



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium oxysporum*
f. sp. *niveum* EN SUELOS DE CULTIVOS COMERCIALES DE
SANDÍA EN SONORA MÉXICO**

Por:

Edgar Josué Ochoa Lagarda

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edgar Josué Ochoa Lagarda la han encontrado satisfactoria y recomienda que sea aceptada con requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Irasema Vargas Arispuro
Directora de tesis



Dr. Ernesto Fernández Herrera
Co-Director de tesis



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Integrante del comité de tesis

Consuelo Corrales

MC. Consuelo Guadalupe Corrales Maldonado
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Aislamiento e Identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* en Suelos de Cultivos Comerciales de Sandía en Sonora, México” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Edgar Josué Ochoa Lagarda, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACION EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada durante la realización mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) por permitirme ser parte de su comunidad estudiantil, por el acceso y usos de sus instalaciones, materiales y equipos para realizar esta tesis de maestría.

Pero sobre todo agradezco a Dios por permitirme cumplir mis metas, darme fuerzas en momentosdificiles y nunca dejarme solo.

Agradezco al Dra. Irasema Vargas Arispuro por aceptar ser mi directora de tesis aún sin conocerme, por su disposición y compromiso desde el primer hasta el último día de este posgrado,por su forma de trabajo y organización, es una gran asesora.

A los integrantes del comité de tesis, Dr. Ernesto Fernández Herrera, Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez y la MC. Consuelo Guadalupe Corrales Maldonado por su asesoramiento, sugerencias, aportaciones y comentarios que estuvieron en todo momento dirigidos para la mejora de este trabajo.

Le agradezco enormemente a la Dra. Irene Iliana Ramírez Bustos por su profesionalismo, sus asesorías, su paciencia conmigo y por ser una guía desde el primer momento de mi ingreso al CIAD espero colaborar nuevamente con usted en un futuro.

A la M.C. Emmanuel Aispuro Hernández por todo el apoyo técnico.

Al personal docente y administrativo del CIAD por apoyar y guiar en todo momento a los estudiantes y brindar un servicio de calidad siempre que se requiere.

A mis compañeros: Lino Batista, Adelmo Rosas, Francisco Alday, Ana Flores, Laura Ochoa, Mario Chocoza, Frida Leal, que de alguna u otra manera formaron parte de mi vida y enseñanza.

Gracias por ser los mejores amigos. Bendiciones.

DEDICATORIA

A mis padres Rosa Amelia Lagarda Antelo y Rubén Ochoa Lagarda quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

Mis hermanos por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

“Lo importante no es el destino sino el trayecto y una vez que llegas es bajaras nuevamente y llevar a alguien contigo. Es el apartado escrito entre líneas del amor donde nos dice, hay más dicha en dar que en recibir”

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	13
2.1. El Cultivo de la Sandía (<i>Citrullus lanatus</i>)	13
2.2. Importancia Socioeconómica del Cultivo de Sandía.....	14
2.3. Problemas Fitosanitarios en el Cultivo de Sandía	15
2.4. Características Generales de <i>Fusarium oxysporum</i>	16
2.5. Características de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	18
2.5.1. Ciclo de Vida de <i>Fusarium oxysporum</i>	19
2.5.2. Síntomas de la Marchitez en Plantas de Sandía.....	21
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo General.....	25
4.2. Objetivo Específicos.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Muestreo de Suelos.....	26
5.2. Obtención de Aislados <i>Fusarium oxysporum</i> (FO).....	26
5.3. Identificación Morfológica de <i>Fusarium oxysporum</i> (FO)	27
5.3.1. Velocidad de Crecimiento en Medio PDA	28
5.3. Preservación de Aislados en Papel Filtro	28
5.4. Preparación de Inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> (FO)	29
5.5. Inoculación de las Plantas.....	29
5.5.1. Evaluación de la Incidencia de la Enfermedad en Plantas de Sandía.....	30
5.5.2. Grado de Severidad en Plantas de Sandía.....	31
5.6. Identificación Molecular de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	32
6. RESULTADOS Y DISCUSION	34
6.1. Muestra de Suelo	34
6.2. Aislados Obtenidos de <i>Fusarium oxysporum</i>	35
6.3. Pruebas de Patogenicidad	42
6.3.1. Evaluación de Síntomas en Plantas de Sandía infectadas con Aislados de Suelos. ..	43

CONTENIDO (continuación)

6.3.2. Incidencia de Marchitez Vascular en Plantas de Sandía Inoculadas con Aislados de Suelo	44
6.3.3. Severidad de la Marchitez Vascular en Plantas de Sandía Provocada por Aislados Obtenidos de Suelos.	46
6.3.4. Re-aislamiento de Tejido de la Planta de Sandía Infeccionadas con Aislados Obtenidos de Suelos.	47
6.5. Análisis Morfológico de los Aislamientos Obtenidos de Suelo	49
6.6. Identificación Molecular de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> (FON)	53
7. CONCLUSIÓN	57
8. RECOMENDACIONES	58
9. REFERENCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	18
2	Clamidospora de <i>Fusarium oxysporum</i>	18
3	Ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i>	20
4	Lesiones en el sistema vascular de las plantas de sandía.....	22
5	Fotografía capturadas mediante el uso de la aplicación telefónica GPS Map Camera.....	34
6	Vista general de crecimiento de colonias fúngicas de la primera dilución (1/10) de suelo en medio de cultivo agar Komada.....	36
7	Diferencia entre las colonias de <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	37
8	Plantas de sandía (var. Sugar Baby) infectadas con FO.....	42
9	Evolución de síntomas en plantas de sandía variedad Sugar Baby.....	43
10	Incidencia de la enfermedad (%) en plantas de sandía, bajo el efecto de los aislamientos empleados en el estudio.....	45
11	Porcentaje de severidad de la enfermedad (%) en plantas de sandía, bajo el efecto de los aislamientos empleados en el estudio.....	46
12	Re-aislamiento a partir de plantas de sandía inoculadas.....	47
13	Aislamiento de tallos de planta de sandía sanas e infectadas con el hongo en medio PDA.....	48
14	Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio PDA al séptimo día.....	50
15	Producción de esporas y cuerpos fructíferos de <i>Fusarium oxysporum</i>	51
16	Primers ITS1/ITS4 para PCR anidado primera ronda.....	53
17	Los cebadores Fon-1/Fon-2 para PCR anidada segunda ronda.....	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Susceptibilidad de cultivares de sandía a las distintas razas (0, 1, 2 y 3) de FON.....	19
2	Escala de severidad usada para evaluar el daño causado por FO en plantas de sandía.....	31
3	Georeferenciación de muestras colectadas en la Costa de Hermosillo y Valle Guaymas-Empalme.....	35
4	Densidad de inóculo de las 10 muestras de suelo colectadas de los 2 campos de cultivo de sandía evaluados durante el año 2020.....	38
5	Aislados con características morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i>	39
6	Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio de cultivo PDA: datos Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio de cultivo PDA: datos colectados diariamente y a los siete días en milímetros.....	59
7	Medición (Largo x Ancho) de microconidias, macroconidias y número de septas.....	52
8	Análisis de secuencia genómica y sus números de acceso al GenBank.....	54

RESUMEN

La marchitez vascular o fusariosis es una de las enfermedades fúngicas a nivel mundial más importantes en el cultivo de sandía (*Citrullus lanatus*), y es causada por el hongo de suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON). La presencia de FON en plantas de sandía provoca cuantiosas pérdidas económicas, ya que ocasiona la muerte en un periodo de 2 a 4 semanas, por lo que se le considera uno de los factores que más limita la producción de frutos en este cultivo. En este estudio se planteó identificar y cuantificar la presencia de FON en suelos de cultivos de sandía ubicados en la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme, Sonora, México. Para el aislamiento del patógeno, se colectaron cinco muestras por cada campo muestreado; en zonas donde las plantas de sandía previamente habían manifestado síntomas de la enfermedad. Para el aislamiento y cuantificación de inóculo del patógeno, se realizaron diluciones seriales por cuenta en placa, utilizando medio agar Komada. De los aislados obtenidos, se seleccionaron aquellas colonias que cumplieron con las características morfológicas a *Fusarium oxysporum* (FO). La patogenicidad de los aislados obtenidos, se evaluó en plántulas de sandía de la variedad Sugar Baby con una suspensión de esporas de 1×10^6 esporas mL^{-1} de cada aislado. La identificación molecular se realizó mediante la técnica de PCR anidado; en la primera ronda se utilizaron los cebadores ITS1/ITS4 y para la segunda los cebadores específicos de FON (Fon-1/Fon-2). De las muestras de suelo analizadas, se encontró que la densidad de inóculo de FO osciló entre 50 y 490 UFC g^{-1} de suelo seco. Se obtuvieron 8 aislamientos con características morfológicas de FO, que provocaron síntomas de marchitez mayor ($p < 0.05$) al 50% en las plantas inoculadas. Los cebadores universales para hongos amplificaron un fragmento de 545 pb, mientras que los específicos amplificaron un fragmento de 174 pb, las secuencias se analizaron con el programa BLAST y se compararon con las secuencias reportadas en el banco de genes (GeneBank) del NCBI, mostrando 99.21% de identidad con FON. Con este resultado pudimos confirmar la presencia de FON en los suelos de cultivo de sandía de la región de la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme en Sonora, México.

Palabras clave: *Citrullus lanatus*, marchitez vascular, fusariosis, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

ABSTRACT

Vascular wilt or Fusarium wilt is one of the most important fungal diseases worldwide in the cultivation of watermelon (*Citrullus lanatus*), and is caused by the soil fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON). The presence of FON in watermelon plants causes considerable economic losses, since it causes death in a period of 2 to 4 weeks, which is why it is considered one of the factors that most limits the production of fruits in this crop. In this study, it was proposed to identify and quantify the presence of FON in soils of watermelon crops located on the Coast of Hermosillo and the Guaymas-Empalme bay, Sonora, Mexico. For the isolation of the pathogen, five samples were collected for each sampled field; in areas where watermelon plants had previously shown symptoms of the disease. For the isolation and quantification of the pathogen inoculum, serial dilutions were made per plate count, using Komada agar medium. From the isolates obtained, those colonies that met the morphological characteristics of *Fusarium oxysporum* (FO) were selected. The pathogenicity of the isolates obtained was evaluated in watermelon seedlings of the Sugar Baby variety with a spore suspension of 1×10^6 mL⁻¹ spores of each isolate. Molecular identification was performed using the nested PCR technique; ITS1 / ITS4 primers were used in the first round and FON-specific primers (Fon-1 / Fon-2) for the second. From the soil samples analyzed, it was found that the density of the inoculum of FO ranged between 50 and 490 CFU g⁻¹ of dry soil. 8 isolates with morphological characteristics of FO were obtained, which caused symptoms of greater wilting ($p < 0.05$) at 50% in the inoculated plants. The universal primers for fungi amplified a 545 bp fragment, while the specific ones amplified a 174 bp fragment, the sequences were analyzed with the BLAST algorithm and compared with the sequences reported in the NCBI gene bank (GeneBank), showing 99.21% identity with FON. With this result, we were able to confirm the presence of FON in the watermelon growing soils of the Costa de Hermosillo region and the Guaymas-Empalme bay in Sonora, Mexico.

Key words: *Citrullus lanatus*, vascular wilt, Fusarium wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*

1. INTRODUCCIÓN

Sonora es el principal productor de sandía (*Citrullus lanatus*) en México, aportando el 38% de la producción nacional. Con el paso del tiempo, los cultivos de sandía en Sonora han presentado cuantiosas pérdidas económicas debido a diversas enfermedades de origen fúngico (SIAP, 2020). En los últimos años, se ha reportado la presencia de hongos patógenos asociados con la marchitez de la sandía en las dos zonas de mayor producción del estado de Sonora, México; La Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme (Rentería *et al.*, 2018). La marchitez vascular es una enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* (FO), provocando síntomas característicos como clorosis de las hojas, marchitamiento general o parcial de las plantas, adelgazamiento del tallo y necrosis en el xilema del tallo (Ortega *et al.*, 2015). FO es definido fenotípicamente como un hongo asexual que produce tres tipos de esporas; microconidias, macroconidias y clamidosporas. Dentro de la misma especie se han encontrado formas patogénicas (f. sp.), según los hospederos que parasitan; algunos se subdividen a su vez en razas (Gordon, 2017). El marchitamiento en plantas de sandía a nivel mundial, está asociada a la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON), considerado como uno de los problemas más graves que enfrentan los productores de sandías, provocando entre el 30 al 80% de pérdidas en la producción (Rahman *et al.*, 2021). Una vez que los campos están infestados por este hongo, puede sobrevivir durante muchos años en los suelos en forma de clamidospora o de forma saprofita en plantas (Costa *et al.*, 2018). Una práctica para controlar el marchitamiento por FON es el uso de portainjertos, pero requiere demandas intensivas de mano de obra y reduce la calidad. Otra estrategia utilizada, es la siembra de plantas con resistencia genética, debido a que ha demostrado ser el método de control más efectivo contra un gran espectro de fitopatógenos (Thies y Levi, 2007; Schwarz *et al.*, 2010). En la actualidad existen cuatro razas de FON que han sido reportadas: raza 0, 1, 2 y 3. Descritas en función de su capacidad para causar enfermedad en los diferentes genotipos de plantas de sandía (Zhou *et al.*, 2010). En México de manera general, y en el estado de Sonora de manera particular, no se conoce la presencia ni la distribución de FON en los suelos de cultivos, por este motivo es relevante identificar y cuantificar la presencia de FON en algunos de los campos agrícolas donde se cultiva la sandía de las dos regiones principales productoras del estado de Sonora, México.

2. ANTECEDENTES

2.1. El Cultivo de la Sandía (*Citrullus lanatus*)

Las plantas de la familia Cucurbitáceas, forman un grupo de diversas especies que se cultivan en todo el mundo, bajo muchas condiciones diferentes y para muchos propósitos diferentes. Son consideradas como plantas enredaderas de crecimiento rápido, herbáceas, de múltiples ramas, procumbentes o trepadoras, su hábitat se encuentra en regiones templadas y tropicales del mundo. Los principales tipos de frutos más cultivados son; pepino, melón, sandía, calabaza, calabacín, entre otros (McCreight, 2017). Las plantas de sandías, pertenecen al género *Citrullus* (Cucurbitaceae), consideradas nativas de África debido a sus registros en la historia, aunque se conoce que estos cultivos son utilizados desde la antigüedad (a.c.) (Jeffrey, 2001; Levi *et al.*, 2017). Dentro del género *Citrullus* se encuentran cinco especies como; *C. lanatus*, *C. colocynthis*, *C. ecirrhosus*, *C. naudinianus* y *C. rehmi*. *Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai (sin. *C. vulgaris* Schrad.) es considerado por dar lugar a la producción de frutos de gran tamaño, produce una pulpa dulce de carne roja, es bien aceptada por la sociedad debido a que son ricos en vitamina A, B y C, así como también contiene minerales como potasio magnesio, hierro, fósforo. Se conoce que poseen propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Wasylikowa y van der Veen, 2004; Paris, 2015; Dieng *et al.*, 2017). En los últimos años se ha incrementado la producción de sandías de tamaño reducido, debido a una demanda creciente de este fruto. En la India se han desarrollado y lanzado varias selecciones de variedades e híbridos para cultivo comercial. Entre ellas, Sugar Baby, lanzada por el Instituto de Investigación Agrícola de la India (ICAR), es una de las variedades más populares principalmente a su pequeño tamaño y sabor dulce. La fruta tarda 85 días en madurar, es de forma redonda con cáscara negra azulada y pulpa de color rosa intenso, pesa entre 3 y 5 kg (PP *et al.*, 2021). Últimamente muchos institutos han desarrollado nuevos cultivos de sandía con cualidades mejoradas entre ellas, el desarrollo de frutos sin semilla o con semillas pequeñas que no presenten sabor amargo (Orduz *et al.*, 2000). La sandía (*Citrullus lanatus* Thunb) es un cultivo frutal de gran importancia económica en la actualidad, como en la generación de ingresos y en la provisión de valor nutricional. En los últimos cuatro años se ha

reportado una producción de 29.6 millones de toneladas producidas en todo el mundo (Verma y Tomar, 2017).

