

# CAPITULO V

## CONTENIDO DE PROTEINAS SOLUBLES, CARACTERIZACION DE ISOENZIMAS, RESPUESTA AL BENOMIL Y CRECIMIENTO MICELIAL DE DIVERSOS AISLAMIENTOS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

Emira Garcés de Granada<sup>1</sup>, Martha Orozco de Amézquita<sup>1</sup>, Orlando Acosta<sup>2</sup>, José Peñaranda<sup>2</sup> y Germán Arbeláez<sup>3</sup>

### INTRODUCCION

*Fusarium oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas. El gran número de plantas hospedantes que pueden ser atacadas por esa especie de hongo indica los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland, 1988).

La variabilidad cultural y patogénica de *Fusarium oxysporum* ha interesado a micólogos, patólogos, biólogos y mejoradores de plantas para entender las bases de la evolución de su patogenicidad (Awak y Lorbeer, 1988).

El estudio taxonómico de *Fusarium oxysporum* se basa en la morfología y en el desarrollo de las estructuras reproductivas y en la manera como éstas se forman, y el taxon forma especial se ha empleado para categorizar aislamientos que causan enfermedades en una especie, género o familia de plantas en particular (Bosland y Williams, 1987; Bosland, 1988).

Las formas especiales de *Fusarium oxysporum* se han subdividido en razas fisiológicas, con base en su especificidad patogénica sobre determinadas variedades de una misma especie de planta (Bosland, 1988).

Las pruebas de patogenicidad y las características de virulencia de los aislamientos del hongo han sido el principal criterio para diferenciar las formas especiales de *Fusarium oxysporum* y sus razas fisiológicas; sin embargo, los resultados de estas pruebas

pueden ser influidos por la temperatura, la naturaleza y la concentración del inóculo, el sustrato de crecimiento de las plantas hospedantes, la variación genética de las plantas y la disponibilidad de agua. Esta multitud de variables originan cierta confusión en la caracterización de algunas formas especiales y razas del patógeno (Armstrong y Armstrong, 1981; Bosland, 1988).

Al inocular aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* de diferente origen en distintas variedades de clavel, se ha observado alguna variabilidad patogénica, lo que ha llevado a proponer la existencia de por lo menos 8 razas fisiológicas del patógeno (Garibaldi *et al*, 1986; Garibaldi y Rossi, 1988).

En los últimos 20 años, se ha empleado la separación electroforética de proteínas para establecer diferencias fenotípicas entre las poblaciones de diferentes hongos. El conocimiento sistemático de *Fusarium oxysporum* ha aumentado con técnicas, como el polimorfismo de isoenzimas, el análisis mediante técnicas de biología molecular y la fusión de protoplastos, ya que dan oportunidad de estudiar la conformación genética del hongo (Bosland, 1988). Sin embargo, Manicom *et al* (1987) señalan, hasta el momento, un éxito parcial con el uso de esas técnicas.

Cuando las características morfológicas son similares, la variación de las isoenzimas se ha usado para determinar la posición taxonómica de algunos organismos. Las isoenzimas son constantes dentro de un individuo, no son afectadas directamente por factores ambientales y, a menudo, muestran una diferenciación considerable entre poblaciones de individuos, ya que cada locus de una enzima puede ser usado como fuente independiente de información taxonómica (Mc Millin, 1984; Bosland, 1988).

Diversos autores han encontrado polimorfismo de algunas enzimas, principalmente para la aril esterasa, y, por este método, ha sido posible diferenciar especies de *Fusarium* y formas especiales y razas de *Fusarium oxysporum* (Belalcázar, 1984; Katan *et al*, 1991). Con esta técnica, Biles y Martin (1988) observaron diferencias en las razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* y *Fusarium*

<sup>1</sup> Profesora Asociada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, D.C.

<sup>2</sup> Profesor Asociado, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, D.C.

<sup>3</sup> Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá D.C.

**Cuadro 5.1.** Procedencia y razas de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* usados en las diferentes pruebas.

AISLA MIENTO No.	VARIEDAD HOSPEDANTE	LOCALIDAD MUESTREO	RAZA*	AISLA MIENTO No.	VARIEDAD HOSPEDANTE	LOCALIDAD MUESTREO	RAZA*
1	Tango Bambi	Engativá	2	57	Scania	Soacha	2
3	Caresse	Mosquera	4	58	Improved White	Tabio	2
4	Arévalo	Mosquera	4	59	White Sim	Tenjo	2
5	Scania	Mosquera	2	62	Nora Barlo	Soacha	2
8	Lena	Funza	2	63	Pink Calypso	Soacha	2
9	Nora Barlo	Funza	2	66	New Pink Ember	Tenjo	2
10	Pallas	Bojacá	2	67	ImprovedWhite	Tenjo	2
11	Light Pink Candy	Bojacá	2	69	Scania	Funza	2
12	Raggio di Sole	Funza	2	71	Pallas	Madrid	2
14	Nadia	Facatativá	2	73	Hellas	Madrid	2
15	Red Runner	Facatativá	2	74	Exquisite	Madrid	2
16	Manon	Madrid	2	75	Ocean Spray	Funza	2
18	Nora Barlo	Madrid	2	76	Tosca	Engativá	2
19	Bogotá	Madrid	2	77	Lemus Star	Engativá	2
20	Pink Candy	Madrid	2	78	U. Conn.	Facatativá	2
23	White Candy	Subachoque	2	79	White Sim	El Rosal	2
25	Simona	Subachoque	2	80	Juventa	El Rosal	2
26	Alice	Subachoque	2	81	Elegans	El Rosal	2
27	Gialleta	Madrid	2	82	White Sim	El Rosal	2
28	Alaska	Madrid	2	83	Dusty	El Rosal	2
30	White Sim	Subachoque	2	84	New Pink	Chía	2
31	Vulcano	Subachoque	2	85	Nora Barlo	Chía	2
32	Sir Arthur	Subachoque	2	86	Sir Arthur	Chía	2
33	White Candy	Subachoque	2	87	Red Baron	Chía	2
35	Sir Arthur	Chía	2	88	Nora Barlo	Suesca	2
37	Malvetta	Subachoque	2	89	U. Conn.	Suesca	2
38	Dark Pink	Madrid	2	90	Flamingo	Suesca	2
39	Floriana	Subachoque	2	93	Red Candy	Chía	4
40	Lena	Subachoque	2	94	Happy Candy	Chía	2
41	White Candy	Chía	2	95	Bogotá	Chía	2
42	Scania	Chía	2	96	Chinera	Chía	2
44	Vanessa	Suba	2	97	Raggio di Sole	Chía	2
45	Tanga	Suba	2	98	Pallas	Nemocón	2
46	White Candy	Suba	2	99	Indios	Nemocón	2
50	Red Runner	Suba	2	100	Raggio di Sole	Subachoque	2
52	Pink Candy	Suba	2	198	Light Pink Candy	Chía	2
53	Red Baron	Madrid	2				

