Capítulo 3. Marchitamiento vascular en el cultivo de la uchuva

Edwin Alirio Rodríguez Velásquez, Víctor Camilo Pulido Blanco, Johan David Barbosa, Diana Marcela Burbano David, Alejandro Caro Quintero, Andrés Alarcón, Julio Martín Duarte Carvajalino, Carolina González Almario

El cultivo de uchuva en Colombia enfrenta limitantes que impactan de manera directa la sostenibilidad de la producción y la calidad de la fruta. Uno de los problemas más importantes está relacionado con la incidencia de la enfermedad marchitez vascular, causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (Foph) (Simbaqueba et al., 2018). Las pérdidas reportadas por este patógeno oscilan entre el 80 % y el 100 %, particularmente en plantaciones comerciales de Cundinamarca y Boyacá (González Almario & Barrero Meneses, 2011).

El control de este patógeno en particular ha sido difícil, principalmente porque puede generar estructuras de resistencia llamadas clamidiosporas, las cuales le confieren la capacidad a Foph de permanecer latente en el suelo durante décadas, lo que imposibilita el uso de rotación de cultivos como mecanismo de control (Crinó et al., 2007).

Dentro de las prácticas culturales, la solarización ha sido utilizada con buenos resultados en algunos casos (Tamietti & Valentino 2006), pero es limitada por condiciones adversas de clima como temperatura y humedad relativa (Shlevin et al., 2004). Debido a las limitaciones en efectividad de los tratamientos químicos, físicos y de control biológico (Cotes et al., 2012), existe una gran necesidad de contar con los mejores métodos costo-efectivo y ambientalmente seguros para el control de la enfermedad. Dentro de las estrategias de manejo, el uso de la resistencia

genética ha mostrado ser promisoria (Enciso-Rodríguez et al., 2013; Núñez-Zarantes et al., 2014), pues el marchitamiento vascular de la uchuva está estrechamente ligado a la siembra de materiales genéticos susceptibles a esta enfermedad. Esa situación ha convertido el cultivo en plantaciones comerciales itinerantes, que se han movido desde Cundinamarca y Antioquia hacia Boyacá y Santanderes, lo que trae como consecuencia la contaminación de nuevos lotes con el patógeno debido a la distribución de material de siembra portador del hongo (González & Barrero, 2011; Osorio-Guarín et al., 2016). Por lo tanto, se hace imperativo para el cultivo de uchuva conocer de cerca al patógeno (variabilidad genética y patogénica) para seleccionar fuentes de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (Foph) y métodos de control efectivos que permitan el manejo integrado de esta enfermedad.

Síntomas del marchitamiento vascular de la uchuva

La identificación en campo de plantas en estados avanzados de la enfermedad se puede realizar a partir de la presencia de los siguientes síntomas:

Síntomas externos: se observa una pérdida de turgencia y amarillamiento (clorosis) de las hojas basales que asciende y alcanza a las hojas más jóvenes, hasta que la planta se marchita y muere (Palma, 2004) (figura 3.1). En varias ocasiones, se presentan una o varias ramas que pueden mostrar síntomas, mientras que las del lado opuesto no.

Síntomas internos: se caracterizan por una coloración café del sistema radical y pudrición completa de la raíz principal, ocasionada por la infección del hongo. Los haces vasculares muestran necrosis que se puede evidenciar gracias a una coloración café-rojizo que se extiende por el tejido vascular no más de 10 cm desde la raíz (Palma, 2004) (figura 3.2).

Figura 3.1. Síntomas externos de la enfermedad. En estadios más avanzados de la enfermedad se puede observar pérdida de turgencia y clorosis en las hojas y marchitamiento en tallos.

Foto: Edwin Alirio Rodríguez Velásquez

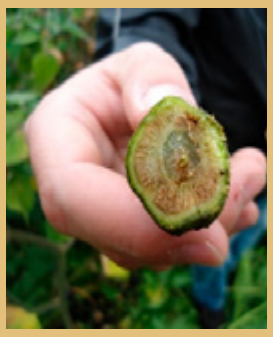


Figura 3.2. Síntomas internos de la enfermedad. Los haces vasculares están necrosados por la infección del hongo.

Foto: Edwin Alirio Rodríguez Velásquez

Fusarium oxysporum f. sp. physali (Foph)

Fusarium oxysporum es un complejo cosmopolita de especies fúngicas, que incluyen individuos fitopatógenos y no fitopatógenos (Di Pietro et al., 2003; Michielse et al., 2009; O'Donnell et al., 2010; Ma et al., 2013, 2014). Dentro de esta especie, existe un conjunto de cepas capaces de infectar un hospedero particular denominado forma specialis (f. sp.), causante del marchitamiento vascular en varias especies vegetales, incluyendo cultivos de importancia económica como banano, algodón, melón, tomate (Michielse et al., 2009) y recientemente uchuva (Simbaqueba et al., 2018).

Caracterización de Fusarium oxysporum f. sp. physali (Foph) agente causal del marchitamiento vascular de uchuva

Para el establecimiento de estrategias de control de enfermedades en plantas, se requiere no solo el conocimiento a nivel taxonómico y filogenético de los organismos causantes de la enfermedad, sino además del entendimiento sobre el origen de un patotipo o raza patogénica, así como de la distribución de los aislamientos que estén causando la enfermedad. Para esto, se necesita a menudo del uso de marcadores moleculares y de pruebas de patogenicidad con diferentes cultivares de la especie hospedera. Es por esta razón que en AGROSAVIA, desde 2008, se conformó una colección de 136 aislamientos de *Fusarium* asociados al cultivo de uchuva, la cual fue caracterizada a nivel morfológico, molecular y patogénico, con el fin de generar insumos para el diseño de estrategias de control eficientes y sostenibles para los productores de uchuva.

