspensión de bud cell obtenida en el paso anterior, se tomó una alícuota para contabilizar las esporas en la cámara de Neubauer (hematocímetro) presentes en los 5 cuadrantes como se detalla en la Figura 1, se contabilizaron las esporas presentes en la primera líneas de arriba y de la izquierda, no así las esporas que se encontraban en la línea de abajo y de la derecha, las observaciones se hicieron usando un aumento de 400 X (Ames de Icochea, 2004).

El número de conidias por mililitro se obtuvo de acuerdo a la metodología empleada en las investigaciones realizadas por el laboratorio de la TUAT.

$$\text{Conidias /ml} = \text{Sumatoria de Bud cell de los 5 cuadrantes} \times 0.5 \times 10^5 \times 10^2$$

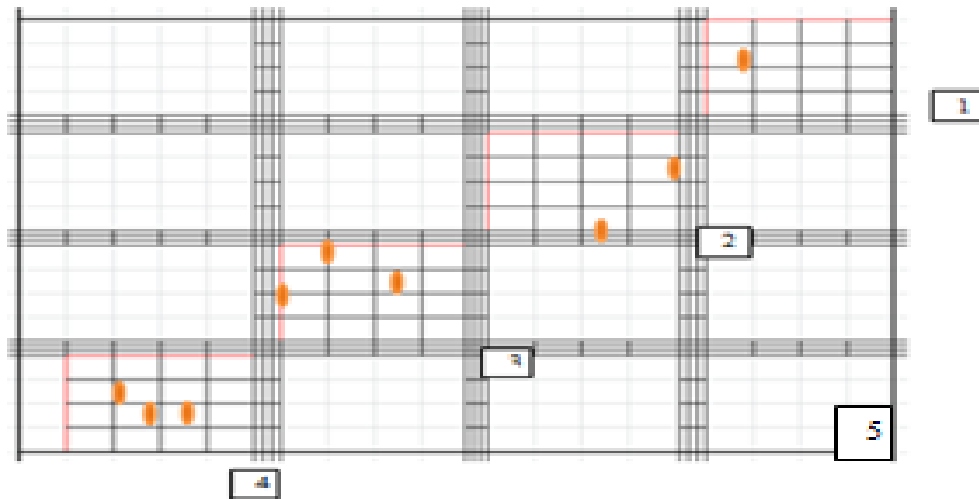


Figura 1. Contabilización de bud cell de *F. oxysporum* en la cámara de Neubauer.

Finalmente, cada suspensión obtenida fue ajustada a la concentración de 1×10^7 bud cell ml^{-1} (Balogun *et al.*, 2008; Inami *et al.*, 2012).

3.6.3. Prueba de la patogenicidad para la determinación de las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Para la evaluación se sembraron semillas de tomate de cada cultivar diferencial (Ponderosa, Momotaro, Momotaro 8, Block) en potes de plástico (7cm-diam.) con sustrato estéril. Por aislamiento se instaló tres potes que contenían dos semillas cada uno, esto se realizó en los 4 cultivares diferenciales, haciendo un total de 6 plantas por aislamiento de cada cultivar. Después de 21 días de la siembra, se procedió a realizar heridas en las raíces introduciendo una espátula de plástico a nivel radicular. Seguido, se inoculó por drench, 1 ml de la suspensión a una concentración de 1×10^7 bud cell ml^{-1} por planta.

A la cuarta semana después de la inoculación se evaluaron los síntomas externos de cada planta, empleando una escala de 0 a 4. Siendo 0, sin síntomas de marchitez o amarillamiento; 1, las hojas de la base están amarillentas; 2, las hojas bajas y superiores están amarillentas; 3, las hojas de abajo están amarillentas, marchitas y las hojas superiores están amarillentas; 4, todas las hojas están amarillentas y marchitas o plantas muertas (Inami *et al.*, 2012)(Figura 2 y Tabla 5).

Concluida la evaluación de los síntomas externos, inmediatamente se procedió a cortar a un mismo nivel todos los tallos (1 cm del sustrato) de manera transversal y se evaluó el pardeamiento del cilindro vascular; donde el grado 0 representa una planta sana, con 0%

de daño en el cilindro vascular; grado 1, 1 a 25% de daño en el cilindro vascular; grado 2, 26-50%; grado 3, 51-75%; grado 4, 76-100% como lo describe la Tabla 6, escala adaptada de Kashiwa *et al.* (2016) y empleada en el laboratorio de TUAT. Las evaluaciones se promediaron y se compararon bajo un diseño estadístico DCA factorial.

Tabla 5: Escala de evaluación en grados para la severidad por síntomas externos de plantas diferenciales de tomates causados por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Grado	Clasificación
0	Sin síntomas de marchitez o amarillamiento.
1	Las hojas de la base están amarillentas.
2	Las hojas bajas y superiores están amarillentas.
3	Las hojas de abajo están amarillentas y marchitas y las hojas superiores están amarillentas
4	Todas las hojas están marchitas y amarillentas o plantas muertas.

Fuente: Inami *et al.*(2012).

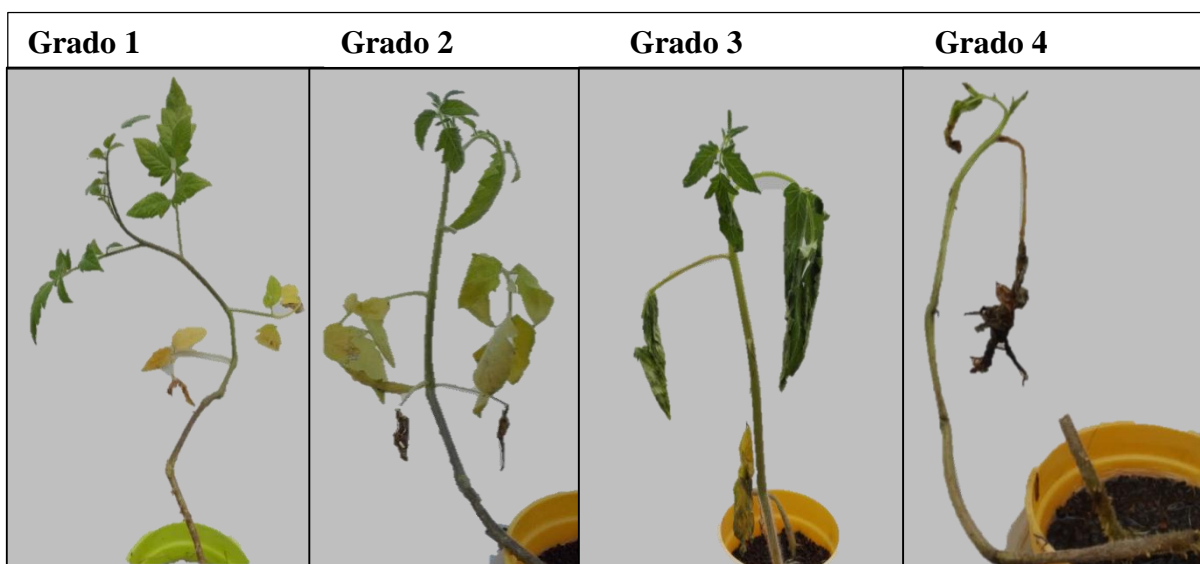







Figura 2. Escala de evaluación en grados para la severidad por síntomas externos de en el cultivo de tomate causados por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Tabla 6: Esquema de evaluación en grados para la severidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a nivel de síntomas ocasionados en el cilindro vascular en el cultivo de tomate.

Grafico	Severidad (%)	Grado
	0	0
	1-25	1
	26-50	2
	51-75	3
	76-100	4

Fuente: Basada en comunicación personal con Akai, kotaro (20 marzo, 2016).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Identificación Morfológica

Las ocho cepas brindadas por la Clínica de diagnóstico, las cuales fueron aisladas de cultivos de tomate provenientes de la costa central del país fueron identificadas como *F. oxysporum*, de acuerdo a las características morfológicas de las colonias en el cultivo PDA y características microscópicas.

En cuanto a las características morfológicas de la colonia, se evaluó la tasa de crecimiento en el medio de cultivo PDA, la cual osciló entre 5 a 7 cm al séptimo día de evaluación (Tabla 7). Para dos aislamientos: HEI 1, HEI 11 produjeron colonias con micelio de coloración violácea sobre y bajo la superficie de los aislamientos (Figura 3 y 6); para los aislamientos: HEI 2, HEI3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10 la pigmentación fue de una tonalidad blanca sobre la superficie y en el reverso de la placa la coloración fue de violácea clara a violácea oscura (Figura 4 y 5). El desarrollo micelial de las colonias se caracterizó por tener un crecimiento radial y concéntrico, con micelio afelpado y algodonoso

Tabla 7: Características de la colonia de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* brindados por la clínica de Diagnóstico de Fitopatología crecidos en medio PDA.

Aislamiento	Tasa de crecimiento (Día 7)	Pigmentación	Características de la colonia
HEI 1	6.3 cm	Superficie: violáceo claro, reverso: violáceo.	Crecimiento radial, afelpado.
HEI 2	6.7 cm	Superficie: blanca, reverso: violáceo oscuro.	Crecimiento radial, afelpado.
HEI 3	5.0 cm	Superficie: blanca, reverso: violáceo oscuro y bordes blanquecinos.	Crecimiento radial, algodonoso.
HEI 5	6.3 cm	Superficie: blanca y reverso: violáceo claro.	Crecimiento concéntrico, afelpado.
HEI 6	5.8 cm	Superficie: blanca, reverso: violáceo oscuro.	Crecimiento radial, afelpado
HEI 9	6.3 cm	Superficie: blanca, reverso: violáceo claro con borde blanco.	Crecimiento concéntrico, algodonoso
HEI 10	7.0 cm	Superficie: blanca, reverso: violáceo.	Crecimiento concéntrico, afelpado
HEI 11	5.5 cm	Superficie: violácea con borde blanquecino, reverso: violáceo.	Crecimiento concéntrico, afelpado

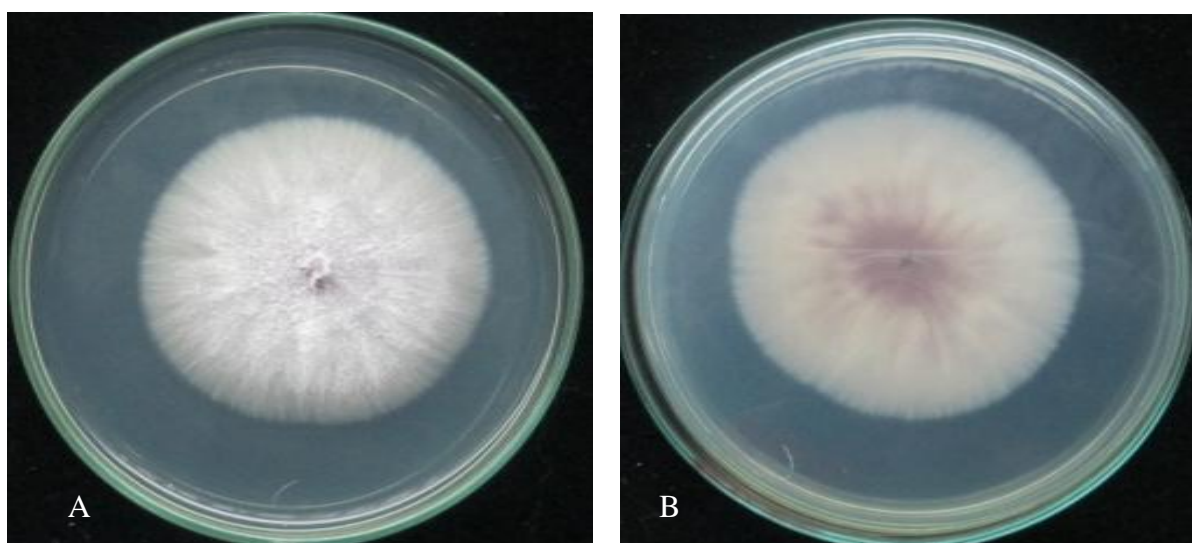


Figura 3. Colonia HEI 1 en medio PDA (A: colonia evaluada sobre de superficie, B: colonia evaluada bajo la superficie).

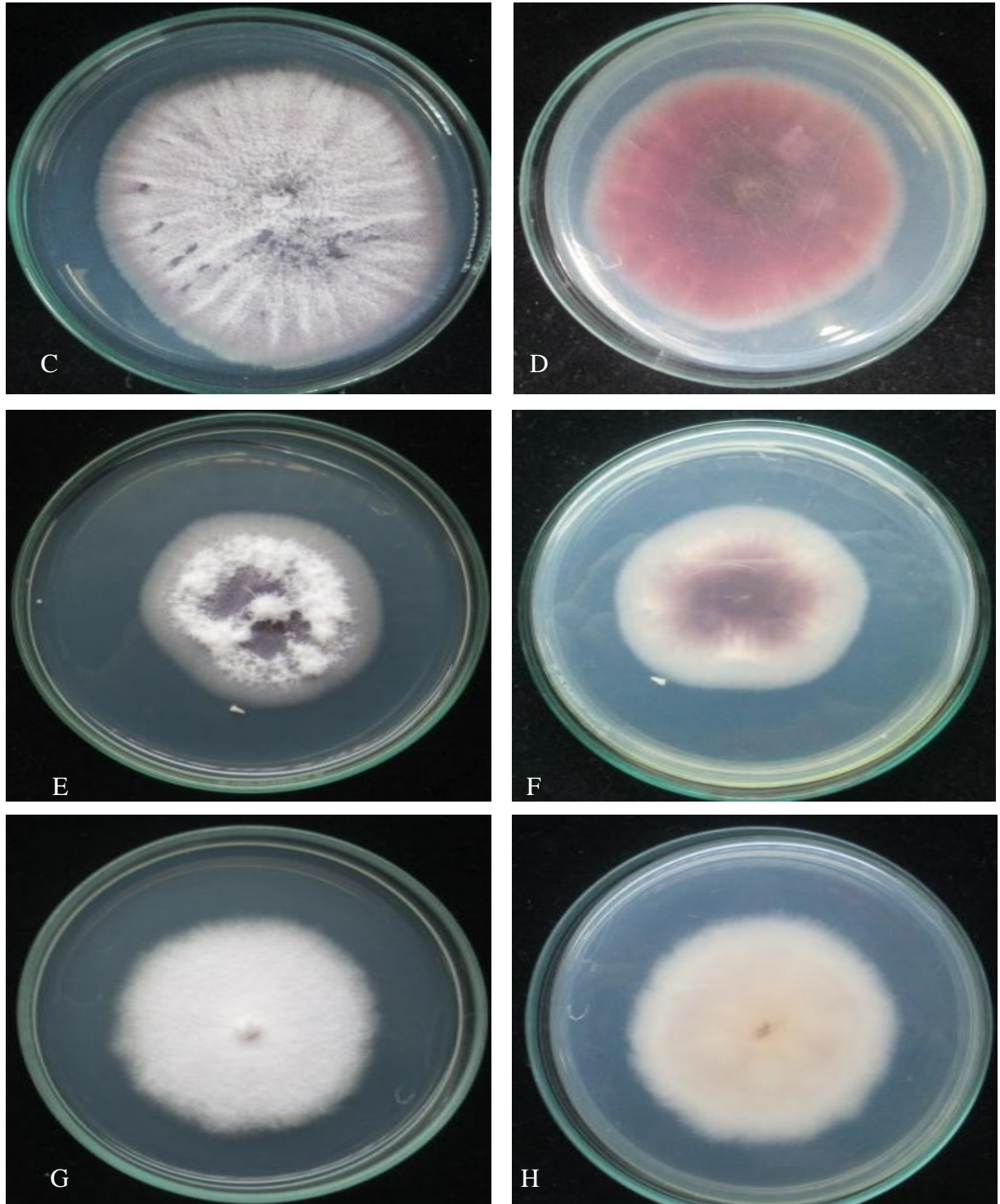


Figura 4. Colonia HEI 2 en medio PDA (C: colonia evaluada sobre de superficie, D: colonia evaluada bajo la superficie); colonia HEI 3 en medio PDA (E: colonia evaluada sobre de superficie, F: colonia evaluada bajo la superficie); colonia HEI 5 en medio PDA (G: colonia evaluada sobre de superficie, H: colonia evaluada bajo la superficie).