2.2. Importancia Socioeconómica del Cultivo de Sandía

La apertura comercial y la liberalización económica, mediante la firma del Tratado De Libre Comercio De América del Norte en la década de 1990, provocó que la agricultura mexicana se profundizará en la globalización, por lo que experimentó un cambio en beneficios del sector primario y la economía (Hernández, 2019). Reporte según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), China ocupa el primer lugar a nivel mundial en la producción de sandía con el 76% de productividad, seguido de Turquía, India y Brasil, posicionando a México en el décimo lugar (FAO, 2020). La superficie cosechada de sandía en México es de aproximadamente 42 mil ha, con una producción aproximada 1,345,705 t en el periodo de primavera-verano y otoño-invierno (SIAP, 2020). El principal estado productor de sandía es Sonora con una producción de 514,232 t, seguido de Chihuahua con una cantidad de 163,691 t y Veracruz con 95,701 t. Los principales municipios del estado de Sonora con mayor producción son: la Costa de Hermosillo aportando un volumen de 288,031 t, seguido de Empalme con 83,070 t y Guaymas con 78,591 t (SIAP, 2020). Los productos agrícolas mexicanos han logrado posicionarse en el mundo en gran parte por los acuerdos comerciales que se tienen con otros países entre ellos, Estados Unidos, Alemania y Canadá, principales importadores. A principios del año 2018 y 2019, se exportaron aproximadamente 1,320,269 t de frutas frescas, con un valor de \$5.1 millones de dólares anuales (SIAP, 2018; ODEPA, 2019). El volumen en producción de sandía ha permitido generar el séptimo mayor monto de divisas en nuestro país, convirtiéndose en uno de los cultivos de gran explotación e importancia económica, así como por la mano de obra que genera y su rentabilidad (Saiz *et al.*, 2017; Inforural, 2019). La Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) reportó un total de 11.8 millones de puestos de trabajo (contratos) como jornaleros en las unidades de producción (INEGI, 2017). Sin embargo, uno de los factores limitantes en la producción de sandía en Sonora, son las enfermedades que se presentan en las plantas. En 2013, plantaciones de sandía localizadas en los Valles de Guaymas-

Empalme y la Costa de Hermosillo, áreas que concentran más del 96% de la superficie en el cultivo de la sandía, se observó que antes de la madurez fisiológica, ciertas plantas presentaban amarillamiento y marchitez de hojas; días después, las plantas murieron. Un análisis visual mostró la presencia de lesiones en la corteza de la base del tallo y en la parte superior de la raíz, así como podredumbre en las raíces principales y secundarias, propias de enfermedades causadas por hongos (Meza-Möller *et al.*, 2014).

2.3. Problemas Fitosanitarios en el Cultivo de Sandía

La agricultura a nivel nacional e internacional, se ha visto afectada a través de los años por los problemas fitosanitarios causados principalmente por bacterias, hongos, nemátodos, fitoplasmas, micoplasmas y virus (Alvarado, 2009). Una de las causas más comunes es por la falta de rotación del cultivo, debido a la plantación de la misma familia botánica aportando nutrientes a los suelos que facilitan el desarrollo del patógeno en el siguiente ciclo de cultivo, causando pérdidas económicas, provocando que los agricultores abandonen sus terrenos (Crawford, 2017; Xiong *et al.*, 2016). En la actualidad el control de las enfermedades en las plantas depende en gran medida del equilibrio en el uso de agroquímicos, injertos, cultivos resistentes y protección a través del manejo integrado de plagas (Vega, 2017). En el estado de Sonora, México y particularmente en el caso de sandía, la problemática fitosanitaria es de gran impacto debido a la falta de información que tienen los agricultores, sobre enfermedades presentes en las plantas de sandías, provocando el uso discriminado de agentes nocivos, ocasionando numerosos daños tanto a las plantas como a los suelos (Silveira *et al.* 2018; Ferreñan y Enrique, 2019). Una de las enfermedades más importantes en los cultivos de sandía, son causados por hongos de suelo, es por lo que actualmente se están empleando diferentes estrategias para identificar y erradicar al patógeno en los campos agrícolas (Fernández *et al.*, 2013). Los fungicidas de amplio espectro como el carbendazim, son aplicados antes de plantar por lo que puede prevenir la infección, pero no puede controlar la enfermedad de la planta una vez infectada. Una advertencia en el uso de estos compuestos, es que afectan la microbiota beneficiosa de los suelos, por esta razón muchos productos están prohibidos en México por la COFEPRIS, ya que son altamente peligrosos para la

salud humana y el ambiente según el PAN International (Villón, 2011; Vargas *et al.*, 2016). El uso de injertos en plantas de sandía ha demostrado eficiencia ya que mejora la tolerancia de nemátodos y las enfermedades del suelo, ayuda a la resistencia de sequías, mejora la absorción de agua como de nutrientes, cuyo resultado es un mayor rendimiento de las plantas favoreciendo el desarrollo de la agricultura, pero requiere demandas intensivas de mano de obra y reduce la calidad. Otro método de mayor eficiencia es la siembra de plantas con resistencia genética ya que, ha demostrado ser el método de control más efectivo contra un gran espectro de fitopatógenos (Thies y Levi, 2007; López *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2010). Un estudio de análisis morfológico de suelos con cultivo de sandía en el estado de Sonora, México, reveló la presencia de tres géneros de hongos; *Fusarium* spp. (74%), *Ceratobasidium* spp. (20%) y *Rhizoctonia* spp. (6%), asociados a la pudrición de la planta de sandía (Rentería *et al.*, 2018). La mayoría de los trabajos señalan a *Fusarium* spp. como el principal responsable de la muerte por marchitez y pudrición del tallo en plantas de sandías. Se conoce a *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* como el patógeno más importante causante de la enfermedad de la marchitez vascular o fusariosis en los cultivos de sandía de todo el mundo (Egel y Martyn, 2007; Zhou *et al.*, 2010). Actualmente una de las estrategias que se utilizan para considerar el manejo o control de un microorganismo altamente patogénico, es recurrir al uso de plantas genéticamente mejoradas como una efectiva medida de control (Fernández *et al.*, 2012).

2.4. Características Generales de *Fusarium oxysporum*

El género *Fusarium* spp. pertenece a la clase Ascomycetes, orden Hypocreales, fue descrito por primera vez por Link en 1809. Es conocido como uno de los grupos de hongos patogénicos más importantes en la agricultura y horticultura, causantes de una variedad de enfermedades en innumerables cultivos, considerados oportunistas (Snyder y Hansen, 1945; Zemankoa y Lebeda, 2001; Zabka y Pavela, 2018). Algunas de sus especies producen toxinas que afectan a hombres, plantas y animales. En la actualidad se conocen más de 100 especies de *Fusarium* spp. descritas que parasitan a las plantas, sólo 12 de ellas pueden considerarse altamente patógenas, entre ellas destacan: *F. solani* y *F. oxysporum* (FO) (Tapia y Amaro, 2014; Gordon, 2017). *F. solani* afecta

principalmente al sistema de raíces de muchas plantas hospedantes, causando síntomas conocidos como pudrición de la raíz en muchos cultivos de importancia agrícola como, por ejemplo; plantas de papas, tomates, calabaza, entre otros miembros de la familia de las cucurbitáceas (Zhang *et al.*, 2006). Las enfermedades provocadas por FO es una de las más graves, por lo que es considerada como limitante en la producción de cultivos en todo el mundo, bajo diversos climas, manifestándose en una variedad de plantas cucurbitáceas entre ellas a las plantas de sandía. Uno de los síntomas que manifiesta la planta, distintivo de los demás, es la necrosis del xilema con el adelgazamiento del tallo (Lombard *et al.*, 2019). Históricamente FO ha sido definido fenotípicamente como un hongo asexual, debido a que aún no se ha descubierto una forma reproductiva sexual (Arie *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2000; Aoki *et al.*, 2014). Se sabe que es un hongo cosmopolita, de aspecto filamentoso con micelios aéreos bien desarrollado el cual, puede variar en la producción de escasos a abundantes. Produce pigmentos en el centro de la colonia de color rosado, violeta o púrpura ampliándose a medida que el hongo va envejeciendo. Su desarrollo óptimo oscila a una temperatura de 25 °C a 28 °C. Por arriba de 33 °C y por debajo de 17 °C produce enzimas inhibitoras de crecimiento que mantienen su desarrollo de forma latente (Booth, 1971; Nelson, 1991; Sinha *et al.*, 2018). FO produce tres tipos de esporas reproductivas; microconidios, macroconidios y clamidosporas. Las microconidias poseen varias formas (ovales o esféricas), es la espora más pequeña del hongo (Figura 1-a), las macroconidias se presentan en forma de medialuna hialinas, son anchas, largas y curvadas, contienen septas en su estructura interna que varían de 3 a 4 según su tamaño (Figura 1-b). FO es considerado principalmente como un hongo de campo, ya que causan un sin número de enfermedades en los cultivos (Leslie y Summerell 2006; Sumalan *et al.*, 2013). Este hongo puede sobrevivir por muchos años en el suelo o de manera saprófita en plantas, considerado resistente a medios ambientes extremos, debido a su estructura fisiológica de resistencia denominada clamidospora. Su característica es de doble pared gruesa, lisa o rugosa (Figura 2), lo que vuelve ineficaz la rotación de cultivos a corto plazo (Lacy *et al.*, 1996; Daugovish *et al.*, 2008). Tienen la capacidad de infectar especies vegetales cuando sufren algún tipo de desbalance, colonizando las partes aéreas y subterráneas de las plantas (Leslie y Summerell, 2006). Estudios realizados en el Estado de Sonora, México indican que el principal agente causal de la marchitez de la planta de sandía en campos de cultivo de la Costa de Hermosillo es por *Fusarium oxysporum* con una incidencia del 91% (Fernández *et al.*, 2013).

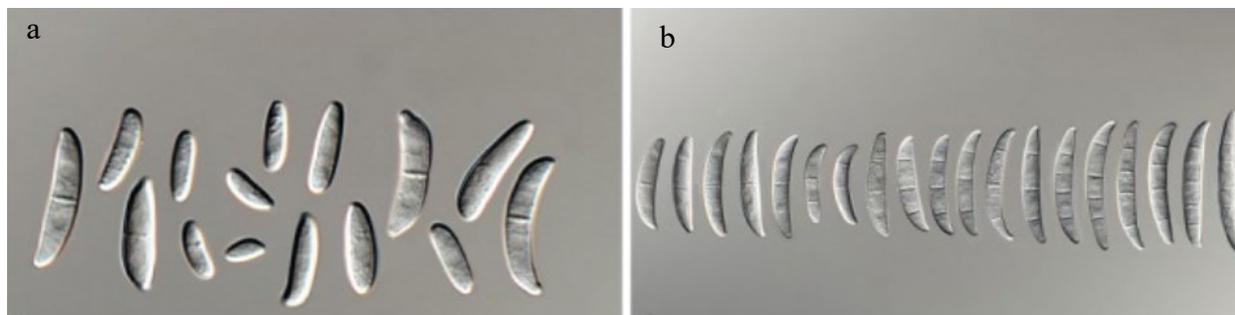


Figura 1. Esporas de *Fusarium oxysporum*. a) Microconidias b) Macroconidias (Lombard *et al.*, 2019)



Figura 2. Clamidospora de *Fusarium oxysporum* (Lombard *et al.*, 2019)

2.5. Características de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

La marchitez vascular o fusariosis en plantas de sandía, es causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON), una enfermedad descrita por primera vez en Carolina del Sur y Georgia de los Estados Unidos. FON es reportado como un patógeno especializado que ocasionar la muerte en plantas de sandías (Smith, 1894). La supervivencia del hongo se encuentra entre 5 a 6 años de forma saprófita en plantas, incluso en ausencia de las plantas hospederas, se ha reportado que pueden sobrevivir en forma de clamidospora por más de 10 años en suelos, debido a que su estructura de pared gruesa, le permite resistir temperaturas extremas (Martyn y Netzer, 1991; Lü *et al.*, 2011). La enfermedad causada por FON es una de las menos controlables, ya que el patógeno se hospeda dentro del sistema vascular de la planta, manifestando síntomas a corto plazo de marchitez, provocando grandes pérdidas a nivel económicos, ya a que un estudio reportó, una disminución del 30 a 80% en productividad de cultivos de sandía a causa de esta

enfermedad (Rahman *et al.*, 2021). Se conocen tres razas descritas de FON: razas 0, 1 y 2. La raza 0 es la menos agresiva y solo causa marchitez en cultivares más viejos y en plantas sin genes de resistencia. La raza 1 es más virulenta que la raza 0 debido a que, causa un marchitamiento leve a moderado en la mayoría de los cultivares que se clasifican como resistentes a la marchitez vascular o fusariosis. La raza 2 fue observada por primera vez en Israel en 1973, conocida por ser, altamente virulenta ya que puede afectar a cultivares resistentes, afecta a todo los cultivares comerciales de sandía disponibles actualmente (Netzer, 1976; Netzer y Dishon, 1973; Zhou y Everts, 2003). Un estudio propone la existencia de una raza 3, manifestándose como la más virulenta de FON descrito hasta la fecha, debido a que enferma a todas las plantas de sandías, incluyendo a las que presentan mayor cantidad de genes de resistencia contra el patógeno (Zhou *et al.*, 2010). En el Cuadro 1 se muestran las susceptibilidad y resistencia (S=susceptibilidad y R=resistencia) de algunos cultivares o genotipos de sandías a las distintas razas (0, 1, 2, y 3).

Cuadro 1. Susceptibilidad de cultivares de sandía a las distintas razas (0, 1, 2 y 3) de FON (Zhou *et al.*, 2010).

Raza 0	Raza 1	Raza 2	Raza 3	Cultivares
S	S	S	S	Black Daimond (Sugar Baby)
R	S	S	S	Charleston Gray (Crimson Sweet)
R	R	S	S	Calhoun Gray
R	R	R	S	PI-296341-FR

2.5.1. Ciclo de Vida de *Fusarium oxysporum*

FON es un hongo predominante, monocíclico, transmitido por el suelo y diversificado en todo el mundo, que incluye entidades saprofitas y patógenas. Es un patógeno que se ha especializado para parasitar las plantas de sandías ya que no se ha reportado que parasite a otras plantas de la familia cucurbitáceas (LeBlanc *et al.*, 2017; Xiong y Zhan, 2018). El agua y los equipos agrícolas contaminados, son un medio de propagación para el patógeno a distancias cortas y en áreas extensas, normalmente una vez que una región se contamina, persiste de manera latente en suelos, cerca o lejos de la radícula de la planta (Egel y Martyn, 2013). Se considera como el primer contacto entre el hongo y la planta de sandía, por medio de secreciones de la raíz captadas

por las esporas del patógeno, considerando a los ácidos fenólicos con una función como moléculas señal o atrayentes aleloquímicos el cual, depende de las concentraciones fenólicas en virtud a que brindan la mayor atracción al patógeno (Hong *et al.*, 2009; Gordon, 2017). Una vez que el hongo se encuentra en la pared de la radícula, las hifas penetran el tejido vascular, comienzan a producir microconidias y se desplazan por el xilema con ayuda del flujo del agua. Colonizando el tejido vascular adyacente del parénquima hasta provocar la oclusión del transporte de agua y nutrientes hacia las partes apicales de la planta manifestando una pérdida de turgencia en las hojas (Di Pietro *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2015). Posteriormente, se produce una infección por el patógeno que habitualmente permanece hasta la muerte o descomposición de la planta, completando el ciclo de vida parasítico como se muestra en la Figura 3. La enfermedad de marchitez por FON se logra generalmente mediante la propagación de spora (microconidias, macroconidias) dentro del sistema vascular de la planta, y las clamidosporas funge su función para brindar una supervivencia a largo plazo en suelos, ya que son el atributo manejable más bajo de la infección del patógeno (Agrios, 2007; Egel y Martyn, 2007). Se menciona que la propagación del patógeno no se realiza de planta a planta dentro de una misma temporada, debido a la ausencia de producción de esporas sobre el suelo en el campo, sin embargo, estudios indican una rápida propagación transmitida por semillas infectadas (Haglund y Kraft, 2001; Martyn y Vakalounakis, 2017).

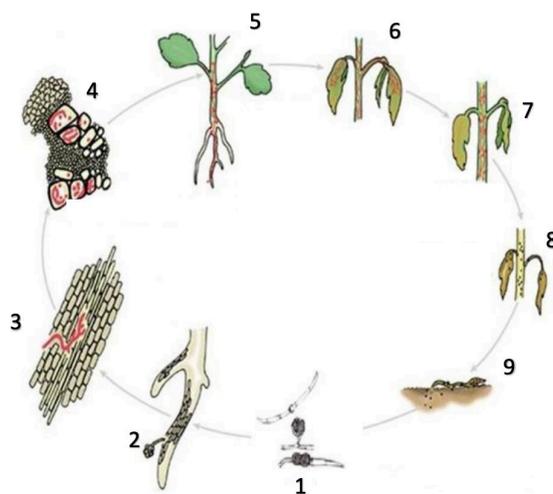


Figura 3. Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum*. 1) Hongo presente en el suelo, 2) penetración a la raíz, 3) colonización en la raíz, 4) penetración de hifas al tejido vascular, 5) colonización de microconidias en los tejidos vasculares, 6) síntomas en las plantas, 7) germinación de esporas

dentro del tejido, 8) muerte de la planta, 9) presencia de estructuras del hongo en el suelo (Kanzan y Gardiner, 2018).