Caracterización morfológica de aislamientos de Foph de zonas productoras de uchuva del país

Las especies del género *Fusarium* son muy variables debido a las condiciones ambientales cambiantes a las que están sometidas para su crecimiento. Estos cambios afectan la morfología de sus macroconidios, los cuales son determinantes para su identificación taxonómica. Por lo tanto, para facilitar esta tarea, es necesario seguir todos los pasos de un procedimiento estandarizado (Nelson et al., 1983). Las especies de *Fusarium* solo se pueden identificar de manera confiable cuando los cultivos han crecido en condiciones óptimas de esporulación. Además, todas las colonias deben ser purificadas por cultivos monospóricos, ya que cada conidio es un genotipo individual y la colonia en desarrollo, salvo mutantes, es de un genotipo específico y es un clon que se logra identificar por sus características (Nelson et al., 1983). En general, es importante centrarse en rasgos como la forma y la estructura de los conidios (macro y microconidios), pues centrarse en los detalles puede

conducir a una identificación errónea por parte del investigador.

Considerando la amplia distribución de las especies del género *Fusarium* y su carácter cosmopolita, que llevan por lo general a aislar más de una especie en una misma muestra, se realizó una purificación de cada uno de los aislamientos obtenidos a partir de muestras infectadas en campo. Como se mencionó anteriormente, cada uno de estos aislamientos creció en medio de cultivo para observar características macro y microscópicas (agar papa dextrosa [PDA] y agar hoja clavel [CLA], respectivamente), necesarias para la identificación a nivel de especie mediante el uso de claves taxonómicas (Nelson et al., 1983).

En todos los aislamientos, se encontraron características morfológicas típicas de la especie *Fusarium oxysporum*: por ejemplo, la producción de pigmentos color violeta o salmón en medio de PDA (figura 3.3), producción de microconidios en estructuras llamadas "falsas cabezas" (figura 3.4a), macroconidios con células terminales con forma de pie (figura 3.4b) y producción de clamidiosporas creciendo de manera simple, en pareja o en clústeres (figuras 3.4c y 3.4d).

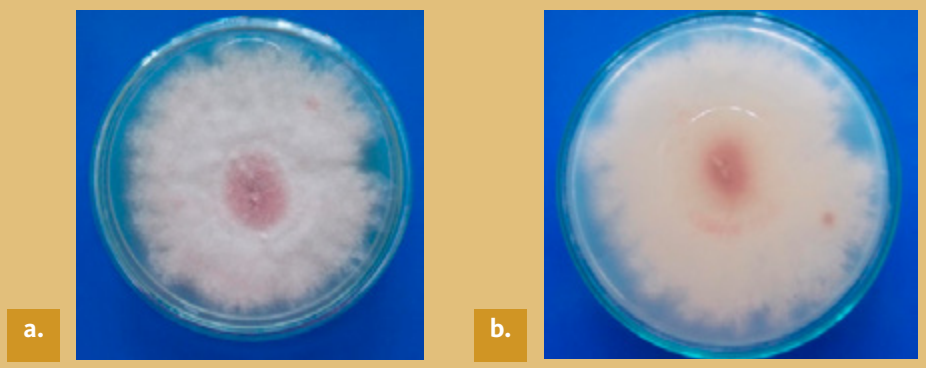


Figura 3.3. Morfología macroscópica de aislamientos de *Fusarium oxysporum* crecidos en medio de cultivo PDA. a. Coloraciones producidas en el anverso; b. Coloraciones producidas en el reverso de una caja Petri con medio PDA.

Foto: Edwin Alirio Rodríguez Velásquez

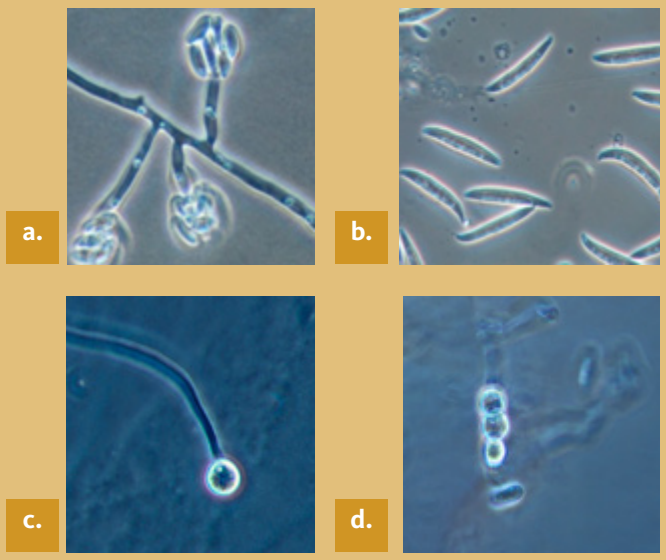


Figura 3.4. Características microscópicas típicas de *F. oxysporum* en medio CLA. a. Microconidios creciendo en falsas cabezas; b. Macroconidios de tres septos con célula basal con forma de pie; c. Clamidiosporas creciendo con forma individual; d. Clamidosporas creciendo en cadenas cortas.

Foto: Edwin Alirio Rodríguez Velásquez

En uchuva existen varios factores que influyen en el desarrollo de la marchitez vascular; uno de ellos es el cultivar, el cual es de gran importancia, sin dejar de considerar los factores bióticos, abióticos, físicos y ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad. A pesar de que la identificación morfológica es significativa para el desarrollo de cultivares resistentes, así como para el desarrollo de alternativas de control y de estrategias de manejo del cultivo, es conveniente determinar la diversidad patogénica y genética que existe dentro y entre las poblaciones de Foph.