\* Según la determinación de Cevallos *et al* (1990)

*solanii*; igualmente, Bosland y Williams (1987) diferenciaron razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*.

Las respuestas a la aplicación de fungicidas sistémicos, principalmente a aquéllos del grupo de los benzimidazoles, han sido variables, debido posiblemente a la aparición de aislamientos resistentes a dichos fungicidas, como lo han comprobado Tramieri y Bettacchini (1974), Leski (1977) y Gullino *et al* (1986).

Con el fin de aportar al conocimiento del patógeno y establecer qué tan homogéneas son las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en la Sabana de Bogotá, se realizó el trabajo con el objetivo de estudiar la variación electroforética de las proteínas y de algunas enzimas, la respuesta al fungicida Benomil y el crecimiento micelial de varios aislamientos obtenidos de diferentes cultivos de clave y de algunos aislamientos extranjeros del hongo.

**Cuadro 5.2.** Procedencia y razas de los aislamientos extranjeros de *Fusarium oxysporum* usados en las diferentes pruebas.

AISLAMIENTO No.	RAZA FISIOLOGICA	PROCEDENCIA
F1	1	Italia
200-01	1	Holanda
CSU2	2	Estados Unidos
F2	2	Italia
200-02	2	Holanda
F4	4	Italia
310	4	Italia
200-04	4	Holanda
F8	8	Italia
276	8	Italia
C5CSU	No patógeno	Estados Unidos
C14CSU	No patógeno	Estados Unidos
618-9	No patógeno	Holanda

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó, durante el año 1991, en los laboratorios del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Se utilizaron 73 aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, obtenidos de diferentes fincas productoras de clavel estándar y miniatura localizadas en la Sabana de Bogotá (Cuadro 5.1). Estos aislamientos se obtuvieron del trabajo de Cevallos *et al* (1990). También, se utilizaron aislamientos extranjeros del patógeno de las Razas 1, 2, 4 y 8, obtenidos del profesor Angelo Garibaldi del Instituto de Patología Vegetal de la Universidad de Turín, Italia, del doctor Henk Rattink de la Estación Experimental de Floricultura de Aalsmeer, Holanda y del doctor Ralph Baker de la Universidad Estatal de Colorado, Fort Collins, Estados Unidos (Cuadro 5.2).

Los aislamientos del patógeno se almacenaron en tubos de ensayo con el medio Papa dextrosa agar (PDA) a 5°C y, para cada uno de los experimentos se hizo replicación en cajas de Petri con PDA durante una semana.

### Contenido de Proteínas Solubles Totales.

De los aislamientos registrados en los Cuadros 5.1 y 5.2, se seleccionaron 60, los cuales se replicaron en PDA; después de 14 días de crecimiento, se extrajo el micelio del hongo, utilizando unas pinzas y evitando incluir el medio de cultivo y de cada aislamiento, se utilizaron de 20 a 40 mg de micelio. Con el fin de evaluar y estandarizar la técnica, inicialmente, se emplearon tres métodos para la extracción y para la precipitación de las proteínas.

En el primer método, en 40 ml de buffer de Laemli, se maceró el micelio y, posteriormente, se llevó al baño de María, hirviendo durante tres minutos. En el segundo método, las proteínas del micelio se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% en acetona, por medio de maceración y posterior almacenamiento a 20°C durante la noche; luego se hicieron tres lavados con acetona fría almacenando cada vial a -20°C por lo menos durante 1 hora; el precipitado obtenido se secó en una bomba de vacío con posterior adición de 40 microlitros de buffer de Laemli y, finalmente, se calentó en agua hirviendo por tres minutos.

El tercer método, que originó mejor respuesta y se empleó en el ensayo definitivo, consistió en macerar las muestras, luego de adicionar volúmenes iguales de 0,3 ml de buffer de Laemli (Laemli, 1970; Bradford, 1976; Van Etten *et al*, 1979).