Estudios mencionan que las conidias de *Fusarium* spp., poseen altas cantidades de compuestos grasos y requieren de un sustrato rico en carbono, así como también, nitrógeno para la germinación de microconidias (Palmero *et al.*, 2008). Las macroconidias se han relacionado con la diseminación aérea, lo que produce más de un ciclo de infección por ciclo del cultivo, no común en patógenos habitantes del suelo (Vázquez *et al.*, 2017). El hongo produce clamidosporas cuando los niveles de carbohidratos disminuyen en el tejido necrótico y son liberadas al suelo junto a restos de hifas cuando la planta muere (Beckman, 1987). La raza de FON que no causa patogenicidad en algunas variedades de plantas de sandía, se debe a que, son incapaces de colonizar la raíz, ya que no pueden penetrar en el sistema vascular, debido a que, la planta desencadena una eficaz combinación de interacciones celulares y refuerzo de determinadas estructuras del tejido permitiendo una respuesta de defensa al patógeno. Existen diferentes maneras en las que penetra el hongo a la planta susceptible y desencadena una variedad de enzimas que provocan la infección; pectolíticas, celulolíticas, hemicelulosas, amilasas, lipolíticas y toxinas como; ophiobolin, lycoramin, piricularin, victorin, colletotol, entre otras (Castaño, 1978). Ante esto la planta reconoce algunos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y desencadena una respuesta de defensa para evitar la infección como la producción de geles, gomas y/o tilosas. Por tanto, algunas razas de FON pueden combatir el mecanismo de defensa de la planta, produciendo ciertos efectores y factores de patogenicidad de forma que el patógeno puede colonizar los tejidos de su huésped formando sus estructuras de reproducción (Ortiz, *et al.*, 2014).

2.5.2. Síntomas de la Marchitez en Plantas de Sandía

FON se ha convertido en un problema serio ya que producen metabolitos tóxicos provocando síntomas severos que ponen en peligro a las plantas de sandía. El desarrollo de la enfermedad se manifiesta más rápido cuando hay un ataque de nemátodos, debido a que las plantas presentan heridas en el tallo o en la raíz, favoreciendo la entrada del hongo a las partes internas del tejido, incrementando la severidad de los síntomas (Varon *et al.*, 2014). El hongo puede mantenerse de

forma latente tanto en la parte externa como interna de la semilla de sandía, presentando síntomas hasta el momento de la germinación. En plantas jóvenes que desarrollan sus primeras hojas verdaderas, regularmente una de las características que se diferencia de las demás plantas sanas es un retraso en el crecimiento, evitando el desarrollo de la floración y por tanto que los frutos se desarrollen (Boughalleb y Mahjoub, 2006; Kleczewski y Egel, 2011). Los síntomas inicialmente se presentan como una clorosis o amarillamiento foliar en algunas hojas de la planta y a medida que la enfermedad progresa, el amarillamiento se observa de forma gradual en la mayor parte del follaje (Acosta y E.A., 2019). En la situación de que el hongo presente mayor virulencia, se observa que el tejido vascular de la base del tallo presenta grietas con coloración castaño oscuro, extendiéndose hasta los extremos apicales de la planta, se observa la coloración parda en la parte interna del tallo característico de la enfermedad de FO, por lo que es utilizado para su identificación como se muestra en la Figura 4 (Jones y Jiménez, 2001). En las plantas adultas, causa el bloqueo de los vasos del xilema causando el adelgazamiento como la necrosis en la parte unilateral del tallo por lo que, a medida que avanza la enfermedad, el marchitamiento se vuelve permanente y las plantas pueden morir (Ortega *et al.*, 2015).



Figura 4. Lesiones en el sistema vascular de las plantas de sandía; decoloración y pudrición de haces vasculares, típicas de síntomas de daños por FON (Fernández-Herrera *et al.*, 2021).

Hasta la fecha no se tiene conocimiento de trabajos publicados sobre FON relacionados con la marchitez en plantas de sandía cultivadas en Sonora, México, sin embargo, con frecuencia se menciona que las enfermedades de las plantas de sandías, producidas en las zonas de la Costa de

Hermosillo y el Valle Guaymas-Empalme, se deben al ataque de FO (comunicación personal con técnicos de campo). Al diagnosticar al patógeno, generalmente se basan en los síntomas del cultivo y en el mejor de los casos, en la morfología de las colonias, así como la observación de las estructuras reproductivas. Estos análisis requieren de un gran conocimiento taxonómico de *Fusarium* spp. Además, la identificación del patógeno con microscopía es ineficaz y no es un método adecuado para detectar al patógeno en tejidos de plantas infectadas, no es posible determinar la forma especial (f. sp.) sin el previo uso de una prueba de patogenicidad utilizando los postulados de Koch el cual consiste: 1) Todas las plantas que presenten los síntomas de la enfermedad contiene al patógeno y todas las plantas donde esté presente el patógeno muestra síntomas de la enfermedad 2) El patógeno debe aislarse en cultivo puro 3) Toda planta inoculada artificialmente con el patógeno debe presentar los síntomas propios de la enfermedad 4) El patógeno debe poder aislarse de las plantas inoculadas artificialmente y coincidir con el patógeno que hemos inoculado inicialmente (Zhang *et al.*, 2005; Martyn, 2014). La amplificación de nucleótidos con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es eficaz, específica y su alta sensibilidad permite una identificación directa del patógeno en mezclas complejas. El uso de los conjuntos de cebadores específicos (Fon-1/Fon-2), para la identificación molecular de FON son más confiables (Jurado *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2010). La finalidad del presente estudio, nos lleva a la correcta identificación del hongo, siguiendo la metodología antes mencionada. Los resultados, nos ayudarán a tener un mejor control fitosanitario, mirándose favorecidos los agricultores en la producción de los cultivos de sandía, aportando un volumen significativo, que se aprecia en beneficio de la economía de nuestro país.

3. HIPÓTESIS

La identificación morfológica y moleculares de aislados de suelos donde se cultiva sandía (*Citrullus lanatus*), con síntomas de marchitez, confirma la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, como agente causal de la enfermedad denominada marchitez vascular, distribuida en zonas de cultivo de la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme, Sonora, México.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Identificar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* en suelos de zonas productoras de sandía (*Citrullus lanatus*) de la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme, Sonora.

4.2. Objetivo Específicos

- Determinar la distribución de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* mediante el aislamiento de cepas en suelos de la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme.
- Identificar características morfológicas y moleculares de aislados obtenidos de suelos colectados de la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme.
- Evaluar la patogenicidad de la cepa aislada utilizando los postulados de Koch.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestreo de Suelos

La colecta de suelos se realizó en campos ubicados en las regiones de la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme. Regiones en las que los cultivos de sandía (*Citrullus lanatus*) presentaron antecedentes de la enfermedad conocida como marchitez vascular. Se realizó un muestreo durante el periodo de preparación para la siembra, en el ciclo primavera-verano, del año 2020. Se colectaron 5 muestras/ha partiendo de las cuatro esquinas del campo seguido de una muestra del centro (muestreo 5 de oros), cada muestra de aproximadamente 500 g, se tomó a una profundidad de 20 cm sobre el suelo (Rodríguez *et al.*, 2001). En cada sitio donde se colectó la muestra de suelo, se tomó una fotografía como geoposicionador del lugar. Las muestras fueron colocadas en bolsas ziploc previamente etiquetadas con el nombre del campo y número muestras. Posterior a la colecta, fueron conservadas en una hilera con geles congelados y transportadas al departamento de Ciencias de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. donde se realizó un proceso de secado a una temperatura 25 °C durante 5 días, en un horno convencional marca yamato, modelo Dx 300 con ello para remover la humedad, al finalizar, las muestras se tamizaron y se almacenaron a una temperatura de 4°C antes de ser utilizada, esto para conservar la concentración del hongo (Villarino *et al.*, 2021).

5.2. Obtención de Aislados *Fusarium oxysporum* (FO)

El aislamiento de FO se realizó partiendo de las muestras suelos previamente colectadas. Se prepararon submuestras de 10 g de cada una de las cinco muestras de suelo, seguido las muestras se vertieron en matraces Erlenmeyer de 500 mL, que contenían 90 mL de agua-agar al 0.1% (solución madre) y se agitaron durante 5 min. Se realizaron tres diluciones en serie (1:10, 1: 100 y 1: 1000), para poder realizar el recuento de las colonias y obtener la densidad de inóculo por

muestra de suelo analizada. En tres tubos de ensayo, conteniendo 9 mL de agua-agar al 0.1%, se agregó de cada dilución correspondiente, 1mL de solución de suelo posterior, se tomó 1 mL de cada dilución y se aplicaron en placas Petri con medio cultivo selectivo agar Komada. El medio de cultivo es selectivo para el género *Fusarium* spp., debido a que este medio contiene nutrientes para el desarrollo fúngico y reactivos inhibidores como la estreptomycin, que ayuda a suprimir el desarrollo bacteriano y el pentacloronitrobenzeno (PCNB) que inhiben algunos contaminantes fúngicos como *Rhizoctonia solani* (Komada, 1975). Una vez inoculada cada dilución de suelo en el medio, se extiende con ayuda de una varilla de vidrio sobre toda la placa y se incubaron a 27°C durante 7-10 días en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se examinaron las colonias emergentes en el medio bajo un microscopio de disección para analizar las características y poderlas contar con mayor precisión. La densidad de población observada se expresa como el número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC g⁻¹) de suelo seco.

5.3. Identificación Morfológica de *Fusarium oxysporum* (FO)

Se seleccionaron las colonias que presentaron características morfológicas de FO, para ser transferidas a un medio papa dextrosa (PDA) modificado con estreptomycin. Se incubaron las colonias a una temperatura de 27 °C durante 7 días, este medio de cultivo nos permitió observar, la morfología de forma macroscópica y el tipo de pigmento (café, rojo, violeta, naranja, púrpura, blanco) que manifiesta la colonia (Tapia y Amaro, 2014). Se utilizó un microscopio marca Zeiss, para la identificación de cuerpos fructíferos como; macroconidias, microconidias y clamidosporas. Se diferenciaron las colonias aisladas siguiendo las claves taxonómicas propuestas por el manual de laboratorio de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). Para las mediciones (µm) de las microconidias, macroconidios como el número de septas producidas, se utilizó un lente digital adaptado al microscopio y la instalación de un software Zeiss zen lite del año 2020 esto, para poder observar con mejor claridad la dimensiones y estructura de las esporas.

5.3.1. Velocidad de Crecimiento en Medio PDA.

La velocidad de crecimiento es otro carácter secundario que es usado con frecuencia para la caracterización de especies del género *Fusarium* spp. Para la realización de estos caracteres, se usaron cajas Petri con 20 mL de medio de cultivo PDA, al cual se le colocó un pequeño cubo de 3 mm² de agar con micelio de los aislamientos que cumplieron con las características de FO, se colocó en el centro de la caja Petri y se incubó a una temperatura de 27°C durante 7 días. Por cada aislamiento se hicieron tres réplicas, realizándose mediciones cada 24 horas hasta que el aislamiento cumpliera su máximo desarrollo. El índice de crecimiento micelial (ICM) fue determinado con la fórmula propuesta por Oliveira (1991):

$$IMC = \frac{C_1}{N_1} + \frac{C_2}{N_2} + \frac{C_3}{N_3} + \dots + \frac{C_n}{N_n}$$

Donde:

IMC= Índice de Crecimiento Micelial

C₁,C₂,C_n= Crecimiento micelial de los aislamientos en la primera, segunda y n evaluación.

N₁,N₂,N_n= Número de días.

5.3. Preservación de Aislados en Papel Filtro

Se realizaron cortes de piezas circulares de papel filtro (Whatman No. 1) previamente esterilizado y se colocaron en el centro de una caja Petri con medio de cultivo PDA. Después se colocaron 6 piezas con una medida de 3 mm² de agar con micelio, provenientes de un cultivo fúngico de 7 días de crecimiento. Las piezas se pusieron con la cara hacia abajo a distancias iguales, a unos pocos mm de la circunferencia del papel filtro. Se incubó a 27 °C durante 7 días en la oscuridad. Una vez el papel filtro se cubrió completamente del micelio del hongo, se desprendió

cuidadosamente del medio PDA, con ayuda de una pinza previamente esterilizada bajo el mechero, dentro de una campana de flujo laminar. El papel filtro se colocó dentro de una caja Petri estéril y se dejó en una incubadora durante 10 días a 27 °C para su secado. Finalizando su secado se cortó con tijeras estériles en forma de pequeñas tiras aproximadamente de 1 mm posterior, se depositó en un tubo de ensayo seco, estéril, etiquetado con nombre y fecha del aislamiento. Los tubos bien sellados con tapón de rosca, se envolvieron en papel aluminio para evitar el contacto con la luz y se guardaron en el refrigerador a una temperatura de -10°C para su conservación, hasta el momento de su uso (Fong *et al.*, 2000).

5.4. Preparación de Inóculo de *Fusarium oxysporum* (FO)

Se prepararon soluciones de esporas de los aislados previamente obtenidos, para poder continuar con las pruebas de patogenicidad. Partiendo de una solución de 50 mL de agua destilada estéril, con Tween 20 al 0.1%. La solución se aplicó sobre la superficie del micelio desarrollado del hongo crecido en PDA seguido, se realizó un raspado con un portaobjeto de vidrio de forma suave para poder remover el micelio y esporas del medio de cultivo. La solución obtenida del raspado, se filtró sobre una gasa estéril para remover el excedente de micelio y solo tener un concentrado de esporas. La solución de esporas se ajustó hasta lograr una concentración de 1×10^6 esporas mL⁻¹ (Fernández *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2010).

5.5. Inoculación de las Plantas.

Para realizar las pruebas de patogenicidad, se utilizaron semillas de sandía de la variedad Sugar Baby proporcionada por la empresa KristenSeed, debido a que muestran un 100% de susceptibilidad al patógeno FON (Wechter *et al.*, 2012). Se utilizaron 200 semillas que fueron previamente lavadas con agua destilada hasta, remover el fungicida (Thiram) que recubre a las semillas (Liu *et al.*, 1994). Se inició el proceso de germinación incubándose durante 3 días a 27

°C, después, las semillas germinadas se sembraron a maceteros de plástico con sustrato estéril (peat moss), se sembraron dos semillas por maceta en un análisis de 10 grupos de plántulas por aislamiento inoculado. Las macetas se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 20-27 °C / 24 h, 80% de humedad y con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8h de oscuridad. Después de la aparición de las primeras hojas verdaderas, se extrajeron las plantas de los maceteros y se lavaron con abundante agua de la llave para remover posible sustrato que haya quedado en las plantas. Con un bisturí se hicieron pequeñas heridas en las raíces y en la parte inferior de los tallos de las plántulas para facilitar la entrada del patógeno, posteriormente, se realizó la inmersión de las plantas en 10 mL de solución de esporas (1×10^6 esporas mL⁻¹) durante 30 min en cada uno de los aislados obtenidos, tomando en cuenta las plantas testigo cual, solo se le realizaron heridas en la raíz como al tallo y fueron colocadas en agua destilada estéril (Latin y Snell, 1986). Una vez inoculadas las plantas con el hongo de interés, se trasplantaron nuevamente a los maceteros con nuevo sustrato estéril y se colocaron nuevamente en la cámara de crecimiento. Las plantas de sandía se regaron con agua destilada, se observaron cada dos días durante 15 días debido a que en este tiempo se esperó observar de manera visual, la manifestación de los síntomas ocasionadas por FO en las plantas, como clorosis o amarillamiento en las hojas, defoliación, enanismo, marchitez y necrosis como el adelgazamiento del tallo (González *et al.*, 2020). Para el re-aislamiento del hongo inoculado se realizaron cortes del tallo de las plantas inoculadas (cinco trozos de tejido). Primero, los trozos se desinfectaron en una solución de cloro (Cl) al 1%, después se lavaron tres veces en agua destilada estéril y se dejaron secar por 10 min en gases estéril bajo el mechero. Las piezas de tejido desinfectado se colocaron en medio PDA adicionado con estreptomycin y se incubaron a 27 °C durante 7 días. El crecimiento micelial de FO presente en los tejidos, se recuperó en PDA, y sus características morfológicas fueron comparadas con las de los aislamientos inoculados para completar los postulados de Koch (Kleczewski y Egel, 2011).

5.5.1. Evaluación de la Incidencia de la Enfermedad en Plantas de Sandía

Para determinar la incidencia de la enfermedad de cada aislamiento, se inició la cuantificación de

plantas de sandías con presencia de marchitez. Esta cuantificación se realizó partiendo de los 15 días posteriores a la inoculación de los aislamientos seleccionados. El método de incidencia es la suma de las plantas que presentan la enfermedad con respecto al total evaluadas por aislamiento inoculado (Castro *et al.*, 2004). El valor de la incidencia se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$Ia \% = \left(\frac{n}{N}\right) \times 100$$

Dónde: Ia (%)= Incidencia de la enfermedad en porcentaje

n= Número de plantas enfermas por aislamiento experimental

N= Número total de plantas evaluadas por aislamiento experimental

5.5.2. Grado de Severidad en Plantas de Sandía

Se evaluó el grado de daño manifestado en las plantas de sandía, mediante el uso de una escala hedónica (Estrada, 1989). Los criterios utilizados en la evaluación de la enfermedad fueron: el número total de plantas infectadas (después de la inoculación) y el grado de la lesión presente en las hojas como en el tallo. Los datos de severidad en este ensayo y en todos los realizados en este estudio, se convirtieron a porcentaje siguiendo la metodología de Townsend y Heuberguer (1943).