Las cepas de Foph de la colección, además de haber sido caracterizadas morfológicamente macro y microscópicamente, fueron identificadas molecularmente utilizando marcadores moleculares a partir de cuatro regiones seleccionadas: IGS, EF-1α, CO1, β-Tubulina; estas últimas, además de confirmar la identidad genética de los aislamientos, permitieron realizar una caracterización molecular usando la técnica PCR-RFLP. Esta técnica consiste en la amplificación de una región específica del ADN y su posterior fragmentación con una enzima de restricción, la cual permite obtener un patrón de bandas propio que se puede usar para caracterizar comunidades y poblaciones, evaluar diversidad y estimar la variación genética de poblaciones de fitopatógenos (Rodríguez & Rodríguez, 2008).

Esta técnica presenta ventajas frente a otras técnicas moleculares como RAPD y AFLP, ya que ayuda a obtener múltiples bandas a partir de la restricción de una región específica del genoma seleccionada por su nivel de conservación. Además, permite establecer perfiles moleculares, denominados haplotipos, propios de un grupo específico de aislamientos, que pueden estar asociados a características como virulencia, origen geográfico, entre otras, sin contar que es una técnica de fácil uso y también económica (Sandoval Lozano, 2010).

Con base en estudios realizados por Rodríguez Velásquez (2013), se seleccionó la región intergénica (IGS) del gen del ADN ribosomal para analizar, mediante PCR-RFLP, la variación dentro de las 136 cepas de Foph, representativas de las principales zonas productoras del país. La región amplificada fue cortada con la enzima de restricción Alu I, la cual fue la más informativa, ya que permitió evidenciar cinco haplotipos diferentes basados en la presencia o ausencia de fragmentos de restricción (figura 3.5). El análisis de diversidad UPGMA, utilizando el índice de Dice y un 93 % de similaridad, evidenció también cinco grupos, lo cual demostró que

existe alguna diferencia entre y dentro de los aislamientos del patógeno, y que no hay relación entre el origen geográfico de las cepas y su patrón molecular (haplotipo) (figura 3.6). Algunas cepas están aisladas de los grupos generados por el análisis de filogenia; no obstante, se consideran un haplotipo diferente por su marcada diferencia en el patrón de bandas que presenta. Si se realizara un muestreo más amplio en la zona de procedencia de estos aislamientos, probablemente se encontrarían más individuos con el mismo haplotipo.

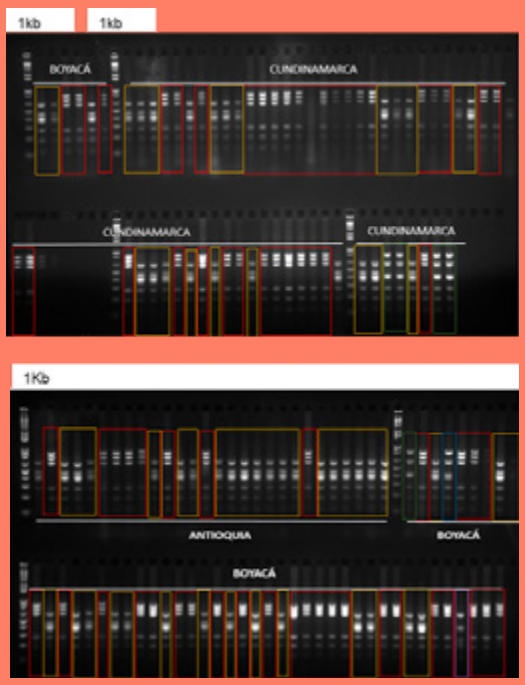


Figura 3.5. Cinco haplotipos determinados a partir de análisis PCR-RFLP. PCR-RLFP obtenido de la restricción con la enzima *AluI* de la región IGS de 136 cepas que conforman la colección de Foph. Cada patrón (haplotipo) se representa con una caja de color (rojo, amarillo, verde, azul y violeta). 1Kb: Marcador de peso molecular (1000 pb).

Foto: Edwin Alirio Rodríguez Velásquez

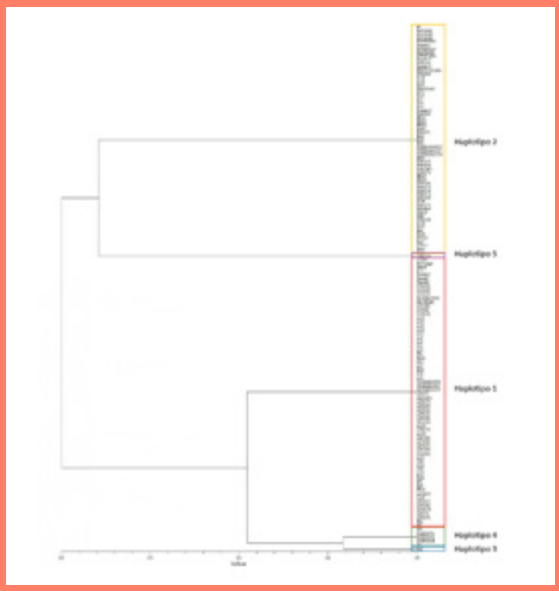


Figura 3.6. Análisis de clúster UPGMA. Clúster obtenido del corte de la región IGS con la enzima de restricción *AluI* en 136 cepas que conforman la colección de Foph, utilizando el índice de Dice y un coeficiente de similitud del 93%.

Fuente: Elaboración propia

Otra metodología que se usa bastante para la caracterización poblacional de microrganismos es multilocus sequence typing (MLST), la cual distingue grupos clonales basándose en la identificación de polimorfismos presentes en múltiples genes. Usualmente se utilizan de seis a ocho genes independientes que se seleccionan a partir de diferentes criterios como: presentar una única copia por genoma, tener alto poder de resolución (suficientes substituciones), estabilidad evolutiva ("housekeeping genes") y baja taza de transferencia horizontal (Maiden et al., 1998). Para la implementación de la técnica de MLST, se diseña un set de primers por gen, que amplifican fragmentos de aproximadamente 400 a 500 pb, los cuales se secuencian y se comparan para determinar las relaciones evolutivas de cada aislamiento.