Cada una de las muestras obtenidas se colocó en viales cónicos de plástico, adicionando volúmenes iguales de buffer: 0,08 M Tris, 0,001 M ditiotritol, 0,01 M EDTA y SDS 2% a pH 6,8 y de fenol al 80%, con 0,01 Macetato de amonio y 0,01 M de ditiotritol.

La mezcla se homogenizó, filtró y centrifugó y el total de proteínas de la fase fenólica se lavó 3 veces con volúmenes iguales de buffer 0,08 M Tris, 0,001 M de ditiotritol, 0,01 M de EDTA y 0,01 M de acetato de amonio a pH 6,8.

Para precipitar las proteínas, se adicionaron 5 volúmenes de metanol que contenían 0,1 M de acetato de amonio y, posteriormente, la muestra se almacenó por 2 horas a -20°C; luego, se recolectaron las proteínas por centrifugación a 8.000 rpm por tres minutos, se lavaron tres veces con metanol-acetato de amonio 0,1 M, y finalmente, una vez con acetona. El precipitado obtenido se secó con una bomba de vacío, se le adicionaron 40 microlitros de buffer de Laemli y se calentó en agua hirviendo durante tres minutos.

Las proteínas de cada aislamiento se colocaron en carriles separados en el gel de corrido o de separación. Después del corrido electroforético, los geles de poliacrilamida se tñieron con azul de Comassie al 0,15% y con nitrato de plata. Como indicadores de peso molecular se emplearon albúmina bovina con peso molecular de 68 Kdalton, ovalbúmina de 45 Kdalton, quimio-tripsinógeno de 25 Kdalton, beta-lactoglobulina de 18 Kdalton y lisozima de 14,5 Kdalton (Figura 5.1).

### Determinación de la Enzima Aril Esterasa.

Para el estudio de la enzima aril esterasa en los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*,



dieron a cultivos del hongo recibidos del exterior (Cuadros 5.1 y 5.2).

Para las pruebas, se utilizó el fungicida Benomil (Benlate, Du Pont). Con el fin de seleccionar las dosis del fungicida que se utilizaría, se realizó un ensayo preliminar, en donde se evaluó el efecto *in vitro* de las dosis de 100; 10; 1; 0,1 y 0 ppm de Benomil, mezclado con el medio de cultivo PDA. Para este ensayo, se utilizaron los aislamientos 35 de Colombia y R 8 de Italia.

Para el ensayo definitivo se preparó, el medio de cultivo PDA, se esterilizó a 121°C por 15 minutos y, posteriormente, se añadió el fungicida y el medio así preparado se dispuso en cajas de Petri, utilizando tres repeticiones por tratamiento. Una rodaja del medio de cultivo con el hongo de 0,5 cm de diámetro del aislamiento correspondiente, se colocó en el centro de la caja de Petri. El material se incubó a 24°C durante seis días, al cabo de los cuales se evaluó el color, la forma y el crecimiento radial de las colonias del hongo. Para este ensayo, se utilizaron las dosis de 2,3; 1,3; 0,8 y 0 ppm de Benomil.

El diseño del experimento fué completamente al azar y el análisis de la información se hizo con base en la disminución del crecimiento del hongo ocasionada por el fungicida, al comparar los valores obtenidos en estos tratamientos con los correspondientes al testigo sin fungicida.

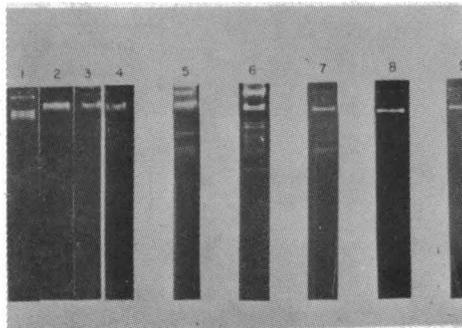
#### Crecimiento Micelial.

En este ensayo, se utilizaron 81 aislamientos del hongo para evaluar su crecimiento micelial. Para ello, se realizaron siembras de cada uno de los aislamientos en cajas de Petri con PDA. Después de seis días, se tomaron rodajas del medio con el hongo de 0,5 cm de diámetro y se colocaron en el centro de cajas de Petri con PDA y se incubaron a 24°C y, cada 24 horas, se midió el crecimiento micelial durante cinco días; para cada aislamiento, se usaron tres repeticiones. Posteriormente, se observó la forma, la elevación y el color de las colonias, lo mismo que la forma, el tamaño y la septación de las esporas.

## RESULTADOS

#### Contenido de Proteínas Solubles Totales.

El análisis electroforético de las proteínas solubles totales de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* permitió observar diferencias y similitudes entre los proteinogramas, especialmente en bandas de aproximadamente 37 y 45 kilodaltons (Fotografía 5.1). Por sus características, los dife-



**Fotografía 5.2.** Patrones electroforéticos de la enzima aril esterasa de algunos aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

**Cuadro 5.3.** Patrones de proteínas para los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

PATRON	AISLAMIENTO
1	1, 9, 10, 11, 14, 19, 23, 26, 30, 33, 35, 40, 44, 50, 63, 67, 76, 77, 78, 80, 81, 85, 90 (Colombia) 200-02 (Holanda)
2	18, 34, 43, 46, 60 (Colombia)
3	F2 (Italia)
4	CSU2 (Estados Unidos)
5	F1 (Italia), 200-01 (Holanda)
6	3, 4, 87, 93 (Colombia) F4 (Italia)
7	F8 (Italia)

rentes aislamientos se clasificaron dentro de 7 grupos (patrones 2 a 8) (Cuadro 5.3).