Cuadro 2. Escala de severidad usada para evaluar el daño causado por FO en plantas de sandía (Estrada, 1989).

CLASE	INTENSIDAD DE LA ENFERMEDAD
0	Sin síntomas visibles a la enfermedad
1	Hojas amarillas
2	Marchitez, hojas amarilla en el hipocótilo
3	Hojas amarillas, marchitez y disminución en el crecimiento de la planta
4	Hojas amarillas, marchitez, defoliación, lesiones necróticas y adelgazamiento del tallo
5	Muerte de la planta

5.6. Identificación Molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

Se realizó la extracción de ADN genómico, de los aislamientos de hongos seleccionados como FO, en base a las pruebas morfológicas y los resultados positivos de las pruebas de patogenicidad. Partiendo de 100 mg de micelio fresco cual, se obtuvo de un previo raspado de un medio PDA con FO desarrollado de 7 días. Se colectó en un microtubo eppendorf de 1.5 mL para posterior, seguir la metodología de extracción de ADN utilizando el kit Norgen Biotek Corp (Kumar y Mugunthan, 2018). Se adicionaron 500 μ L de Buffer lisis a 100 mg de micelio fresco seguido, se realizó una molienda con una varilla azul estéril, para poder romper la pared celular del hongo. Después, se agregó 1 μ L de RNAsa para incubarse a una temperatura de 65 °C por 10 min, seguido se agregaron 100 μ L de Buffer binding y se homogeneizó. Se incubó la muestra en hielo por 5 min luego, se ensambló la columna F (anillo blanco) al microtubo y se pipeteo el lisado a la columna para centrifugar a 14,000 rpm por 2 min. Se midió el volumen de la muestra centrifugada y se agregó el mismo volumen de etanol al 70 % para luego colocar la muestra en una nueva columna F (anillo gris) para centrifugar a 1,000 rpm por 1 min. Se descartó el filtrado y se realizó un lavado de la columna, adicionando 500 μ L de solución WN seguido, se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min, se descartó el filtro y se adicionaron 500 μ L de wash solution A (repetir este lavado dos veces) y centrifugar por última vez a 14,000 rpm por 2 min. En la dilución de ADN se ensambla la columna en un tubo de elución de 1.7 mL y se agregó 100 μ L de Buffer de elución B seguido, se incubó a 25 °C por 1 min para después centrifugar la muestra a 10,000 rpm por 1 min. Finalizando la muestra de ADN se colocó en un microtubo eppendorf de 1.5 mL y se conservó a una temperatura de -20 °C, hasta el momento de su procesamiento. Una vez obtenido el ADN del hongo se realizará la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada, el cual incluyó dos rondas de amplificación, en la primera ronda se utilizaron los cebadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para la identificación de FO (Panabieres *et al.* 1989; White *et al.*,1990; Li y Hartman 2003; Zhang *et al.* 2005). Para la segunda ronda se utilizaron oligonucleótidos específicos para FON, los primer Fon-1 (5'-CGATTAGCGAAGACATTCACAAGACT-3') y Fon-2 (5'-ACGGTCAAGAAGATGCAGGGTAAAGGT -3'), amplifican un fragmento de 174 pb (Lin *et*

al., 2010). El PCR anidado se realizó partiendo de un volumen de reacción de 25 μL : 5 μL de Buffer, 2.5 μL de MgCl_2 , 0.5 μL de dNTP, 1 de primer ITS1 (10 μM), 1 μL de primer ITS4 (10 μM), 0.125 μL de DNA polimerasa, 1 μL de ADN (50 a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y 13.875 μL de H_2O . La amplificación se realizó en un termociclador convencional marca MJ Research modelo PTC-200. Para la primera ronda (ITS1/ITS4) se programó para un ciclo de: 1) 94 °C por 5 min, 2) 94 °C por 30 s, 3) 58 °C por 30 s, 4) 72 °C por 1 min, 5) ir al paso 2, 29 tiempos, 6) 72 °C por 10 min y 7) 4 °C para finalizar. Para la segunda ronda (Fon-1 / Fon-2) programado para un ciclo de: 1) 94 °C por 5 min, 2) 94 °C por 30 s, 3) 54 °C por 30 s, 4) 72 °C por 1 min, 5) ir al paso 2, 29 tiempos, 6) 72 °C por 10 min y 7) 4 °C para finalizar. Los productos amplificados de PCR anidado, se examinaron mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% (p / v), un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pares de bases (pb) y 4 mL de un marcador fluorescente (GelRed) para su foto documentación. Los fragmentos amplificados que se obtuvieron en el PCR de la segunda ronda (Fon-1/Fon-2), se enviaron a secuenciar a un laboratorio de referencia (Macrogen's sequencing service), posterior las secuencias se analizaron en el programa BLAST y se compararon con las secuencias reportadas en el banco de genes (GeneBank).

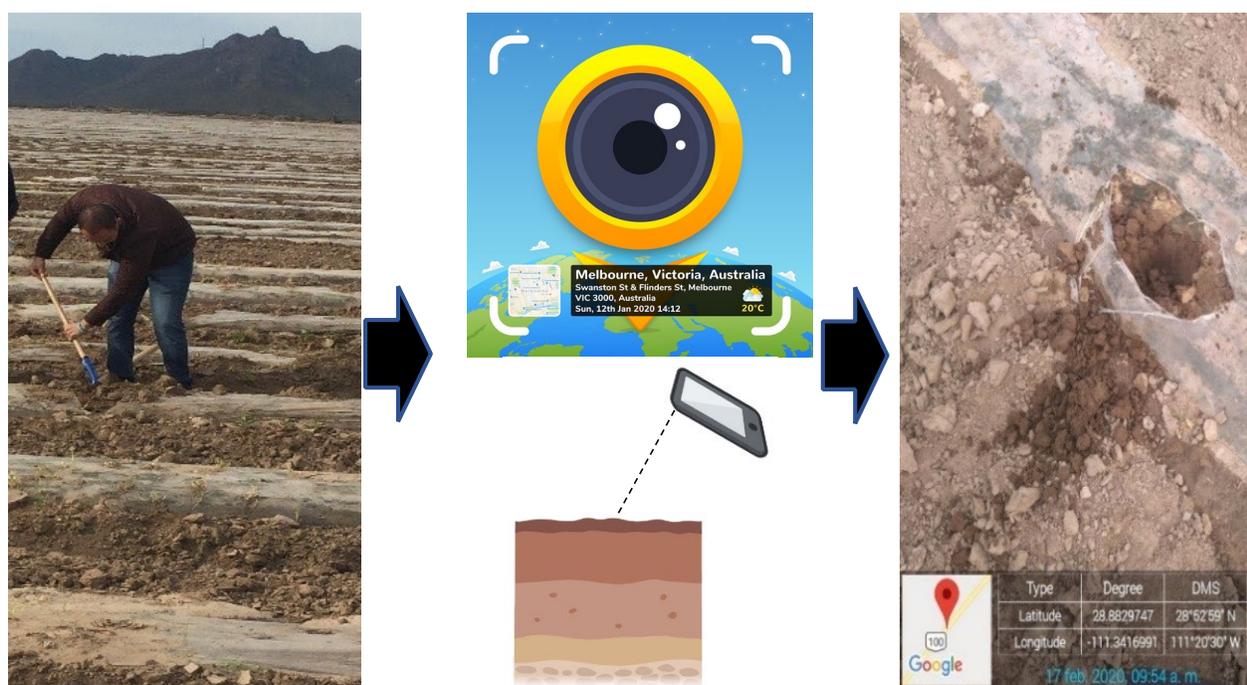
5.7. Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y se empleó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) después de comprobar su normalidad con la prueba de D'Agostino Skewness. Las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Todos los datos se analizaron utilizando el software estadístico NCSS 2021 (Kaysville, UT, EE.UU).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Muestra de Suelo

Se colectaron 5 muestras de suelos de 500 g previo a la siembra en dos campos agrícolas: uno ubicado en la Costa de Hermosillo y otro en el Valle de Guaymas-Empalme; donde las plantas presentaban antecedentes de marchitez. Para el muestreo, se realizó una abertura al plástico que recubre el suelo, con una pala se retiró la capa superficial (aprox. 5-10) y a una profundidad de 20 cm se tomó 500 g de suelo para cada una de las muestras. Las muestras colectadas fueron previamente etiquetadas y se tomaron fotografías como referencia en los cinco lugares donde se colectaron las muestras de suelo, mediante el uso de una aplicación telefónica llamada GPSMap cámara, como se puede apreciar en la Figura 5. En la Cuadro 3 se muestran las coordenadas y número de muestras colectadas por municipio.



Cuadro 3. Georeferenciación de muestras colectadas en la Costa de Hermosillo y Valle Guaymas-Empalme.

Localidad	Latitud	Longitud	Muestra (#)	Peso (g)	Tipo de muestra
Costa de Hermosillo	28.8829	-111.3107	1	500	Suelo
	28.8829	-111.3105	2	500	Suelo
	28.8830	-111.3106	3	500	Suelo
	28.8830	-111.3106	4	500	Suelo
	28.8831	-111.3107	5	500	Suelo
Valle de Guaymas-Empalme	28.1437	-110.6692	1	500	Suelo
	28.1643	-110.6685	2	500	Suelo
	28.1577	-110.6889	3	500	Suelo
	28.1431	-110.6665	4	500	Suelo
	28.0118	-110.6301	5	500	Suelo

6.2. Aislados Obtenidos de *Fusarium oxysporum*

Las colonias fúngicas desarrolladas en medio Komada, a partir del suelo colectado de la Costa de Hermosillo y del Valle de Guaymas-Empalme, fue favorecido mediante el uso de este medio de cultivo semi-selectivo para *Fusarium* spp., debido a que en los resultados, se pudo observar en las primeras diluciones (1/10) de las 10 muestras de suelos analizadas, el desarrollo de abundantes y pequeñas colonias con estructura y coloraciones diferentes como se puede observar en la Figura 6, mientras que en las diluciones (1/100, 1/1000) no se observó crecimiento fúngico.

Muestra de suelo	Costa de Hermosillo	Valle de Guaymas-Empalme
1		
2		
3		
4		
5		

Figura 6. Vista general de crecimiento de colonias fungicas de la primera dilución (1/10) de suelo en medio de cultivo agar Komada.

De los diferentes crecimientos fúngicos obtenidos en medio Komada, se observó el desarrollo de algunas colonias que presentaron el halo bien definido, micelio compacto (abundantes hifas aéreas) y una coloración blanca; que al observarlas al microscópico presentaban fiálides largas, las cuales son características de *Fusarium solani* (FS) (Figura 7-a). Por el contrario, otras colonias desarrollaron un halo de forma irregular, micelio menos compacto (pocas hifas aéreas) y de color rosadas; que al observarlas al microscopio presentan fiálides cortas, característico de *Fusarium oxysporum* (FO) (Figura 7-b). Lo anterior coincide con lo reportado por Leslie y Summerell (2006), quienes señalan que *Fusarium oxysporum* se diferencia de *Fusarium solani* por el tamaño de las fiálides; largas para FS y cortas para FO. Adicionalmente, Nishimura (2007) menciona que las colonias de FO presentan pigmentos de color violeta o rosado en el medio de cultivo agar Komada, mirándose a la vez necesario una previa identificación de forma visual cómo a nivel microscópico, para poder diferenciar entre FS y FO.

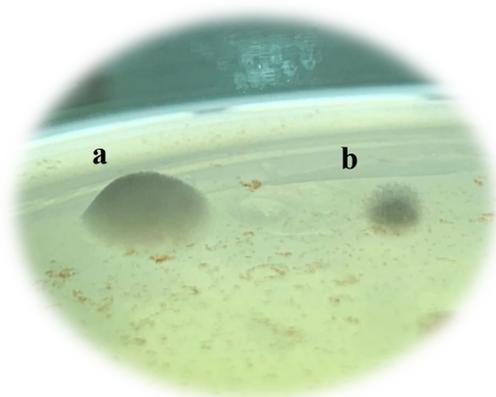


Figura 7. Diferencia entre las colonias de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*. a) colonia con halo bien definido (abundantes hifas aéreas) b) colonias con halo irregulares y escasos (pocas hifas aéreas).

La severidad de la marchitez por FO, se ve afectada debido a la densidad del inóculo que se encuentra presente en el suelo, así como también por el nivel de virulencia del patógeno. En el presente estudio se observó el crecimiento de colonias fúngicas solo en la primera dilución (1/10), de cada una de las muestras analizadas de los dos campos muestreados. La densidad de inóculo en los lotes de suelo previamente colectado mostró una diferencia en cargas de inóculo,

presentando una variación de 50 a 490 UFC g⁻¹ de suelo seco (Cuadro 4). Se observó mayor concentración de FO en las muestras de suelo del Valle de Guaymas-Empalme con una carga máxima de 490 UFC g⁻¹ y una mínima de 50 UFC g⁻¹, a diferencia de la región de la Costa de Hermosillo, con una carga máxima de 270 UFC g⁻¹ y una mínima de 70 UFC g⁻¹. Resultados similares a los nuestros fueron reportados por Boughalleb y El Mahjoub (2006) en campos de sandía en África, presentando una concentración de FO entre 0 a 200 UFC g⁻¹ de suelo seco. Estos autores indican que en suelos con una densidad de inóculo entre 99 a 200 UFC g⁻¹ de suelo seco, la incidencia de la enfermedad por FO oscila entre 54 y 67%. Por otra parte, Netzer (1976) realizó un estudio de la densidad de inóculo de FON en un campo de sandía (var. Sugar Baby) en Israel, reportando una concentración entre 400 y 1400 UFC g⁻¹ de suelo seco. Este mismo autor indica que aún con 400 UFC g⁻¹ de suelo seco, la incidencia y la severidad de la enfermedad oscila entre el 95 y el 100% de las plantas de sandía. Estos estudios resaltan la importancia de conocer y estudiar la densidad de inóculo presente en los diferentes campos agrícolas donde se cultiva la sandía. Con base en lo anterior, se puede considerar que en nuestro estudio las densidades de inóculo en los suelos de los campos de la Costa de Hermosillo presentan una concentración baja, mientras que los campos del Valle de Guaymas-Empalme son medianas; lo que puede estar estrechamente relacionado con la incidencia y la severidad de la enfermedad en las plantas de sandía de los diferentes sectores analizados.

Cuadro 4. Densidad de inóculo de las 10 muestras de suelo colectadas de los 2 campos de cultivo de sandía evaluados durante el año 2020.

Localidad	Muestra de suelo (#)	Densidad de inóculo (UFC g ⁻¹)
Costa de Hermosillo	1	250
	2	280
	3	70
	4	270
	5	110
Valle de Guaymas-Empalme	1	163
	2	490
	3	50
	4	350
	5	260

Las colonias que presentaron mayor similitud a FO se seleccionaron de forma arbitraria; 16 colonias que cumplieron con las características morfológicas del hongo. Se realizaron una serie de aislamientos en medios de cultivo PDA adicionado con estreptomomicina, para observar su máximo desarrollo durante un periodo de 7 días a 27 °C; los aislamientos variaron en su pigmentación. Las colonias presentaron generalmente, una coloración azul opaca no muy pronunciada en el centro de la colonia, se mostró crecimiento de micelios con aspecto algodonoso envejecido (Cuadro 5). Al respecto, Ansari y Butt (2011) mencionan que esta causa (colonia envejecida) se pueden deber a la degeneración de las colonias, lo cual es una de las características más comunes en la mayoría de los hongos en cultivos con medios artificiales, o comúnmente a través de realizar subcultivos sucesivos repetidos. De igual manera, Chang y col. (2020) mencionan que los factores de resiembra pueden ocasionar cambios como la degeneración fenotípica y la atenuación de la virulencia. Por lo anterior, es posible que alguno de los aislamientos obtenidos en el presente estudio hayan desarrollado un crecimiento anormal, debido al tiempo de almacenamiento y resiembra frecuentes en medios de cultivo artificiales durante su manejo.

