

CAPITULO IV

USO DE LA COMPATIBILIDAD VEGETATIVA EN LA IDENTIFICACION DE LAS RAZAS FISIOLÓGICAS DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*

Xiomara Sinisterra¹, Gregorio Medina² y Germán Arbeláez³

INTRODUCCION

La propagación eminentemente asexual de los hongos imperfectos, entre los cuales se encuentra *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, les permite una rápida adaptación a un ambiente cambiante; por esta razón, se puede esperar una población del patógeno en la cual puede existir una gran variación y, sólo, se necesita una presión de selección determinada para aumentar o disminuir sus frecuencias génicas (Van der Plank, 1982).

Una de las mayores fuentes de variación la constituye el ciclo parasexual, en el cual ocurre la fusión de micelio y de núcleos provenientes de aislamientos diferentes, originándose un micelio heterocarionte; dicha compatibilidad o complementación vegetativa puede ocurrir dentro o entre razas o formas especiales preexistentes, con la consecuente aparición de variantes patogénicas.

La compatibilidad vegetativa ha sido usada para establecer la variabilidad genética existente en los hongos imperfectos, encontrándose que los aislamientos compatibles, con capacidad de anastomosarse y formar heterocariontes estables, son similares en características, como el tamaño de la colonia, la producción de antibióticos, los patrones de isoenzimas y la virulencia (Anagnostakis, 1982; Leach y Yoder, 1983; Bosland y Williams, 1987; Katan *et al.*, 1989).

Mediante el uso de mutantes del hongo que no utilizan nitratos como fuente de nitrógeno (mutantes nit), Puhalla (1985) estableció una técnica para determinar la relación existente entre distintos aislamientos de *Fusarium*, permitiendo que ocurra la complementación sobre un medio de cultivo mini-

mo, el cual contiene nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno; la aparición de micelio tipo "salvaje" en el punto de contacto entre los aislamientos se considera como reacción positiva.

Con esta metodología, Puhalla (1985) demostró que aislamientos que pertenecen a diferentes formas especiales de *Fusarium oxysporum* pueden clasificarse en grupos de compatibilidad diferentes que contienen los genes que determinan la compatibilidad vegetativa y los genes que condicionan la patogenicidad. Probablemente dichos genes quedaron fijados en el mismo grupo de ligamento a través de la evolución, originando grupos de compatibilidad vegetativa caracterizados por una virulencia específica.

El análisis de los grupos de compatibilidad vegetativa se ha usado para la caracterización de aislamientos no patogénicos de *Fusarium oxysporum*, pudiendo comprobarse que estos aislamientos pertenecen a grupos de compatibilidad diferentes de los aislamientos patogénicos de *Fusarium oxysporum* (Correll y Puhalla, 1986a; Katan *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1992).

Además, la compatibilidad vegetativa se ha utilizado para caracterizar razas de algunas formas especiales de *Fusarium oxysporum*, tales como *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* (Katan *et al.*, 1989), *F. oxysporum* f.sp. *apii* (Correll *et al.*, 1986b), *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Bosland y Williams, 1987), *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Katan y Katan, 1988), *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Elias y Schneider, 1988), *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Ploetz y Correll, 1988), *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (Jacobson y Gordon, 1988), *F. oxysporum* f.sp. *asparagi* (Elmer y Stefens, 1989) y *Fusarium* sección "Elegans" (Baayen y Kleijn, 1989).

En estudios sobre la ecofisiología y la dinámica de las poblaciones de los aislamientos patogénicos y no patogénicos de *Fusarium oxysporum*, se han usado la compatibilidad vegetativa y los grupos de compatibilidad como marcadores genéticos naturales (Correll y Puhalla, 1986a; Katan *et al.*, 1989).

Para la caracterización y la identificación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp.

¹ Microbióloga, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A.14490, Santafé de Bogotá, D.C.

² Laboratorista, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, D.C.

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

dianthi, se han utilizado métodos tales como las pruebas de patogenicidad sobre variedades diferenciales (Garibaldi, 1983), la determinación de patrones de isoenzimas (Belalcazar, 1984), el estudio de las características morfológicas y de la tasa de crecimiento micelial (Correll *et al*, 1986b) y el polimorfismo de la longitud de fragmentos de DNA (Manicon *et al*, 1987; Kristler *et al*, 1991).

Sin embargo, los estudios de compatibilidad vegetativa son de fácil ejecución, ya que no necesitan equipos especializados para su realización, ni reactivos demasiado costosos y no requieren mucho espacio, ni se ven afectados por condiciones ambientales y se pueden obtener resultados en corto tiempo.

El objetivo de este estudio fue la determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* como criterio para su utilización en la identificación de las diferentes razas de dicho patógeno.

