

IDENTIFICACION DE MARCADORES GENETICOS DEL AGENTE CAUSAL DEL MARCHITAMIENTO DEL CLAVEL *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* MEDIANTE AMPLIFICACION ARBITRARIA DE FRAGMENTOS POLIMORFICOS DE ADN

IDENTIFICATION OF GENETIC MARKERS OF *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* , THE CARNATION CURLING AGENT, USING THE RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) TECHNIQUE

Hernandez J¹., Arbelaez G²., Junca H¹., Posada M¹., Del Portillo P¹.

RESUMEN

La técnica de Amplificación Arbitraria de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD) fue utilizada para identificar marcadores genéticos útiles para el desarrollo de un método diagnóstico para *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*, el agente etiológico de la enfermedad del marchitamiento del clavel. Con el fin de identificar fragmentos genéticos característicos de este patógeno, un total de 18 aislados diferentes, provenientes de diferentes lugares del mundo y 17 cepas de *F. oxysporum* de otras formas especiales fueron amplificadas utilizando 15 iniciadores diferentes. Aunque ninguno de los iniciadores empleados en este estudio amplificó una banda común a todas las formas especiales *dianthi*, el iniciador OPA 17 mostró un patrón de RAPD que permitió la identificación de cuatro grupos polimórficos dentro de este grupo taxonómico. Este mismo iniciador, permitió la discriminación entre aislados de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* y cepas de *F. oxysporum* de otras formas especiales. No se observó una correlación directa entre el patrón de RAPD y las razas reportadas para *F. oxysporum f.sp. dianthi*, previamente determinadas mediante ensayos biológicos por otros grupos de investigadores. Los análisis de hibridación molecular con fragmentos escogidos de estos patrones de RAPD, permitieron el reconocimiento selectivo de los cuatro grupos

descritos. Los fragmentos genómicos identificados, son candidatos para el desarrollo de un sistema diagnóstico por PCR para este patógeno del clavel.

Palabras claves: RAPD; *Fusarium oxysporum*, polimorfismos, clavel.

SUMMARY

The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was used to analyse genetic markers useful in developing a method to diagnosis *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* infections. To identify characteristic genetic fragments of this pathogen, 18 strains were isolated from locations around the world and 17 special forms of *F. oxysporum* (non-*dianthi F. oxysporum*) were amplified using 15 different primers. None of these primers allowed the identification of a single amplification band common to the *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* samples. However, the OPA 17 primer generated an RAPD pattern that allowed the identification of four amplification groups within this taxonomic group. The same marker

¹ Corporación CorpoGen, Calle 26A No 37-28 Santafé de Bogotá, D.C. Teléfono: 368 5411/ 4983. Fax: 368 4987 E-mail: corpogen@colomsat.net.co

² Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, D.C. Teléfono: 316 5118. Fax: 368 1448. E-mail: garbelae@bacata.usc.unal.edu.co

permitted to distinguish between the *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* and the special forms of *F. oxysporum*. No direct correlation was observed between the RAPD pattern and the race of the samples established in previous works. Molecular hybridization analysis, using the OPA 17 amplified fragments as probes, showed the feasibility of identifying molecular markers that can be used in developing a PCR method for diagnosis of *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* infections.

Key words: RAPD; *Fusarium oxysporum*; polymorphism, carnation.

INTRODUCCION

Fusarium oxysporum f.sp. dianthi es el agente causal de la enfermedad del marchitamiento del clavel un problema que resulta en enormes pérdidas económicas para la industria de la floricultura. Mientras es relativamente fácil identificar *Fusarium* a nivel de especie, la confirmación de la forma especial y de la raza requiere estudios de patogenicidad en invernaderos, estudios que toman mucho tiempo y necesitan gran infraestructura. Más aún los resultados de estos ensayos dependen de múltiples factores difíciles de controlar: variables tales como humedad, luz, temperatura, componentes del suelo, y calidad del agua entre otros (Baayen et al; 1998; Corell, 1991). Como consecuencia, los resultados de estos ensayos son subjetivos y a veces difíciles de reproducir. Es por lo tanto necesario desarrollar nuevos métodos de diagnósticos rápidos, específicos y confiables que permitan la identificación de este hongo fitopatógeno en material vegetal lo que puede ser de gran utilidad para la industria de los cultivadores de clavel.