La mayoría de los aislamientos colombianos que pertenecen a la Raza 2 del patógeno, se clasificaron dentro de los grupos electroforéticos 1 y 2. Sin embargo, debido a las muy pocas diferencias entre los dos grupos, se puede considerar que el grupo 3 es una variante del grupo 2. Los aislamientos extranjeros de la Raza 2 se clasificaron en los grupos 4 y 5 y presentaron patrones electroforéticos similares entre sí y con los grupos 2 y 3.

Los aislamientos de la Raza 1, procedentes de Italia y Holanda presentaron el mismo patrón electroforético (Grupo 6).

Los aislamientos colombianos 3, 4 y 93 de la Raza 4 presentaron un patrón electroforético igual al aislamiento de la Raza 4 procedente de Italia y se ubicaron dentro del grupo 7; el aislamiento colombiano 87 de la Raza 2, presentó, también, el mismo patrón electroforético de los aislamientos de la Raza

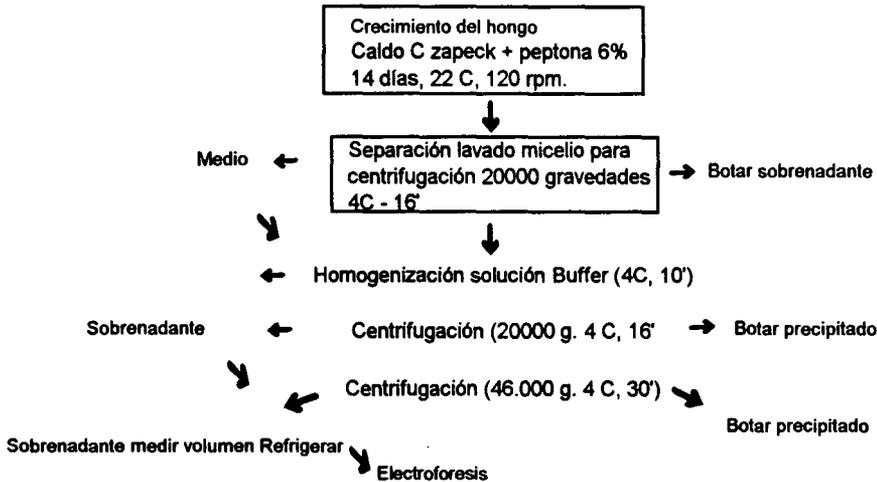


Figura 5.2. Metodología para la extracción de enzimas *Fusarium oxysporum f.sp. dlanthi*.

4. El aislamiento de la Raza 8 de Italia presentó un patrón electroforético completamente diferente a los patrones de los demás aislamientos del hongo (Grupo 8) (Cuadro 5.3).

#### Análisis de la Enzima Aril Esterasa en los Aislamientos de *Fusarium oxysporum f.sp. dlanthi*.

Los resultados obtenidos en un primer experimento con 20 aislamientos de *Fusarium oxysporum f.sp. dlanthi* permitieron diferenciar nueve patrones electroforéticos.

Cuadro 5.4. Variación de los patrones electroforéticos de la enzima aril esterasa para los aislamientos de *Fusarium oxysporum*.

PATRON ELECTROFORETICO	AISLAMIENTO
1	F8 (Raza 8, Italia)
2	618-9 (No patógeno, Holanda)
3	3 (Raza 4, Colombia), F4 (Raza 4, Italia)
4	93 (Raza 4, Colombia)
5	43, 67 (Raza 2, Colombia)
6	1A, 59A, 67A (Raza 2, Colombia), 103A (Raza no identificada, baja patogenicidad, Colombia)
7	C14CSU (No patógeno, Estados Unidos)
8	7A (Raza 2, Colombia), C5CSU (No patógeno, Estados Unidos)
9	F2 (Raza 2, Italia)
10	200-01 (Raza 1, Holanda)
11	F1 (Raza 1, Italia)

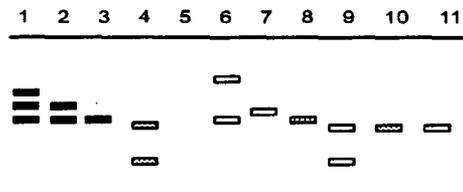


Figura 5.3 Patrones electroforéticos de la enzima aril esterasa de algunos aislamientos de *Fusarium oxysporum F. sp. Dlanthi*

Con base en la localización e intensidad de las bandas en el gel, se evidenció claramente el polimorfismo de la enzima aril esterasa (Fotografía 5.2).

En un segundo experimento y una vez ajustada la técnica, se evaluó el patrón electroforético de la enzima aril esterasa en otros 20 aislamientos del hongo, dentro de los cuales se incluyeron algunos de los utilizados en el ensayo inicial.

Los resultados mostraron once patrones electroforéticos, cada uno con diferente número, posición e intensidad de bandas o formas de la enzima (Cuadro 5.4 y Figura 5.3).

En la mayoría de los aislamientos, se observó la presencia de dos formas de la enzima aril esterasa.

#### Respuesta de Diferentes Aislamientos al Fungicida Benomil.

En el ensayo preliminar efectuado con los aislamientos F8 (Raza 8 Italia) y 35 (Raza 2 Colombia), no se observó ningún crecimiento de las colonias en las dosis de 10 y 100 ppm de Benomil. A la con-

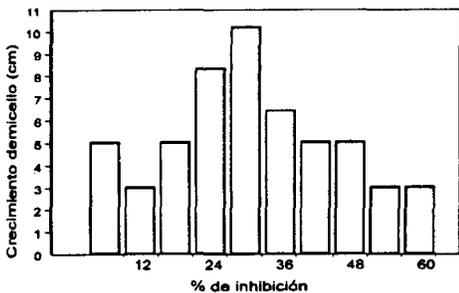


Figura 5.4. Efecto de 1,3 ppm de Benomil en el porcentaje promedio de inhibición del crecimiento micelial de los 53 aislamientos de *Fusarium oxysporum* estudiados.