MATERIALES Y METODOS

Para el ensayo se utilizaron 60 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, colectados en diferentes cultivos de clavel ubicados en la Sabana de Bogotá por Cevallos *et al* (1990) y 14 aislamientos provenientes de Estados Unidos, Holanda e Italia; igualmente, se utilizaron tres aislamientos no patógenos de *F. oxysporum*. Cada uno de estos aislamientos se cultivó en el medio Papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubó a 24°C durante 5 días, antes de iniciar las pruebas de compatibilidad vegetativa.

Obtención de mutantes que no utilizan nitratos (nit).

De cada uno de los aislamientos se tomaron discos de 0,5 cm de diámetro, los cuales fueron transferidos a cajas de Petri con PDA suplementado con clorato de potasio, en concentraciones de 1,5; 3,0; 5,0; 7,0 y 9,0 % y se incubaron a 24°C por siete días. Posteriormente, se escogieron, como mutantes, las colonias de rápido desarrollo, cuyo micelio era poco denso y presentaba un crecimiento totalmente pegado a la superficie del agar. De cada aislamiento, se obtuvieron por lo menos dos mutantes.

Pruebas de compatibilidad vegetativa.

Inicialmente, se determinó la autocompatibilidad permitiendo el contacto entre el micelio en crecimiento y, de cada pareja de mutantes sobre un medio mínimo para *Fusarium* (MMF); este medio es

rico en sales (Na_2NO_3 - 2 g/l; KH_2PO_4 - 1 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g/l), y tiene nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. La aparición de micelio tipo "salvaje" en el punto de unión del micelio se consideró como reacción positiva; la reacción negativa consistió en el cese de crecimiento del micelio en el punto de contacto de los aislamientos.

Para determinar la complementaridad entre los diferentes aislamientos del hongo, una pareja de mutantes autocompatibles y un mutante proveniente de otro aislamiento se cultivaron en una caja de Petri sobre el medio mínimo para *Fusarium* y se incubaron a 24 °C; las lecturas se hicieron a los 7 y a los 14 días.

RESULTADOS

La menor concentración de clorato de potasio de la cual se pudieron obtener mutantes de todos los aislamientos de *F. oxysporum* fue del 5 % y, a partir de los mutantes que se desarrollaron en dicha concentración, se obtuvieron aquéllos que se usaron en las pruebas de auto y heterocompatibilidad vegetativa.

En la investigación se establecieron siete grupos de compatibilidad vegetativa (Cuadro 4.1). En tres de esos grupos se colocaron los aislamientos extranjeros de la raza 2 y la mayoría de los aislamientos colombianos clasificados como raza 2 por Cevallos *et al* (1990). Los otros cuatro grupos de compatibilidad correspondieron a los aislamientos de las razas 1, 4 y 8 del patógeno.

La mayoría de los aislamientos colombianos de la raza 2 pertenecen a un solo grupo de compatibilidad (Grupo 2001), mientras que el aislamiento 200-02, proveniente de Holanda, y el aislamiento CSU 2, proveniente de los Estados Unidos, ambos pertenecientes a la raza 2, correspondieron cada uno a un grupo de compatibilidad diferente. El aislamiento CSU 2 fue el único que presentó el fenómeno de autoincompatibilidad, el cual consiste en la imposibilidad de obtener mutantes que puedan complementarse vegetativamente.

Los aislamientos no patógenos C5CSU, C14CSU y 618-9 de *Fusarium oxysporum* pertenecen al mismo grupo de compatibilidad que la mayoría de los aislamientos colombianos de la raza 2.

Los aislamientos 310 de Italia, F-4 de Holanda y los aislamientos colombianos 3, 4 y 93, identificados como de la raza 4 del patógeno, se clasificaron en un solo grupo de compatibilidad; además, a este grupo pertenecen los aislamientos 72, 73, 75 y 79 de la raza 2.

Cuadro 4.1. Grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA	RAZA FISIOLÓGICA*	AISLAMIENTO No.
1001	1	200-01 (Holanda)
20012	2	5, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 32, 33, 34, 37, 38, 41, 43, 44, 46, 52, 54, 58, 59, 62, 66, 69, 83, 85, 87, 89, 90, 95, 97, 100 (Colombia)
Aislamientos no patogénicos	2	200-04 (Holanda) C5CSU (Estados Unidos) C14CSU (Estados Unidos) 618-9 (Holanda)
2002	2	200-02 (Holanda)
2003	2	CSU-2 (Estados Unidos)
4001	4	3, 4, 75, 79, 93 (Colombia) 310 (Italia) F4 (Holanda)
8001	8	F8 (Holanda)
9001	1	8F1 (Italia)
	2	F2 (Italia) F8 (Italia)

* Según pruebas de patogenicidad

Los aislamientos italianos que pertenecen a las razas 1, 2 y 8 se colocaron en otro grupo de compatibilidad.

En pruebas realizadas con la variedad Nora Barto, bajo condiciones controladas en el invernadero, dos mutantes y el heterocariote formado en la prueba de autocompatibilidad del aislamiento colombiano 18, que pertenece a la raza 2, conservaron su patogenicidad.