Cuadro 5. Aislados con características morfológicas de *Fusarium oxysporum* (Leslie y Summerell, 2006)

Localidad	Muestra	Aislado	Imagen
Costa de Hermosillo	Hermosillo, muestra número dos, dilución uno (HM2D1)	A3	
	Hermosillo, muestra número dos, dilución uno (HM2D1)	A4	

Hermosillo,
muestra número
dos, dilución uno
(HM2D1)

A5



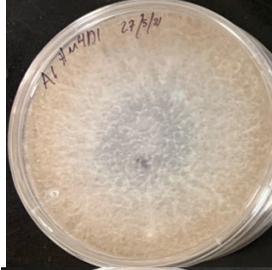
Hermosillo,
muestra número
dos, dilución uno
(HM2D1)

A6



Hermosillo,
muestra número
cuatro, dilución uno
(HM4D1)

A6



Hermosillo,
muestra número
dos, dilución dos
(HM2D2)

A7



Hermosillo,
muestra número
dos, dilución dos
(HM2D2)

A8



Hermosillo,
muestra número
cuatro, dilución uno
(HM4D1)

A11



Valle
Guaymas/Empalme

Empalme, muestra
número dos,
dilución uno
(EM2D1)

A2



Empalme, muestra
número dos,
dilución uno
(EM2D1)

A4



Empalme, muestra
número cuatro,
dilución uno
(EM4D1)

A8



Empalme, muestra
número cinco,
dilución uno
(EM5D1)

A11



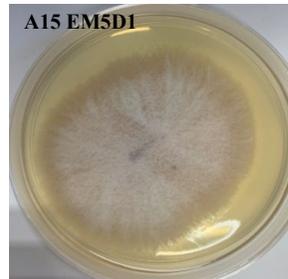
Empalme, muestra
número cinco,
dilución uno
(EM5D1)

A12



Empalme, muestra
número seis,
dilución uno
(EM5D1)

A15



Empalme, muestra
número dos,
dilución uno
(EM2D1)

A18

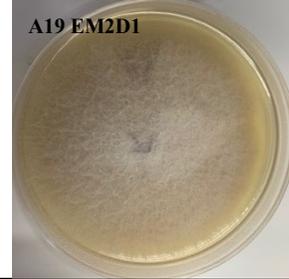
A18 EM2D1



Empalme, muestra
número dos,
dilución uno
(EM2D1)

A19

A19 EM2D1



6.3. Pruebas de Patogenicidad

Al iniciar los postulados de Koch, todas las plantas fueron retiradas de sus macetas y se pusieron en un contenedor de vidrio que contenía agua destilada, para mantener a las plantas hidratadas (Figura 8-a). Posterior se realizaron pequeñas heridas en las raíces y el tallo de las plantas con un bisturí estéril (Figura 8-b). Se preparó una suspensión de esporas de 50 mL ajustado a una concentración de 1×10^6 esporas mL^{-1} de cada uno de los aislamientos previamente seleccionados para inocularlas a las plantas. Se utilizó el método por inmersión, colocando dos plantas en tubo de vidrio con 10 mL de suspensión de esporas durante 30 min (Figura 8-c). Inicialmente las plantas de sandía presentaron entristecimiento de las hojas y flacidez en el tallo, debido a su extracción de las macetas y heridas que se le realizaron, sufriendo un proceso de estrés restableciéndose posterior a su trasplante (Figura 8-d). La manifestación de los síntomas previamente mencionados, puede deberse al cierre de estomas en una respuesta rápida y bien estudiada de las hojas al presentar un estrés hídrico, este mecanismo fisiológico se utiliza para prevenir la pérdida excesiva de agua al disminuir la tasa de transpiración según el estudio realizado por Else y col. (2001).



Figura 7. Plantas de sandía (var. Sugar Baby) infectadas con FO. a) plantas de sandía en recipiente con agua destilada, b) herida en tallo y raíces con bisturí, c) tubos con 10 mL de suspensión de 1×10^6 esporas mL^{-1} , d) plantas inoculadas y restablecidas en maceteros.

6.3.1. Evaluación de Síntomas en Plantas de Sandía infectadas con Aislados de Suelos.

Se realizó diariamente el análisis de los síntomas, en los grupos de diez plantas de sandía por aislamiento inoculado (Figura 9-a). Se consideraron síntomas por efecto del hongo aquellos que se presentaron síntomas en un tiempo de 2 a 3 semanas posterior a la inoculación del hongo a las plántulas. El grupo de plantas testigo (sin infestar) crecieron normalmente hasta el momento de la floración, no presentaron síntomas a la enfermedad cual se esperaba, ya que solo fueron regadas con agua destilada (Figura 9-b). Algunas plantas de sandía que presentaban inóculo de hongo, se observó a inicios de la segunda semana síntomas de clorosis en las hojas y una diferencia en el crecimiento (Figura 9-c). En la tercera y cuarta semana, se observó la marchitez parcial en las hojas, defoliación y el adelgazamiento del tallo (figura 9-d). Algunas plantas manifestaron síntomas más severos en el transcurso de la primera semana como el cambio de color marrón oscuro en la medula del tallo con grietas de 2 a 5 cm (Figura 9-e), marchitez, disminución en su crecimiento y necrosis en las partes laterales del tallo como en hojas (Figura 9-f). Resultados similares reportados por Elmer y col. (2018), mencionan que la manifestación de síntomas en plantas de sandía como: retraso del crecimiento, clorosis en hojas y defoliación, pueden ocurrir en un periodo de 2 a 4 semanas posterior a la inoculación del patógeno. De igual forma, Kleczewski y Egel, (2011) mencionan que los síntomas pueden variar en función a las razas, ya que las plantas de sandía que presentan una enfermedad severa pueden morir en un periodo menor a los 10 días.

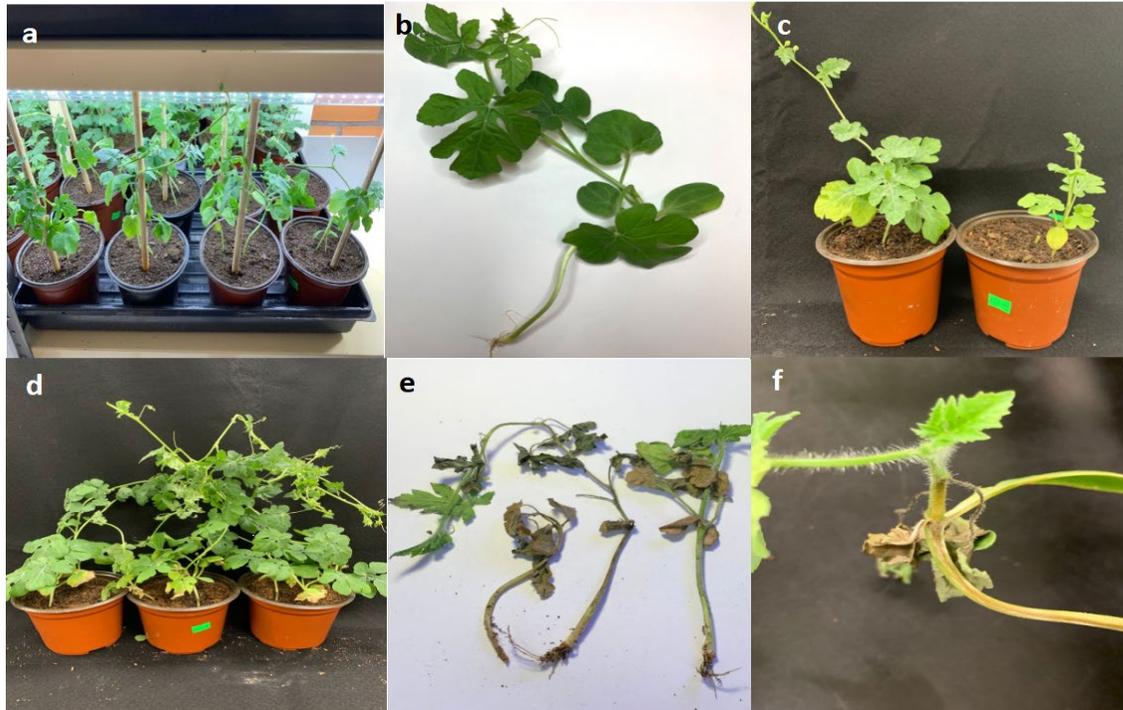


Figura 8. Evolución de síntomas en plantas de sandía variedad Sugar Baby. a) 2 plantas de sandía por maceta, en un estudio de 10 plantas por aislamiento, b) plantas testigo asintomáticas, c) clorosis en hojas y enanismo, e) defoliación y adelgazamiento del tallo, e) herida en tallo de 2 a 5 cm, f) necrosis y adelgazamiento del tallo en plantas de sandía.

6.3.2. Incidencia de Marchitez Vascular en Plantas de Sandía Inoculadas con Aislados de Suelo

Los grupos de plantas de sandía que fueron infectadas con el hongo, presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) con las plantas que no manifestaron síntomas, apreciándose de forma clara en un periodo de 15 días posterior de la inoculación del hongo. La incidencia de la enfermedad en las plantas de sandías correspondiente a los aislamientos de la Costa de Hermosillo y del Valle de Guaymas-Empalme mostraron una variación del 20% al 100% (Figura 10). En los resultados podemos observar tres aislado de la costa de Hermosillo (HM2D1 A5, HM2D1 A6, HM4D1 A6) y cinco aislados del Valle de Guaymas-Empalme (EM4D1 A8, EM5D1A12, EM5D1 A15, EM2D1 A18 y EM2D1 A19) que presentaron una incidencia de la enfermedad ($\geq 50\%$) representativa en plantas de sandía. Los aislamientos EM4D1 A6, EM4D1

A8, EM5D1 A15 y EM2D1 A19 mostraron los valores de incidencia más altos (>90%), con una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a los aislamientos; HM2D1 A3, HM2D1 A4, HM2D1 A7, HM2D2 A8, HM4D1 A11 correspondientes a los suelos colectados de la Costa de Hermosillo y los aislamientos; EM2D1 A2, EM2D1 A4, EM5D1 A11 a los suelos del valle de Guaymas-Empalme, manifestando una incidencia $\leq 30\%$ no representativa en las plantas analizadas, descartándose al momento de continuar con el estudio. Los aislamientos HM2D1 A3 y EM2D1 A2 no mostraron una diferencia significativa en relación al control, considerando a las plantas como resistentes al patógeno por lo que también se descartaron. Por otra parte, Zhou y col (2010) mencionan que al inocular a FON en plantas de sandía var. Sugar baby, presentan una alta incidencia de marchitez ($\geq 67\%$), mientras que estudios realizados por Kurt y col (2008) en plantas de sandía (Crimson Sweet, Crimson Tide, Crisby y 'Emperor) inoculadas con FON, reportaron una incidencia media (46%). Estas diferencias en la manifestación de síntomas pueden verse afectados por múltiples factores como: la concentración del inóculo, la edad de las plantas inoculadas, las condiciones ambientales, el método de inoculación y el genotipo de la planta expuesto al patógeno.

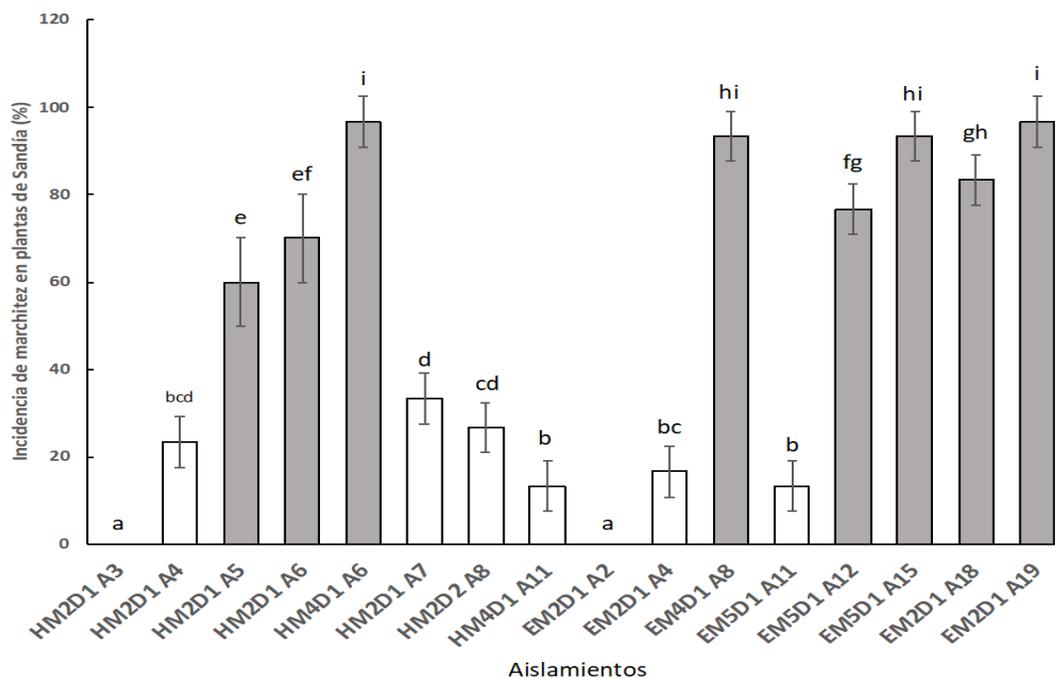


Figura 9. Incidencia de la enfermedad (%) en plantas de sandía, bajo el efecto de los aislamientos empleados en el estudio. Los datos graficados representan la media \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras distintas entre barras indican diferencias presentes entre los aislamientos ($P < 0.05$).

6.3.3. Severidad de la Marchitez Vascular en Plantas de Sandía Provocada por Aislados Obtenidos de Suelos.

Los aislamientos; HM2D1 A5, HM2D1 A6, HM4D1 A6, EM4D1 A8, EM5D1A12, EM5D1 A15, EM2D1 A18 y EM2D1 A19, causaron una severidad mayor al 50% de las plantas de sandía, manifestando síntomas como: marchitez, clorosis en hojas, defoliación, enanismo y necrosis en el tallo. Los aislados EM4D1 A8, EM5D1 A15 y EM2D1 A19 se consideran como los más agresivos (>90%), manifestando en las plantas síntomas como; defoliación, marchitez, adelgazamiento del tallo y necrosis, llevando a la planta hasta la muerte en un periodo menor a los 10 días. Los aislamientos HM2D1 A5, HM2D1 A6, HM4D1 A6, EM5D1A12 y EM2D1 A18 presentaron una severidad moderada (50-80%) en un periodo de 2 a 3 semanas, presentando síntomas como: clorosis en las hojas, defoliación, enanismo y marchitez. Los aislamientos HM2D1 A4, HM2D1 A7, HM2D2 A8, HM4D1 A11, EM2D1 A4 y EM5D1 A11 manifestaron severidad débil ($\leq 30\%$) en las plantas analizadas; síntomas como clorosis en las hojas de los hipocótilo. Los aislamientos HM2D1 A3 y EM2D1 A2 no manifestaron síntomas durante las 4 semanas analizadas por lo que se descartaron del estudio. Asimismo, Fulton y col (2021) agruparon a FON en cuatro grupos de agresividad según el índice de gravedad de la enfermedad; no agresivo, débil, moderado y grave, que corresponde a 0%, 1–32%, 33–67% y 68–100% en todas las plantas examinadas, respectivamente. Previo resultado menciona que FON presenta diferentes niveles de agresividad, debido a las diferentes subespecies dentro de la misma forma especial de FON. Con estos resultados podemos concluir que la severidad del patógeno es diversa, posiblemente por factores como: la carga de inóculo presente en suelos donde se cultiva la sandía y el nivel de virulencia que presenta FON en las regiones de la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme.

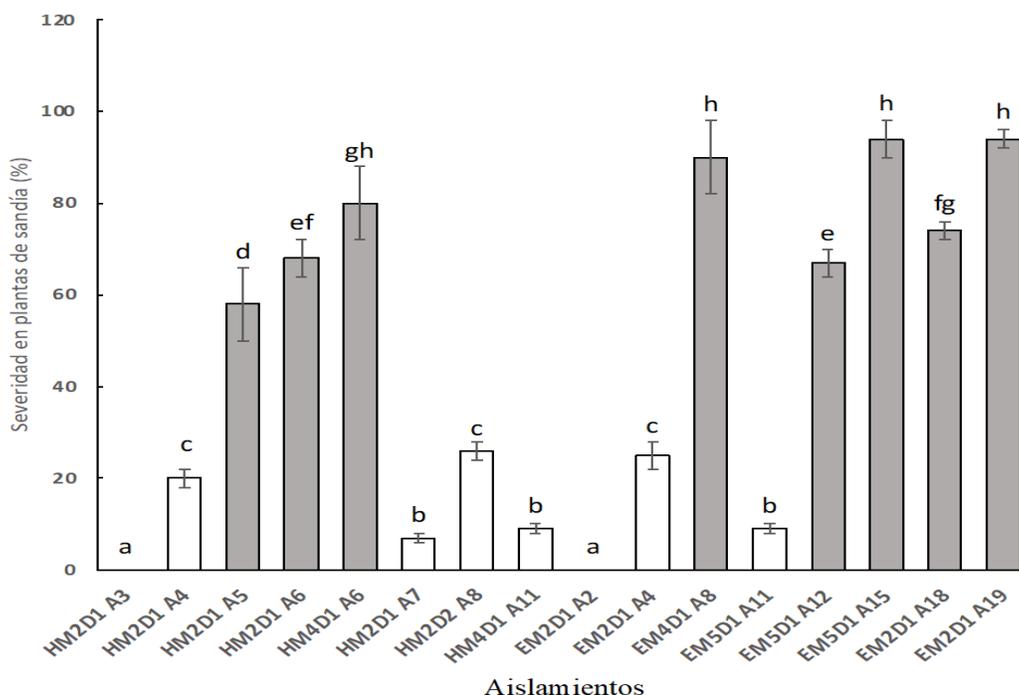


Figura 10. Porcentaje de severidad de la enfermedad (%) en plantas de sandía, bajo el efecto de los aislamientos empleados en el estudio. Los datos graficados representan la media \pm desviación estándar ($n=3$). Letras distintas entre barras indican diferencias entre los aislamientos ($P < 0.05$).