La técnica de MLST se ha utilizado exitosamente en la caracterización de levaduras y mohos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium solani* (Saghrouni et al., 2013; De Valk et al., 2009; Debourgogne et al., 2010). Para el caso de

Fusarium oxysporum, actualmente no se cuenta con un esquema exitoso de MLST, lo cual implica buscar una aproximación sistemática para la selección de genes, que permita dar un soporte más robusto de las relaciones filogenéticas entre los aislamientos.

La disponibilidad de genomas completos de *F. oxysporum* secuenciados por el Instituto Broad (http://www.broadinstitute.org/), así como la secuenciación de una cepa patogénica (Map5) de uchuva a través de proyectos de investigación realizados por AGROSAVIA en 2016 (Simbaqueba et al., 2021), permitieron la búsqueda sistemática de marcadores para el desarrollo de un sistema MLST para este patógeno. Para ello, se identificó la fracción compartida por todos los genomas y a partir de esta se identificaron los genes ortólogos. Estos genes son ideales para el diseño de primers, pues representan genes heredados de un ancestro común y no representan duplicaciones (parálogos) o adquisiciones por transferencia horizontal de genes (xenólogos).

Con el grupo de genes identificados, se determinó la relación filogenética de las especies (Konstantinidis et al., 2006) a partir de datos genómicos de los 13 genomas y se diseñaron primers para determinar su nivel polimórfico de acuerdo con la metodología sugerida por Caro-Quintero & Ochman (2015).

A partir de los resultados conseguidos, fue posible amplificar dos marcadores (EF-1α y rpb2) con los cuales se logró identificar tres clústeres vs. cinco encontrados por PCR-RFLP, y se discriminaron cepas en otros clústeres que no habían podido ser visibles por PCR-RFLP. Igualmente, se evidenció una alta correspondencia entre los patrones de ambas técnicas. El 71% de las cepas evaluadas de la colección de *F. oxysporum* se organizaron en grupos compuestos por los mismos aislamientos obtenidos por ambas metodologías (RFLP y MSLT). Sin embargo, 29% de las cepas presentó un agrupamiento distinto al esperado basado en la información de haplotipos que obtuvo PCR-RFLP.

Con la secuencia del genoma de Foph (Simbaqueba et al., 2021) se contempló el uso de otros marcadores específicos para la especie, asociados no solo a genes ortólogos para estudios de diversidad e identificación de grupos clonales, sino también a genes que codifican para factores de virulencia propios de la especie patógena de uchuva. Esta información es fundamental para complementar los estudios de diversidad y entender los mecanismos de patogenicidad, claves para la búsqueda y selección de materiales genéticos de uchuva resistentes a este patógeno.

Caracterización patogénica de aislamientos de Foph de zonas productoras de uchuva del país

Hablar de estudios de diversidad de Foph no solo hace referencia a estudios a nivel genético, sino también a nivel de su patogenicidad, pues este último permite caracterizar las cepas del hongo que son patogénicas a cultivares específicos. Para ello, es necesario medir la respuesta de diferentes materiales frente a distintas cepas del patógeno, con el fin de evaluar de manera adecuada la presencia de grupos de virulencia o razas.

La caracterización patogénica de la colección de cepas de Foph conformada por 136 aislamientos de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Antioquia se determinó inicialmente sobre accesiones o materiales genéticos de uchuva seleccionados a partir de estudios previos que se hicieron sobre 104 genotipos identificados en repositorios internacionales y que cumplían con datos de pasaporte completos, amplia distribución geográfica, caracterizaciones morfoagronómicas, análisis fisicoquímicos, grados Brix ≥ 15°, peso de fruto ≥ 3g, entre otras (Osorio Guarín, 2014).

Para la evaluación en invernadero, se estandarizó la preparación de inóculo de acuerdo con la metodología descrita por Namiki et al. (1994); también la

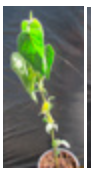
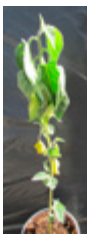
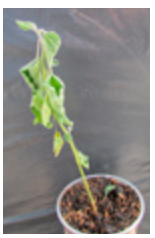
concentración ideal de Foph (Pulido Blanco, 2010) y el método de inoculación. Se evaluaron dos métodos, uno de ellos por inmersión de raíces de plántulas de uchuva en una suspensión de $1*10^5$ conidios/ml de Foph (Pulido Blanco, 2010; Rodríguez Velásquez, 2010) y otro método de inoculación aplicando una concentración de inóculo de Foph de 1×10^6 conidios/ml durante la preparación del sustrato (Rodríguez Velásquez, 2013). A pesar de que los dos métodos son muy eficientes en términos de reproducibilidad, se seleccionó el método de inoculación durante la preparación del sustrato de siembra, el cual facilitó la evaluación de las cepas en varios genotipos de uchuva de manera simultánea (figura 3.7).

Figura 3.7. Inoculación con Foph. a. Incremento del inóculo de Foph hasta 1×10^6 conidios/ml en medio líquido de potato dextrose broth (PDB) por ocho días a 28 °C en agitación constante; b. Inoculación del sustrato (suelo, cascarilla y turba) (3:1:1) 100ml de inóculo/900g sustrato; c. Siembra de material vegetal de uchuva proveniente de semilla o *in vitro*.