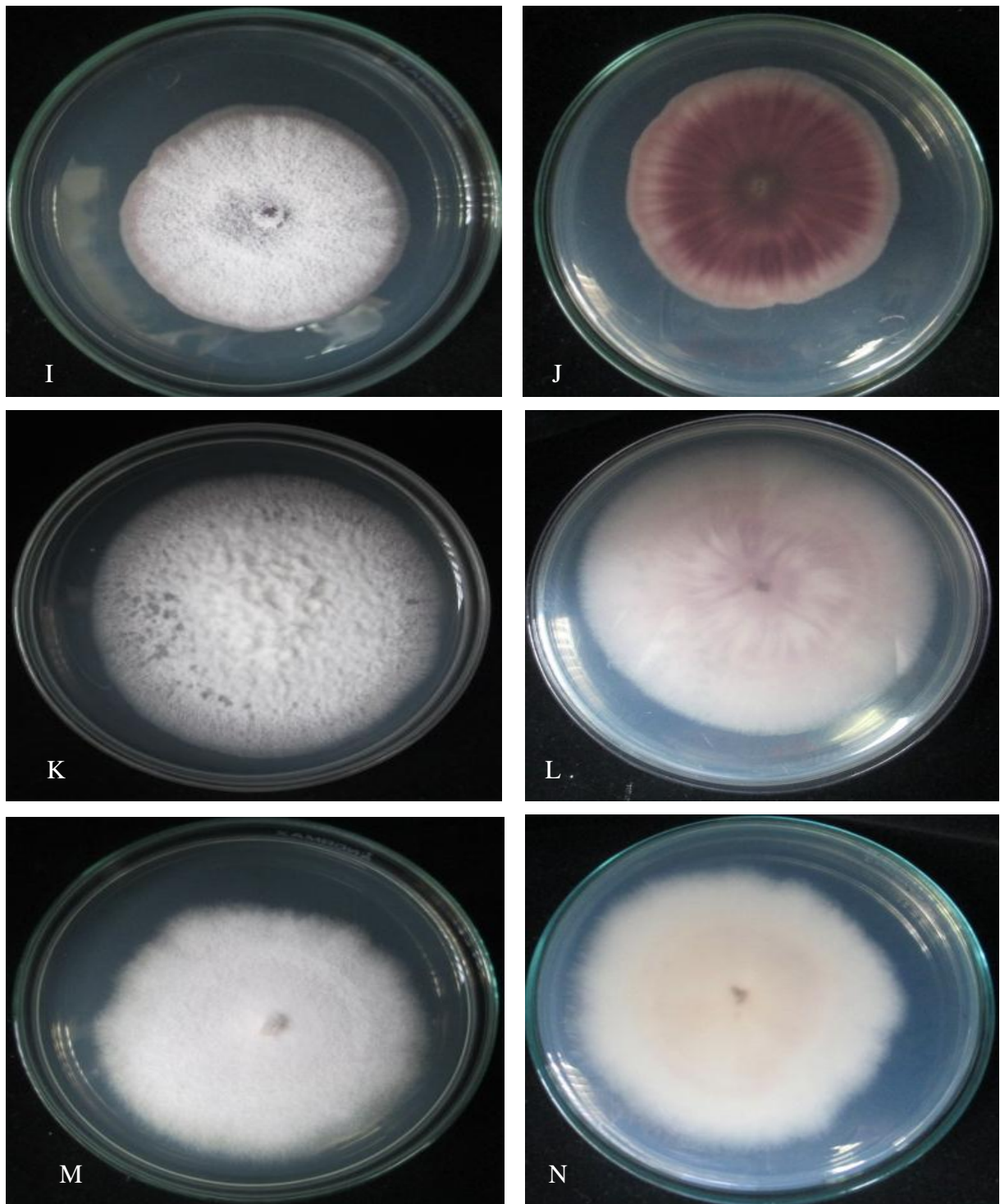


Figura 5. Colonia HEI 6 en medio PDA (I: colonia evaluada sobre de superficie, J: colonia evaluada bajo la superficie); colonia HEI 9 en medio PDA (K: colonia evaluada sobre de superficie, L: colonia evaluada bajo la superficie); colonia HEI 10 en medio PDA (M: colonia evaluada sobre de superficie, N: colonia evaluada bajo la superficie).

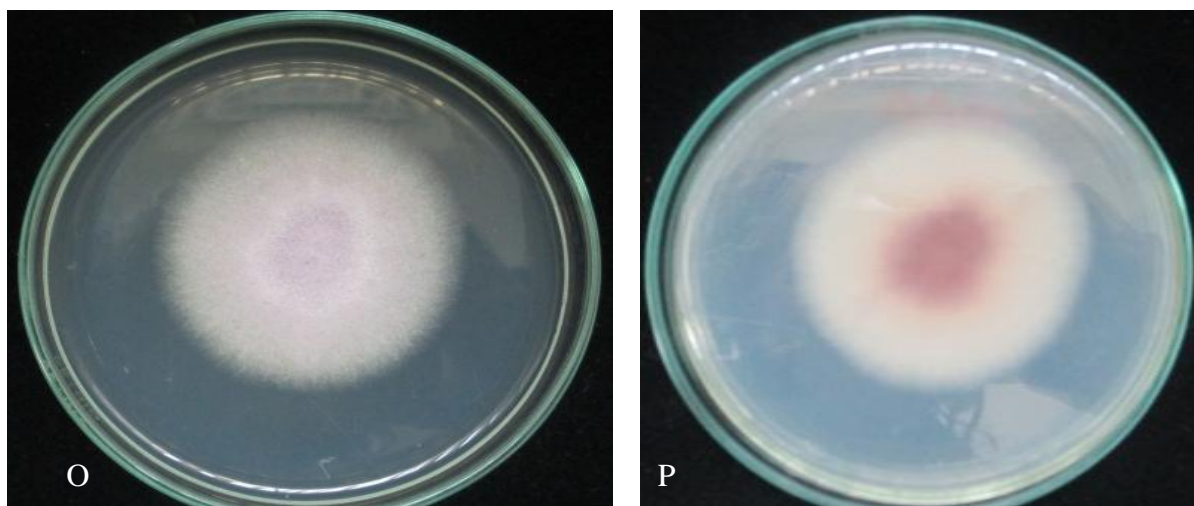


Figura 6. Colonia HEI 11 en medio PDA (O: colonia evaluada sobre de superficie, P: colonia evaluada bajo la superficie).

De acuerdo a las características microscópicas evaluadas después de 15 días de incubación, en los ocho aislamientos (HEI 1, HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, HEI 11) se observó la presencia de microconidias de forma oval a elíptica, cuyas mediciones oscilaron entre: 6.72 - 11.34 x 2.64 -3.48 μm , usualmente sin septas y en ocasiones solo presentó una septa. Las macroconidias obtuvieron mediciones desde 25.2 -29.28 x 3.58- 4.44 μm , con 3 a 5 septas; ligeramente curvadas con la presencia de una célula pie y las clamidosporas fueron simples a doble de diámetros de 6.86- 12.64 μm . (Tabla 8 y Figura 7).

Tabla 8: Mediciones de las estructuras de los ocho aislamientos HEI, identificados como *Fusarium oxysporum*.

Aislamiento	Microconidia		Macroconidia		clamidospora	
	Tamaño	septas	Tamaño	Septas	Diámetro	Descripción
HEI 1	11.34 x 3.48	0 a 1	26.46 X 3.84	3 a 4	10.985	Simple/Pares
HEI 2	6.72 x 2.64	0 a 1	27.36 x 4.44	3 a 5	8.905	Simple/pares
HEI 3	10.02 x 3.06	0	33.18 x 4.26	3 a 5	7.64	Simple/Pares
HEI 5	8.94 x 3.36	0 a 1	25.2 x 4.38	3 a 4	8.35	Simple/Pares
HEI 6	7.14 x 2.64	0 a 1	29.28 x 4.38	3 a 4	9.36	Simple
HEI 9	11.5 x 3.05	0 a 1	26.28 x 4.18	3 a 4	8.43	Simple/Pares
HEI 10	10.9 x 2.8	0 a 1	25.6 x 3.58	3 a 5	6.86	Simple
HEI 11	8.94 x 3.48	0	27 x 4.44	3 a 4	12.64	Simple

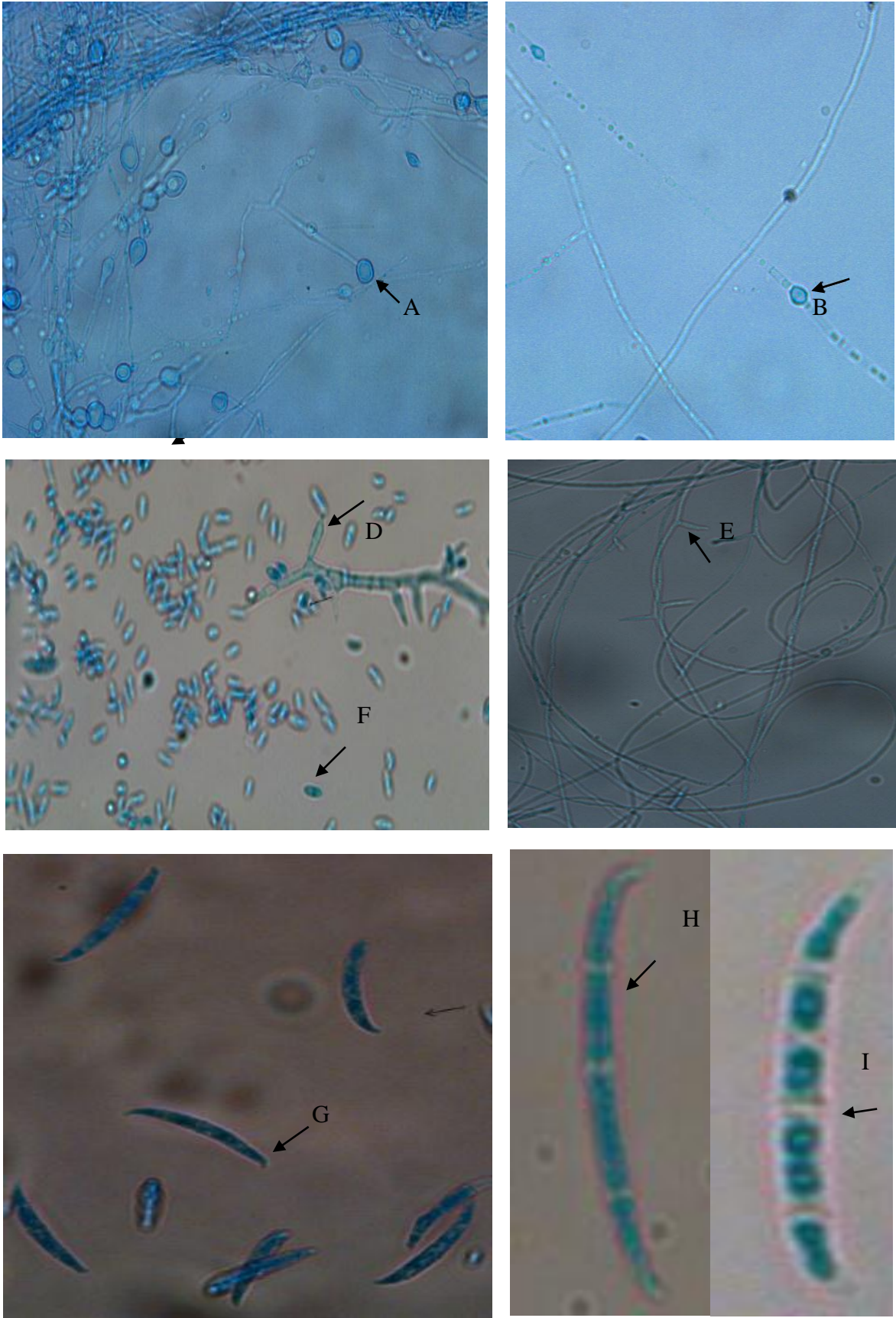


Figura 7. Características de estructuras de las colonias aisladas. A-B: Clamidospora; D-E: microconidioforo; F: Microconidias; G: Célula pie en macroconidias; H-I: macroconidias con 3 a 4 septas.

En nuestros aislamientos identificados como *F. oxysporum* se observaron variaciones en cuanto al color y crecimiento de las colonias, cultivadas en medio PDA. Estos resultados coinciden con la descripción de Arbeláez (2000) quien manifiesta que una de las dificultades encontradas para la identificación de especies de *F. oxysporum* es la frecuente variación observada en las características culturales de la colonia del hongo y en tamaño de las esporas. Así mismo, Waite (1960) atribuye que estas variaciones se deben a la presencia de muchos clones en *F. oxysporum* y la frecuente mutación en medio de cultivo PDA.

Sin embargo, se logró la identificación a nivel de especie; ya que las mediciones de las estructuras asexuales como: microconidias, macroconidias y clamidosporas coincidieron con los descriptores propuestos por Hoog (2000), Booth (1970) y Leslie y Summerell (2006) para la especie de *F. oxysporum*.

4.2. Extracción de ADN

El ADN de los aislamientos HEI obtenidas por el método de extracción propuesta por Saitoh *et al.* (2006) fue exitoso y puede ser visualizado en gel de agarosa al 0.8 %, para todos los aislamientos la cantidad del ADN osciló entre 51 a 86 ng /ul (Figura 8).

El protocolo de extracción de ADN empleado para nuestra investigación descrito por Saitoh *et al.* (2006) permitió obtener ADN de buena calidad y de una manera más rápida, a partir de una pequeña porción de agar con micelio (0.5 cm²) y no fue necesario emplear nitrógeno líquido.

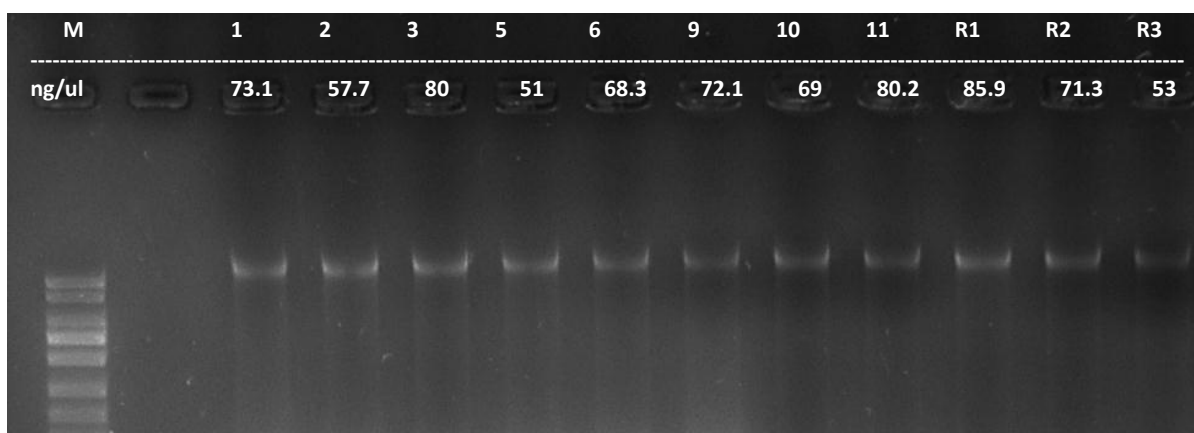


Figura 8. M: λ DNA Hind loader; Línea 1,2,3,5,6,9,10,11, aislamientos evaluados HEI 1, HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, HEI11, respectivamente; Línea R1, R2, R3, Razas 1,2,3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; respectivamente.

4.3. Reacción de la cadena de la polimerasa

4.3.1. PCR de la región Intergénica del ADN r (IGS)

En todos los aislamientos se logró amplificar la región IGS con el uso de los primers FIGS11 y FIGS12, los productos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% observándose una única banda de alrededor de 600 pares de bases, como se puede apreciar en la Figura 9. Esto indicaría que todos los aislamientos evaluados pertenecen a *F. oxysporum*, confirmando la caracterización morfológica; ya que en investigaciones realizadas por Balogun *et al.* (2008), Inami *et al.* (2014); Kawabe *et al.* (2005) han demostrado el uso exitoso de dichos primers para identificación de *Fusarium oxysporum*.