- 1 Aislamiento F8 - Raza 8, Italia.
- 2 Aislamiento 618-9 - No patógeno, Holanda.
- 3 Aislamiento 3 - Raza 4, Colombia.
- 4 Aislamiento 93 - Raza 4, Colombia.
- 5 Aislamiento 43 - Raza 2, Colombia.
- 6 Aislamiento 59A - Raza 2, Colombia.
- 7 Aislamiento C14CSU - No patógeno, Estados Unidos.
- 8 Aislamiento C5SU - No patógeno, Estados Unidos.
- 9 Aislamiento F2 - Raza 2, Italia.
- 10 Aislamiento 200-01 - Raza 1, Holanda.
- 11 Aislamiento F1 - Raza 1, Italia

centración de 1 ppm del fungicida, se presentó crecimiento del micelio y los valores fueron de 2,5 cm/semana para el aislamiento F8 y de 0,75 cm/semana para el aislamiento 35. A la dosis de 1 ppm, las colonias del aislamiento F8 fueron de color crema y no presentaron crecimiento micelial aéreo, mientras que las colonias del aislamiento 35 fueron rosadas y de bordes irregulares.

En la concentración de 0,1 ppm del fungicida, las colonias tuvieron promedios de radio micelial de 4 cm para el aislamiento F8 y de 3,5 cm para el aislamiento 35 y ambos casos presentaron bordes regulares. Cuando no se aplicó fungicida, los dos aislamientos del hongo presentaron un crecimiento radial de 4 cm y las colonias tuvieron bordes regulares y crecimiento micelial aéreo.

Teniendo en cuenta las dosis del fungicida que presentaron inhibición parcial del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, para el ensayo definitivo se escogieron las dosis de 2,3; 1,3; 0,8 y 0 ppm.

Según los resultados obtenidos, se observó una gran variabilidad en el crecimiento del micelio de los aislamientos sembrados en el medio de cultivo más Benomil, con porcentajes de inhibición que variaron entre el 10 y el 75%, en comparación con el Testigo que no recibió fungicida.

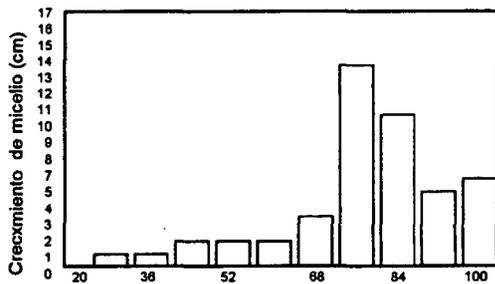


Figura 5.5. Efecto de 0,8 ppm de Benomil en el porcentaje promedio de inhibición del crecimiento micelial de los 53 aislamientos de *Fusarium oxysporum* estudiados.

Para comparar los promedios respectivos, se evaluó la diferencia mínima significativa y se encontró al nivel del 1% que las diferencias mayores en el porcentaje de inhibición fueron de 10,4 y 17,3 para las concentraciones de 0,8 y 1,3 ppm de Benomil respectivamente.

En las Figuras 5.4 y 5.5, se presenta la inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos. En el Cuadro 5.5, se indican los porcentajes de inhibición obtenidos como respuesta a la concentración de 1,3 ppm de Benomil.

Para la mayoría de los aislamientos del hongo, se observó que, al incrementarse la dosis de Benomil, disminuyó el crecimiento micelial, los bordes de las colonias se hicieron bastante irregulares, pero su color no cambió de una manera muy importante; además, se observaron cambios en el crecimiento del micelio, pues al aumentar la concentración del fungicida, en algunos casos, aumentó el crecimiento aéreo y en otros casos la esporulación fué mayor.

Para la dosis de 2,3 ppm de Benomil, que fué la más alta del experimento, solamente se observó crecimiento del micelio en los aislamientos F8 de Holanda, CSU2 de Estados Unidos y 15 y 96 de Colombia. El crecimiento del micelio de los otros 49 aislamientos fué totalmente inhibido por la concentración alta del fungicida.

Al analizar la inhibición en el crecimiento del micelio ocasionada por las concentraciones de 0,8 y 1,3 ppm de Benomil, se observó alguna inhibición, encontrándose, en el análisis de varianza, diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas.

Los aislamientos 3 y 93 del patógeno, los cuales se identificaron como pertenecientes a la Raza 4 por Cevallos *et al* (1990), presentaron los mayores promedios de tolerancia al fungicida y con valores muy similares para la mayoría de los aislamientos extranjeros. Los aislamientos colombianos 18, 37,

Cuadro 5.5. Porcentaje promedio de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* a 1,3 ppm de Benomil.