Recientemente se han publicado varios métodos moleculares que detectan variaciones genéticas dentro de la especie *Fusarium oxysporum* (McDonald, 1997). Dentro de estos métodos, uno de los más útiles es la técnica de Amplificación Arbitraria de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD) (Williams et al; 1990), la cual ha sido aplicada a diferentes sistemas biológicos para determinar polimorfismos genéticos. Estudios utilizando RAPDs han sido reportados para la caracterización e identificación de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* (Manulis et al, 1993; Kalc Wright et al, 1996).

En el presente trabajo, se aplicó la técnica del RAPD para comparar aislamientos de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* recolectados de diversos lugares del mundo con *Fusarium oxysporum* de otras formas especiales con el

objetivo principal de identificar marcadores genéticos que puedan ser utilizados para el desarrollo de un sistema diagnóstico basado en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para este hongo fitopatógeno.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de *Fusarium oxysporum*: Las cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* y las cepas no *dianthi* utilizadas en el presente estudio así como la fuente de la cual fueron aisladas y su origen geográfico están listadas en la tabla No 1.

Tabla 1. ADN aislados y empleados en RAPDs

N°	Cepa	Raza	País de c
1	C.8		Japón
2	Fo. 15Ba		Colombia
3	Fo. 18Ba		Colombia
4	Fo. 28Aa		Colombia
5	Fo. cepae		Brasil
6	Fo. cubense wac 6965		Australia
7	Fo. cubense wac 6969		Australia
8	Fo. cubense wac 6959		Australia
9	Fo. cubense wac 6985		Australia
10	Fo. frageriae		Japón
11	Fo. lycopersici V31CG9		España
12	Fo. R82a		Israel
13	Fo. cucumerinum 27 val	1	Grecia
14	Fo. cucumerinum 36330	1	Grecia
15	Fo. nicotianae Fon 7		USA
16	Fo. phaseoli 0007		Brasil
17	Fo. phaseoli 1678		Brasil
18	Fo. dianthi 02-88	2	Israel
19	Fo. dianthi 03-88	2	Israel
20	Fo. dianthi 03-89	2	Israel
21	Fo. dianthi 06-89	2	Israel
22	Fo. dianthi 08-88	2	Israel
23	Fo. dianthi 09-88	2	Israel
24	Fo. dianthi 11-88	2	Israel
25	Fo. dianthi 12-89	4	Israel
26	Fo. dianthi 95023	2	Colombia
27	Fo. dianthi R2 / 56	2	Colombia
28	Fo. dianthi R2 / 71	2	Colombia
29	Fo. dianthi R4 / 103	4	Colombia
30	Fo. dianthi R2 2-75	2	Italia
31	Fo. dianthi R8	8	Italia
32	Fo. dianthi Ratting R1	1	Holanda
33	Fo. dianthi Ratting R4	4	Holanda
34	Fo. dianthi Ratting R8	8	Holanda
35	Fo. dianthi 2.07	*	Colombia

Extracción de ADN: El ADN fue extraído de la masa micelial de los hongos crecidos en agar papa dextrosa por 14 días y crecidos a 27°C. El ADN fue liberado por rompimiento mecánico de la pared celular del hongo en un Mini-Bead-Beater (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) en presencia de perlas de vidrio y del detergente iónico dodecilsulfato de sodio (SDS) a una concentración final del 1%. Los productos proteicos fueron degradados por la adición de proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml. La muestra fue purificada utilizando bromuro

de cetiltrimetil amonio (CTAB, Sigma Chemical Co.) y el ADN fue extraído con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 V/V) y precipitado con 0.6 volúmenes de isopropanol. El ADN fue resuspendido en buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM; pH 8.0) y cuantificado por espectrofotometría.

Iniciadores empleados en el RAPD: Algunos iniciadores fueron obtenidos de Operon Technologies (Alameda, CA) y otros fueron sintetizados químicamente utilizando un sintetizador Beckman-Oligo 1000. Los iniciadores utilizados y su secuencia de nucleótidos son listados en la tabla No 2.