Debido a que las regiones IGS son regiones espaciadoras que separan unidades repetitivas de ADN ribosomal que evolucionan muy rápido; es útil para inferir filogenia entre taxones cercanamente relacionados. Es decir, esta región se emplea para caracterización y discriminación de especies de hongos (Bravo, 2013; Keigo Inami *et al.*, 2010; Kawabe *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2014; Mohamed *et al.*, 2015; Otero, Ducasse, & Miller, 2004). Las especies estrechamente relacionadas pueden mostrar una considerable diversidad en la región IGS, manifestándose en variaciones frecuentes en cuanto a longitud y secuencia; lo que permite la diferenciación entre especies cercanas genéticamente relacionadas (Appel & Gordon, 1995; Gómez, 2008). Así mismo, Kawabe *et al.* (2005) demostró la utilidad de la secuencia IGS en la clasificación de variaciones moleculares dentro de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

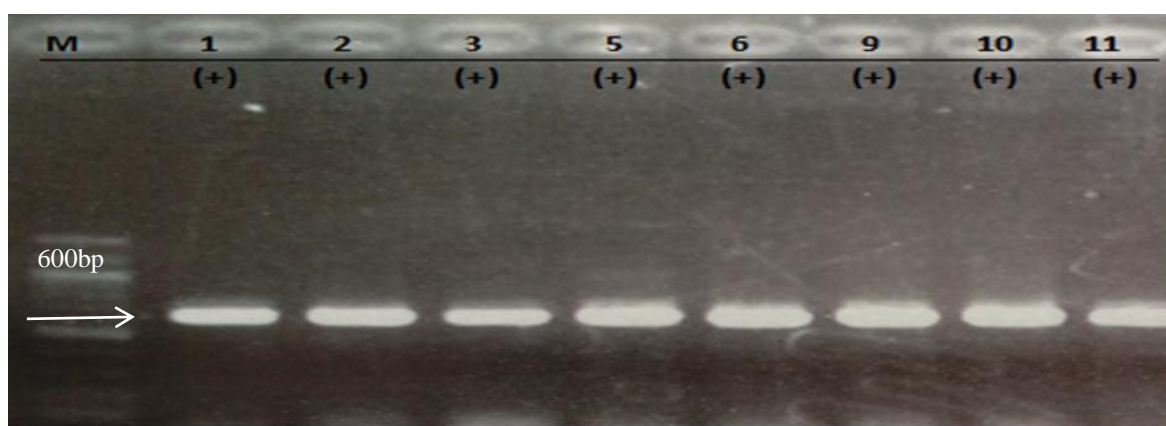


Figura 9. Identificación de *F. oxysporum*, mediante PCR de la región IGS empleando los primers FIGS11/FIGS12. M: Marcador; 1,2,3,5,6,9,10,11 son aislamientos HEI de Perú.

4.3.2. Análisis Filogenético de la Región IGS

Se realizó la construcción filogenética de la región IGS del ADN r (Figura 10) mediante el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2015) por el método de Neighbor-Joining (NJ) elaborado a partir de los alineamientos obtenidos de la región IGS de los aislamientos y de las secuencias obtenidas de formas especiales de *F. oxysporum* que fueron tomados de la base de datos NCBI, con una prueba de bootstrap (1000 réplicas) para evaluar el soporte de agrupaciones. Se observó un ordenamiento de los ocho aislamientos (Tabla 1) dentro del grupo perteneciente a *F. oxysporum* pero separadas de *Gibberella fujikuroi* (FGSC 7610), especie que es empleada como grupo externo en muchas de las investigaciones de filogenia de *F. oxysporum* (Kawabe *et al.*, 2005). Corroborando así la identidad de nuestros aislamientos a nivel de especie.

En el árbol filogenético también se puede apreciar que hay un reagrupamiento dentro de la forma especial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a partir del cual se podría inferir que existe una variabilidad genética en la región de los espacios intergénicos; de igual manera, en el caso de nuestros aislamientos es posible observar que se encuentran separados entre sí, lo cual podría demostrar la existencia de polimorfismo en las secuencias de IGS evaluadas. Ya que, según Silva *et al.* (2014) y Alanis-martínez *et al.* (2015), las cepas de las formas especiales de *F. oxysporum* pueden tener una información genética muy distinta atribuida a su origen polifilético.

Con respecto a los aislamientos HEI 1 y HEI 3, éstos fueron agrupados dentro del clado 1 y HEI 2, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, HEI 11 se encuentran entre los clado 2 y clado 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* dentro de la filogenia IGS. Cabe resaltar que todos los aislamientos de Fol hasta ahora estudiados pertenecen a uno de los tres clados (A1-A3); lo que sugiere una relación polifilética con al menos 3 orígenes. No existe ninguna relación entre las razas de Fol y los clados; es decir, el agrupamiento de los aislamientos a nivel de clado no indica la patogenicidad del aislamiento, solo refiere al grado de cercanía en relación con los Fol y otros *F. oxysporum* no patogénicos u otras especies de *Fusarium* (Appel & Gordon, 1995; Kawabe *et al.*, 2005). Sin embargo, particularmente para este estudio se realizó comparación de las secuencias nucleotídicas con las secuencias de los Fol procedentes de Japón, por la cual se mantiene la relación en la que las razas 1 de Fol pertenecen al clado 2, las razas 2 de Fol pertenecen al clado 1 y las razas 3 de Fol pertenecen al clado 3 a excepción de Kochi-1 que está ubicado en el Clado 2 (Inami *et al.*, 2014; Kawabe *et al.*, 2005).

Al encontrarse nuestros aislamientos muy cercanamente relacionados con los *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* no se puede asociar a que sean patogénicos o no patogénicos; porque según Mes *et al.* (1999) mencionado por Kawabe *et al.* (2005), en las colecciones de Fol no se ha encontrado una relación entre las razas y grupos polifiléticos reportados. Así mismo, Arie (2010) tiene como hipótesis que los *F. oxysporum* no patogénicos dieron origen a Fol durante su asociación saprofítica con el tomate después del inicio de la domesticación y la actividad de elementos móviles en el genoma de *F. oxysporum* lo que pudo contribuir a la emergencia de Fol y a su diversidad patogénica. Además, Inami *et al.* (2014) reportó aislamientos de *F. oxysporum* no patogénicos aislados de tomate provenientes de los Andes de Perú que fueron agrupados dentro de clados A1, A2 y A3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* lo que sugiere que podrían ser ancestros de común de Fol.

Se ha reportado que la región IGS no brinda precisión al detectar formas especiales, debido a que los determinantes de la especificidad del hospedante puede transferirse horizontalmente entre cepas de *F. oxysporum* de diferentes linajes. Este intercambio genético hace que sea difícil desarrollar primers para la detección específica de una forma especial dada. Por ello, los marcadores moleculares basados en los determinantes genéticos de la patogenicidad son promisorios para distinguir la forma especial (Silva *et al.*, 2014; Van Der Does *et al.*, 2008)

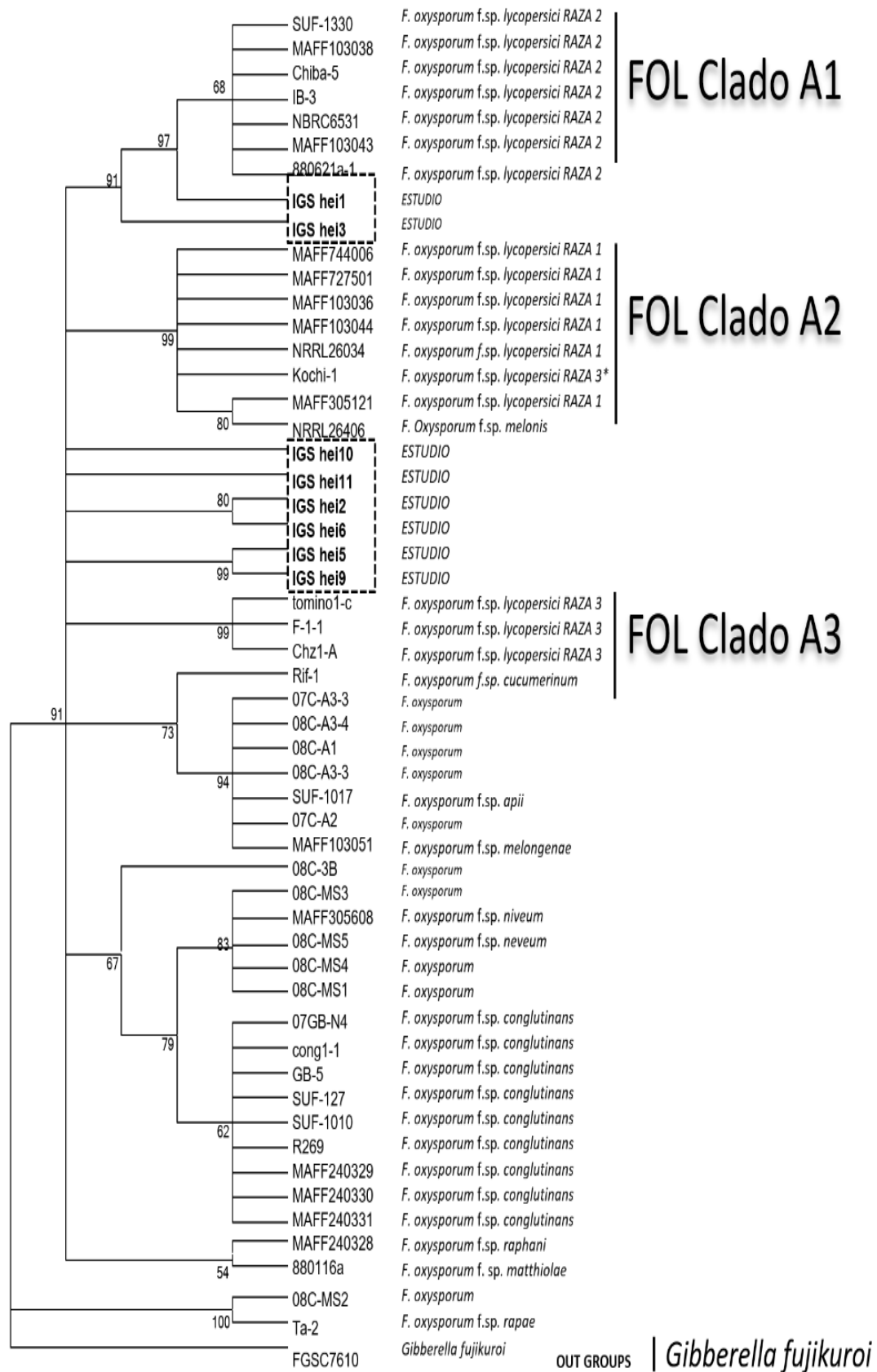


Figura 10: Análisis filogenético de espacios intergénicos (IGS) de secuencias nucleotídicas de *F. oxysporum* donde se observa la agrupación en clados pertenecientes a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

4.3.3. PCR para detección de genes de Avirulencia (gen SIX)

De acuerdo a los resultados obtenidos, HEI 11 es el único aislamiento que evidenció los tres genes de avirulencia (AVR1, AVR2 y AVR3). En la Figura 11, se observa el producto de amplificación del gen de avirulencia AVR1 (=SIX 4) y su tamaño fue similar al control positivo R1 (raza 1). Además, en la Figura 12 se observa la amplificación del gen de avirulencia AVR2 (=SIX 3), el cual mostró un producto amplificado similar a los controles positivos R1, R2 (raza 2), R3 (raza 3). Y, por último, en la Figura 13, se observa el producto de amplificación para el gen de avirulencia AVR3 (=SIX 1) y similar a los controles positivos R1, R2 y R3. Para los otros aislamientos HEI 1, HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, se observaron productos de amplificación solo para el gen AVR2; sin embargo, los tamaños fueron diferentes a los controles positivos.

Al comparar las secuencias de los genes SIX 4, SIX 3, SIX 1 obtenidos del aislamiento HEI 11, mediante un análisis de alineamiento de secuencias usando el programa BLAST (Anexo 2, 3 y 4), se confirmó su alto grado de identidad con los genes SIX reportados para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con un porcentaje de identidad de 100%, 99% y 98% respectivamente tal como se muestra en la Tabla 9.

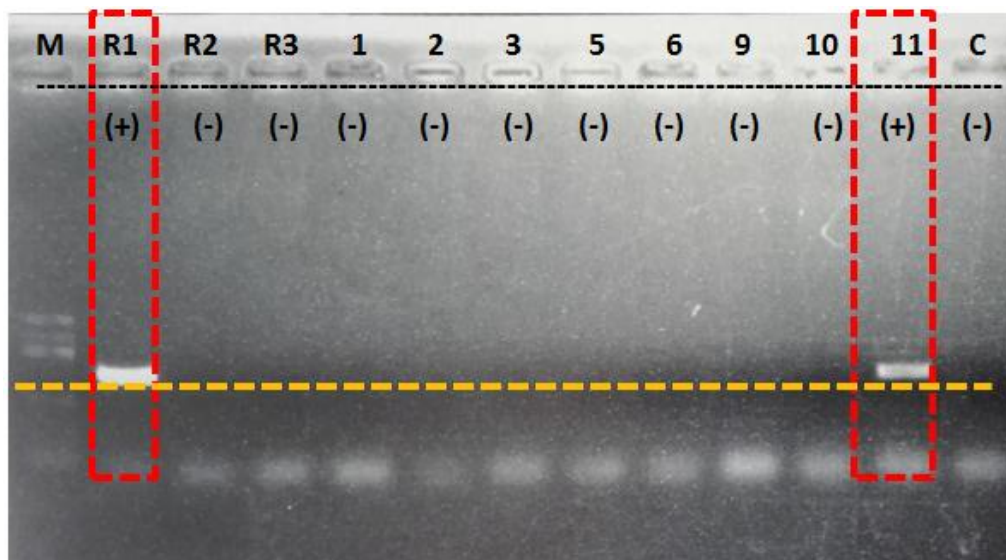


Figura 11: Producto de PCR obtenido a partir de ADN obtenido de micelio puro con los primer SIX 4F1/SIX 4 R1. Línea R1: Raza 1, Línea R2: Raza 2, Línea R3: Raza 3, controles positivos; Línea 1,2,3,5,6,9,10,11 Aislamientos de Perú; Línea C: control negativo.

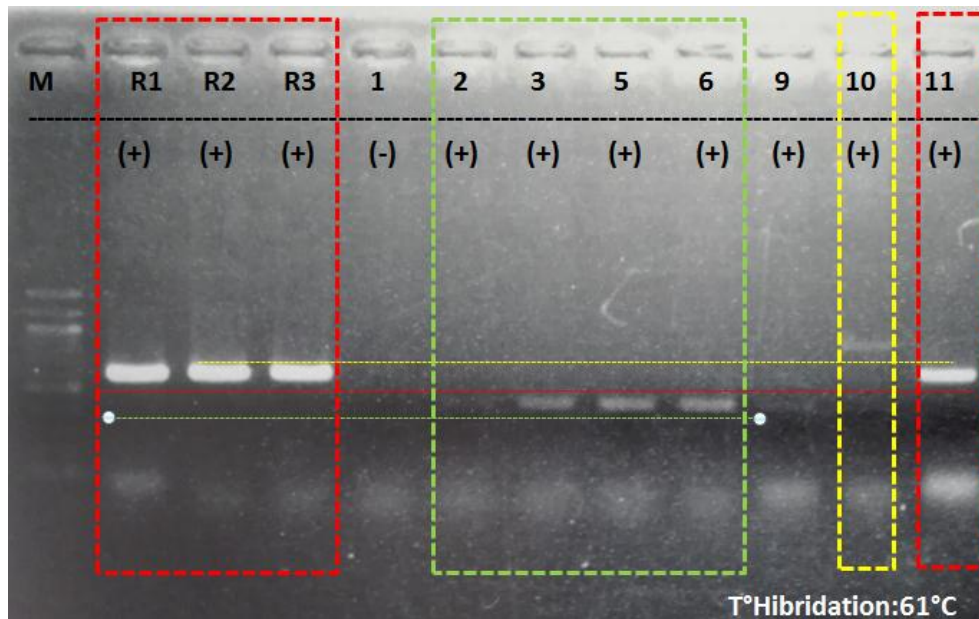


Figura 12: Producto de PCR obtenido a partir de ADN obtenido de micelio puro con los primer SIX 3 F1/R2. Línea R1: Raza1, Línea R2: Raza 2, Línea R3: Raza 3, controles positivos; Línea 1,2,3,5,6,9,10,11 Aislamientos de Perú.