INHIBICION CRECIMIENTO MICELIAL %	AISLAMIENTO	RAZA FISIOLOGICA	PROCEDENCIA	TIEMPO DE CULTIVO (años)
10-15	C14CSU	NP	Estados Unidos	..
16-20	310	4	Italia	-
	200-04	4	Holanda	-
21-25	F8	8	Italia	-
	93	2	Chía	10
31-35	CSU2	2	Estados Unidos	-
36-40	276	8	Italia	-
	200-02	2	Holanda	-
	F1	1	Italia	-
	F4	4	Italia	-
46-50	C5CSU	NP'	Estados Unidos	-
	3	4	Mosquera	15
	15	2	Facatativá	4
	67	2	Tenjo	3
	53	2	Madrid	15
	F2	2	Italia	4
	78	2	Facativá	4
	66	2	Tenjo	5
	27	2	Madrid	4
	89	2	Suesca	15
	4	2	Mosquera	-
	62	2	Soacha	11
	57	2	Soacha	11
51-55	200-02	2	Holanda	-
	52	2	Suba	7
	198	2	Subachoque	10
	95	2	Cajicá	9
	73	2	Madrid	8
	14	2	Facativá	4
	33	2	Subachoque	4
	39	2	Subachoque	5
56-60	96	2	Cajicá	9
	38	2	Madrid	10
	59	2	Tenjo	4
	86	2	Chía	3
	8	2	Funza	16
	43	2	Chía	15
	46	2	Suba	3
	11	2	Bojacá	8
	100	2	Subachoque	-
61-65	45	2	Suba	14
	20	2	Madrid	5
	87	2	Chía	10
	9	2	Funza	8
	32	2	Subachoque	4
	71	2	Madrid	8
	618-9	NP'	Holanda	-
	200-08	2	Holanda	-
66-70	97	2	Cajicá	9
	79	2	Facativá	4
	75	2	Funza	2
71-75	37	2	Subachoque	5
	18	2	Madrid	5

NP - No Patógeno

" Sin determinar

75, 79 y 97, pertenecientes a la Raza 2, fueron los más susceptibles al fungicida. De los aislamientos no patogénicos ensayados, el aislamiento C14CSU presentó la mayor tolerancia al fungicida.

### Crecimiento Micelial *in vitro*.

Los aislamientos estudiados mostraron diferencias macroscópicas, en cuanto al color, morfología y tasa de crecimiento de las colonias; éstas fueron de color blanco, crema, rosado, naranja y fucsia con diferentes tonalidades. También, se observó que el color era más evidente con la edad y se observaba primero en los sitios más viejos de la colonia; sin embargo, en algunos aislamientos, el color fué consistente con la edad.

En general, la forma de crecimiento de las colonias fué radial y con bordes enteros, aunque algunos aislamientos presentaron bordes irregulares. El crecimiento sobre el medio de cultivo mostró aislamientos con abundante micelio aéreo, mientras que en otros, el micelio fué deprimido o pionnotal.

La tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos fué variable. Los aislamientos extranjeros ocuparon toda la caja de Petri en aproximadamente 120 horas. Un comportamiento similar al señalado anteriormente se observó en los aislamientos 1, 16 y 30 de la Raza 2 y en los aislamientos 3, 4, 93 de la Raza 4, obtenidos de diversas fincas de la Sabana de Bogotá.

Los aislamientos extranjeros de una misma raza presentaron variabilidad en su tasa de crecimiento, incluso los provenientes de un mismo país. En general, se observó una mayor tasa de crecimiento para los aislamientos extranjeros, con excepción de los aislamientos F8 de la Raza 8 de Italia y 200-04 de la Raza 4 de Holanda.

En la Figura 5.6, se observa el crecimiento micelial de las colonias de algunos aislamientos de la Raza 4, con valores bastante similares y, en la Figura 5.7, se presentan los valores correspondientes a cuatro aislamientos de la Raza 2 con valores, también, muy similares, excepto el aislamiento CSU2 procedente de Estados Unidos con un valor mayor que el de los otros aislamientos.

En la Figura 5.8, se presenta el crecimiento del micelio de los tres aislamientos no patógenos, los cuales presentaron valores muy similares. Al ajustar los datos del crecimiento micelial a diversas funciones matemáticas, la mejor interpretación del proceso se observó con una ecuación lineal de la forma

$$Y = b_0 + b_1x$$

con una ecuación exponencial de la forma

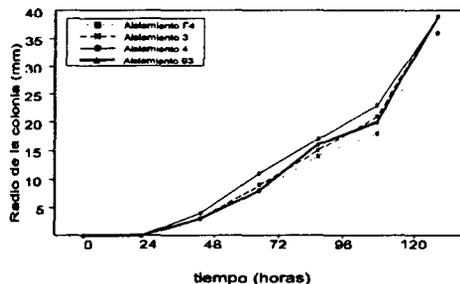


Figura 5.6. Crecimiento micelial de aislamientos de la Raza 4 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

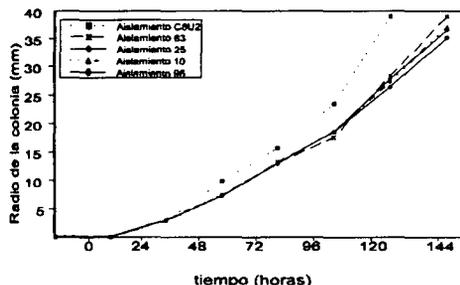


Figura 5.7. Crecimiento micelial de aislamientos de la Raza 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

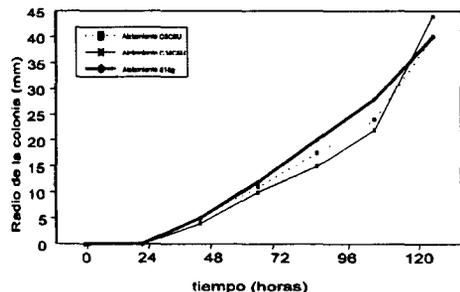


Figura 5.8. Crecimiento micelial de aislamientos no patogénicos de *Fusarium oxysporum*.

$$Y = b_0X^{b_1}$$

y con una ecuación logarítmica de la forma

$$Y = b_0e^{b_1}$$

en donde Y = diámetro de la colonia,  $b_0$  = intercepto de la curva con el eje Y,  $b_1$  = tasa de crecimiento, X = tiempo, e = base de los logaritmos neperianos. Del

total de aislamientos del hongo evaluados, el crecimiento de 46 aislamientos se ajustó a la ecuación lineal, 31 a la ecuación exponencial y 4 aislamientos a la ecuación logarítmica.