6.3.4. Re-aislamiento de Tejido de la Planta de Sandía Infeccionadas con Aislados Obtenidos de Suelos.

Las plantas inoculadas que manifestaron una incidencia y una severidad mayor al 50% de la enfermedad, se retiraron de sus macetas y se lavaron con agua destilada para retirar posible sustrato (peat moss) que pueda contener el tallo sobre su superficie (Figura 12-a). Se realizaron dos cortes al tallo de forma vertical en la parte inferior del hipocotilo dividiendo el tallo en dos partes iguales, observar en las plantas enfermas, necrosis en la parte interna del tejido y daño en los haces vasculares característico de FO, a diferencia del tejido testigo el cual se observaron totalmente sanos (Figura 12-b). Los tejidos se fraccionaron en partes de 0.5 mm aproximado y posteriormente se realizó una limpieza del tejido en cuatro secciones; el primer lavado fue con cloro al 0.1% por un minuto, seguido de tres lavados con agua destilada estéril de 1 minuto cada uno. Este proceso sirvió de utilidad para eliminar cualquier microorganismo o contaminante que pueda encontrarse en la epidermis de la planta pudiendo contaminar el medio de cultivo o bien

inhibir el desarrollo de hongo de interés (Figura 12-c). Posterior al lavado, las muestras de tejido se colocaron en una gasa estéril, bajo un mechero durante 30 min esto, para que la gasa pueda absorber el exceso de humedad que pueda contener el tejido. Al finalizar los tejidos fueron cultivados en medio PDA y se incubaron a 27 °C durante 7 días.



Figura 11. Re-aislamiento a partir de plantas de sandía inoculadas. a) corte de 3 cm en la parte inferior del hipocótilo, b) diferencia del tejido enfermo y tejido de plantas sanas, c) lavado y secado del tejido.

Se incubaron los tejidos de las plantas testigos y los tejidos de las plantas que fueron inoculadas con los 8 aislamientos (HM2D1 A5, HM2D1 A6, HM4D1 A6, EM4D1 A8, EM5D1A12, EM5D1 A15, EM2D1 A18 y EM2D1 A19), se colocaron en medio de cultivo PDA a 27 °C durante 7 días. Al tercer día de incubación, se apreció el crecimiento de pequeños filamentos sobre el tallo, manifestando una pigmentación color blanca, característico del hongo que habíamos aislado la primera vez, mientras que las plantas testigo no presentaron desarrollo de ningún tipo de contaminante (Figura 13). Los estudios fueron realizados con éxito completando así los postulados de Koch.

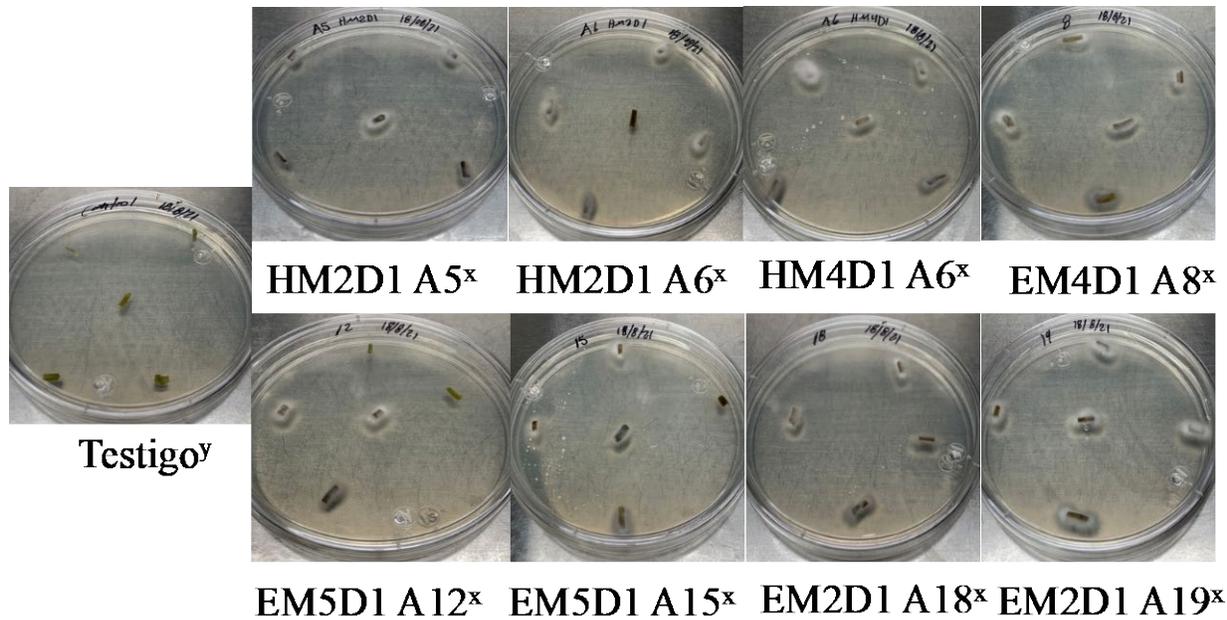


Figura 12. Aislamiento de tallos de planta de sandía sanas e infectadas con el hongo en medio PDA. ^x= tejido con desarrollo de hongo ^y= tejido testigo sin desarrollo de hongo.

6.5. Análisis Morfológico de los Aislamientos Obtenidos de Suelo

Los parámetros morfológicos que se evaluaron fueron: el color de las colonias, la tasa de crecimiento por día y la caracterización de esporas en medio de cultivo PDA. Las colonias presentaron crecimiento de forma circular, el diámetro de las colonias al cumplir los 7 días de incubación fue diferente manifestando una variación de 63 a 73 mm de diámetro, con un promedio de 66.75 mm. La velocidad de crecimiento radial varió de 8.39 a 9.09 mm/día, con un promedio de 8.65 mm/día (Cuadro 6). La velocidad de crecimiento radial guarda relación con los resultados obtenidos por Clavijo (2014), analizando aislamientos de *Fusarium* spp. procedentes de plantas del género *Capsicum*, presentaron un rápido crecimiento en medio PDA, con una velocidad de crecimiento radial de 5.55 a 12.85 mm/día. Estos datos nos indican que los aislados del fitopatógeno al presentar una alta velocidad de crecimiento permiten una mayor y eficaz colonización de los suelos, llegando a producir pérdidas mayores en plantas de sandía cultivadas como se evidencio en la zona del Valle de Guaymas-Empalme, siendo congruentes con los daños reportados donde se realizaron los muestreos.

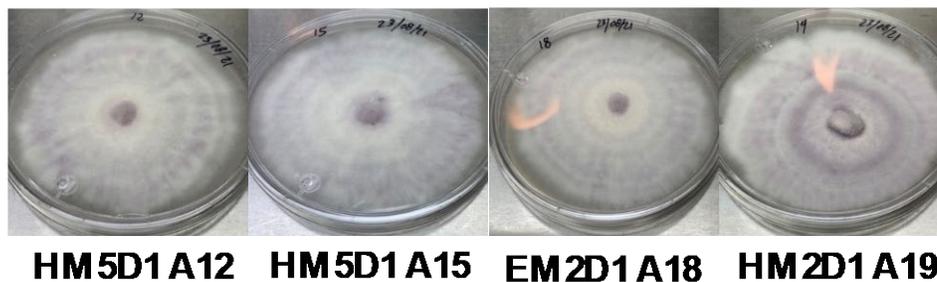
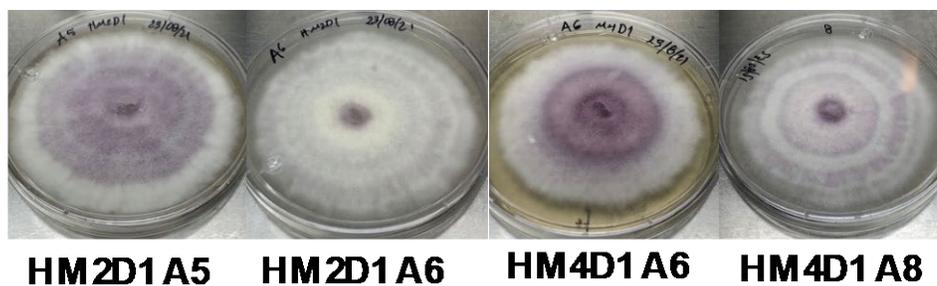
Cuadro 6. Crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo PDA: datos colectados diariamente y a los siete días en milímetros.

Aislamiento	7° día (mm)*	Por día (mm)*
HM2D1 A5	70	8.64
HM2D1 A6	66	8.74
HM4D1 A6	63	8.86
HM4D1 A8	65	8.49
EM5D1 A12	65	8.59
EM5D1 A15	65	8.43
EM2D1 A18	67	8.39
EM2D1 A19	73	9.09
Promedio	66.75	8.65

*= Los valores representan la media (n=3) de cada uno de los aislamientos.

El crecimiento micelial en medio PDA inicialmente produjo micelio vellosos de color blanco algodónoso, al paso de la primera semana de la incubación se manifestó una coloración en su centro, a un color púrpura o violeta. En la parte inferior o reverso de la placa, se observó el crecimiento inicialmente blanco y al pasar de los días la coloración del centro cambió a café o negro como también, la formación de anillos conforme el hongo se desarrollaba (Figura 14). Además, estos resultados coinciden con los estudios realizados por Villanueva y col. (2013) y los de Retana y col. (2018), quienes mencionan que en medios de cultivos sintéticos como PDA, FO pueden presentar pigmentación, violeta, rosado, rojo carmín, rojo vino e incluso azul, esta pigmentación se relaciona con la difusión en el medio de cultivo a partir del micelio y puede variar el cambio de pigmento producido dependiendo del desarrollo del hongo.

a) Anverso



b) Reverso

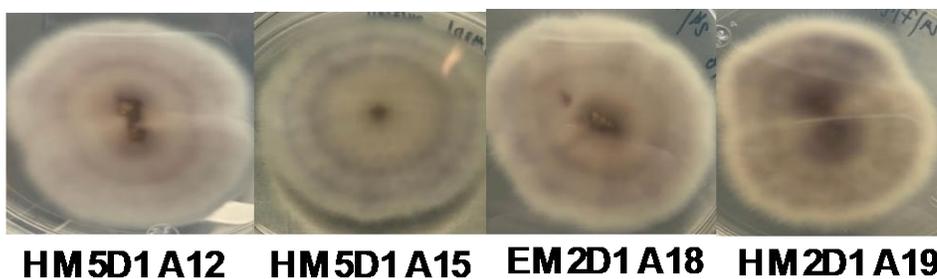
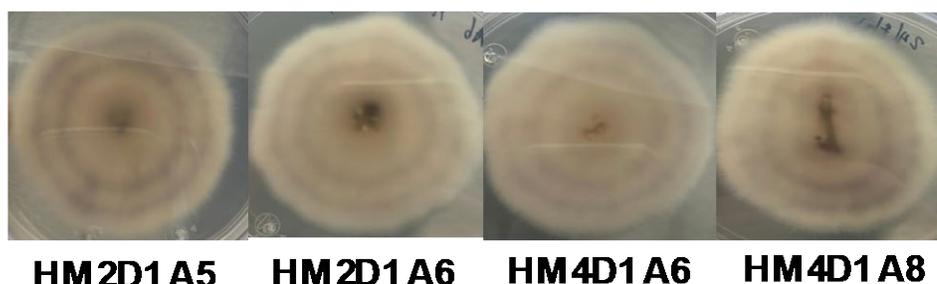


Figura 13. Crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio PDA al séptimo día. a) parte superior: crecimiento anverso micelial, b) parte inferior: crecimiento en el reverso en medio PDA.

Los aislamientos fueron analizados microscópicamente para poder observar los cuerpos fructíferos como: macroconidias, microconidias, clamidosporas y la producción de fiálides. Los 8 aislamientos, presentaron crecimiento de abundantes microconidias aceptadas, algunos soportados por monofialides cortas, la mayoría presentaron forma ovalada, mientras que algunas presentan formas reniformes (Figura 15-a). Se observaron macroconidias largas, en forma de media luna, moderadamente curvadas y con septas transversales (3 a 4) (Figura 15-b). Se apreció

el desarrollo escasas clamidosporas con estructura de pared gruesa, en posiciones terminales o intercalares en la pared (Figura 15-c). La presencia de fiálides cortas intercaladas entre las paredes de las hifas es una de las estructuras representativas de FO que se diferencia a las demás especies del género (Figura 15-d). De igual manera, Leslie y Summerell (2006) describen de forma clara a las esporas de FO para diferenciarlas de otras especies ya que, muchos investigadores confunden a FS con FO. Otra diferencia a la mencionada anteriormente es que los microconidios de FS tienden a ser más anchos, ovales y con paredes más gruesas que los microconidios de FO. Además, FS presenta microconidios con hasta dos septos, mientras que los de FO generalmente son sin septos.

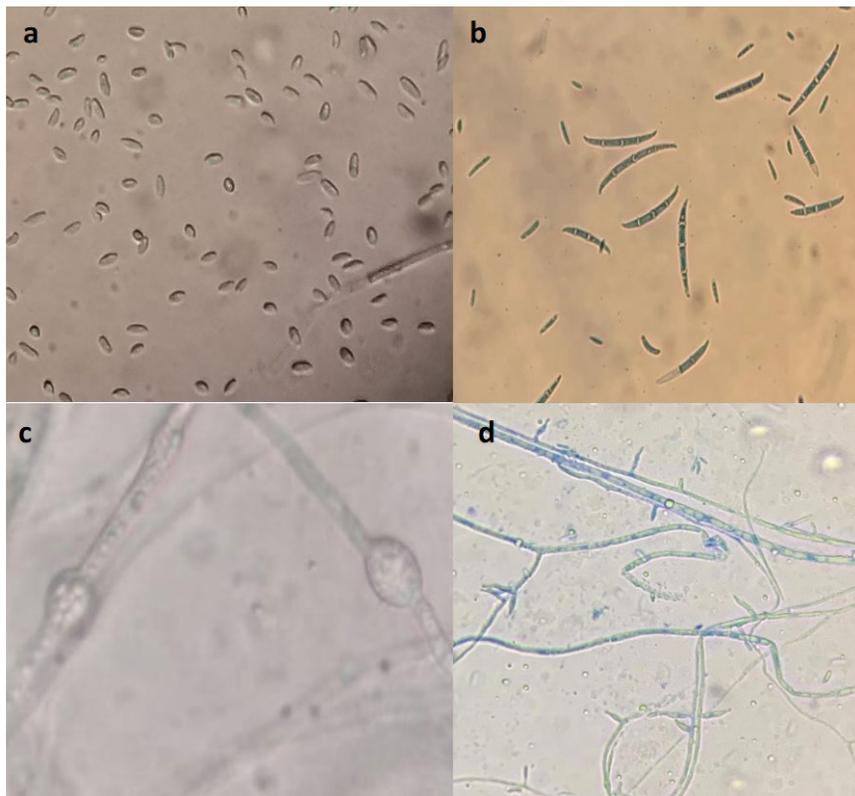


Figura 14. Producción de esporas y cuerpos fructíferos de *Fusarium oxysporum*. a) Microconidia aceptado b) Macroconidia con 4 septas c) Clamidosporas de pared gruesa intercalada en las paredes de las fiálides d) Fiálides cortas.

Se analizaron las dimensiones de las esporas, tomando en cuenta las microconidias y las macroconidias. La medición (Longitud x Anchura) de los microconidios osciló entre 2.27 x 0.67

a 5.51 x 1.49 μm con un tamaño promedio de 3.82 x 1.03 μm . Las macroconidias variaron entre 12.96 x 2.48 a 39.06 x 3.48 μm , con un tamaño promedio de 22.96 x 2.96 μm (Cuadro 7). Estudio similar realizado por Nath y col (2017), argumentan que la medición de las microconidias y macroconidias de FO presentaron variaciones respecto a los tamaños; se observó que la longitud de las microconidias presenta una oscilación de 1.00 a 4.00 μm y que las macroconidias presentan una oscilación de 9.00 a 26.00 μm con un número de septas que oscila de 1 a 5. Las diferencias obtenidas de este estudio podrían atribuirse a su composición genética. Así mismo, Din y col (2020) mencionan que las medidas de las microconidias oscilan de 3.8 x 2.9 a 15.7 x 4.9 μm , las macroconidias de 14.8 x 2.4 a 38.5 x 5.7 μm y el número de septas fue de 1 a 4. Refiriéndose esta variación de tamaños, al tiempo del desarrollo de la colonia así como el tipo de medio sintético que se utilice. Por lo anterior, estos resultados, hacen una inferencia a los nuestros ya que las mediciones coinciden con las estructuras morfológicas (macro y microconidias) de FO, así como en la producción de anillo concéntrico color violeta o morado.