Fotos: Edwin Alirio Rodríguez Velásquez

Después de seleccionar el método de inoculación, se estandarizó una escala de evaluación de síntomas de la enfermedad, inicialmente conformada por nueve niveles (Rodríguez Velásquez, 2010; Pulido Blanco, 2010; Enciso-Rodríguez et al., 2013, Rodríguez Velásquez, 2013) y posteriormente ajustada por Barbosa (2013) a cinco niveles, los cuales se describen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Escala cualitativa de evaluación de síntomas del marchitamiento vascular en invernadero

Nivel	SINTOMA	IMAGEN
0	Ningún síntoma visible, 0% de daño en la planta.	
1	Clorosis leve, hojas de verde oscuro a verde claro o hasta amarillo, entre las nervaduras o desde los extremos hacia el centro. Leve pérdida de turgencia no mayor que el 10% de daño en la planta.	
2	Pérdida de turgencia en hojas del tercio superior y presencia de clorosis enhojas basales o sin ella. Daño de >10% a <30% de la planta.	
3	Pérdida de turgencia en un 90%, con clorosis en las hojas basales o ausencia de ella. Daño de >30% a <90%.	
4	Pérdida de turgencia en un 100% y encopamiento de las hojas. Presencia de clorosis o ausencia de ella y defoliación. Daño de >90% a <100%.	 
5	Pérdida de turgencia en un 100% y postración del tallo, hasta la muerte de la planta. Daño 100%.	

Fuente: Johan David Barbosa
Fotos: Johan David Barbosa

La escala de evaluación de síntomas permitió identificar, para la colección de cepas de Foph, cuatro niveles de virulencia (hipovirulento, medianamente virulento, virulento y altamente virulento) (figura 3.8), los cuales permitieron sugerir la respuesta fenotípica en planta (tabla 3.2).

Figura 3.8. Niveles de virulencia establecidos para la evaluación de la colección de cepas de Foph sobre *P. peruviana*. a. Hipovirulento; b. Medianamente virulento; c. Virulento; d. Altamente virulento.

Fotos: Johan David Barbosa

Tabla 3.2. Asociación del nivel de severidad, nivel de virulencia de las cepas y respuestafenotípica en plantas bajo condiciones controladas.

Nivel en la escala de severidad	Nivel de virulencia	Respuesta Fenotípica en planta
0	No patogénico	Resistente (R)
1-2	Hipovirulento	Resistente (R)
3	Medianamente virulento	Moderadamente Resistente (MR)
4	Virulento	Moderadamente Resistente (MR)
5	Altamente virulento	Susceptible (S)

Fuente: Elaboración propia

Selección de genotipos promisorios de uchuva a partir de la caracterización patogénica de Fusarium oxysporum F.Sp. *physali (Foph)*

Teniendo en cuenta la escala de evaluación de síntomas y el proceso estandarizado de inoculación del patógeno, se realizó la evaluación de virulencia de la colección de cepas de Foph sobre un grupo seleccionado de genotipos de uchuva (09U128, 09U140 y 09U190), que se identificaron con anterioridad como tolerantes a la cepa altamente virulenta Map5 del patógeno, bajo condiciones de invernadero (Rodríguez et al., 2015).

Con base en los resultados que se consiguieron, se confirmó, por análisis de varianza y por comparación de medias mediante una prueba de Tukey, la susceptibilidad y el nivel de resistencia de estos tres materiales frente a las cepas de la colección, y se destacaron las accesiones 09U140 y 09U190 como tolerantes a este patógeno. De igual forma, se estimó la severidad utilizando la escala diseñada para este patosistema (tabla 3.1) y se realizó el análisis de los datos mediante una prueba de conglomerados, empleando el software SAS (v.9.0) sobre esta variable. Este análisis permitió identificar los cuatro niveles de virulencia con que se clasificaron las cepas de acuerdo con el nivel de virulencia en los distintos materiales de uchuva evaluados (figuras 3.9 y 3.10).

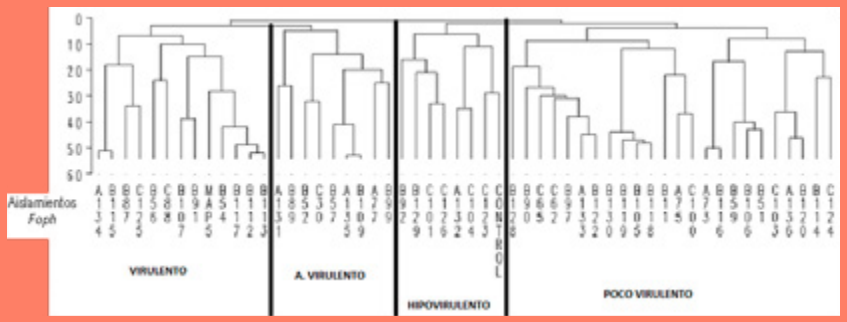


Figura 3.9. Grupos de virulencia de Foph determinados sobre la accesión 09U140 de *P. peruviana* a partir de análisis de conglomerados.
Fuente: Elaboración propia

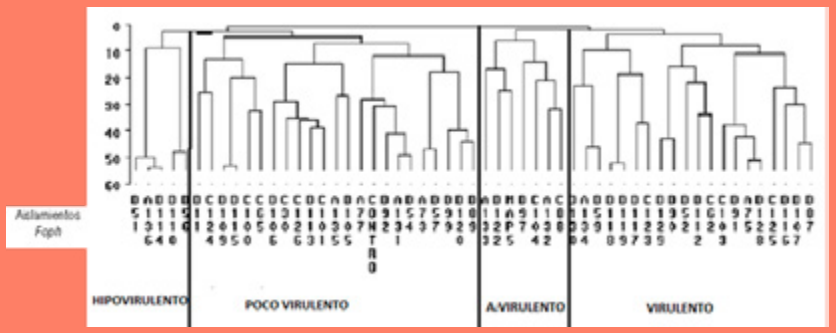


Figura 3.10. Grupos de virulencia de Foph determinados sobre la accesión 09U190 de *P. peruviana* a partir de análisis de conglomerados.
Fuente: Elaboración propia

Estos niveles de virulencia se pudieron asociar con la respuesta fenotípica de los materiales frente a las cepas y, a su vez, con el nivel de severidad descrito en la escala (tabla 3.2). Esta información es clave no solo como insumo para estudios de diversidad del patógeno, sino también para la búsqueda de fuentes de resistencia.