Tabla 2. Listado de oligonucleotidos empleados en RAPDs

Iniciadores	Secuencia 3'--- 5'
CPMO 2	C CGA TGC CAGA
FUS 01	CCG CAT CTA C
FUS 02	CAG GCC CTT C
FUS 03	TTT CC ACG G
PMO 2	CGA TGC CAGA
OPA 11	CAA TCG CCG T
OPA 12	TCG GCG ATA G
OPA 14	TCT GTG CTG G
OPA 15	TTC CGA ACC C
OPA 16	ACC CAG CGA A
OPA 17	GAC CGC TTG T
OPA 20	GTT GCG ATC C
P2	CTG TTG CTA C
M 13 Directo	GTA AAA CGA CCG CAA GT

Condiciones de RAPD: La reacción de RAPD fue llevada a cabo en un volumen de 50 µl que contenían: 50 ng del ADN genómico de *Fusarium oxysporum*, 2mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 3 µM de cada primer y una unidad de Taq DNA polimerasa (Gibco-BRL). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400 con una denaturación inicial de 94°C por 5 min., seguido por 30 ciclos con una denaturación a 94°C por 1 min., un anillaje a 38°C por 1 min., y elongación a 72°C por 1 min. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio: 0.5 ug/ml

Análisis de Hibridación Molecular de los productos del RAPD: Las muestras amplificadas de ADN fueron separadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, denaturadas mediante tratamiento alcalino y transferidas a membranas de nylon. La hibridación se llevó a cabo a 42°C empleando 3 sondas seleccionadas obtenidas del producto de amplificación con el iniciador OPA 17. Las sondas fueron eluidas de geles de agarosa con el sistema de GlassMax (Gibco-BRL) y marcadas con el sistema no radiactivo ECL (Amersham).

RESULTADOS

Se probaron 15 iniciadores diferentes con una longitud entre 10 y 17 nucleótidos con 35 cepas de *F. oxysporum*

aisladas de diferentes regiones geográficas y caracterizadas de acuerdo a la raza por diferentes grupos de investigadores. Dentro de estas cepas se contaba tanto con formas espaciales *dianthi* como no *dianthi*. Ninguno de los iniciadores estudiados reveló una banda única que estuviera presente en todos los *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* y ausente en los *F. oxysporum* no *dianthi*. Los patrones de amplificación obtenidos fueron complejos. Algunos de los iniciadores mostraron patrones de amplificación idénticos tanto en las cepas *dianthi* como en las no *dianthi*; algunos RAPDs mostraron muy pocas bandas de amplificación y por lo tanto no fueron útiles para el propósito de este estudio, mientras que otros mostraron patrones demasiado complejos que permitieran la identificación de bandas comunes.

El iniciador OPA 17 permitió la discriminación de varios grupos polimórficos dentro de las cepas clasificadas como *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Dentro de estas cepas, se observaron cuatro patrones de bandedo diferentes los cuales fueron denominados Grupos I a IV (Fig. 1A). No todos los aislamientos que correspondieron a un mismo patrón de RAPD se correlacionaron con la clasificación por razas. Como se ve en la figura No 1A, los carriles 2 a 9 muestran patrones de amplificación idénticos (Grupo I), y corresponden a la raza 2 como fue previamente determinado fitopatológicamente por autores en Israel, Colombia e Italia. Los carriles 10 y 11 con patrones de amplificación idénticos y clasificados como Grupo II corresponden a un aislado colombiano que fue clasificado biológicamente como raza 2, mientras que el otro corresponde a un aislado holandés previamente clasificado como raza 1. Resultados similares fueron obtenidos con otros aislados.