## DISCUSION

Los patrones electroforéticos de las proteínas solubles encontrados en la mayoría de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* corresponden a los patrones de la Raza 2, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Cevallos *et al* (1990) y Arbeláez y Calderón (1991), utilizando pruebas de patogenicidad en variedades diferenciales de clavel.

La observación de pequeñas diferencias en los proteinogramas de los aislamientos, que pertenecen a la Raza 2 de Colombia, Italia, Holanda y Estados Unidos, muestran que existe alguna variabilidad dentro de dicha raza, lo cual coincide con lo observado por Sparnaaij (1978) en Holanda, por Scovel (1987) en Israel y por Arbeláez y Calderón (1991) en Colombia.

Los aislamientos colombianos 3, 4 y 93 y el aislamiento italiano F4, pertenecientes a la Raza 4 presentaron patrones de proteínas similares. Esto confirma la presencia, aunque en muy baja proporción, de la raza 4 del patógeno en Colombia, como había sido registrado por Cevallos *et al* (1990).

Ninguno de los aislamientos colombianos analizados mostró un patrón electroforético de proteínas semejante a los patrones presentados por los aislamientos de las Razas 1 y 8, lo cual demuestra que estas dos razas aún no están presentes en Colombia y concuerda con los resultados de las pruebas de patogenicidad realizadas anteriormente.

Los patrones electroforéticos para la enzima aril esterasa demostraron que existen múltiples formas de esa enzima en los aislamientos de *Fusarium oxysporum*, como lo encontró Belalcázar (1984). Aunque los patrones electroforéticos observados permiten agrupar aislamientos de una misma raza, principalmente de la Raza 2, sus diferencias indican que es recomendable el uso de varias enzimas, tal como lo sugieren Biles y Martin (1988), quienes separando las 6 P deshidrogenasa, la shikimato deshidrogenasa, la esterasa y la fosfoglucoasa isomerasa, encontraron diferencias en los organismos analizados.

Aunque Bosland y Williams (1987) han relacionado la aril esterasa con la patogenicidad, los resultados de este trabajo no permiten concluir que, a mayor número de bandas de dicha enzima, la patogenicidad sea mayor, pues el aislamiento F8 de la Raza 8 de Italia (menos patógeno que los aislamientos de la

Raza 2) y el aislamiento no patógeno 618-9 de Holanda presentaron mayor número e intensidad de las bandas de la enzima.

Los resultados obtenidos para la separación de razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* por electroforesis para la enzima aril esterasa, mostraron que cualquier cambio en el método, especialmente en el tiempo de corrido del gel y en la técnica de tinción de los geles, varía la posición, el número y la intensidad de las bandas. Lo anterior complica la interpretación de los resultados y por consiguiente la diferenciación de las razas.

Los resultados de esta investigación muestran que es posible determinar la variación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* por electroforesis de proteínas y de algunas enzimas, pero es necesario profundizar aun más en este aspecto antes de reemplazar las pruebas patológicas por las pruebas químicas.

Aunque en todos los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, la inhibición de crecimiento del micelio fué proporcional a la concentración del fungicida Benomil empleada, la respuesta fué diferente en los distintos aislamientos. En general, los aislamientos extranjeros fueron más resistentes al Benomil y, únicamente, el aislamiento 93 de la Raza 4 de Colombia quedó incluido en este grupo.

Posiblemente, la respuesta obtenida está relacionada con el tiempo de cultivo y con las condiciones ambientales de los diferentes países y empresas, pero, muy especialmente, está relacionada con las dosis del fungicida utilizadas y con la frecuencia de las aplicaciones.

Actualmente, en Colombia, por la baja eficiencia del Benomil en el control de la enfermedad, dicho fungicida se aplica muy poco (Arbeláez, 1987). Garibaldi y Gullino (1987) encontraron que, en Italia, por el uso repetido del Benomil, se presentó una disminución significativa en la sensibilidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* a dicho fungicida.

Los resultados obtenidos en la respuesta del patógeno al Benomil no permiten diferenciar razas o grupos específicos de los aislamientos colombianos y parece que el comportamiento de los aislamientos está relacionado con características fisiológicas y genéticas ligadas a la patogenicidad y a la especificidad del hospedante.

Entre los aislamientos obtenidos de diferentes municipios, no se encontró relación alguna, como tampoco con el tiempo en que las fincas han estado dedicadas al cultivo de clavel, ni con la resistencia

o la susceptibilidad de las variedades de las cuales fué aislado el hongo.

El aislamiento no patogénico C14CSU de Estados Unidos fué el aislamiento más resistente al fungicida y podría ensayarse, para el control de la enfermedad en aplicaciones combinadas de dicho aislamiento con dosis bajas del fungicida.