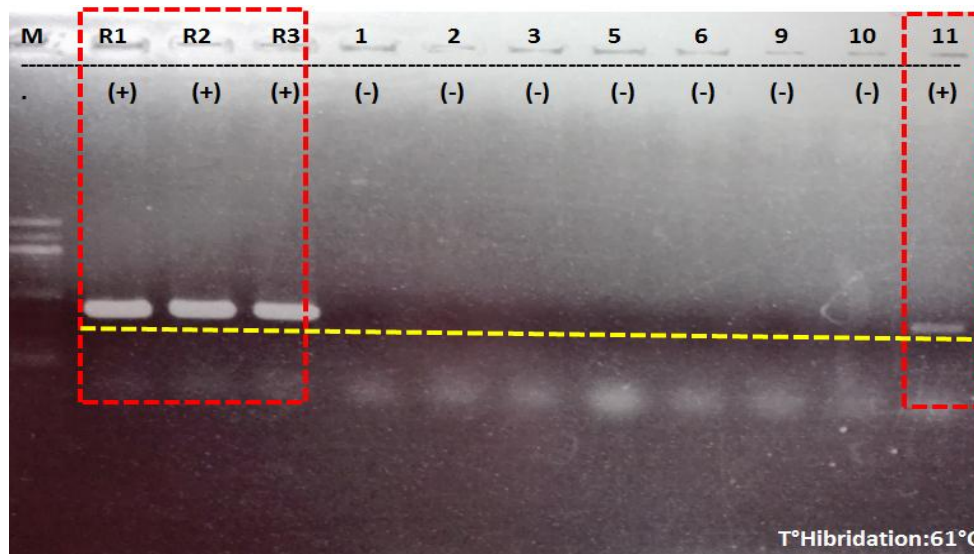


Figura 13:Producto de PCR obtenido a partir de ADN obtenido de micelio puro con los primer P12 F2/P 12 R1/. Línea R1: Raza1, Línea R2: Raza 2, Línea R3: Raza 3, controles positivos; Línea 1,2,3,5,6,9,10,11 Aislamientos de Perú.

Tabla 9: Resultados del análisis BLAST de las secuencias nucleotídicas de los genes de avirulencia (SIX4, SIX3, SIX1) del aislamiento HEI 11.

Iniciadores	Identidad	Cobertura	E value	Max. Identidad
SIX 4 R1/F1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> gen SIX4	99%	0	100%
SIX 3 R2/F1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> gen SIX3	91%	0	99%
P12 R1/F2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> gen SIX1	97%	1e-174	98%

Las proteínas efectoras en hongos son secretadas dentro del espacio extracelular, las cuales pueden actuar a este nivel o pueden ser absorbidos por las células de la planta e interactuar con objetivos intracelulares (Houterman *et al.*, 2007). Ese juego de proteína efectoras, determina la virulencia de un patógeno hacia un hospedante en particular (González *et al.*, 2012). Para el caso de las proteínas relacionadas a la patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Rep *et al.* (2003) describen que se encuentran acumuladas en la savia del xilema tras la infección y éstos promueven la virulencia de este patógeno hacia el tomate. Entre ellos se reportaron 3 genes de avirulencia AVR1 (=SIX4), AVR2 (=SIX 3) y AVR3 (=SIX 1). Por lo que, las razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pueden ser determinadas por la combinación de estos genes AVR (Inami *et al.*, 2012). Por lo tanto, se puede inferir que la amplificación de los genes de avirulencia en el aislamiento HEI 11, indicarían que su identidad corresponde a *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*; ya que, numerosas investigaciones, reportan estos genes SIX 1, SIX 3, SIX 4 como parte exclusiva de aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y no en otras formas especiales o aislamientos no patogénicos (Lievens *et al.*, 2009).

Asimismo, los resultados obtenidos indicarían que solo el aislamiento HEI 11 pertenecería a la raza 1; ya que, fue el único aislamiento que amplificó el gen de avirulencia AVR1, que solo es detectado en la raza 1 y no en la raza 2 o raza 3 (Houterman *et al.*, 2009; Inami *et al.*, 2014). Además, amplificaron los genes de avirulencia AVR 2 y AVR3. Inami *et al.* (2012) describe que basados en los genes AVR, la presencia de los tres genes de avirulencia: AVR1 (SIX4), AVR 2 (SIX 3) y AVR 3(SIX 1) corresponden a la Raza 1 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Sin embargo, en los aislamientos HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9 y HEI 10 se observó una banda de amplificación para el AVR2 (=SIX 3) (Figura 12), cuyo tamaño difiere a los controles positivos; así mismo, no se evidenció producto del gen de avirulencia AVR3 (=SIX1). Houterman *et al.* (2009) e Inami *et al.* (2012) describen que la raza 2 contiene una secuencia idéntica al AVR 2 de la raza 1 y, para el caso de la raza 3 la secuencia del AVR 2 solo difiere en puntos únicos de mutación, que son tres sustituciones de nucleótidos (G121A, G134 A, G137 C), cuya nomenclatura es avr2. Además, Inami *et al.* (2012) menciona que la raza 2, carece de AVR1, pero posee AVR2 y AVR3 y en el caso de la raza 3, carece de AVR1, pero posee la avr2 y AVR3. Por lo tanto, se descartaría que alguna de estos aislamientos pertenecen alguna de las dos razas.

4.3.4. PCR para detección de genes de la poligalacturonasa de *Fusarium oxysporum*

En la Figura 14 se puede observar que el aislamiento HEI 11 logró amplificar para el juego de primer Uni (672bp) con igual tamaño de banda con respecto a los controles positivos R1, R2, y R3. Así también, amplificó para el set de primers sp13 (445bp) y no se evidenció ningún producto amplificado para el set de primers sp23.

Los resultados de la amplificación del aislamiento HEI 11 con el conjunto de primers: Uni, sp13, sp23 fue colocado en la tabla 10 y se comparó con patrones moleculares de razas de Fol obtenidos por Hirano y Arie (2006).

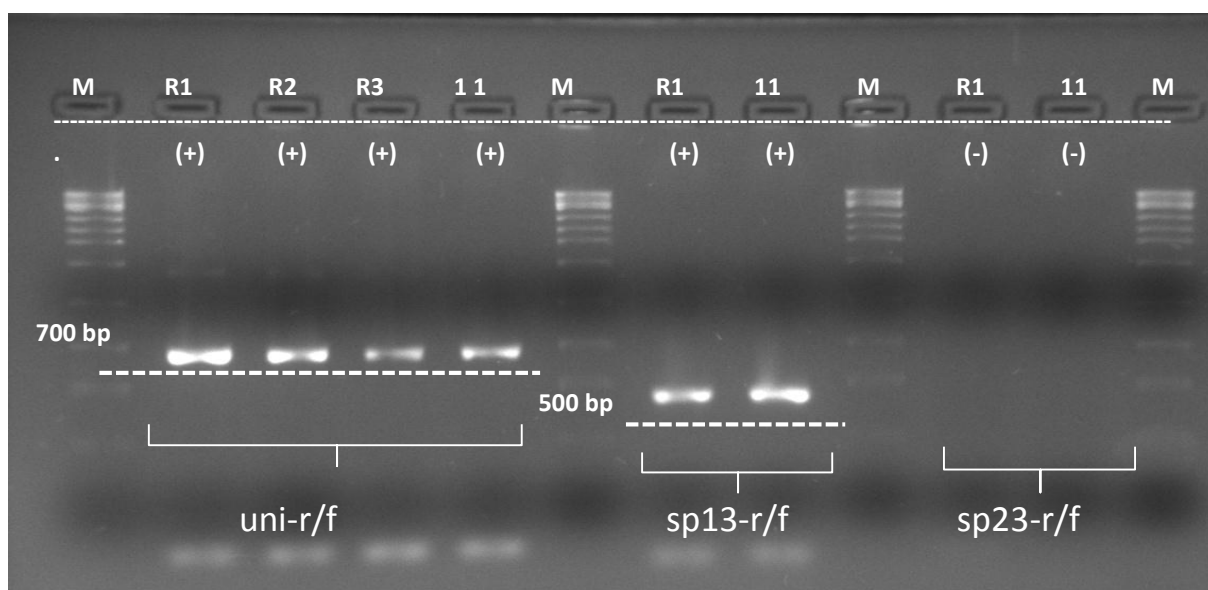


Figura 14. Electroforesis de productos de PCR usando juego de primers Uni (672 bp), sp13 (445 bp), sp23 (518bp) para el aislamiento HEI 11.

Tabla 10 . Comparación del aislamiento HEI 11 con respecto a la evaluación de la identificación de *F. oxysporum* (razas Fol) en base a los resultados de la PCR con conjuntos de primers específicos realizados por Hirano y Arie (2006).

AISLAMIENTOS	Set de primer			Descripción
	Uni	Sp13	Sp23	
Fol RAZA 1	+	+	-	Razas de Fol descritas por
Fol RAZA 2	+	-	+	Hirano y Arie (2006)
Fol RAZA 3	+	+	+	Con set de primers
HEI 11	+	+	-	Aislamiento en evaluación

Debido a que las poligalacturonasas (PGs) son las primeras enzimas producidas cuando entra en contacto con el hospedante (Jones *et al.*, 1972 citado por Bravo, 2013) juegan un papel importante en el desarrollo de la infección al menos en dos fases: penetración de la corteza de la raíz, con el fin de alcanzar el sistema vascular; y colonización y difusión del hongo hacia la parte superior a través de los vasos del xilema (Beckman 1987 citado por Bravo 2013). Por lo que, Hirano y Arie (2006) diseñaron primers específicos a partir de secuencias nucleotídicas parciales de genes como la endopoligalacturonas (pg 1) y exopoligalacturonasas (pgx 4) de aislamientos de Fol y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* que fueron: Uni, sp13, sp23, sprl que permitieron la confirmación del aislamiento HEI 11 como raza 1 de Fol.

El juego de primer Uni (672bp) amplificó un producto con un mismo tamaño de banda con respecto a los controles positivos R1, R2, y R3, confirmando la presencia de *F. oxysporum*. Además, amplificó para el set de primers sp13 (445bp), el cual indica que el aislamiento HEI 11, pueda pertenecer a la raza 1 o raza 3; sin embargo, al no amplificar con el juego de primer sp23 (518 bp), el cual sólo amplifica para raza 2 o raza 3, se descartó que el aislamiento HEI 11, pueda pertenecer a la raza 3. Con lo que se valida que, a nivel molecular el aislamiento HEI 11 pertenece a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1. Dicha combinación de set de primers han resultado exitosos para diferenciar los tipos patogénicos de Fol en investigaciones realizadas por Baysal et al. (2009), Çolak & Bıçlıcı (2013) y Kawabe et al. (2005)

4.4. Prueba de patogenicidad

Todos los aislamientos brindados por la Clínica de diagnóstico de fitopatología aislados a partir de plantas de tomate produjeron colonias con características morfológicas y moleculares propias de *F. oxysporum*. Sin embargo, de estos aislamientos solo el aislamiento HEI 11 causó los síntomas característicos de la marchitez vascular producidas por Fol en el cultivar susceptible (Ponderosa), observándose en la segunda semana después de la inoculación, una ligera decoloración a nivel de las venaciones de las hojas, amarillamiento en las hojas basales y epinastia. En la tercera semana, se pudo observar síntomas como marchitez y muerte total de la planta. A la cuarta semana, en la última evaluación, se observó pequeñas lesiones a nivel del cuello de la planta; además al realizar el corte a nivel de cuello se pudo notar una decoloración vascular solo en los controles positivos y en el aislamiento HEI 11 (Figura 15,16,17 y 18). Fue posible apreciar estos síntomas a una temperatura promedio de 31 °C. Sin embargo, cuando las temperaturas en los meses de mayo a junio fueron de 21°C la sintomatología no fue evidenciada en ningún aislamiento.

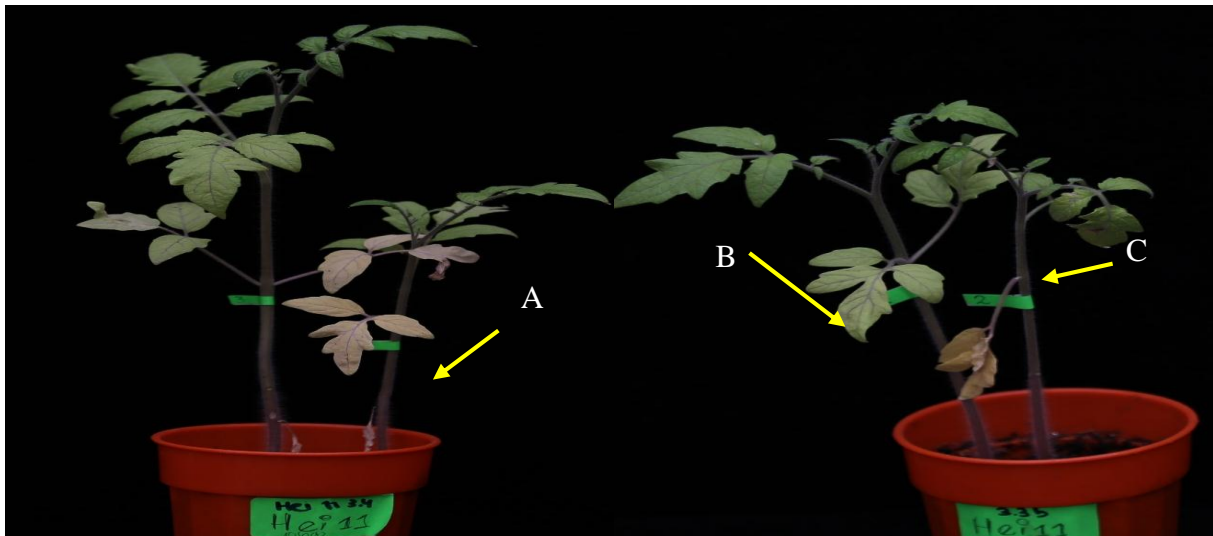


Figura 15. Síntomas presentados en la segunda semana de evaluación en la prueba de patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate, A: Amarillamiento de hojas basales; B: Decoloración en venaciones; C: Epinastia.

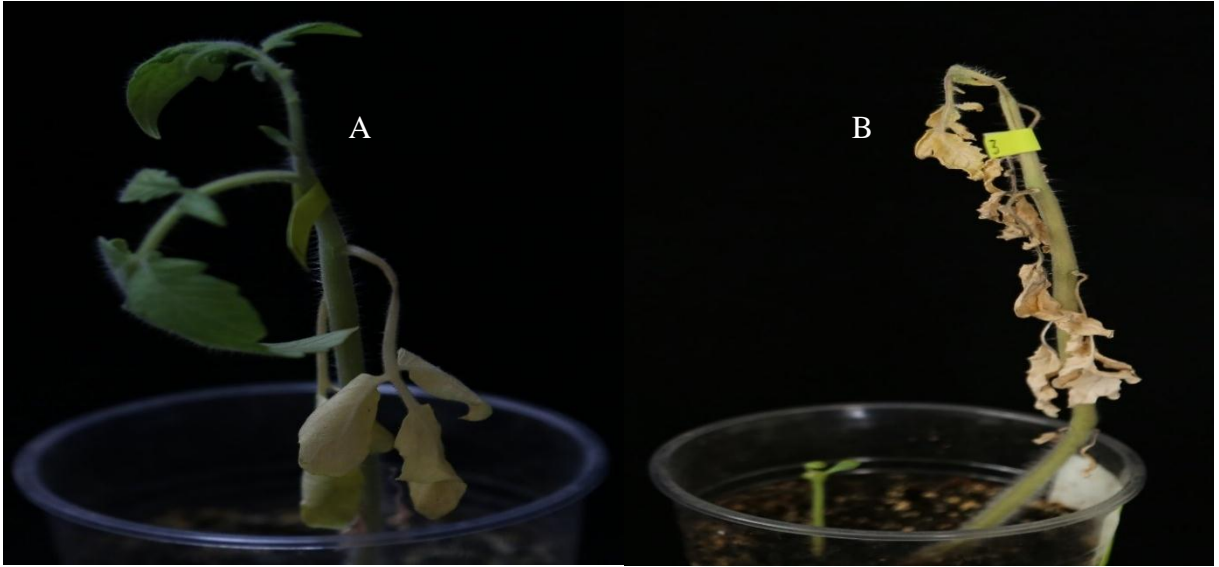


Figura 16. Síntomas presentados a la tercera semana de evaluación, en la prueba de patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate, A: Marchitez; B: Muerte total de la planta.