En la figura 2A, los carriles 1 a 4 muestran los patrones representativos de cada uno de los Grupos identificados (I a IV) y los carriles 5 a 12 muestran los patrones de RAPD de las cepas no *dianthi*. Como puede verse, el primer OPA 17 también permitió la discriminación entre *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* y cepas de *Fusarium oxysporum* diferentes a *dianthi*, ya que ningún patrón de las cepas no *dianthi* tienen patrón igual a alguno de los 4 grupos de amplificación de las cepas *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

Tomando en cuenta estos resultados, tres fragmentos representativos de los 4 grupos polimórficos fueron escogidos para ser utilizados como sondas en estudios de hibridación molecular. Los resultados de estas pruebas permitieron determinar su presencia en cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* y su ausencia en cepas pertenecientes a otras formas especiales de *F. oxysporum*. Los fragmentos de 2,600 pb (presente en los grupos I y III), 1,200 pb (presente en el grupo II) y 300 pb (presente en los grupos II y IV) fueron recobrados de geles de agarosa, marcados no radiactivamente y empleados en estas pruebas.

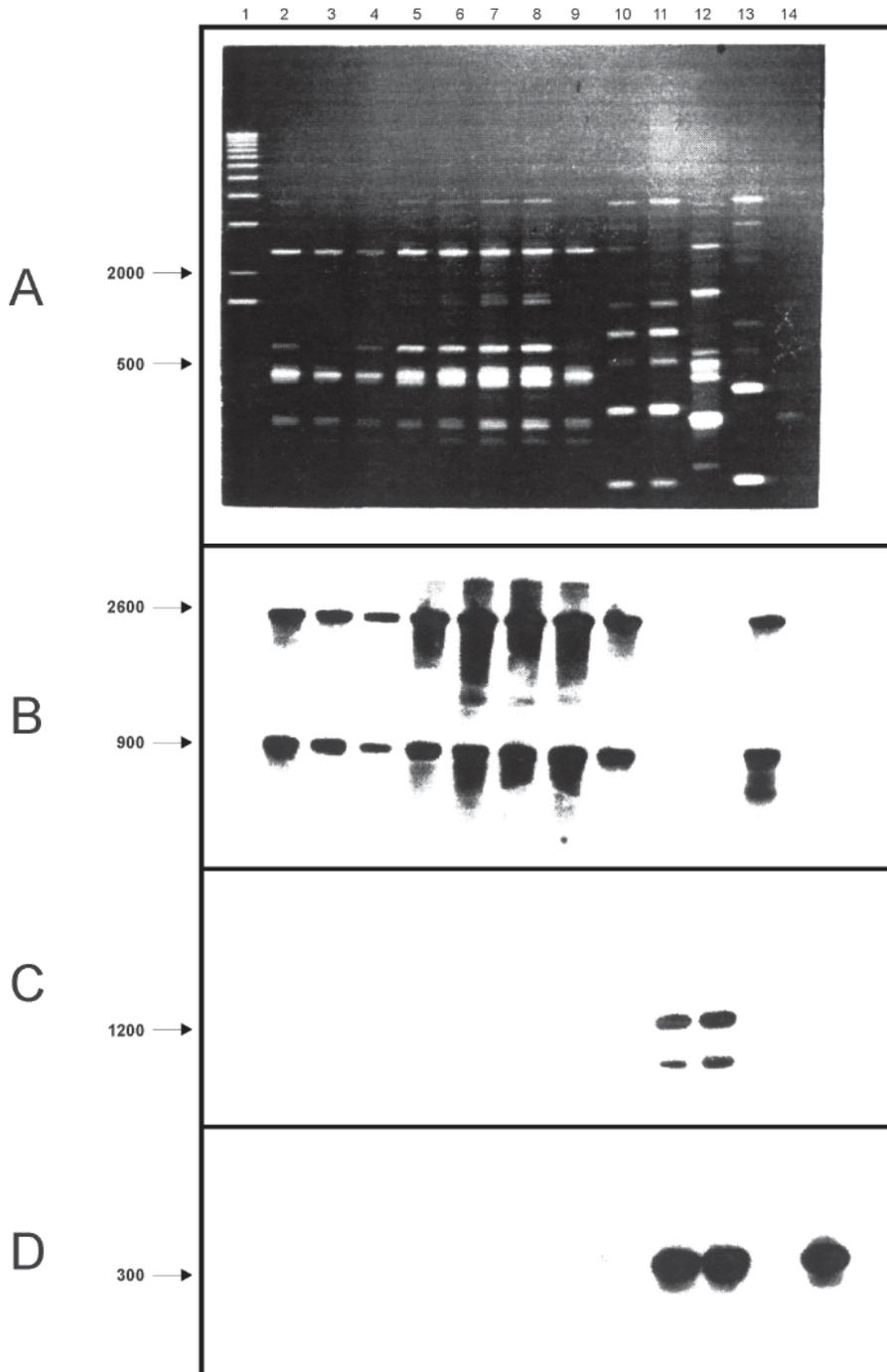


Figura 1A. Electroforesis en gel de agarosa de RAPDs aislados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* amplificados con el primer OPA 17.