De igual manera, los datos obtenidos en invernadero y el análisis de conglomerados confirmó, por medio del cálculo del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC), la respuesta de los tres genotipos de uchuva frente a las cepas evaluadas (figura 3.11). Este cálculo confirmó que a mayores valores de AUDPC, mayor es la

susceptibilidad de estos materiales frente a las cepas evaluadas y, por tanto, se presenta un mayor progreso de la enfermedad en el tiempo, así lo demuestran Osorio Guarín (2014) y Osorio-Guarín et al. (2016) en sus estudios con el patosistema uchuva-*Fusarium*. Es así como el progreso de la enfermedad fue más rápido en la accesión 09U128, comparado con el progreso que se observó en las accesiones 09U140 y 09U190 (figura 3.11). Esto confirma un alto nivel de tolerancia por parte de la accesión 09U190 y una alta susceptibilidad de la accesión 09U128.

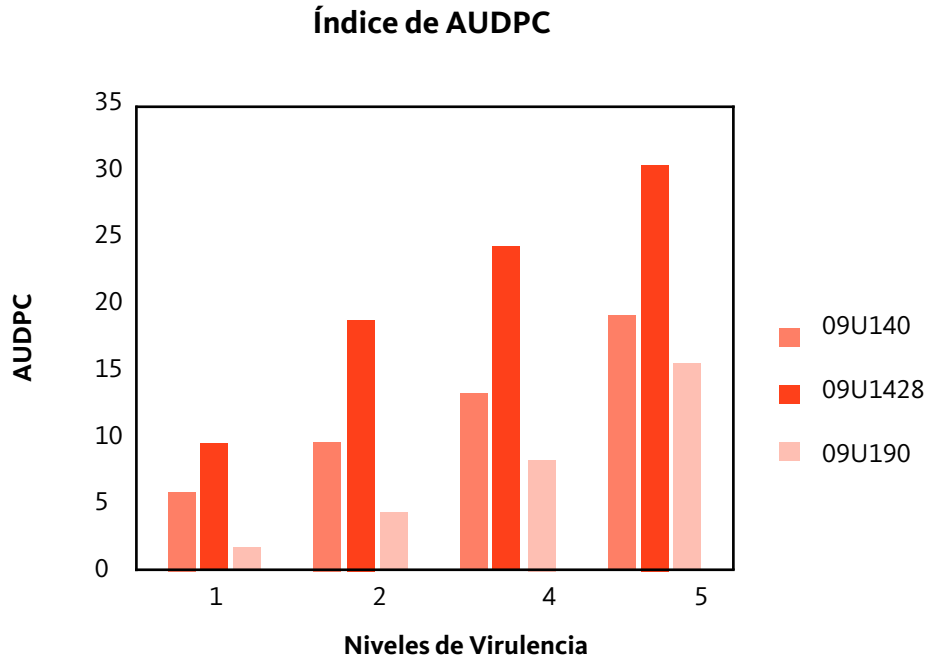


Figura 3.11. Índices de AUDPC para los tres genotipos de uchuva evaluados frente a las cepas de Foph agrupadas de acuerdo con el nivel de virulencia.

Fuente: Elaboración propia

El análisis del nivel de virulencia obtenido para cada una de las cepas de Foph frente a los tres genotipos de uchuva evaluados evidencia la conformación de 43 grupos, los cuales no se relacionan con su lugar de origen ni tampoco con su haplotipo molecular (PCR-RFLP y MLST). Estos resultados demuestran que, además de existir una alta variabilidad patogénica de las cepas que conforman la colección, las accesiones de uchuva evaluadas responden de manera diferente a cada una de ellas (Nirmaladevi et al., 2016; Chehri et al., 2014).

La respuesta de resistencia en planta está íntimamente relacionada con el nivel de virulencia de las cepas, lo cual se confirma en este estudio. Así, los aislamientos virulentos y altamente virulentos indujeron a un fenotipo susceptible en la planta y los hipovirulentos y moderadamente virulentos, a un fenotipo resistente. De estos resultados es importante destacar la presencia de un grupo de virulencia conformado por cepas que se comportaron como hipovirulentas frente a los tres genotipos evaluados. Esta información es importante para profundizar en la presencia o ausencia de genes efectores o factores de virulencia en estas cepas, que pueden interactuar con genes específicos de respuesta de defensa en la planta. La secuencia del genoma de la cepa Map5 (Simbaqueba et al., 2021) podrá servir de referencia para la identificación de estos genes del patógeno y para estudios de interacción y función.

Un aspecto importante para resaltar, según los resultados que se encontraron, está relacionado con el origen de los aislamientos y su dispersión; es el caso, por ejemplo, de algunas cepas que para 2008 fueron aisladas de cultivos de uchuva en zonas altamente productoras de Boyacá que ya no existen por causa de este patógeno (caso Arcabuco) y que, teniendo en cuenta los análisis de virulencia, el grupo patogénico, la haplotipo RFLP y el grupo MLST, los encontramos a 2015 en otras zonas distantes de este departamento, como lo es Ciénega. Estos resultados permiten inferir que posiblemente hubo un traslado de material vegetal infectado desde Arcabuco hasta Ciénega, que facilitó la dispersión del patógeno.