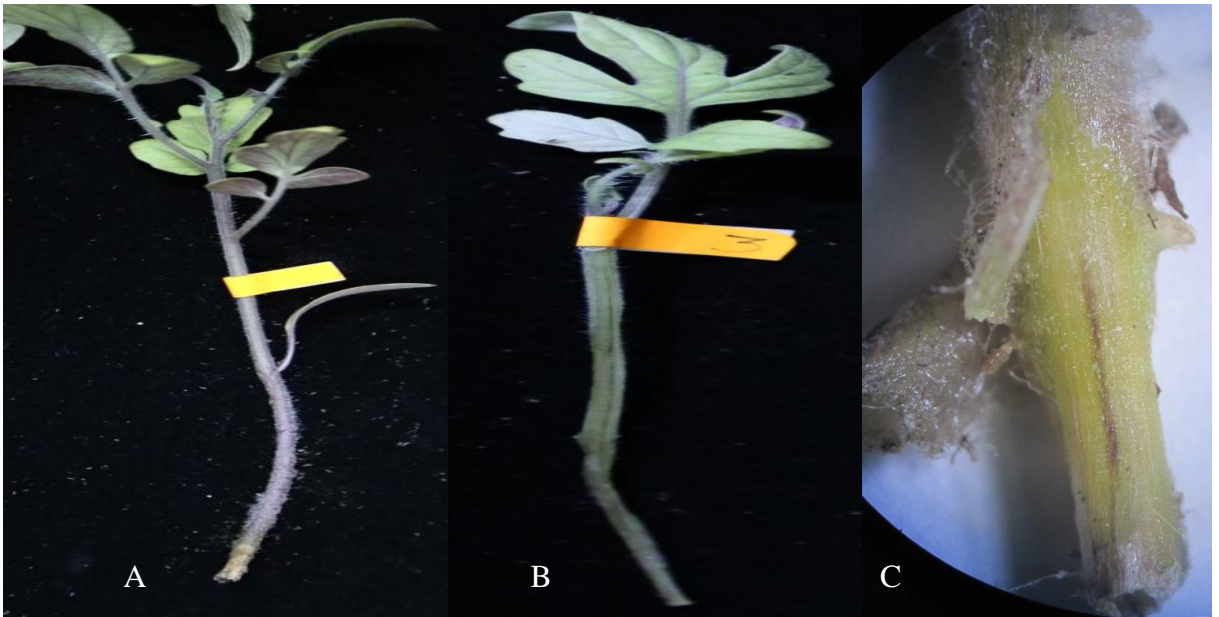


Figura 17. Síntomas presentados a la cuarta semana de evaluación, en la prueba de patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate, A: daño a nivel de cuello y B-C: decoloración vascular.



Figura 18: Sintomatología evaluada en el cultivar ponderosa a la cuarta semana de inoculación con los aislamientos. Testigo, no existe daño a nivel de cuello; Raza 1, un ligero daño y muerte total de la planta y HEI 11, daño a nivel de cuello y un ligero amarillamiento en hojas basales.

En la tabla 11 se muestra el comportamiento de patogenicidad del aislamiento HEI 11 frente a los cultivares diferenciales, solo el cultivar Ponderosa mostró susceptibilidad al igual que los controles positivos R1, R2 y R3. Sin embargo, no se observó sintomatología en el cultivar Momotaro, resistente solo a la Raza 1; en el cultivar Momotaro 8, resistente a las razas 2 y raza 3; ni tampoco en el cultivar Block, resistente a todas las razas (Tabla 11). Además, en el análisis estadístico para estos tres últimos cultivares diferenciales, el aislamiento HEI 11 no mostró diferencia estadística significativa con la raza 1 (Figura 19 y Anexo 5).

Tabla 11: Identificación de la raza del aislamiento HEI 11 inoculados en cultivares diferenciales (Ponderosa, Momotaro, Momotaro 8 y Ponderosa).

CULTI	HEI11	R1	R2	R3
POND	S	S	S	S
MOMO	R	R	S	S
MOMO 8	R	R	R	S
BLOCK	R	R	R	R

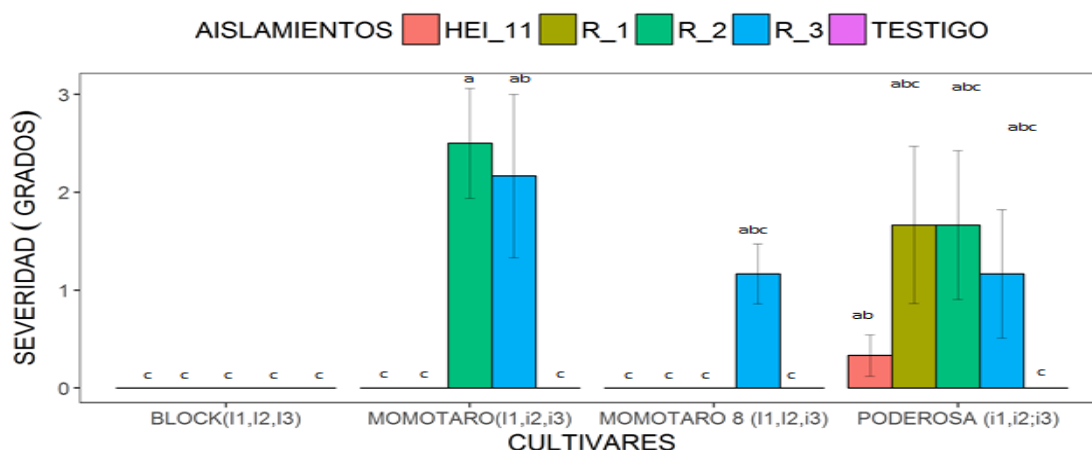


Figura 19. Severidad del aislamiento HEI 11 y controles positivos de las tres a razas (R1, R2 y R3) de Fol frente a cuatro cultivares diferenciales de tomate.

Las sintomatologías observada del aislamiento HEI 11 en el cultivar Ponderosa concuerda con lo descrito por Walker (1971) para los síntomas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* dentro de un invernadero, los cuales comienzan con una ligera decoloración a nivel de las nervaduras de las hojas, seguido de un decaimiento del peciolo (epinastia) y con un amarillamiento que comienza con las hojas basales y avanzan sucesivamente sobre las hojas jóvenes seguida de una marchitez y pardeamiento de las células vasculares. Por lo cual, se puede inferir que el aislamiento HEI 11 logró infectar a nivel vascular al cultivar susceptible; ya que según Negrete (2013) indica que al desarrollarse el patógeno dentro del sistema vascular de la planta se produce una obstrucción y destrucción de los vasos en especial el xilema de manera que el transporte del agua y nutrientes se dificulta, lo que conduce al marchitamiento parcial o total de la planta.

Walker (1971) menciona que el grado de aparición y desarrollo de la sintomatología es afectado principalmente por dos factores: La temperatura del aire y la temperatura del suelo. Lo que tuvo mucha relación con nuestros resultados; ya que, en condiciones de otoño bajaron las temperaturas, llegando a ser en promedio 21.2 °C, en este ambiente el aislamiento HEI 11, no mostró sintomatología característica durante este tiempo de evaluación. Sin embargo, con las temperaturas del mes de abril (temperaturas promedio de 30.5°C) las plantas se mostraron susceptibles al aislamiento HEI 11, manifestando la sintomatología característica en el cultivar Ponderosa, lo que corrobora que las temperaturas juegan un papel importante para la predisposición de las plantas al ataque del patógeno.

La sintomatología manifestada por daño a nivel de cuello puede deberse a que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* contienen en su genoma un complejo sistema lipolítico extracelular que

contiene flexibilidad para hidrolizar compuestos lipídicos. Así mismo, contiene en su genoma una familia de genes endo y exo poligalacturonasas que las refieren como *pg1*, *pgx4*, *pg 5* y *pgx6* y éstas le podrían aportar flexibilidad para hidrolizar pectina (Bravo, 2013). En el estudio porciones parciales de los genes *pg1* y *pg4* pudieron ser detectados en el aislamiento HEI 11, así como su sintomatología en la prueba de patogenicidad.

Para los aislamientos HEI 1, HEI 2, HEI 3, HEI 5, HEI 6, HEI 9, HEI 10, si bien éstos fueron obtenidos de tomate. Sin embargo, no mostraron síntomas en el cultivar susceptible a las tres razas ni en ningún otro cultivar; por lo que fueron descartadas a pertenecer a razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, este resultado se pudo corroborar con las pruebas moleculares. Aunque, estos aislamientos son capaces de parasitar plantas de tomate, ya que fueron aislados de este cultivo; no obstante, el análisis molecular de los genes de avirulencia demostraron que carecen de genes de patogenicidad que les permita causar síntomas en el cultivar susceptible. Similares resultados fueron obtenidos en 10 aislamientos de *F. oxysporum* aislados de tomate procedentes de México (Negrete, 2013). Algunas investigaciones manifiestan que estos *F. oxysporum* no patogénicos pero que han sido aislados de tomate pudieron dar lugar a los *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* patogénicos durante su asociación saprofítica en el inicio de la domesticación del tomate (Arie, 2010).

El ensayo en invernadero mostró la importancia del contenido de genes de resistencia dentro de los cultivares de tomate frente a las razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, basado sobre la hipótesis de gen por gen, esto refiere que la resistencia a la enfermedad está conferida por genes R, los cuales manifiestan su efecto protector cuando reconocen a su respectivo gen de avirulencia (AVR) en tomates (Houterman *et al.*, 2008). Por lo que, en la prueba de patogenicidad la determinación del aislamiento HEI 11 como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1, fue establecida cuando éste, mostró síntomas en el cultivar que carecía de genes de resistencia (Ponderosa) y no se evidenció síntomas en los cultivares: Momotaro (I, i2,i3), Momotaro 8 (I,I2,i3) y Block (I, I2,I3); los cuales poseían genes de resistencia I (Balogun *et al.*, 2008; Inami *et al.*, 2012; Negrete, 2013). Así mismo, en base al análisis molecular se demostró que el aislamiento HEI 11 posee los genes de avirulencia (AVR1, AVR2, AVR3), los cuales pudieron ser reconocidos por al menos uno de los genes de resistencia, estableciéndose una relación incompatible entre el patógeno y el hospedante evidenciándose en la ausencia de la enfermedad en los cultivares resistentes. Por el contrario, en el cultivar susceptible al no poseer genes de resistencia se estableció una relación compatible, es decir presencia de la enfermedad.

V. CONCLUSIONES

- Los resultados indican que las pruebas moleculares son herramientas útiles para la determinación de *F. oxysporum* patogénicos y no patogénicos, presentes en cultivos de tomate.
- La amplificación de la región IGS no permite identificar a nivel de patogenicidad en los aislamientos. Sin embargo, los análisis filogenéticos basados sobre esta región permitieron agrupar nuestros aislamientos dentro de *F. oxysporum*, validando la identificación morfológica.
- La identificación de razas Fol mediante la PCR, empleando los sets de primers: SIX 4 F1/R1, SIX 3 F1/R2 y P12 R1/F1, amplificaron solo en el aislamiento HEI 11 para los genes SIX4 (AVR1), SIX 3 (AVR2) y SIX 1 (AVR3) respectivamente. Así mismo el uso de primers diseñados a partir de la porción de la región poligalacturonasa: Uni r/f, sp13 r/f, sp23 r/f, permitieron determinar que el aislamiento HEI 11 pertenece a la raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- Los cultivares diferenciales permitieron corroborar la identidad del aislamiento HEI 11 como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1.

VI. RECOMENDACION

Las pruebas moleculares son técnicas modernas que facilitan la identificación de patógenos; sin embargo, es importante tener en cuenta que deben considerarse como parte complementaria a los análisis que cumplan los postulados de Koch. Ya que, son herramientas para agilizar temas de diagnóstico.

Los trabajos en invernaderos con el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* deberán realizarse en épocas de temperaturas cálidas a calurosas y si es posible realizar el experimento en invernaderos con ambiente controlado. Ya que, la temperatura es uno de los factores importante para la presencia de la sintomatología.

Es importante continuar con investigaciones enfocados en los genes de avirulencia y otros genes relacionados a la patogenicidad; ya que son éstos los que nos proporcionan información útil en la determinación del agente causal de la enfermedad en un determinado cultivo.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Agrios, G. 1996. *Fitopatología*. (Segunda, Ed.) (Limusa). Mexico.
- Alanis-martínez, I., Medina-mendoza, C., Marbán-mendoza, N., & Valadez-moctezuma, E. 2015. Técnicas moleculares clásicas para la diferenciación de formas especiales de *Fusarium oxysporum*, 42, 1-7.
- Ames de Icochea, T. 2004. *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. International Potato Center.
- Appel, D., & Gordon, T. 1995. Intraspecific Variation within Populations of *Fusarium oxysporum* Based on RFLP Analysis of the Intergenic Spacer Region of the rDNA. *Experimental Mycology*. Recuperado de <https://doi.org/10.1006/emyc.1995.1014>
- Arbeláez, G. 2000. Aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17, 11-22.
- Arie, T. 2010. Phylogeny and phytopathogenicity mechanisms of soilborne *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Plant Pathology*, 76(6), 403-405. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0264-z>
- Balogun, O. , Hirano, Y., Teraoka, T., & Arie, T. 2008. PCR-based analysis of disease in tomato singly or mixed inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersid races 1 and 2. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(1), 50-60.
- Baysal, Ö., Siragusa, M., Ikten, H., Polat, I., Gümürkücü, E., Yigit, F., Carimi, F., Teixeira da Silva, J. A. 2009. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 68-75. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.09.008>

Birch, P., Boevink, P., Gilroy, E., Hein, I., Pritchard, L., & Whisson, S. 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 373-379. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.005>

Black, W., Mastenbroek, C., Mills, W. , & Peterson, L. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica*, 2(3), 173-179. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/BF00053724>

Blancard, D. 2011. *Enfermedades Del Tomate - identificar,conocer y controlar* (Mundi-Pren).

Booth, C. 1970. *Fusarium oxysporum*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 211, 1-2.

Bravo, R. 2013. *Sistemas hidrolíticos de componentes vegetales en el patógeno de tomate Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici: lipasas y poligalacturonasas*. Universidad de Córdova.

Carbonell, C., Cifuentes, D., Tello, J., & Cenis, L. 1994. Diferenciación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. o. f. sp. radicis-lycopersici* y su detección en planta mediante marcadores RAPD. *Bol. San. Veg. Plagas*, 20, 919-926.

CATIE (Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza). 1990. *Guia para el manejo integrado de plagas del cultivo de Tomate*. Turrialba, Costa Rica.

Chisholm, S., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>

Çolak, A., & BİÇİCİ, M. 2013. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f . sp . *radicis - lycopersici* and races of *F . oxysporum* f . sp . *lycopersici* of tomato in protected tomato-growing areas of the eastern Mediterranean region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 457-467. Recuperado de <https://doi.org/10.3906/tar-1203-71>

Fornaris, G. 2007. *Conjunto Tecnológico para la producción de Tomate*.

Gabe, H. 1975. Standardization of nomenclature for pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Transactions of the British Mycological Society*, 64(1), 156-159. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(75\)80089-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(75)80089-1)

Garcés de Granada, E., Orozco De Amézquita, M., Bautista, G. R., & Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum* El hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7-26. Recuperado de <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.5.449>

Gómez, L. 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. *Riunet*.