Carril 1: Marcadores de peso molecular de 1Kb ladder; carril 2: *F. oxysporum* f.sp. 3-88; dianthi; carril 3: 8-88. carril 4: 9-88; carril 5: 11-88; carril 6: 3-89; carril 7: 6-89; carril 8: 95023; carril 9: 2/75; carril 10: R2-56; carril 11: RR1; carril 12: R8; carril 13 RR8; carril 14 12-89.

Figura 1B, C, D. Southern blot del mismo gel hibridado con las sondas de 2.600; 1200 y 300 pb respectivamente.

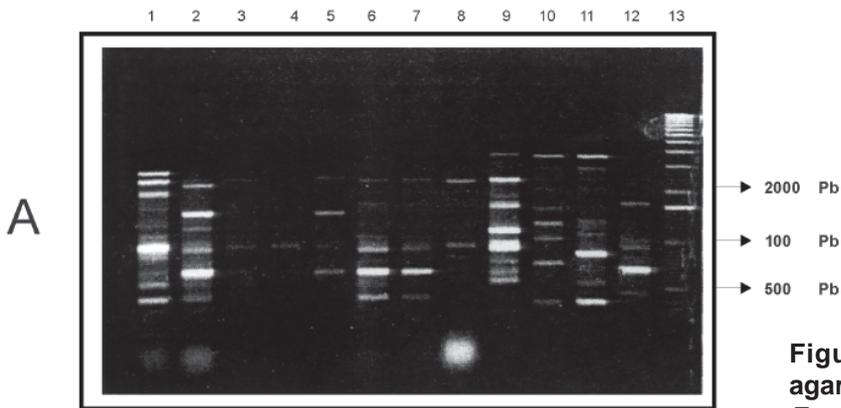


Figura 2A. Electroforesis en geles de agarosa de RAPDs aislados de no-*dianthi* *F. oxysporum* amplificados con el primer OPA 17.

Carril 1: *F. oxysporum* R82a no patógenos; carril 2: *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*; carril 3: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; carril 4: *F. oxysporum* f.sp. *cepae*; carril 5: *F. oxysporum* C8 no patógenos; carril 6: *F. oxysporum* f.sp. *cupense* wac 6965; carril 7: *F. oxysporum* f.sp. *cupense* wac 6964; carril 8: *F. oxysporum* 28Aa no patógeno; carril 9: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* 95023; carril 10: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* RR1; carril 11: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* RR8; carril 12: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*R8; carril 13: Marcadores de peso molecular 1 Kb ladder.