Para el caso de Antioquia, los aislamientos colectados en este departamento no se asocian a un mismo grupo patogénico; por el contrario, siempre están asociados a grupos patogénicos de Boyacá, lo cual indica una presunta movilidad del patógeno entre Boyacá y Antioquia. Esto concuerda con la movilidad que ha tenido el cultivo durante los últimos diez años, puesto que los inicios de este sistema productivo se centraron en Cundinamarca y debido al marchitamiento vascular su producción se trasladó a Boyacá, y posteriormente a Antioquia.

Escala cuantitativa estandarizada por fenotipificación para evaluación de la respuesta de P. peruviana a Fusarium oxysporum f. sp. physali (Foph)

Las técnicas tradicionales de fenotipificación en plantas se basan principalmente en evaluaciones subjetivas utilizando la cuantificación visual de las características fenotípicas. Este procedimiento limita la reproducibilidad de las evaluaciones del fenotipo y puede introducir ruido en los programas de mejoramiento genético. Una alternativa para obtener información fenotípica más fiable es la incorporación de tecnologías, como imágenes hiperespectrales, robótica y sensores remotos, que han sido utilizadas con éxito en otras áreas. La incorporación de dichas tecnologías permitirá conseguir información fenotípica más precisa para eliminar las falsas asociaciones relacionadas con la integración de genotipo-fenotipo mediante estudios de genómica, como asociación genética (GWAS) y la selección genómica (GS).

A pesar de que hay esfuerzos para desarrollar plataformas de fenotipificación de alto rendimiento que son capaces de capturar la información fenotípica de cultivos con mayor precisión y rapidez, la adopción de estas tecnologías por parte de los investigadores es escasa, debido a los altos costos asociados para el desarrollo de estas plataformas y para la contratación de servicios de fenotipificación a través de empresas que ofrecen estos servicios. Además, la configuración, el ajuste y el mantenimiento de plataformas de fenotipificación no son triviales y requieren un trabajo multidisciplinario. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de un nuevo

conjunto de plataformas que, además de tener un bajo costo, se puedan configurar fácilmente sin reducir la precisión y fiabilidad.

Para el caso del patosistema uchuva-*Fusarium oxsyporum* f. sp. *physali* (Foph), se han logrado rasgos fenotípicos utilizando una escala cualitativa de evaluación de síntomas del marchitamiento vascular en invernadero (tabla 3.1), la cual ha permitido asociar algunos marcadores ligados a la resistencia a Foph (Osorio-Guarín et al., 2016); sin embargo, esta escala es subjetiva y depende de la inspección visual realizada por un evaluador. En este contexto, surge la necesidad de evaluar el fenotipo de genotipos de uchuva afectados por Foph a través de una escala cuantitativa con mayor precisión, utilizando tecnologías de última generación que permitan un fenotipado más eficiente y robusto. Para ello, se creó una escala cuantitativa que permite evaluar de manera más precisa el progreso de la enfermedad causada por el hongo, usando una plataforma de fenotipado de bajo costo en invernadero. La plataforma desarrollada monitorea los cambios de dosel de las plantas a través del tiempo para evaluar la pérdida de turgencia en sus hojas, que es una de las principales manifestaciones de la enfermedad; además, tiene un bajo costo y una fácil configuración que permite su amplia adopción.

El sistema que se propuso está compuesto por un trípode, una cámara NIR S110 y un ordenador portátil con el software Anaconda 4.0.0, que incluye varios paquetes de código abierto como Spyder, el cual es un entorno de desarrollo para el lenguaje de programación Python. El trípode se utilizó para sujetar la cámara, con el fin de reducir el movimiento de esta y mejorar la calidad de la imagen. La cámara apuntó hacia abajo para capturar imágenes desde el dosel de las plantas a 1,5 metros, con una resolución espacial de hasta 4.000 x 3.000 pixeles (~14MB) e información en el espectro infrarrojo (NIR), verde y azul. La captura de la imagen se realiza desde una vista superior y en diferentes instantes de tiempo para controlar el progreso de la enfermedad causada por el hongo.

Para analizar las imágenes y medir la gravedad de la enfermedad de la planta, se desarrolló un *script* en Python que procesa automáticamente el flujo de imágenes. El programa de software detecta el porcentaje de píxeles ocupado por la planta dentro de la imagen. Este parámetro se utiliza para determinar qué tan enferma esta la planta debido a cambios de dosel.

La figura 3.12 muestra los gráficos del área ocupada de forma normalizada para un número de 16 plantas. En todas las plantas que se analizaron, sus áreas de dosel presentan un comportamiento inicial de crecimiento hasta alcanzar un valor máximo; luego, como manifestación de la enfermedad, las áreas de dosel empezaron a disminuir. Se observaron diferentes formas entre los gráficos que pueden estar relacionados con las plantas que son más o menos tolerantes a la enfermedad. Por ejemplo, la figura 3.12c muestra que después de la manifestación de la enfermedad en la planta (cuarta muestra) su progreso era muy agresivo y la planta se marchitó muy rápido. Hubo resultados similares en las plantas correspondientes a las figuras 3.13f, 3.13h, 3.13o y 3.13p. Al contrario, para las plantas representadas por las figuras 3.12a, 3.12d, 3.12e, 3.12j, 3.12k y 3.12n la enfermedad progresó lentamente.

Con el fin de facilitar el proceso de selección de materiales tolerantes, la información que se presenta en la figura 3.12 se transforma mediante una interpolación lineal y luego se representa como gráficos de barras (figura 3.13). La altura de las barras se correlaciona con el nivel de enfermedad de las plantas y con cuánta área de dosel han perdido (pérdida de turgencia). Es decir, cuanto mayor sea la barra, más enferma se encuentra la planta. Además, se muestran las etapas de las plantas en diferentes instantes para determinar su comportamiento en el tiempo.