González, I., Yailén, A., & Peteira, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7. Recuperado a partir de Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000100001

Hirano, Y., & Arie, T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*, 72(5), 273-283. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0287-7>

Houterman, P., Cornelissen, B., & Rep, M. 2008. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens*, 4(5), 1-6. Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000061>

Houterman, P., Ma, L., Van Ooijen, G., De Vroomen, M. , Cornelissen, B., Takken, F., & Rep, M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant Journal*, 58(6), 970-978. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x>

Houterman, P., Speijer, D., Dekker, H., De Koster, C. , Cornelissen, B., & Rep, M. 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants: Short communication. *Molecular Plant Pathology*, 8(2), 215-221. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x>

Inami, K., Kashiwa, T., Kawabe, M., Onokubo-Okabe, A., Ishikawa, N., Pérez, E. R.,

Hozumi, T., Aragón, L., de Baldarrago, F., Roco, M., Madadi, K., Peever, T., Teraoka, T., Kodama, M., Arie, T. 2014. The Tomato Wilt Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* shares Common Ancestors with Nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from Wild Tomatoes in the Peruvian Andes. *Microbes and Environments*, 29(2), 200-210. Recuperado de <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13184>

Inami, K., Yoshioka-Akiyama, C., Morita, Y., Yamasaki, M., Teraoka, T., & Arie, T. 2012. A genetic mechanism for emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Inactivation of avirulence gene AVR1 by transposon insertion. *PLoS ONE*, 7(8), 1-10. Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044101>

Inami, K., Yoshioka, C., Hirano, Y., Kawabe, M., Tsushima, S., Teraoka, T., & Arie, T. 2010. Real-time PCR for differential determination of the tomato wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and its races. *Journal of General Plant Pathology*, 76(2), 116-121. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0224-7>

Jarvis, W. R., & Shoemaker, R. A. 1978. Taxonomic Status of *Fusarium oxysporum* Causing Foot and Root Rot of Tomato. *The American Phytopathological Society*, 68, 1679-1680.

Kashiwa, T., Suzuki, T., Sato, A., Akai, K., Teraoka, T., Komatsu, K., & Arie, T. 2016. A new biotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 emerged by a transposon-driven mutation of avirulence gene AVR1. *FEMS Microbiology Letters*, 363(14), 1-6. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw132>

Kawabe, M., Kobayashi, Y., Okada, G., Yamaguchi, I., Teraoka, T., & Arie, T. 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and *pg1*, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. *Journal of General Plant Pathology*, 71(4), 263-272. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0203-6>

Kimura, S. & Sinha, N. 2008. How to Grow Tomatoes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(12), pdb.prot5081-pdb.prot5081. Recuperado de <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5081>

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. 2015. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis versión 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874.

Leslie, F., & Summerell, B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual* (First). Usa: Blackwell.

Lievens, B., Houterman, P. M., & Rep, M. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiology Letters*, 300(2), 201-215. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x>

Martínez, S. & Soto, C. 1993. Extracción del ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Revista Colombiana de Química*, 22(1), 79-88.

MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego). 2018. Boletín Estadístico de Producción Agrícola y Ganadera, 174.

Mohamed E. & Abdel F. 2014. Discrimination of different pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates based on virulence and intergenomic-spacer sequences (IGS), 3(11), 157-165.

Mohamed, R., Hassan, A. & Hamed, M. 2015. *Monograph On The Genus Fusarium. Department of Microbiology. Cairo University.* Recuperado de <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3104.2728>

Negrete, L. 2013. *Prevalencia de Razas de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici en predios tomateros de Villa de Arista, San Luis Potosí, posibles fuentes de resistencia y forma de herencia.* Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Olivain, C., & Alabouvette, C. 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytologist*, 141(3), 497-510. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00365.x>

Otero, L., Ducasse, D., & Miller, R. 2004). Variability in ribosomal DNA genic and spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different hosts. *Fitopatologia Brasileira*, 29(4), 441-446. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/s0100-41582004000400015>

Pérez-Almeida, I., Morales-Astudillo, R., Medina-Litardo, R., Salcedo-Rosales, G., Dascon, A. & Solano-Castillo, T. 2016. EVALUACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE

TOMATE POR SU RESISTENCIA A Meloidogyne incognita , *Fusarium oxysporum* Y *Ralstonia solanacearum* CON FINES DE MEJORAMIENTO, 28(2), 107-116.

Rep, M., Dekker, H., Vossen, J., De Boer, A., Houterman, P., De Koster, C., & Cornelissen, B. 2003. A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins. *FEBS Letters*, 534(1-3), 82-86. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03788-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03788-2)

Rep, M., Van Der Does, H., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P., Dekker, H. , De Koster,C., Cornelissen, B. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1373-1383. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x>

Rodríguez-molina, M., Medina, I., Torres-vila, L., & Cuartero, J. 2003. Vascular colonization patterns in susceptible and resistant tomato cultivars inoculated with *Fusarium oxysporum* f . sp . *lycopersici* races 0 and 1. *Plant Pathology*, 52, 199-203. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00810.x>

Senthilkumar, G., Madhanraj, P., & Panneerselvam, A. 2011. Studies on saprophytic survival of *Fusarium oxysporum* using precolonized paddy straw bits. *J. Nat. Prod. Plant Resour*, 1(3), 15-19.

Silva, F., Vechiato, M., & Harakava, R. 2014. EF-1α 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), 64-73. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000100008>

Tello, J., & LaCasa, A. (1988). Evolución racial de poblaciones *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Bol. San. Veg. Plagas*, pp. 335-341.

Van Der Does, H., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P. , Cornelissen, B., & Rep, M. 2008. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1475-1485. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01561.x>

Waite, B. H. 1960. Studies on *Fusarium* wilt of bananas.VI.Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f. cubense. *Can. J. Bot.*, 38, 985-994.

VIII. ANEXO

Anexo 1. Secuencias obtenidas del NCBI para la elaboración del árbol Filogenético y secuencias de las regiones intergénicas (IGS) de los aislamientos HEI.

#SUF-1330

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAGTTCCGTCGAGTCT
GGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGAGATGGTCGGCTCGAGGATC
GATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGGTGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGT
CTTGGTTCAATTTGATGTCGCCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGTAGGTA
CAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCCGATCTGAC
ACTGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCG
ATTTGGACGAGATGTGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAACTCGAGTTTCGTGCG
CCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTA
CTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#MAFF103038

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAGTTCCGTCGAGTCT
GGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGAGATGGTCGGTTCGAGGATC
GATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGGTGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGT
CTTGGTTCAATTTGATGTCGCCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGTAGGTA
CAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTGATCTGGAGGTCGATTCTTCCGGCTGGCCGATCTGAC
ACTGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCG
ATTTGGACGAGATGTGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAACTCGAGTTTCGTGCG
CCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTA
CTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#Chiba5

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAGTTCCGTCGAGTCT
GGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGAGATGGTCGGTTCGAGGATC
GATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGGTGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGT
CTTGGTTCAATTTGATGTGCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGTAGGTA
CAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGAC
ACTGTGCAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCG
ATTTGGACGAGATGTGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAACTCGAGTTTCGTGCG
CCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTA
CTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#IB3

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAGTTCCGTCGAGTCT
GGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGAGATGGTCGGTTCGAGGATC
GATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGGTGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGT
CTTGGTTCAATTTGATGTGCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGTAGGTA
CAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGAC
ACTGTGCAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCG
ATTTGGACGAGATGTGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAACTCGAGTTTCGTGCG
CCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTA
CTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#NBRC6531

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAGTTCCGTCGAGTCT
GGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGAGATGGTCGGTTCGAGGATC
GATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGGTGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGT
CTTGGTTCAATTTGATGTGCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGTAGGTA
CAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGAC
ACTGTGCAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCG
ATTTGGACGAGATGTGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAACTCGAGTTTCGTGCG
CCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTA
CTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#MAFF103043

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAGTTCCGTCGAGTCT
GGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGAGATGGTCGGTTCGAGGATC
GATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGGTGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGT
CTTGGTTCAATTTGATGTGCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGTAGGTA
CAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGAC
ACTGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCG
ATTTGGACGAGATGTGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAACTCGAG

#880621a-1

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAGTTCCGTCGAGTCT
GGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGAGATGGTCGGTTCGAGGATC
GATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGGTGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGT
CTTGGTTCAATTTGATGTGCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGTAGGTA
CAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGAC
ACTGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCG
ATTTGGACGAGATGTGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAACTCGAGTTTCGTGCG
CCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTA
CTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#IGS_he1

ATTGTAAGCCGGTCCCTCGCCTCGATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGT
AGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCGTCCTCCGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAG
ACTTGGTGGAAATCCGTCGATAGGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGT
GCAGGGTAGGCTGCTTGGAGATGGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGA
TGGTGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTTCAATTTGATGTGCGCT
CCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGAGGGTCCAGGGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTG
GTTGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGATGCGAG
CGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATGTGTGGTTT
AGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAACTCGAGTTTCGTGCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTA
TGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCG
ATTTTTTTGTTTTGCCATACTATTGAAATATTGCAACA

#MAFF74406

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGTTGGTTTGTCTTGGTTCGATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCAGGGTAGGTGCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGATGCGAGGGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
ACTTGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTLAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGA
ATTCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTCGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#MAFF727501

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGTTGGTTTGTCTTGGTTCGATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCAGGGTAGGTGCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGATGCGAGGGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
ACTTGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTLAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGA
ATTCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTCGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#MAFF103036

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGTTGGTTTGTCTTGGTTCGATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCAGGGTAGGTGCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGATGCGAGGGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
ACTTGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTLAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGA
ATTCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTCGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#MAFF103044

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGTTGGTTTGTCTTGGTTCGATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCAGGGTAGGTGCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGATGCGAGGGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
ACTTGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGA
ATTCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTCGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#NRRL26034

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGTTGGTTTGTCTTGGTTCGATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCAGGGTAGGTGCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGATGCGAGGGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
ACTTGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGA
ATTCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTCGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#Kochi-1

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGTTGGTTTGTCTTGGTTCGATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCAGGGTAGGTGCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGATGCGAGGGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
ACTTGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGA
ATTCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTCGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#MAFF305121

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGTTGGTTTGTCTTGGTTCGATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCAGGGTAGGTGCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTGCAAACGAGATGCGAGGGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
ACTTGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTLAGGGTAGGCTCTATGTTAAGTAGA
ATTCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTCGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#NRRL26406

ATTTCCCAATGGTTCCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGTGTGGGATTTTTGATGTGTC
GTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAGGA
GTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGT
CGGTTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGG
TAGGTTGGTTTGTCTTGGTTCGATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGG
TCCAGGGTAGGTGCAGGGTAGCCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGC
TGGCGGATCTGACACTGTGCAAACGAGATGCGAGGGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTAC
TTGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTLAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAAATT
CGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAAGCAAATCTCT
CTCCGGCCAGTACTTGTCTCGTGGTTCGTGACTCGATTTTTTTGGTTT

#IGS_hei10

TGTAAGCCGTTCTTCGCCTCGATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGG
GGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACT
TGGTGGAATTCCGTCGATAGGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCA
GGGTAGGCTGCTTGGACATGGTCCGGTTCGAGGGTCGATTTCGAGGGCCGGCGCCTGTCGAT
GATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTTCAATTTGATGTCCGGCTC
CCGTGCAGGGCAGAGTGAGGGGGGTCCAGTGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGG
TCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTGCAAACGAGATGCGAGC
GGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCCGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTATA
GGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTAT

GGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTACTTGCTCTGGTGGTTCGTGAGTCGA
TTTTTTTGTGTTTGCCATACTATTGAATTTTGCAAAAA

#IGS_hei1

GTAAGCCGTCCTTCGCCTCGATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGG
GGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACT
TGGTGGAATTCGTCGATAGGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCA
GGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATTCGAGGGCCGGCGCCTGTTCGAT
GATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTTCAATTTGATGTCCGGCTC
CCGTGCAGGCCAGAGTGAGGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTATATTTGGTTCGATCTGGAG
GTCGATTCTCCGGTTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTA
GGCTAGTTTCGTCCTCGCCAGGTTGCGACTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCT
AGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCGATAGTTTTCTGTGGGGTGTATGGTAGGTGCAG
GGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTACTTGCTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT
GCCATACTATTGAATATTGCAA

#IGS_hei2

GTAAGCCGTTCCCTTCGCCTCGATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGG
GGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACT
TGGTGGAATTCGTCGGTAGGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCA
GGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATTCGAGGGCCGGCGCCTGTTCGAT
GATGTGTGAAGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTTCAATTTGATGTCCGGCCT
CCCGTGCAGGCCAGAGTGAAGGGGGGTACAGGGTAGGCAGCTTATATTTGGTTCGATCTGG
AGGTTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGG
TAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTAGGGTAGGCT
CTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGGTGTATGGTAGGTAC
AGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTACTTGCTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTT
TTGCCATACTATTGAAATTTTGC

#IGS_hei5

GTAAGCCGGCCTTCGCCTCGATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGG
GGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCGTCTCTGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACT
TGGTGGAATTCGTCGATAGGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCA
GGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATTCGAGGGCCGGCGCCTGTTCGAT
GATGTGTGATGCATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTTCAATTTGATGTCCGGCTC

CCGTGCAGGCCAGAGTGAAGGGGGGTCCAGGGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTATATTTG
GTCGGTGTGGAGGTCGATTCTCTGGCTGGCGGATCTGACACTGTGCGAAACGAGATGCGAG
CGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTT
ATGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTGCGCCGACAGTTTTCTGTGTGTGA
TGGTAGGTGCAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGCGGTTCGTGAGTCG
ATTTTTTTGTTTTGCCATACTATTGAATTTTGC

#IGS_hei6

GGTAAGCCGTCCTTCGCCTCGATTTCCTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGG
GGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACT
TGGTGGAATTCGTCGGTAGGAGTTCCGTCGAGTCTGGTTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCA
GGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCGCCTGTCGAT
GATGTGTGAAGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTTCAATTTGATGTCCGCCT
CCCGTGCAGGCCAGAGTGAAGGGGGGTACAGGGTAGGCAGCTTATATTTGGTCGATCTGG
AGGTCGATTTCCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTGCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGG
TAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTAGGGTAGGCT
CTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTGCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTAC
AGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTT
TTGCCATACTATTGAAATTTTGA

#IGS_hei9

GTAAGCCCGGCCTTCGCCTCGATTTCCTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGG
GGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCTCTGGACGGGCGGTGCAGGGTAGACGAGTTAGACT
TGGTGGAATTCGTCGATAGGAGTTCCGTCAGTCTGGTTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCA
GGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCGCCTGTCGAT
GATGTGTGATGCATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTTCAATTTGATGTCCGCCTC
CCGTGCAGGCCAGAGTGAAGGGGGGTCCAGGGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTATATTTG
GTCGGTGTGGAGGTCGATTCTCTGGCTGGCGGATCTGACACTGTGCGAAACGAGATGCGAG
CGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTT
AGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTGCGCCGACAGTTTTCTGTGTGTGA
TGGTAGGTGCAGGGTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGCGGTTCGTGAGTCG
ATTTTTTTGTTTTGCCATACTATTGAAATTTTGA

#tomino1-c

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGAACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCCGTCGATGATATGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTAGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAAGGG
GGTCCAGGGTAAGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTGCAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
CCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTAGGGTAGGCTATAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#F-1-1

ATTTCCCAATGGTTCCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGTTGTGGGATTTTTGATGTGTC
GTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAGGA
GTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGAACATGGT
CGGTTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCCGTCGATGATATGTGATGTATGCGGTCTAGG
GTAGGCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTAGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAAGGGG
GTCCAGGGTAAGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGG
CTGGCGGATCTGACACTGTGCAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
CTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTAGGGTAGGCTATAGGGTAAGTAGA
ATTCGAGTTTCGTGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#Chz1-A

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCAGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGAACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCCGTCGATGATATGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTAGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAAGGG
GGTCCAGGGTAAGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTGCAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
CCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTTTAGGGTAGGCTATAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#Rif-1

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTTIGATGT
GTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATA
GGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACAT
GGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTA
GGGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTTCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGG
GGGTCCAGGGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCC
GGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCG
TCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGATATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTTGTTTT

#07C-A3-3

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTTCGATGT
GTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATA
GGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACAT
GGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCAGTCTA
GGGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGG
GGGTCCAGGGTAGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCC
GGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCG
TCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGATATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTTGTTTT

#08C-A3-4

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTTCGATGT
GTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATA
GGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACAT
GGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCAGTCTA
GGGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGG
GGGTCCAGGGTAGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCC
GGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCG
TCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGATATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTTGTTTT