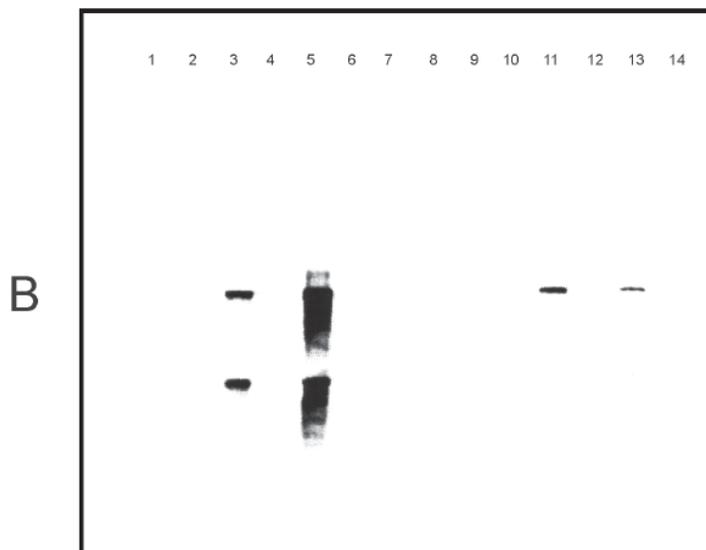
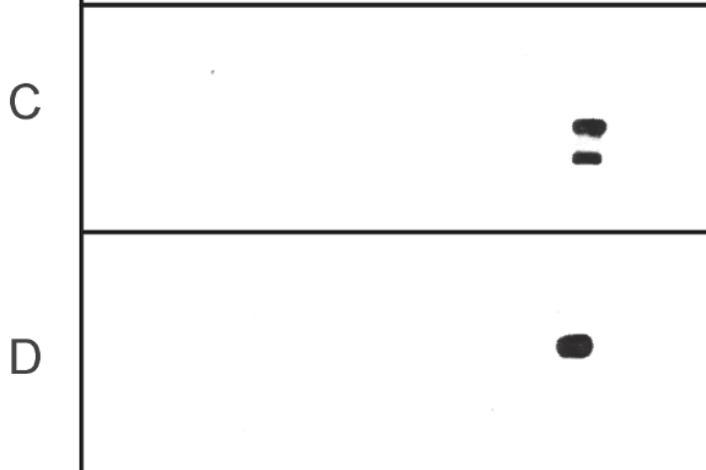


Figura 2B, C, y D: Southern blot de una muestra representativa de aislados no *dianthi* de *F. oxysporum* hidridada con las sondas de 2,600; 1,200 y 300 pb respectivamente.



Carril 1: *Fusarium oxysporum* C8 no patógeno; carril 2: *F. oxysporum* f.sp. *cepae*; carril 3: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; carril 4: *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*; carril 5: *F. oxysporum* R82a no patógeno; carril 6: *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*; carril 7: *F. oxysporum* f.sp. *cupense* wac 6985; carril 8: *F. oxysporum* f.sp. *nicotianae* fon 7; carril 9: *F. oxysporum* 28Aa no patógeno; carril 10: *F. oxysporum* f.sp. *cupense* wac 6965; carril 11: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* 3-88; carril 12: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* RR1; carril 13: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*R8; carril 14: MWM 1Kb ladder.

La Figura 1B muestra los resultados de Southern blots en los cuales el fragmento marcado de 2,600 pb fue hibridado con los patrones de amplificación de las muestras extraídas de cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*. En estas cepas, la sonda híbrida con un fragmento de igual tamaño (2,600 pb) y con un fragmento de 900 pb en todas las cepas clasificadas como Grupo I y en las cepas clasificadas como Grupo III. La figura 2B representa unas muestras escogidas de patrones RAPD de cepas no-*dianthi* de *F. oxysporum* hibridadas con la sonda de 2,600 pb. Este fragmento marcado hibridó fuertemente con una cepa aislada de claveles en Israel, conocida como R-82a, y clasificada como no patógena (carril 5), y con una cepa de *F. oxysporum f.sp. lycopersici* aislada en España (carril 3). El carril 11 y el 13 corresponden a hibridaciones positivas de los aislados de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* del grupo I y III, empleados como controles positivos.

Las figuras 1C y 2C muestran los resultados del Southern blot utilizando la sonda de 1,200 pb hibridada con los patrones de RAPD de cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* y de cepas de otras forma especiales de *F. oxysporum* respectivamente. Para las cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*, estos fragmentos hibridaron únicamente con una banda de tamaño igual en todas las cepas denominadas grupo II y no hibridaron con ninguna cepa probada de *F. oxysporum no-dianthi*.

Las Figuras 1D y 2D muestran los resultados de Southern blot utilizando el fragmento marcado de 300 pb como sonda con los patrones de RAPD de cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* y *F. oxysporum no dianthi* respectivamente. Las cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*, muestran una hibridación positiva con una banda de igual tamaño en las cepas denominadas grupos I y IV. También se puede observar que el fragmento de 300 pb no hibrida con ninguna cepa probada de *F. oxysporum* pertenecientes a otras formas especiales de este hongo.