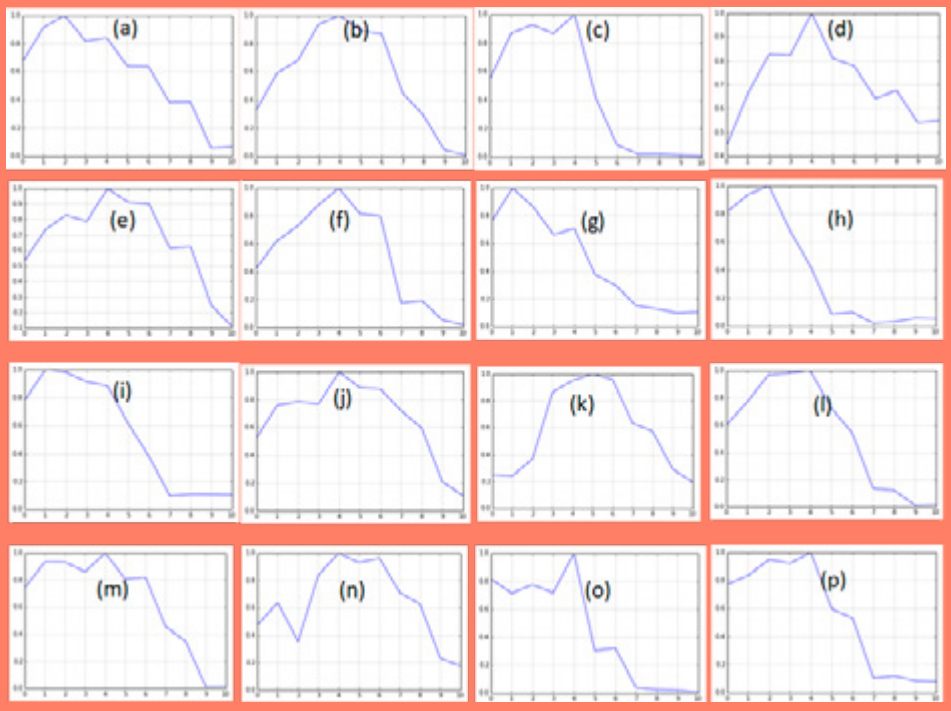


Figura 3.12. Escala de severidad cuantitativa obtenida para 16 plantas de uchuva afectadas por Foph. Las barras toman valores que van desde o hasta 5, se le asigna un valor de o al momento actual y anterior al que la planta alcanzó su máxima superficie de dosel.
Fuente: Elaboración propia

Si se analizan las gráficas se puede establecer que las plantas que tuvieron un mejor comportamiento son las que están representadas por las figuras 3.13d, 3.13e, 3.13j, 3.13k y 3.13n. Por el contrario, las plantas que se muestran en las figuras 3.13c, 3.13g, 3.13i y 3.13 h tuvieron el peor rendimiento.

Por último, para cada planta se calculó el área bajo la curva a partir de los valores de escala que se obtuvieron a través del tiempo en el diagrama de barras. Este valor de área es el resultado final que caracteriza a la planta y que permite comparar su rendimiento con las otras plantas en términos de resistencia a la enfermedad.

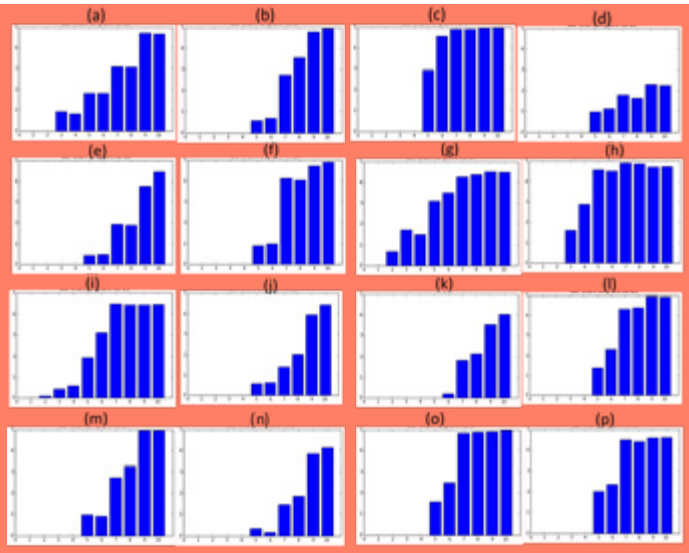


Figura 3.13. Escala de severidad cuantitativa obtenida para 16 plantas de uchuva afectadas por Foph. Las barras toman valores que van desde o hasta 5, se le asigna un valor de o al momento actual y anterior al que la planta alcanzó su máxima superficie de dosel.
Fuente: Elaboración propia

La tabla 3.3 muestra en una manera decreciente los valores de área de la escala cuantitativa obtenida para las plantas que se analizaron en la figura 3.13. Estos valores corroboran el análisis anterior, del cual se concluyó que las plantas marcadas como d, k, n, e y j presentaron los mejores resultados, mientras que las plantas i, c, g y h fueron más susceptibles a la enfermedad.

Tabla 3.3. Valores de área bajo la curva de la escala cuantitativa obtenida para las plantas analizadas

Planta	D	K	N	E	J	B	m	F
Valor	8.89	9.72	9.75	10.73	10.82	14.78	15.26	17.26

Planta	A	I	P	O	I	C	G	h
Valor	18.54	19.78	20.15	21.12	21.78	24.72	25.81	31.22

Fuente: Elaboración propia

Fotografía: Gabriel D. Roveda

Fotografía: Gabriel D. Roveda