Esto confirma la posibilidad de combinar aplicaciones de aislamientos saprófitos de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium* spp. y del fungicida Benomil para lograr una reducción en la incidencia y en la severidad de la enfermedad, como lo han observado Tramier *et al* (1983) en Francia y Garibaldi *et al* (1986) en Italia.

Las diferencias en el crecimiento micelial de los distintos aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, principalmente en sus características culturales, como forma, elevación y coloración de la colonia, para conocer la variabilidad patológica del hongo, muestran muy poco aporte de este tipo de estudio. Esto coincide con lo observado con Matthews (1978) en Inglaterra, Cevallos *et al* (1990) y Arbeláez y Calderón (1991) en Colombia y Wright *et al* (1992) en Australia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arbeláez, G. Fungal and bacterial diseases on carnation in Colombia. *Acta Horticulturae* 216: 151-157. 1987.
2. Arbeláez, G. y O.L. Calderón. Determination of the physiological races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* on carnation in Colombia. *Acta Horticulturae* 307: 43-49. 1991.
3. Armstrong, G.M. and J.K. Armstrong. Another approach to race classification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *Phytopathology* 71: 474-478. 1981.
4. Awak, R.T. and J.K. Lorbeer. Nature of cultural variability in *Fusarium oxysporum* f.sp. *apil* race 2. *Phytopathology* 78: 385-389. 1988.
5. Belalcázar, S. Untersuchungen zur differenzierung verschiedener rassen und formae speciales von *Fusarium oxysporum* und anderen *Fusarium* arten anhand der muster multipler esterase-formen nach elektroforetischer trennung. Doktorititel These. Institut für Pflanzen pathologie und Pflanzen schutz der Georg August-Universität Göttingen. Göttingen. 1984.
6. Biles, C.L. and R.D. Martin. Isozyme analysis of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* races and selected *Fusarium* sp. *Phytopathology* 78: 625. 1988.
7. Bosland, P.W. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology* 6: 281-289. 1988.
8. Bosland, P.W. and P.H. Williams. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographical origin. *Canadian Journal of Botany* 65: 2067-2073. 1987.
9. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
10. Cevallos, J.F., D. González y G. Arbeláez. Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en clavei en la Sabana de Bogotá. *Agronomía Colombiana* 7: 40-46. 1990.
11. Garibaldi, A., G. Lento y G. Rossi. Indagine sulla diffusione dei patogeni di *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* nelle colture dianthicole liguri. *Panorama Floricolo* 11: 1-4. 1986.
12. Garibaldi, A., F. Brunatti and M.L. Gullino. Suppression of *Fusarium* wilt of carnation by competitive non-pathogenic strains of *Fusaria*. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 51: 633-638. 1986.
13. Garibaldi, A. and M.L. Gullino. *Fusarium* wilt of carnation: present situation, problems and perspectives. *Acta Horticulturae* 216: 45-54. 1987.
14. Garibaldi, A. y G. Rossi. Osservazioni sulla resistenza del garofano nei confronti del *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Panorama Floricolo* 12: 5-9. 1987.
15. Gullino, M.L., G. Lento and A. Garibaldi. Sensitivity to benomyl of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* isolated in Italy over 17 years. *Riv. Ortoflorofrutt. It.* 70: 139-144. 1986.
16. Katan, T., D. Zamir, M. Sarfatti and J. Katan. Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 81: 255-262. 1991.
17. Laemli, U.K. Cleavage for structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685. 1970.
18. Leski, B. Occurrence and characteristics of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyder et Hansen strains resistant to systemic fungicides. *Acta Agrobot.* 30: 195-211. 1977.
19. Loxdale, H.D., P. Castañera and C.P. Brookes. Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations. 1. Electrophoretic techniques and staining systems for characterizing isoenzymes from six species of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae). *Bull. Ent. Res.* 73: 645-657. 1983.
20. Manicon, B.Q., M. Bar-Joseph, A. Rosner, H. Vigodsky-Hass and J.M. Kotze. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the fusaria. *Phytopathology* 77: 669-672. 1987.

21. Matthews, P. Variation of english isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Proceedings of the Eucarpia meeting on carnation and gerbera. Alassio: 115-126. 1978.
22. McMillin, D.E. Plant isozymes: a historical perspective. p. 3-13. In S.D. Tanksley and T.J. Orton (Eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Elsevier Publ. Amsterdam. 1984.
23. Scovel, G. Improved agrotechnical and sanitation methods versus resistant cultivars as a mean of avoiding *Fusarium* wilt. Acta Horticulturae 216: 55-61. 1987.
24. Sparnaaij, L.D. Current research on carnation with special reference to breeding. Proceeding of the Eucarpia meeting on carnation and gerbera. Alassio: 47-55. 1978.
25. Tramier, R. et A. Bettachini. Mise en évidence d'une souche de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* résistante aux fongicides systémiques. Ann. Phytopathol. 6: 231-236. 1974.
26. Tramier, R., J.C. Pionnat and N. Tebibel. Role of the fungi in the induction of suppressiveness into substrates to *Fusarium* wilt of carnation. Acta Horticulturae 141: 55-59. 1983.
27. Wright, G.K., I. Pascoe, R. van Hesswijck, D. Guest and S. Wimalajeewa. Characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* from carnation in Victoria. Acta Horticulturae 307: 65-72. 1992.
28. Van Etten, J.L., S.N. Freer and B.K. McCune. Presence of major (storage?) protein in dormant spores of the fungus *Botryodiplodia theobromae*. Journal of Bacteriology 138: 650-652. 1979.