DISCUSION

La identificación de marcadores genéticos que puedan distinguir entre cepas patógenas y no patógenas, así como entre cepas estrechamente relacionadas genéticamente, puede ser de un inmenso valor para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos de microorganismos patógenos de plantas. Algunas técnicas moleculares han sido aplicadas para identificar polimorfismos genéticos en diversos organismos (Manicom y Baayen, 1993; Waalwijk, et al., 1996; Kistler, et al., 1991). Estos polimorfismos reflejan diferencias en el contenido del material genético y pueden indicar diferencias en la actividad biológica y posiblemente en la patogenicidad de los organismos.

La técnica de "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD), ha sido utilizada exitosamente para identificar

polimorfismos genéticos (Bently et al., 1995; Achenbach, et al., 1996; Assigbets, et al., 1994). Los resultados de este estudio mostraron que usando RAPDs es posible distinguir entre *F. oxysporum f.sp. dianthi* y *F. oxysporum* de otras formas especiales, siendo todos patotipos estrechamente relacionados. En un estudio similar, Manulis (Manulis et al., 1993), usando RAPDs amplificó 15 aislados no patógenos y 42 aislados patógenos de *F. oxysporum f.sp. dianthi*, y fue capaz de distinguir entre cepas patógenas y no patógenas. Kalc Wright (Kalc Wright, et al., 1996), también utilizó esta técnica para diferenciar entre cepas patógenas y no patógenas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* aunque, estos estudios solo incluyeron cepas de una determinada área geográfica.

Los patrones de amplificación por RAPD mostrados en este estudio, indican que las cepas de *F. oxysporum* aisladas de diferentes lugares del mundo, son altamente polimórficas y que este polimorfismo es evidente inclusive entre cepas clasificadas dentro de la misma forma especial. En un estudio previo, Manulis y colaboradores mostraron una correlación directa entre raza y patrón polimórfico (Manulis et al 1993). Sin embargo en el presente trabajo, no se observó una correlación directa entre el patrón de bandeo obtenido por RAPD y la raza. Esta discrepancia es probablemente debida al hecho de que todas las cepas utilizadas en el estudio de Manulis fueron aisladas en Israel. En contraste, los aislados de este estudio fueron obtenidos de diferentes áreas geográficas del mundo y fueron clasificados como razas 1, 2, 4, y 8. Estos resultados están de acuerdo con reportes previos, sugiriendo que la clasificación basada en métodos genéticos es más exacta que los ensayos de patogenicidad utilizados en la clasificación por razas, los cuales dependen de muchas variables del medio ambiente (Waalwijk y Baayen, 1995; Kistler, 1997).

Kalc Wright y colaboradores (Kalc Wright et al., 1996), identificaron una banda de 500 pb, común a varias cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* aisladas de diferentes lugares geográficos en Australia. Sin embargo, los autores no estudiaron la presencia de esta banda en cepas de *F. oxysporum* diferentes a *dianthi*, experimentos de los cuales ellos mismos sugieren debieran ser llevados a cabo antes de dar una conclusión definitiva. El presente trabajo utilizó 15 iniciadores diferentes los cuales se utilizaron para amplificar tanto cepas de *F. oxysporum f.sp. dianthi* como de *F. oxysporum* de otras formas especiales. Ninguno de los iniciadores utilizados amplificó una banda común a todas las cepas de *dianthi* que al mismo tiempo estuviera ausente en cepas no *dianthi* de *F. oxysporum* y que por lo tanto pudiera correlacionarse directamente con patogenicidad.