#08C-A1

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTCGATGT
GTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATA
GGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACAT
GGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCAGTCTA
GGGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGG
GGGTCCAGGGTAGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCC
GGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCG
TCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGATATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#08C-A3-3

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTCGATGT
GTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATA
GGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACAT
GGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCAGTCTA
GGGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGG
GGGTCCAGGGTAGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCC
GGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCG
TCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGATATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#SUF-1017

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTCGATGT
GTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATA
GGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACAT
GGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCAGTCTA
GGGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGG
GGGTCCAGGGTAGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCC
GGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCG
TCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGATATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#07C-A2

ATTTCCCTAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTCGATGT
GTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATA
GGAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACAT
GGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCAGTCTA
GGGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGG
GGGTCCAGGGTAGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCC
GGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCG
TCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGATATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTTGTTTT

#MAFF103051

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTTCGATGT
GTCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATA
GAAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACAT
GGTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCAGTCTA
GGGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGG
GGGTCCAGGGTAGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCC
GGCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCG
TCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGATATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAG
AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTTGTTTT

#08C-3B

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTTGCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCATGGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTTCGAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
CCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTATGCTCTAGGGTAAGTAGA
ATTCGTGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATC
TCTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTTGTTTT

#08C-MS3

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATT
CGAGGGCCAGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTG
GTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACAGGGTAGGCAGCTT
AGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGG
TGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCGGGTTGCGATTTGGACGAGATATG
TGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTG
GGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTTGICTGGTGGTTCGT
GAGTCGATTTTTTTGTTTT

#MAFF305608

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATT
CGAGGGCCAGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTG
GTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACAGGGTAGGCAGCTT
AGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGG
TGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCGGGTTGCGATTTGGACGAGATATG
TGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTG
GGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTTGICTGGTGGTTCGT
GAGTCGATTTTTTTGTTTT

#08C-MS5

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATT
CGAGGGCCAGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTG
GTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACAGGGTAGGCAGCTT
AGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGG
TGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCGGGTTGCGATTTGGACGAGATATG
TGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTG
GGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTTGICTGGTGGTTCGT
GAGTCGATTTTTTTGTTTT

#08C-MS4

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATT
CGAGGGCCAGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTG
GTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACAGGGTAGGCAGCTT
AGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGG
TGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCCTCGCCGGGTTGCGATTTGGACGAGATATG
TGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCCCGACAGTTTTCTGTG
GGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTTGICTGGTGGTTCGT
GAGTCGATTTTTTTGTTTT

#08C-MS1

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTTCGGTTCGAGGATCGATT
CGAGGGCCAGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTGTCTTG
GTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACAGGGTAGGCAGCTT
AGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGG
TGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCCTCGCCGGGTTGCGATTTGGACGAGATATG
TGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCCCGACAGTTTTCTGTG
GGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTTGICTGGTGGTTCGT
GAGTCGATTTTTTTGTTTT

#07GB-N4

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTTCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCT
GACACTGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCCTCGCCGGGTT
GCCATTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCG
TCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCA
GTCCTTGICTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#cong1-1

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCCGGATCT
GAACTGTGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCGGGTT
GCCATTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCG
TCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCA
GTCCTTGICTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#GB-5

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCCGGATCT
GAACTGTGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCGGGTT
GCCATTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCG
TCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCA
GTCCTTGICTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#SUF-127

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCCGGATCT
GAACTGTGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCTCCGGGTT
GCCATTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCG
TCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCA
GTCCTTGICTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#SUF-1010

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCCGGATCT
GACTGTGCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCGGGTT
GCGATTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCG
TCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCA
GTCCTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

#R269

CCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTGTGTCGTC
TCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAGGAGTT
CCGTCGAGTCTGGTCCGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTCCG
TTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAG
GCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACA
GGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCCGGATCTGACAC
TGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCGGGTTGCGATT
TGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCG
ACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTT
GTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGT

#MAFF240329

CCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTGTGTCGTC
TCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAGGAGTT
CCGTCGAGTCTGGTCCGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTCCG
TTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAG
GCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACA
GGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCCGGATCTGACAC
TGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCGGGTTGCGATT
TGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCG

ACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTT
GTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGT

#MAFF240330

CCCAATGGGTTCCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCGTC
TCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCGTCGATAGGAGTT
CCGTCGAGTCGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTCGG
TTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAG
GCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACA
GGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACAC
TGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCGGGTTGCGATT
TGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCG
ACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTT
GTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGT

#MAFF240331

CCCAATGGGTTCCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCGTC
TCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCGTCGATAGGAGTT
CCGTCGAGTCGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATGGTCGG
TTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAG
GCTGGTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGGGTACA
GGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACAC
TGTCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCGGGTTGCGATT
TGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCG
ACAGTTTTCTGTGGGTGTGTGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCCCTCCGGCCAGTCCTT
GTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGT

#MAFF240328

CCCAATGGGTTCCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTGTCGTC
TCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCGTCGATAGGAGTT
CCGTCGAGTCGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGACTGCTTGGACATGGTCGG
TTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAGGGTAG
GCTGGTTTGTCTTGGTTCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAAGGGGGGTA
CAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGAC
ACTGTCGAAATGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCAGGTTGCG

ATTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAGAATTCTAGTTTCGTCCG
CCGACAGTTTTCTTTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAATCTCTCTCGGGCCAGTA
CTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTTGT

#880116a

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAATTCCGTCGATAG
GAGTTCCGTCGAGTCTGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGAGGGG
GGTCCATGGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTCGATTCTCCG
GCTGGCGGATCTGACACTGTCAAACGAGGTGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGT
CCTCGCCAGGTTGCGATTCGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTAGGCTCTAGGGTAAGTAG
AACTCTAGTTTCGTCCCGACAGTTTTCTTTGGGTGTATGGTAGGTACAGGGTAGGCAAAT
CTCTCTCCGGCCGGTACTTGTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTTGT

#08C-MS2

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTCGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTGGACTTGGTGGAATTCCGTTTATTCC
AATCCGTCGAGTCTGGCTGGCACGATCGTGTGCGGCTGTGTGCTGGACGGTGTAGGGTAG
GCTGCTTGGACATGGTCCGGTTCGAGGATCGATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGA
TGTATGCGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGA
CCAGAGTGAGGGCGGTCCAGGGTAGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGATCGATCTGG
AGGTCGATTCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTCAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGG
TAGGCCAGTTTTGTCTCGCCAGGTTGCCATTCGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTCTAGG
GTAAGTAGAGTTCGAGTTTCGTCCCAACAGTTTTGCTGTATGTGTAGGGTAGGTGCAGGGT
AAGCAAATCTCTCTCTGGCCAGACGGTTTTGCGGCTCTGGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTTGT
TTT

#1a-2

CCCAATGGGTTCTCCGGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGTTTTTCGATGTGTCTGTC
TCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTGGACTTGGTGGAATTCCGTTTATTTCGAATCC
GTCCGAGTCTGGCTGGCACGATCGTGTGCGGCTGTGTGCTGGACGGTGTAGGGTAGGCTGCT
TGGACATGGTCCGGTTCGAGGATCGATTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATG
CGGTCTAGGGTAGGCTGGTTTTGTCTTGGTCCAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGACCAGA

GTGAGGGCGGTCCAGGGTAGGGTCCAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGATCGATCTGGAGGTC
GATTCCTCCGGCTGGCGGATCTGACACTGTGCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGC
CAGTTTTGTCGTCGCCAGGTTGCGATTCCGACGAGATATGTGGTCTAGGGTCTAGGGTAAG
TAGAGTTCGAGTTTCGTCGCCAACAGTTTGCTGTATGTGTAGGGTAGGTGCAGGGTAAGCA
AATCTCTCTCTGGCCAGACGGTTTTGCGGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGT

#FGSC7610

ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCCGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGCTTTTCGAGATG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGCCGAGCTGGACTTGGTGGAAATTCGATCCCGTC
GAGTCCGGCATGGCTCTGTGCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTCGGTCTT
GGTCGATTTCGTGGATCGATTTCGAGGACCGGCCAGAGGATGTGGGATAGAGGGGGTCTAGG
GTAGGCTGGTTTTGTCTTGGTTCGAACTCGATGTCCGGCTCCCGTGTAGACCAGAGCGAGGGTG
GTGCAGGGTATAGGTACAGGGTAGGCAGCTTAGACTTGGTCGATCTGGATGTCGGTTCTCTG
GCTGATGGATCTGAGAGCGTCAAACGAGATGCAGGCGCTGCAGGGTAGGTAACCTCTGT
CTTCGTCAGGAAGCGATTTGTGTTGAGGTGTGTGGTCTAGGGTAGGTACAGGGTAGGTAA
ATATCTATGCGGCCAGTACTGGCCCATGCGTGCAGAAATCGTTTCGCAGTCTGGTGGCCGTG
AGTTGATTCTCTAGTCTT

#MAFF103070

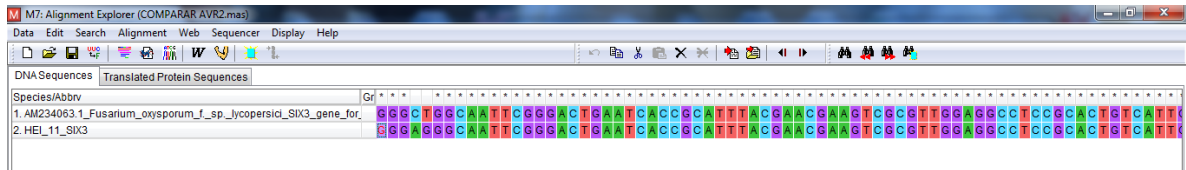
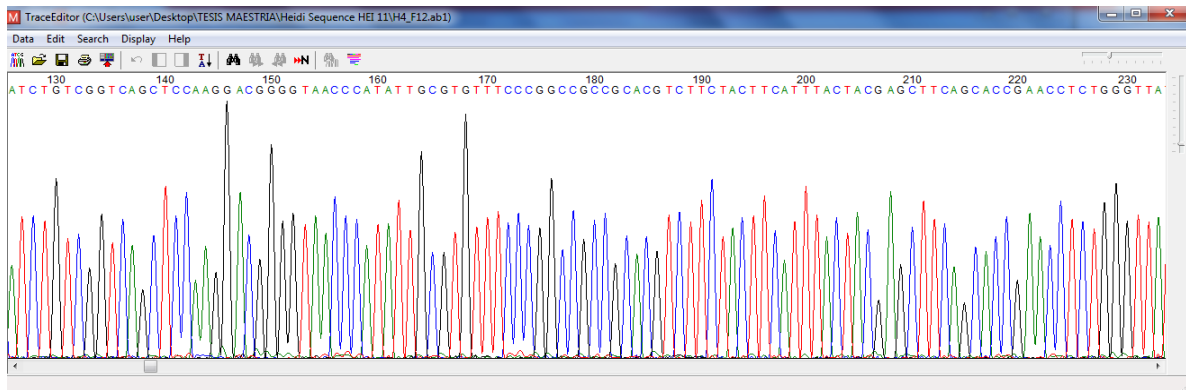
ATTTCCCAATGGGTTCTCCGATTTCTGGAGACTTGTAGGGGTTGTGGGATTTTTGATGTG
TCGTCTCCGGACGGGCGGTGCAGGGTAGTCGAGTTAGACTTGGTGGAAATTCGTCGATAG
GAATTGCGCCGAGICTGGTCCGGCTGTGTGTTGGACGGTGCAGGGTAGGCTGCTTGGACATG
GTCGGTTCGAGGATCGATTTCGAGGGCCGGCCTGTCGATGATGTGTGATGTATGCGGTCTAG
GGTAGGCTGGTTTTGTCTTGGTTTAATTTGATGTCCGGCTCCCGTGCAGGCCAGAGTGGGGG
GTCCAGGGTAGGTACAGGGTAGGCAGCTTAGATTTGGTCGATCTGGAGGTTCGATTCTCCGG
CTGGCGGATCTGACACTGTGCGAAACGAGATGCGAGCGGTGTAGGGTAGGCTAGTTTCGTC
CTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTAGTTTAGTGTATACTCTAGGGTAAGTAGAA
TTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTGCAGGGTAGGCAAATCT
CTCTCCGGCCAGTACTTGTCTGGTGGTTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

Anexo 2 : secuencia de la región de AVR1 se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los Primer SIX 4 F1/R1, usando el programa GENETIX-MAC and ENZYME X y analizados con el programa Blast del NCBI.

GAGAAGCTAAAGCTCTGGTCGCTGGAAGGATCAAAGTTCATGTCGGTTCATGCTTG
CC
ACATTATCAATGTGGTATACCTCCTTACCATTACGGAAAAAGCCCATTCTTGAAGTTTG
T
CCATAATGCCCGTCTCTGCGATAGACTTGGGCCTTGAGTCGAATGAGCTTTCGTCCTAT
T
CCTGGCTTTCCTGCACGCGTGACAACTTTGCCATTTACATGTGTTGCCTCCTTGTCATCT
ACCGCATCAAAAACAGTGTTAGACGGAGAGCAAGTAGCGTCAGGCTCTCTATCACCCC
AAAAGTTGCCAACTTGCTCCAAGCAATCCTGACCTGCGGGACATGTTCCGGT
GTGTGTCGATCCAGCATTTTTATTACCCGCAGGCGCGCAGTTAACAGTATATGTCGATT
TACCA
GTGCATATTGCATTAAGCCAGTGGAGATCTGCGCCAGTAGCAGTGCCAGCATGTACAC
AA
ACAGACTCGGTATGAGCAGATCTTTTAACGAGATTGGAGCCTAAGTTTGAATTCAATT
AG
ATAACCTCTTGTAATAGCAAGACATCTGAAGCCATTGACTTACCTGAACTATCCGGA
GT
ATCTACCCAGTGGATTTTAAGCGGCTGACTGTCTGAGCTGCTAAAGTTGAATGTTCCGA
T
GATGTCACCCTCCTCCCCCCCG

Anexo 3: secuencia de la región de AVR2 se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los Primer SIX3 F1/R2, usando el programa GENETIX-MAC and ENZYME X y analizados con el programa Blast del NCBI.