Cuadro 7. Medición (Largo x Ancho) de microconidias, macroconidias y numero de septas.

Aislamiento	Macroconidias (μm)			Microconidias (μm)	
	Largo ^x	Ancho ^x	Septa	Largo ^x	Ancho ^x
HM2D1 A5	15.26 \pm 1.8 ^{ab}	3.48 \pm 0.40 ^a	3 \pm 1	2.72 \pm 0.43 ^{bc}	1 \pm 0.11 ^{bc}
HM2D1 A6	39.06 \pm 0.58 ^c	2.80 \pm 0.43 ^a	3 \pm 1	2.27 \pm 0.38 ^{ab}	0.84 \pm 0.11 ^{ab}
HM4D1 A6	26.36 \pm 3.66 ^d	2.62 \pm 0.36 ^a	3 \pm 1	3.48 \pm 0.32 ^a	0.67 \pm 0.09 ^a
EM4D1 A8	20.26 \pm 3.48 ^{abc}	2.76 \pm 0.36 ^a	3 \pm 1	3.95 \pm 0.39 ^{ab}	0.90 \pm 0.11 ^{ab}
EM5D1 A12	23.20 \pm 3.28 ^{bc}	3.22 \pm 0.38 ^a	3 \pm 1	3.51 \pm 0.15 ^{ab}	0.87 \pm 0.13 ^{ab}
EM5D1 A15	25.70 \pm 2.76 ^{cd}	2.80 \pm 0.20 ^a	3 \pm 1	4.48 \pm 0.39 ^{bcd}	1.30 \pm 0.19 ^{bcd}
EM2D1 A18	12.96 \pm 1.64 ^a	2.58 \pm 0.12 ^a	3 \pm 1	5.51 \pm 0.87 ^{cd}	1.49 \pm 0.16 ^{cd}
EM2D1 A19	20.90 \pm 2.58 ^{abc}	3.48 \pm 0.28 ^a	3 \pm 1	4.71 \pm 0.57 ^{bc}	1.22 \pm 0.09 ^{bc}
Promedio^y	22.96 \pm 2.47	2.96 \pm 0.34		3.82 \pm 0.43	1.03 \pm 0.12

x=Los datos representan la media \pm desviación estándar (n= 7). Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). y= Promedio de las mediciones de microconidias y macroconidias.

6.6. Identificación Molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)

Los 8 aislamientos que cumplieron con las características morfológicas a FO y que presentaron

resultados positivos a las pruebas de patogenicidad en plantas de sandía. Se les realizó la extracción de ADN partiendo de muestras de micelio posterior, se ajustó el templado a una concentración de 50-100 ng en una mezcla de reacción de 25 μ L, y se finalizó realizando la técnica de PCR anidado primera ronda. Se logró obtener productos específicos utilizando primers que se encuentran en las regiones de los espaciadores transcritos internos (ITS1/ITS4), ubicados entre los genes 18S ADNr, 5.8S ADNr y 28S ADNr. En los resultados de electroforesis, se observó que los carriles 1-8 (aislamientos obtenidos de suelo) y el carril 10 (control + a FO), manifestaron una banda fluorescente de aproximadamente 545 pb, mientras que el carril 9 (control -) no mostró ninguna banda, debido a que no se adicione el templado (ADN) al momento de realizar el PCR (Figura 16). Estudio realizado por Kim y col (2020), quienes mencionan con el fin de respaldar la identificación morfológica como molecular del patógeno FO, aislado de la fresa, demostraron por la técnica de PCR, utilizando el par de cebadores ITS1 e ITS4, la amplificación de forma reproducible, de un fragmento de aproximadamente 545 pb con una homología del 100% con FO (No. MAFF744009). Esto nos indica que los cebadores utilizados amplificaron un fragmento que pertenece a FO, ya que al iniciar previamente una búsqueda en el banco de genes (GenBank) del NCBI, se encontró un registro de un fragmento de 545 pb con No. NJLS1301, presentando una identidad del 99.8% a FO.

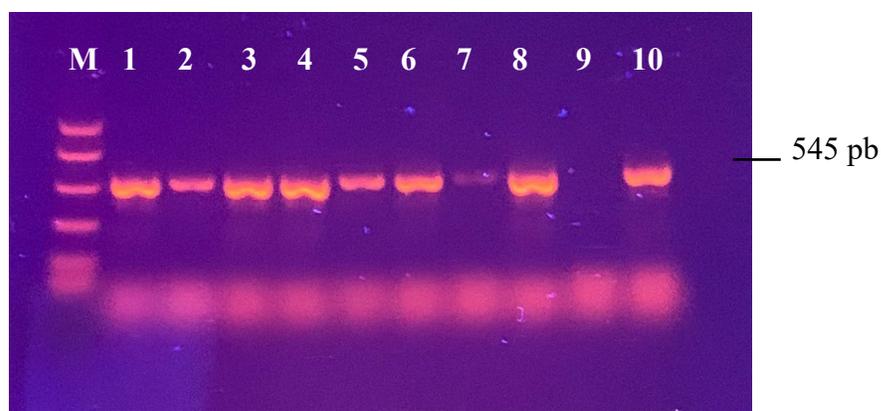


Figura 16. Primers ITS1/ITS4. Carril M, marcador molecular de ADN de 100 a 1000 pb; Carriles 1–8, productos amplificados utilizando ADN 5 μ L de una reacción de PCR de 25 μ L. Carril 9 sin templado (-). Carril 10 muestra con templado de FO (+).

Para obtener una mayor especificidad en el sistema de detección molecular de FON, se utilizaron los productos de amplificación de la primera ronda como templado para la segunda ronda de PCR anidado utilizando los cebadores específicos Fon-1/Fon-2, secuencias que se encuentran dentro de las regiones de espaciadores internos (ITS1/ITS4). Este conjunto de cebadores específicos fue capaz de amplificar un fragmento de ADN de 174 pb (Figura 17). Trabajo reportado por Keinath y col (2020), mencionan los cebadores Fon-1 / Fon-2 pueden ser una alternativa útil a las pruebas de patogenicidad con Sugar Baby para identificar aislamientos de FON dentro de una colección de FO. Estos resultados indicaron que los aislados obtenidos de los suelos de la Costa de Hermosillo y el Valle de Guaymas-Empalme, muy probablemente sea FON.

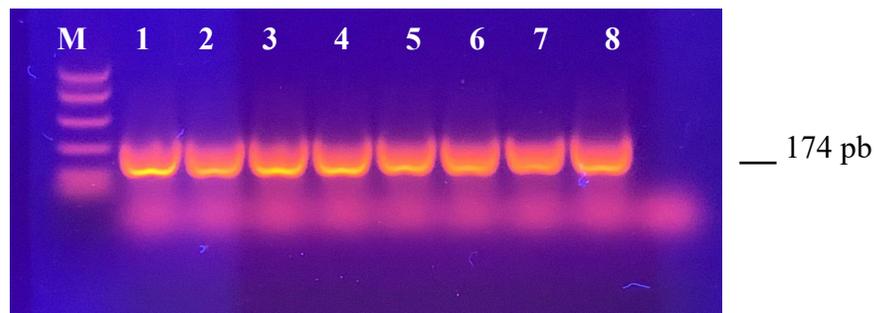


Figura 17. Los cebadores Fon-1/Fon-2 amplificaron fragmentos de 174 pb resultante de la reacción de PCR anidada segunda ronda, usando como templado el fragmento de 545 pb de la primera reacción de PCR. Carril M, marcador molecular de 100 a 1000 pb; Carriles 1–8, productos amplificados utilizando 5 μ L de fragmento de 545 pb de reacción previa de reacción de PCR.

Los resultados obtenidos por parte del laboratorio de referencia (Macrogen's sequencing service), se sometió a una búsqueda en BLAST para asignar la identidad putativa; designación de unidades taxonómicas operativas basadas en medidas de similitud de secuencia e inferencia filogenética. Luego se alineó con otras secuencias similares de FON para determinar su posible relación por su secuencia genómica. Por esto, se sometió a una búsqueda en el banco de genes (GenBank) del NCBI, el cual se encontró una variación en los porcentajes de identidad, con un mínimo de 95.98% y un máximo de 99.21% de identidad que comparte una cobertura de secuencia similar a FON, confirmando así la identidad del patógeno (Cuadro 8). En el aislamiento EM2D1 A18 no se encontró ninguna similitud significativa a FON, debido a que el fragmento de amplificación no complica con las concentraciones adecuadas por lo que no se logró secuenciar.

Cuadro 8. Análisis de secuencia genómica y número de acceso al GenBank

Aislamiento	Dirección*	Punto máximo	Cobertura de secuencia (%)	Identidad (%)	No. de acceso
HM2D1 A5	FON	778	97	98.29	KY786126.1
HM2D1 A6	FON	767	99	96.55	KY786126.1
HM4D1 A6	FON	913	97	99.21	EU588397.1
EM4D1 A8	FON	752	99	96.70	MN423183.1
EM5D1 A12	FON	606	82	95.98	MN423234.1
EM5D1 A15	FON	760	98	97.53	KY786126.1
EM2D1 A18		No se encontró ninguna similitud significativa			
EM2D1 A19	FON	809	99	98.90	KY786126.1

*= *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)

7. CONCLUSIÓN

A partir del aislamiento del patógeno de suelos cultivados con sandía, se logró demostrar supatogenicidad mediante los postulados de Koch, identificando morfológica y molecularmente la presencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (FON). Con nuestros resultados, se confirma que la infección de FON es favorecida por la presencia de heridas en el tallo o aberturas naturales en el sistema radical. La infestación de las plantas en una solución de 1×10^6 esporas mL⁻¹, provoca el desarrollo del hongo en los tejidos con síntomas más pronunciados en un lapso de tiempo menor a las dos semanas. Lo anterior coincide con la incidencia y severidad de la enfermedad reportada por FON ya que las plantas manifestaron los síntomas característicos de la marchitez o fusariosis como: clorosis, disminución en el crecimiento, adelgazamiento como heridas en el tallo y necrosis. Estos resultados nos permitieron generar un diagnóstico inicial sobre la presencia y el problema que representa FON en los campos de cultivo de sandía en las dos regiones estudiadas.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar una investigación más amplia de los diferentes campos de cultivo de sandía pertenecientes a la Costa de Hermosillo como al Valle de Guaymas-Empalme, que permita encontrar diferencias entre variedades de plantas de sandía que se vean afectadas por FON, determinando la resistencia de cada variedad sobre el patógeno de estudio. Así mismo identificar cuales razas de FON están establecidas en los cultivos de sandía pertenecientes a los campos de estas dos regiones

9. REFERENCIAS

- Agrios G. N. 2007. Fitopatología. Limusa. Segunda edición. México. 831 pp.
- Acosta E. y Emmanuel. A. 2019. Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) en la finca el Carrizal–México. Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), La Maná, Ecuador.
- Alvarado A.G. 2009. Detección de *acidovorax avenae* pv. *citrulli* en sandía (*Citrullus vulgaris*) y melón (*Cucumis melo*) en Sonora, México. Universidad de Sonora, Sonora, México.
- Ansari M.A. & Butt T.M. 2011. Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. *Journal of applied microbiology*. 110(6): 1460-1469.
- Aoki T., O'Donnell K. & Geiser D.M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*. 80(3): 189-201.
- Arie T., Kaneko I., Yoshida T., Noguchi M., Nomura Y. & Yamaguchi I. 2000. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13(12): 1330-1339.
- Beckman C. H. 1987. *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. Ed, Society. USA. 175 pp.
- Booth C. 1971. *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. England
- Boughalleb N. & El Mahjoub M. 2006. *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* inoculum densities in tunisian soils and their effect on watermelon seedlings. *Phytoparasitica*. 34(2): 149-158.
- Boughalleb N. & El Mahjoub M. 2006. In vitro determination of *Fusarium* spp. infection on watermelon seeds and their localization. *Plant Pathology Journal*. 5: 178-182.
- Calvijo-Castro S.D. 2014. Búsqueda de resistencia a la pudrición causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 75 pp.
- Castaño J.J. 1978. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia (1571-1974). Editorial Letras. Medellín, Colombia. 164p
- Castro E.H., Jiménez, J.A.V., Vázquez R.M. & Aguilera, J. A. M. 2004. Efecto de la erradicación de plantas enfermas por el PRSV-P en un sistema de manejo integrado del papayo (*Carica papaya* L.) en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(3): 382-388.
- Chang T.H., Lin Y. H., Wan Y. L., Chen K.S., Huang J. W. & Chang P.F.L. 2020. Degenerated virulence and irregular development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* induced by successive subculture. *Journal of Fungi*. 6(4): 382.
- Crawford H. 2017. Manual de manejo agronómico para cultivo de sandía. Convenio INIA – INDAP ed. Santiago: s.n.

- Costa A.E.S., da Cunha F. S., da Cunha Honorato A., Capucho A.S., Dias R.D.C.S., Borel J.C. & Ishikawa F.H. 2018. Resistance to *Fusarium* Wilt in watermelon accessions inoculated by chlamydospores. *Scientia Horticulturae*. 228: 181-186.
- Daugovish O., Smith R., Cahn M., Koike S., Smith H., Aguiar J., Quiros C., Cantwell M. & Takele, E. 2008. Celery production in California. The Regents Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. Publication. 7220: 4 pp.
- Dieng S.I.M., Diallo A.J., Fall A.D., Diatta-Badji K., Diatta W., Sarr A., & Bassene E. 2017. Total polyphenols and flavonoids contents of aqueous extracts of watermelon red flesh and peels (*Citrullus lanatus*, Thunb). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(5): 801-803.
- Di Pietro A., Madrid M.P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J. & Roncero, M.I.G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 4(5): 315-325.
- Din H.M., Rashed O. & Ahmad K. 2020. Prevalence of *Fusarium* Wilt Disease of Cucumber (*Cucumis sativus* Linn) in Peninsular Malaysia Caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Tropical Life Sciences Research*. 31(3): 29.
- Egel D.S. & Martyn R.D. 2007. *Fusarium* wilt of watermelon and other cucurbits. *The Plant Health Instructor*. 10: 1094.
- Egel D.S. & Martyn R.D. 2013. *Fusarium* wilt of watermelon and other cucurbit crops. *Plant health instructor*.
- Elmer W., De La Torre-Roche R., Pagano L., Majumdar S., Zuverza-Mena N., Dimkpa C., & White J.C. 2018. Effect of metalloid and metal oxide nanoparticles on *Fusarium* wilt of watermelon. *Plant disease*. 102(7):1394-1401.
- Else M.A., Coupland D., Dutton, L. & Jackson M.B. 2001. Decreased root hydraulic conductivity reduces leaf water potential, initiates stomatal closure and slows leaf expansion in flooded plants of castor oil (*Ricinus communis*) despite diminished delivery of ABA from the roots to shoots in xylem sap. *Physiologia Plantarum*. 111(1): 46-54.
- Estrada R.F. 1989. Etiología de la Pudrición de la Corona y Raíz del Tomate en Sinaloa y San Luis Potosí, y búsqueda de Fuentes de Resistencia al Patógeno. Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. 47 p.
- FAO. 2020. FAOSTAT. Producción agrícola. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Fernández-Herrera E., Acosta-Ramos M., Ponce-González F. & Manuel-Pinto V. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista mexicana de fitopatología*. 25(1): 35-42.
- Fernández-Herrera E., Ruiz J.G., Puente E. R. & Ramos M. A. 2013. Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Biotecnia*. 15 (3): 46-50.
- Fernández-Herrera E., González-Soto T. E. & Ramírez-Bustos I.I. 2021. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*: Causal Agent of Vascular Withering of Watermelon. *Agro*

Productividad. 14(05).