Los estudios de hibridación molecular llevados a cabo

con los fragmentos seleccionados (2600 pb; 1200 pb y 300 pb) mostraron que dos de las sondas utilizadas, (1200 pb y 300 pb) hibridaron con los productos de amplificación de las cepas pertenecientes al Grupo de los cuales ellas fueron aisladas. El fragmento de 2600 pb aislado del Grupo I hibridó con fragmentos de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* de cepas que pertenecían a ese mismo Grupo y con cepas que pertenecían al Grupo III de amplificación. Es de anotar que este fragmento también hibridó con un fragmento de 2600 pb en dos cepas de *F. oxysporum* no *dianthi* aunque sus patrones de RAPD fueron diferentes a los patrones del Grupo I y Grupo III. Las dos cepas que hibridan con la sonda de 2600 pb, *F. oxysporum f.sp. lycopersici* y *F. oxysporum* R82a han sido clasificadas como otras formas especiales de este hongo, es posible que estas cepas puedan también ser patogénicas para el clavel. De hecho se ha demostrado en un reporte reciente que *F. oxysporum f.sp. lycopersici* causa enfermedad no solamente en tomate sino también en otras familias de plantas (Kistler, et al., 1997). Actualmente se están adelantando estudios de patogenicidad cruzada con esta cepa de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* para validar esta hipótesis.

Para confirmar la existencia de los cuatro grupos descritos

en este trabajo, los resultados deben ser extendidos a un número mayor de cepas aisladas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*. En un grupo taxonómico tan complejo como *F. oxysporum* es probable que otros patrones de bandeado de RAPD se puedan encontrar. Por ejemplo aislamientos de razas diferentes a la 1, 2, 4 y 8 que no fueron incluidas en este estudio y que podrían en teoría presentar diferencias en sus patrones genéticos.

Tomados en su conjunto, los tres fragmentos que fueron recobrados de los RAPDs, hibridan con todas las cepas de todos los grupos de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* estudiados. Esto nos lleva a contemplar la posibilidad de desarrollar un sistema de multiplex PCR en el cual dos parejas de iniciadores derivados de los fragmentos de 2600 y 300 pb podrían ser suficientes para identificar aislamientos de *F. oxysporum f.sp. dianthi* en claveles obtenidos de invernaderos. Actualmente se está realizando la secuencia de ácidos nucleicos para desarrollar este sistema diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a la financiación conjunta de Asocoflores y Colciencias.

BIBLIOGRAFIA

- Achenbach L.A. Patrick, J., and Gray, L.** 1996. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. *Plant disease* 80: 1228-1232.
- Assigbetse, K.B., Fernández, D., Duboi, M.P., and Geiger, J-P.** 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum* races on cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology*. 84: 622-626.
- Baayen, R.P., Elgersma, D.M., Demmink, J.F. Sparnaaij, L.D.,** 1998. Differences in pathogenesis observed among susceptible interaction of carnation with four races of *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*. *Neth.J.Plant Path.* 94: 81-94.
- Bentley, S., Pegg, K.G., and Dale, J.L.** 1995. Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* analyzed by RAPD- PCR fingerprinting. *Mycological Research* 99: 1378-1384.
- Corell, J.C.,** 1991. The relationship between formae speciales races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 81: 1061-64.
- Kalc Wright, G.F., Guest, D.I., Wimalajeewa, D.LS., and van Heeswijk, R.** 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assay. *European Journal of Plant Pathology* 102: 451-457.
- Kistler, H.C.,** 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87: 474-479.
- Kistler, H.C., Momol, E.A., and Benny, U.** 1991. Repetitive genomic sequence for determining relatedness among strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopatology*. 81: 331-336.
- Manicom, B.Q., and Baayen, R.P.,** 1993. Restriction Fragment Length Polymorphism in *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* and other fusaria from *Dianthus* species. *Plant Pathology*. 42: 851-857.
- Manulis, S., Kogan, N., Reuven, M., and Ben-Yephet, Y.** 1994. Use of the RAPD Technique for identification of *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* from carnation. *Phytopathology*. 84: 98-101.
- McDonald, B.A.,** 1997. The population genetics of fungi: Tools and techniques. *Phytopathology*. 87: 448-453.
- Waalwijk, C., Baayen, R.P., De Koning, J.R.A., and Gams, W.** 1996. Ribosomal DNA analysis challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia*. 48: 90-104.
- Waalwijk, C., De Koning, J.R.A., Baayen, R.P., and Gams, W.** 1996. Discordant groupings of *Fusarium* sp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlamina* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia* 88: 361-368.
- Waalwijk, C., and Baayen R.P.** 1995. Identification of races of *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* by fingerprinting and vegetative compatibility. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 25: 117-124.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, J., Rafalsk, J.A., and Ting, V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.