TTCCAGACGCAGGAGGGCGCCAGCACTTACACAAATTCGTTTTAATTACGACATCAGC
TT
AACATACATTCGCGTTCTCGCTAAGCCAGTCCTGACACTGCGTTGCTCTATGCTGGCAA
C
TTGCAAGATGCGATTCATCGTCGGTCAGTCCAAGGACGGGTAACCCATATGCGTGTTCC
CC
GGCCGCCGCACGTTTTTACTCATTACTACGAGCTCAGCACCGAACCTCTGGGTTTGCTA
G
ATGTACACAGAGACCTCATATAGCGGGCGGCATTCGGATGATCACGCATTACGAAGAGT
CG
CGTGGAGGCTCCGCACGTCATGATGTCGCCCCCGACGACACAAGCATCGCAACTAC
GA
GATCGAATCGTCGTATTCCTGTTGCAACACCTATGCGGCTGGAGATTGCTTTCACACTG
C
ACGCTTAGTACCGGCTCTCGAGGTCCAGCCACAATCAGTTGGGATGCCGACGCTAGTT
AT
ACCTACTATCTTACTATCTCAGAGGATGATTCTGTGGGCAATTATAAACACTCTGCCAA
G
GGGAACTGCCACAGAATCAATCCTCTGAGATAGTAAGATAGTAGGTATAACTAGCGTC
GGCATCCCAACTGATTGTGGCTGGACCTCGAGAGCCGGTACTAAGGCGTGACAGTGTGA
AAGCAATCTCCAGCCGCATTAGGTGTTGCAACAGGAATACGACGGACTTCGATCTCGT
AGTTGGCGATGGCTTGGTGTCCGTCCGGGGGGGCGACATCAATGACAGTGC GGAGGCC
TCCAACGCGACTTCGTTTCGTAAATGCGGTGATTCAGTCCCGAATTGCCAGCCCGCTCAT
ATGGAGGGTCTCTGTGTAACATTCTAGCATAACCCAGAGGTTCCGGTGCTGAAGCTCGT
AGTAAATGAAGTAGAAGACGTGCGGCGGCCGGGAAACACGCAATATGGGTACCCCG
TCCTTGGAGCTGACCGACAGATGAATCGGCATCTTCCACAGGTAGCCCAGCAATAGAG
CAAACCCATGTCATGGACATGGCTATAAGCAGAAGGAAACGCATAGTGGTAAATGTTT
AGGCAAGATGGTCGGTAATTAATCGAGTTT



Sequences producing significant alignments:

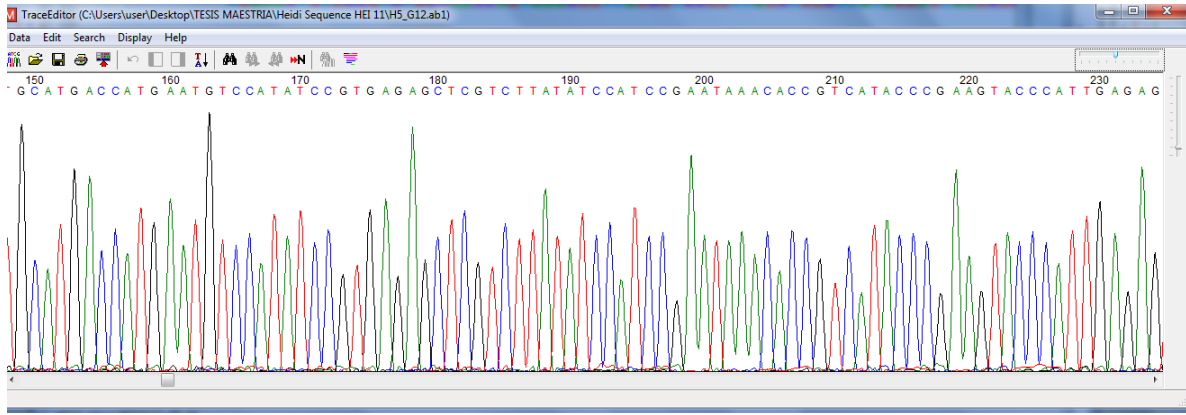
Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici 4287 hypothetical protein mRNA	1033	1590	93%	0.0	99%	XM_018396424.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici SIX3 gene for Secreted in xylem 3 protein	1024	1581	91%	0.0	99%	AM234063.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate BFOL-51 secreted in xylem 3 (SIX3) gene, complete cds	909	1453	84%	0.0	100%	GQ268950.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate FOL-MM10 secreted in xylem 3 (SIX3) gene, complete cds	904	1442	84%	0.0	99%	GQ268957.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate IPO3 secreted in xylem 3 (SIX3) gene, complete cds	904	1442	84%	0.0	99%	GQ268956.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate 14844 secreted in xylem 3 (SIX3) gene, complete cds	904	1442	84%	0.0	99%	GQ268955.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate SIX3MN25 secreted in xylem 3 (SIX3) gene, partial cds	898	1437	84%	0.0	99%	KM047030.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. cepae isolate FUS2 secreted in xylem 3 (SIX3) gene, complete cds	726	1071	87%	0.0	91%	KP964964.1

Anexo 4: secuencia de la región de AVR3 se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los Primer P12 R1/ F1, usando el programa GENETIX-MAC and ENZYME X y analizados con el programa Blast del NCBI.

TAATAGAGGCCCCGAAAGCATGTTGAATGCTTCCTCGAGGCTGAGGGTAAATGAATGG
CT
GTGAATTGAAATAGAGAAAGTAGTGTTTGGAGGGCTTTGGATCGCAACTTAGTGTTGGG
CT
GGTATATCCAAACGCCCAAGTTGCGCGATATGTGTTTGTGATAGTCACCTTGCCTCTCG
G
GCAATTAATGCATGACCATGAATGTCCATATCCGTGAGAGCTCGTCTTATATCCATCCG
A
ATAAACACCGTCATACCCGAAGTACCCATTGAGAGTGCCCGCCATCTGGGCGAAATAA
TC
GTAGGTCCCAGGCGATTTAGGCGATTTCGGGGTACCAGGTAAGTCCACTCCGTGTTACC
AA
A



M7: Alignment Explorer (COMPARAR AVR3.maf)

DNA Sequences

Translated Protein Sequences

Species/Abbrv

1. AJ608702.1_Fusarium_oxysporum_f_sp_lycopersici_mRNA_for_secreted_in_xylem_1_protein_six1_1

2. HEL_T1_Six_1

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici 4287 hypothetical protein mRNA	614	614	97%	1e-174	98%	XM_018396441.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici six1 gene, fof5 gene, six2 gene, shh1 gene and ORF2 (partial)	614	614	97%	1e-174	98%	AJ608703.3
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici mRNA for secreted in xylem 1 protein (six1 gene)	614	614	97%	1e-174	98%	AJ608702.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici transposon Drifter transposase gene, complete cds, and SIX1-H pseudogene, complete sequence	507	507	94%	2e-142	94%	AY751529.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate BFOL-51 secreted in xylem 1 (SIX1) gene, complete cds	440	440	68%	2e-122	99%	GQ268948.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum SIX1 gene, complete cds	379	379	93%	5e-104	87%	HQ260601.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. cubense isolate E421A secreted in xylem 1 (SIX1) gene, complete cds	307	307	74%	3e-82	87%	KP964963.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. melonis six1 effector-like protein (SIX1) gene, complete cds	272	272	66%	9e-72	87%	KR811364.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici isolate RBS-1 Six 1 protein gene, partial cds	259	259	38%	7e-68	100%	FJ664546.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate Fo37 Six1 (Six1) gene, partial cds	180	180	54%	6e-44	83%	KC296735.1

Anexo 5: Temperatura en la primera y segunda evaluación de la inoculación de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de tomate.

Mes de abril

ABRIL FECHA	MAXIMA	MINIMA	RH(%)	
	OUT	OUT	MAX	MIN
4/04/2017	22.1	46.7	73	20
5/04/2017	21.9	46.7	73	17
6/04/2017	21.4	46.7	72	18
7/04/2017	21.5	46.7	73	17
8/04/2017	21.6	46.7	73	20
9/04/2017	21.5	46.7	72	17
10/04/2017	21.6	46.7	73	17
11/04/2017	22	41.7	75	22
12/04/2017	21.5	41.3	76	20
13/04/2017	21.9	42	75	22
14/04/2017	21.9	41	76	19
15/04/2017	22	41.5	75	20
16/04/2017	21.7	41.2	75	19
17/04/2017	21.1	42.5	79	17
18/04/2017	19.4	35.9	85	30
19/04/2017	21.6	35.5	80	34
20/04/2017	20.9	34.9	85	35
21/04/2017	19.9	34.7	85	35
22/04/2017	19.7	35.6	85	32
23/04/2017	19.5	34.6	85	36
24/04/2017	19.4	33.8	89	37
25/04/2017	19.8	30.2	84	46
26/04/2017	19.2	33.6	88	36
Promedio	21.0	40.0		
T.prome	30.5		78.5	25.5

Mes de mayo-junio

MAYO-JUNIO FECHA	MINIMA	MAXIMA	RH(%)	
	OUT	OUT	MAX	MIN
24/05/2017	18	26.9	93	51
25/05/2017	18.6	25.5	92	60
26/05/2017	18.7	23.9	92	67
29/05/2017	17.8	31.2	94	45
30/05/2017	17.8	19.2	96	83
31/05/2017	17.5	19.2	96	81
2/06/2017	17.3	23.5	96	70
5/06/2017	17.1	27.9	74	53
7/06/2017	16.8	24.1	93	53
8/06/2017	18	25.5	84	61
9/06/2017	17.9	25.5	84	61
12/06/2017	16.9	25.5	77	41
14/06/2017	16.6	25.7	73	40
15/06/2017	16.4	25.5	72	41
16/06/2017	17.3	25.7	73	41
19/06/2017	17	24	72	44
20/06/2017	17.5	24	83	45
21/06/2017	17.6	26.5	72	39
22/06/2017	17.3	24.3	72	30
23/06/2017	17.3	26.7	71	40
26/06/2017	15.8	25.8	73	40
27/06/2017	17.8	21.8	72	38
Promedio	17.4	24.9		
T. promedio	21.2		82.0	51.1

Anexo 6: Datos de evaluación de síntomas a nivel del cuello y síntomas vasculares del aislamiento HEI 11 y controles positivos de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1, R2 y R3).

ID	REP	AISLA	CULT	SEVE	SEVET (Raíz (SEVE+1))
U114	r1	HEI_11	BLOC	0	1.0
U127	r2	HEI_11	BLOC	0	1.0
U193	r3	HEI_11	BLOC	0	1.0
U202	r4	HEI_11	BLOC	0	1.0
U247	r5	HEI_11	BLOC	0	1.0
U251	r6	HEI_11	BLOC	0	1.0
U110	r1	R_1	BLOC	0	1.0
U132	r2	R_1	BLOC	0	1.0
U142	r3	R_1	BLOC	0	1.0
U187	r4	R_1	BLOC	0	1.0
U205	r5	R_1	BLOC	0	1.0
U232	r6	R_1	BLOC	0	1.0
U108	r1	R_2	BLOC	0	1.0
U136	r2	R_2	BLOC	0	1.0
U245	r3	R_2	BLOC	0	1.0
U250	r4	R_2	BLOC	0	1.0
U255	r5	R_2	BLOC	0	1.0
U256	r6	R_2	BLOC	0	1.0
U102	r1	R_3	BLOC	0	1.0
U118	r2	R_3	BLOC	0	1.0
U167	r3	R_3	BLOC	0	1.0
U179	r4	R_3	BLOC	0	1.0
U241	r5	R_3	BLOC	0	1.0
U263	r6	R_3	BLOC	0	1.0
U126	r1	TESTIGO	BLOC	0	1.0
U129	r2	TESTIGO	BLOC	0	1.0
U188	r3	TESTIGO	BLOC	0	1.0
U216	r4	TESTIGO	BLOC	0	1.0
U231	r5	TESTIGO	BLOC	0	1.0
U248	r6	TESTIGO	BLOC	0	1.0
U105	r1	HEI_11	MOMO	0	1.0
U128	r2	HEI_11	MOMO	0	1.0
U146	r3	HEI_11	MOMO	0	1.0
U191	r4	HEI_11	MOMO	0	1.0
U212	r5	HEI_11	MOMO	0	1.0
U228	r6	HEI_11	MOMO	0	1.0
U141	r1	R_1	MOMO	0	1.0
U177	r2	R_1	MOMO	0	1.0
U182	r3	R_1	MOMO	0	1.0
U185	r4	R_1	MOMO	0	1.0

U201	r5	R_1	MOMO	0	1.0
U236	r6	R_1	MOMO	0	1.0
U194	r1	R_2	MOMO	3	2.0
U195	r2	R_2	MOMO	0	1.0
U213	r3	R_2	MOMO	4	2.2
U221	r4	R_2	MOMO	3	2.0
U237	r5	R_2	MOMO	3	2.0
U259	r6	R_2	MOMO	2	1.7
U101	r1	R_3	MOMO	0	1.0
U112	r2	R_3	MOMO	0	1.0
U135	r3	R_3	MOMO	4	2.2
U147	r4	R_3	MOMO	4	2.2
U203	r5	R_3	MOMO	4	2.2
U240	r6	R_3	MOMO	1	1.4
U139	r1	TESTIGO	MOMO	0	1.0
U151	r2	TESTIGO	MOMO	0	1.0
U160	r3	TESTIGO	MOMO	0	1.0
U173	r4	TESTIGO	MOMO	0	1.0
U215	r5	TESTIGO	MOMO	0	1.0
U249	r6	TESTIGO	MOMO	0	1.0
U123	r1	HEI_11	MOMO_8	0	1.0
U125	r2	HEI_11	MOMO_8	0	1.0
U162	r3	HEI_11	MOMO_8	0	1.0
U186	r4	HEI_11	MOMO_8	0	1.0
U214	r5	HEI_11	MOMO_8	0	1.0
U223	r6	HEI_11	MOMO_8	0	1.0
U134	r1	R_1	MOMO_8	0	1.0
U138	r2	R_1	MOMO_8	0	1.0
U163	r3	R_1	MOMO_8	0	1.0
U229	r4	R_1	MOMO_8	0	1.0
U260	r5	R_1	MOMO_8	0	1.0
U261	r6	R_1	MOMO_8	0	1.0
U165	r1	R_2	MOMO_8	0	1.0
U196	r2	R_2	MOMO_8	0	1.0
U199	r3	R_2	MOMO_8	0	1.0
U207	r4	R_2	MOMO_8	0	1.0
U220	r5	R_2	MOMO_8	0	1.0
U230	r6	R_2	MOMO_8	0	1.0
U119	r1	R_3	MOMO_8	2	1.7
U159	r2	R_3	MOMO_8	1	1.4
U183	r3	R_3	MOMO_8	0	1.0
U227	r4	R_3	MOMO_8	1	1.4
U234	r5	R_3	MOMO_8	2	1.7
U262	r6	R_3	MOMO_8	1	1.4
U116	r1	TESTIGO	MOMO_8	0	1.0
U158	r2	TESTIGO	MOMO_8	0	1.0
U161	r3	TESTIGO	MOMO_8	0	1.0
U243	r4	TESTIGO	MOMO_8	0	1.0

U244	r5	TESTIGO	MOMO_8	0	1.0
U267	r6	TESTIGO	MOMO_8	0	1.0
U117	r1	HEI_11	POND	0	1.0
U121	r2	HEI_11	POND	1	1.4
U143	r3	HEI_11	POND	1	1.4
U233	r4	HEI_11	POND	0	1.0
U253	r5	HEI_11	POND	0	1.0
U254	r6	HEI_11	POND	0	1.0
U157	r1	R_1	POND	0	1.0
U184	r2	R_1	POND	4	2.2
U204	r3	R_1	POND	2	1.7
U208	r4	R_1	POND	4	2.2
U210	r5	R_1	POND	0	1.0
U252	r6	R_1	POND	0	1.0
U104	r1	R_2	POND	3	2.0
U170	r2	R_2	POND	0	1.0
U176	r3	R_2	POND	0	1.0
U224	r4	R_2	POND	3	2.0
U246	r5	R_2	POND	0	1.0
U266	r6	R_2	POND	4	2.2
U113	r1	R_3	POND	0	1.0
U115	r2	R_3	POND	1	1.4
U166	r3	R_3	POND	2	1.7
U197	r4	R_3	POND	0	1.0
U211	r5	R_3	POND	0	1.0
U222	r6	R_3	POND	4	2.2
U103	r1	TESTIGO	POND	0	1.0
U133	r2	TESTIGO	POND	0	1.0
U140	r3	TESTIGO	POND	0	1.0
U149	r4	TESTIGO	POND	0	1.0
U175	r5	TESTIGO	POND	0	1.0
U190	r6	TESTIGO	POND	0	1.0

Anexo 7: Análisis de variancia para la severidad en grados del aislamiento HEI 11 en los cuatro cultivares diferenciales de tomate.

Tabla de Analisis de Variancia

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
CULT	3	2.270	0.7567	8.987	2.51e-05	***
AISLA	4	2.963	0.7407	8.798	3.98e-06	***
CULT:AISLA	12	3.618	0.3015	3.581	0.000188	***
Residuals	100	8.419	0.0842			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						

MSerror	Mean	SDev	Min	Max	Num	CV
0.08	1.18	0.38	1	2.24	120	24.62

tratamiento	promedio	M
1 R_2:MOMO	1.828020	a
2 R_3:MOMO	1.687070	ab
3 R_2:POND	1.539345	abc
4 R_1:POND	1.534031	abc
5 R_3:MOMO_8	1.451124	abc
6 R_3:POND	1.397055	abc
7 HEI_11:POND	1.138071	bc
8 HEI_11:BLOC	1.000000	c
9 HEI_11:MOMO	1.000000	c
10 HEI_11:MOMO_8	1.000000	c
11 R_1:BLOC	1.000000	c
12 R_1:MOMO	1.000000	c
13 R_1:MOMO_8	1.000000	c
14 R_2:BLOC	1.000000	c
15 R_2:MOMO_8	1.000000	c
16 R_3:BLOC	1.000000	c
17 TESTIGO:BLOC	1.000000	c
18 TESTIGO:MOMO	1.000000	c
19 TESTIGO:MOMO_8	1.000000	c
20 TESTIGO:POND	1.000000	c