- Ferreñan P., & Enrique J. 2019. Sistema de visión artificial para apoyar en la identificación de plagas y enfermedades del cultivo de sandía en el distrito de Ferreñafe. Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo, Perú.
- Fong Y.K., Anuar S., Lim H.P., Tham F.Y. & Sanderson F.R. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. *Mycologist*. 14(3): 127-130.
- Fulton J.C., Amaradasa B.S., Ertek T.S., Iriarte F.B., Sanchez T., Ji P. & Dufault N.S. 2021. Phylogenetic and phenotypic characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* isolates from Florida-grown watermelon. *Plos one*. 16(3): e0248364.
- Gordon T.R. 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *Annual Reviews. Phytopathology*. 55: 23-39.
- González V., García-Martínez S., Ruiz J. J., Flores-León A., Picó, B. & Garcés-Claver A. 2020. First Report of *Neocosmospora falciformis* Causing Wilt and Root Rot of Muskmelon in Spain. *Plant Disease*. 104(4): 1256.
- Haglund W.A. & Kraft J.M. 2001. *Fusarium* wilt. In: Kraft, J.M., Pflieger F.L. (Eds.), *Compendium of Pea Diseases and Pests*. The American Phytopathological Society. U.S.A. St. Paul, 13–14.
- Kraft J.M. & Pflieger F.L. 2001. *Compendium of pea diseases and pests*. American Phytopathological Society (APS Press). Segunda edición. U.S.A. 67 pp.
- Hernández J.L. 2019. Desarrollo tecnológico e integración comercial de los productores agrícolas de la Costa de Hermosillo en la globalización. *Región y Sociedad*. 31.
- Hong S., Wang Y., Zhang C.Y., Bao W., Ling N., Liu D.Y. & Shen Q.R. 2009. Growth of in vitro *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in chemically defined media amended with gallic acid. *Biological research*. 42(3): 297-304.
- INEGI. 2017. Encuesta Nacional Agropecuaria 2017 <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=4294>
- Inforural. 2019. El cultivo de la sandía. <https://www.inforural.com.mx/tag/limon-2>.
- Jeffrey C. 2001. Cucurbitáceas. En: Hanelt, P. (ed) *Enciclopedia de cultivos agrícolas y hortícolas de Mansfeld*. 3. Springer-Verlag. Berlín. 1510-1557 pp.
- Jeffrey C. 2001. Cucurbitaceae. In *Mansfeld's Encyclopedia of agricultural and horticultural crops*. Edited by Hanelt P. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Springer. Berlin, Germany. 3:1510–1557.
- Jones J.B. y Jiménez G. M. 2001. *Plagas y enfermedades del tomate*. Mundi–Prensa Libros. Madrid, España. 74p.
- Jurado M., Vázquez C., Marín S., Sanchis V. & González-Jaén, M. 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*. 29(8): 681–689.
- Kanzan K., Donald M., & Gardiner. 2018. *Fusarium* crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum* in cereal crops: recent progress and future prospects (Pathogen profile). *Molecular Plant Pathology*. 19(7): 1547–156.

- Keinath A.P., DuBose V.B., Katawczik M.M. & Wechter W.P. 2020. Identifying Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in South Carolina Recovered From Watermelon Seedlings, Plants, and Field Soil. *Plant Disease*. 104(9): 2481-2488.
- Kim M.J., Shim C.K., Ko B.G. & Kim J. 2020. Effect of the Microalga *Chlorella fusca* CHK0059 on Strawberry PGPR and Biological Control of *Fusarium* Wilt Disease in Non-Pesticide Hydroponic Strawberry Cultivation. *Microbiol. Biotechnol.* 30(5): 708-716.
- Kleczewski N.M. & Egel D.S. 2011. A diagnostic guide for *Fusarium* wilt of watermelon. *Plant Health Progress*. 12(1): 27.
- Komada H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soils. *Plant Protection Research*. 8: 114-125
- Kumar M. & Mugunthan M. (2018). Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Medical journal armed forces india*. 74(4): 333-336 pp.
- Kurt S., Dervis S., Soylu E. M., Tok F.M., Yetisir H. & Soylu S. 2008. Pathogenic races and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in commercial watermelon fields in southern Turkey. *Phytoparasitica*. 36(2): 107-116.
- Latin R.X. & Snell S.J. 1986. Comparison of methods for inoculation of muskmelon with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Plant Disease*. 70(4): 297-300.
- Lacy, M.L., Berger R.D., Gilbertson R.L. & Little E.L. 1996. Current challenges in controlling diseases of celery. *Plant Disease*. 80: 1084-1091.
- Leslie J.F. & Summerell B. A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. First edition. U.S.A. 369 pp.
- Levi A., Jarret R., Kousik S., Patrick Wechter W., Nimmakayala P., Reddy U.K. 2017. Genetic Resources of Watermelon. In: Grumet R., Katzir N., Garcia-Mas J. (eds) *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae*. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*. Springer, Cham. 20: 87-110.
- LeBlanc N., Essarioui A., Kinkel, L. & Kistler H.C. 2017. Phylogeny, plant species, and plant diversity influence carbon use phenotypes among *Fusarium* populations in the rhizosphere microbiome. *Phytobiomes*. 1(3): 150-157.
- Li S. & Hartmann L. 2003. Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots and soil. *Plant Pathol.* 52: 74–83.
- Liu A., Latimer J.G. & Wilkinson R.E. 1994. Growth characteristics and root calcium absorption of watermelon seedlings as influenced by the fungicides captan and thiram. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 119(2): 202-208.
- López J., Romo A. R.F. & Domínguez J.G. 2008. Evaluación de métodos de injerto en sandía (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & Nakai) sobre diferentes patrones de calabaza. *Idesia*. 26(2): 13-18.
- Lombard L., Sandoval-Denis M., Lamprecht S.C. and Crous P.W. 2019. Epitypification of *Fusarium oxysporum* - clearing the taxonomic chaos. *Persoonia*. 43: 1–47.
- Lü G., Guo S., Zhang H., Geng L., Song F., Fei Z. & Xu Y. 2011. Transcriptional profiling of watermelon during its incompatible interaction with *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*.

European journal of plant pathology. 131(4): 585-601.

- Lin Y.H., Chen, K.S., Chang J.Y., Wan Y.L., Hsu C.C., Huang J. W. & Chang P.F.L. 2010. Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. *New Biotechnology*. 27(4): 409-418.
- Link H.F. 1809. Observations in ordines plantarumnaturales. *Mag Ges Naturforsch Freunde, Berlin*. 3: 1-10.
- Martyn R.D. y Netzer D. 1991. Resistencia a las razas 0, 1 y 2 de marchitez de sandía *Fusarium* en *Citrullus* sp. PI296341 FR. *HortScience*. 26: 429 - 32.
- Martyn R. & Vakalounakis D. 2012. Marchites por *Fusarium* de las cucurbitáceas de invernadero: melón, sandía y pepino. *Fusarium Wilts of Greenhouse Vegetable and Ornamental Crops*. 16: 159-174.
- Martyn R.D. 2014. *Fusarium* wilt of watermelon: 120 years of research. *Horticultural reviews*. 42(1): 349-442.
- McCreight J. 2017. Botany and culture. Compendium of cucurbit diseases and insect pests, 2nd ed. American Phytopathological Society. St. Paul, Minn, 1-9 pp.
- Meza-Möller A.C., Rentería-Martínez M.E., Guerra-Camacho M., Romo-Tamayo F., Ochoa-Meza A. & Moreno-Salazar S.F. 2014. First report of root rot of watermelon caused by *Ceratobasidium* sp. in Sonora, Mexico. *Plant Disease*. 98:847.
- Nath, N. Ahmed, A.U. & Aminuzzaman, F.M. 2017. Morphological and physiological variation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates causing wilt disease in chickpea. *Int. J. Environ. Agric. Biotechnol.* 2: 202-212.
- Nelson P.E. 1991. History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology*. 81: 1045–1048.
- Netzer D. & Dishon I. 1973. Screening for resistance and physiological specialization of *Fusarium oxysporum* in watermelon and muskmelon. *Abstr. Second Int. Congr. Plant Pathology*.
- Netzer D. 1976. Physiological races and soil population level of *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytoparasitica*. 4(2): 131-136.
- Nishimura N. 2007. Selective media for *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Plant Pathology*. 73(5): 342-348.
- Oliveira J.A. 1991. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). Lavras MG. Universidade Federal de Lavras.
- Ortiz E., Cruz M., Melgarejo L. M., Marquínez X. & Hoyos-Carvajal L. 2014. Histopathological features of infections caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in purple passionfruit plants (*Passiflora edulis* Sims). *Summa Phytopathologica*. 40(2): 134-140.
- Ortega S.Á., Hernández J., Sandoval J.S., Ayala V., Soto L. & Alejo A. 2015. Distribución y frecuencia de organismos asociados a la enfermedad "pata prieta" de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. *Revista mexicana de fitopatología*. 33(2): 173-194.
- Orduz J.O., León G.A., Chacón Díaz A., Linares V.M. & Rey C.A. 2000. El cultivo de la sandía o patilla (*Citrullus lanatus*) en el departamento del Meta. Programa regional de

investigacion agricola CORPOICA. Villavicencio, Meta, Colombia.

- ODEPA. 2019. Boletín Fruta fresca. Gobierno de Chile. Recuperado de <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletin-de-fruta-fresca-abril-de-2019>
- Paris H.S. 2015. Origin and emergence of the sweet dessert watermelon, *Citrullus lanatus*. *Annals of botany*. 116(2): 133-148.
- Palmero D., de Cara M., Iglesias C., Ruiz G. and Tello J.C. 2008. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 1411-1418.
- Panabières F., Marais A., Trentin F., Bonnet P. & Ricci P. 1989. Repetitive DNA polymorphism analysis as a tool for identifying *Phytophthora* species. *Phytopathology*. 79(10): 1105-1109.
- PP S.B., Sagar V.R., Kar A., Varghese E., Singh S. & Choudhary H. 2021. Identification and Quantification of Physicochemical and Bioactive Components from Sugar Baby Variety of Watermelon (*Citrullus lanatus*). *Agricultural Research*. 1-11.
- Rahman M. Z., Ahmad K., Bashir-Kutawa A., Siddiqui Y., Saad N., Geok Hun T. & Hossain M. I. (2021). Biology, Diversity, Detection and Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* Causing Vascular Wilt Disease of Watermelon (*Citrullus lanatus*): A Review. *Agronomy*. 11(7): 1310.
- Reche Marmol José. 1988. “La Sandía”, Tercera Edición. Ediciones MundiPrensa, impreso en Madrid. 230 pág.
- Rentería M.E., Guerra-Camacho M.Á., Ochoa-Meza A., Moreno-Salazar S.F., Varela-Romero A., Gutiérrez-Millán L. E. & Meza-Moller A.D.C. 2018. Análisis filogenético multilocus del complejo fúngico asociado a pudrición radicular de sandía en Sonora, México. *Revista mexicana de fitopatología*. 36(2): 233-255.
- Retana K., Ramírez-Coché J.A., Castro O. & Blanco-Meneses M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 42(1): 115-126.
- Rodríguez M.C., Torres L.M., Tello J.C., Blanco A., Palo E.J. 2001. Características de las poblaciones de *Fusarium* Link de suelos de dehesas de Badajoz. *Bol. San. Veg. Plagas*. 27: 433- 437.
- Saiz R., Aguirre G. L., Rodríguez J.C., Watts C.J., Saiz J.A., Ochoa A. & Saiz J.A. 2017. Estimación de evapotranspiración con imágenes de PROBA-V de un cultivo de sandía en la costa de Hermosillo, Sonora, México. *Terra Latinoamericana*. 35(4): 301-308.
- Sinha P., Rizvi G. & Parashar R. 2018. Management of wilt disease of pulses: a review. *Int J Pure Appl Biosci*. 6: 696-708.
- Smith E.F. 1894. The watermelon disease of the South. *Proc. Am. Adv. Sci.* 43:289-290
- Smith S.N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathol Bull.* 16: 97-120.
- SIAP. 2018. Producción agrícola. México. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx> ; <http://infosiap.siap.gob.mx/>
- SIAP. 2020. Producción agrícola. México. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx> ;

<http://infosiap.siap.gob.mx/>

- Schwarz D., Roupshael Y., Colla G. & Venema J.H. 2010. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: Thermal stress, water stress and organic pollutants. *Scientia Horticulturae*. 127(2): 162-171.
- Silveira M.I., Aldana M.L., Piri J., Valenzuela A.I., Jasa G. & Rodríguez G. 2018. Plaguicidas agrícolas: Un marco de referencia para evaluar riesgos a la salud en comunidades rurales en el estado de Sonora, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 34(1): 7-21.
- Snyder W.C. & Hansen H.N. 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*. 32(10): 657-666.
- Sumalan R.M., Alexa E. & Poiana, M. A. 2013. Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*. 7(1): 1–12.
- Tapia C. & Amaro J. 2014. Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*. 31(1): 85–86
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S. and Fisher M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 21–32.
- Thies, J.A. & Levi A. 2007. Characterization of watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) germplasm for resistance to root-knot nematodes. *Hort Science*. 42(7): 1530-1533.
- Townsend G.R. and Heuberger J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*. 27: 340-343 pp.
- Vásquez L.M. & Castaño-Zapata J. 2017. Integrated disease management of fusarium wilt of tomato [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (sacc.) wc snyder & hn hansen]: a review. *Revista udca actualidad & divulgación científica*. 20(2): 363-374.
- Valdez S. 1991. Cultivo de hortalizas en trópicos y subtropicos. Santo Domingo, república dominicana, Carripio. 622 p.
- Varon A.G., Nouer S.A., Barreiros G., Trope B.M., Magalhaes F., Akiti T. & Nucci M. 2014. Las lesiones cutáneas superficiales positivas para *Fusarium* se asocian con el desarrollo posterior de fusariosis invasiva. *Revista de infección*. 68(1): 85-89.
- Van P., Fokkens L., Schmidt S.M., Linmans J.H., Kistler H.C., Ma L.J. & Rep M. 2016. Effector profiles distinguish formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Environmental Microbiology*. 18(11): 4087-4102.
- Vargas-González G., Alvarez-Reyna V.D.P., Guigón-López C., Cano-Ríos P., Jiménez-Díaz F., Vásquez-Arroyo J. & García-Carrillo M. 2016. Patrón de uso de plaguicidas de alto riesgo en el cultivo de melón (*Cucumis melo* L.) en la Comarca Lagunera. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 3(9): 367-378.
- Vega A.M. 2017. Control de plagas y enfermedades forestales. Mundi-Prensa Libros. España. 239 pp.
- Verma R. & Tomar M. 2017. Watermelon: a valuable horticultural crop with nutritional benefits. *Popular Kheti*. 5: 5–9.

- Villanueva-Arce R., Aguilar-Pompa C.A., Y.M. Gómez G., Valencia-Del Toro A.B., Piña A. y Bautista-Baños S. 2013. Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Agrociencia*. 47(7): 691-705.
- Villarino M., De Cal A., Melgarejo P. y Larena I. 2021. Development of a multiplex PCR for the identification of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* in a single step. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 1-16.
- Villón-Lucín M.Á. 2011. Manejo biológico de hongos fitopatógenos del suelo e insectos-plaga en el cultivo de sandía *Citrullus lanatus* Thunb., en la comuna Rio Verde, parroquia Chanduy, provincia de Santa Elena. Universidad Estatal Península de Santa Elena, Ecuador.
- Wechter W.P., Kousik C., McMillan M. & Levi A. 2012. Identification of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 2 in *Citrullus lanatus* var. *citroides* plant introductions. *HortScience*. 47(3): 334-338.
- Wasylikowa K. & van der Veen M. 2004. An archaeobotanical contribution to the history of watermelon, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai (syn. *C. vulgaris* Schrad.). *Vegetation History and archaeobotany*. 13(4): 213-217.
- White T. J., Bruns T., Lee S.J., Taylor J., Innis M.A., Gelfand D.H. & Sninsky, J.J. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications.
- Xiong W., Zhao Q., Xue C., Xun W., Zhao J., Wu H. & Shen Q. 2016. Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla *Fusarium* wilt disease. *Frontiers in microbiology*. 7: 117.
- Xiong W. & Zhan A. 2018. Testing clustering strategies for metabarcoding-based investigation of community–environment interactions. *Molecular Ecology Resources*. 18(6): 1326-1338.
- Yun S.H., Arie T., Kaneko I., Yoder O.C. & Turgeon B.G. 2000. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*. 31(1): 7-20.
- Zabka M. & Pavela R. 2018. Review Chapter: *Fusarium* genus and essential oils. In *Natural Antimicrobial Agents*. Springer, Cham. 95-120 pp.
- Zemankoa M. & Lebeda A. 2001. *Fusarium* Species, their Taxonomy, Variability and Significance. *Plant Protection Science*. 37(1): 25-42
- Zhang Z., Zhang J., Wang Y. & Zheng X. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plants tissue and soil. *FEMS Microbiology Letters*. 249: 39-47.
- Zhang S., Ahearn D.G., Noble-Wang J.A., Stulting R.D., Schwam B.L., Simmons R.B. & Crow S.A. 2006. Growth and survival of *Fusarium solani*-*F. oxysporum* complex on stressed multipurpose contact lens care solution films on plastic surfaces in situ and in vitro. *Cornea*. 25(10): 1210-1216.
- Zhang M., Xu J.H., Liu G., Yao X.F., Li P.F. & Yang X.P. 2015. Characterization of the watermelon seedling infection process by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant pathology*. 64(5): 1076-1084.
- Zhou X.G. & Everts K.L. 2003. Races and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp.

niveum in commercial watermelon fields in Maryland and Delaware. Plant disease. 87(6): 692-698.

Zhou X.G., Everts K.L. & Bruton B.D. 2010. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing *Fusarium* wilt in watermelon. Plant disease. 94: 92-98.