DISCUSION

La compatibilidad vegetativa ha probado ser una herramienta útil para la caracterización de la diversidad entre los aislamientos de *Fusarium oxysporum*, como lo han demostrado Correll y Puhalla (1986a), Correll *et al* (1987), Katan *et al* (1989) y Wrigth *et al* (1992).

De esta manera, fue posible colocar en distintos grupos de compatibilidad vegetativa a los aislamientos colombianos y extranjeros de las razas 1, 2, 4 y 8, con excepción de los aislamientos italianos de las razas 1, 2 y 8 que pertenecen al mismo grupo de compatibilidad; ésto parece significar que existe un origen vegetativo común entre ellos, diferente del de los aislamientos holandeses, norteamericanos y colombianos que pertenecen a esas mismas razas.

La presencia de los aislamientos no patogénicos

C5CSU, C14CSU y 618-9 de *F. oxysporum* en el grupo de compatibilidad 2001, junto con aislamientos patogénicos de *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, indica que estos aislamientos se originaron, posiblemente, por mutaciones de aislamientos de la raza 2, afectando los genes que gobiernan la patogenicidad y no a los genes que gobiernan la compatibilidad vegetativa. Además, el aislamiento 618-9 mostró mayor patogenicidad y los aislamientos C5CSU y C14CSU fueron ligeramente patogénicos en los trabajos de Rodríguez *et al* (1992) y Sánchez y Rojas (1992).

La existencia de varios grupos de compatibilidad vegetativa para la raza 2, indica que existe una variabilidad adicional en esta raza, que, en este caso, es mayor que en las razas 1, 4 y 8, lo cual coincide con lo observado por Arbeláez y Calderón (1992); sin embargo, la caracterización de una raza por esta metodología tiene que englobar toda la variabilidad posible, representada en todos los grupos de compatibilidad que puedan establecerse entre aislamientos de diverso origen.

La autoincompatibilidad presentada por el aislamiento CSU-2 es un fenómeno que ya ha sido descrito por otros autores, como Puhalla (1985), Correll *et al* (1986a), Bosland y Williams (1987) y Jacobson y Gordon (1988), pero no se ha determinado su importancia ni su frecuencia a nivel de la población; se cree que este fenómeno resulta de la inhabilidad de un aislamiento para iniciar o comple-

tar la formación de heterocariontes, debido a una doble mutación en algunos de los mutantes nit (Papas, 1986).

Las pruebas de compatibilidad vegetativa junto con las pruebas de patogenicidad pueden proveer una valiosa información sobre la diversidad genética de las poblaciones naturales de *F. oxysporum*; además, la técnica de la compatibilidad vegetativa es potencialmente útil para el diagnóstico de razas a nivel de laboratorio, para la caracterización de aislamientos no patogénicos del hongo y como criterio para determinar el riesgo de su uso como agente de control biológico en términos de su capacidad de combinación.

BIBLIOGRAFIA

1. Anagnostakis, S.L. Genetic analyses of *Endothia parasitica*: Linkage data for four single genes and three vegetative compatibility types. *Genetics* 102: 25-28. 1982.
2. Arbeláez, G. and O.L. Calderón. Determination of the physiological races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* on carnation in Colombia. *Acta Horticulturae* 307: 43-49. 1992.
3. Baayen R.P. and J. Kleijn. The *Elegans* fusaria causing wilt diseases of carnation. II. Distinction of vegetative compatibility groups. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95: 185-194. 1989.
4. Belalcázar, S. Untersuchungen zur differenzierung verschiedener rassen und formae speciales von *Fusarium oxysporum* und anderen *Fusarium*-arten anhand der muster multipler esterase-formen nach elektrophoretischer trennung. Dokortitel These. Institut für Pflanzen pathologie und Pflanzen schultz der Georg-August - Universität Göttingen. Göttingen. 1984.
5. 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.
6. Cevallos, J.F., D. González y G. Arbeláez. Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en clavel en la Sabana de Bogotá. *Agro-nomía Colombiana*. 7: 40-46. 1990.
7. Correll, J.C., J.E. Puhalla, R.W. Schneider and J.M. Kraft. Differentiating races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *psii* based on vegetative compatibility. (Abstr.) *Phytopathology* 75: 1347. 1985.
8. Correll, J.C., J.E. Puhalla and R.W. Schneider. Vegetative compatibility groups among nonpathogenic root colonizing strains of *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Botany* 64: 2358-2361. 1986a.
9. Correll, J.C., J.E. Puhalla and R.W. Schneider. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *apil* on the basis of colony size, virulence and vegetative compatibility. *Phytopathology* 76: 396-400. 1986b.
10. Correll, J.C., C.J.R. Klittich and J.F. Leslie. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640-1646. 1987.
11. Elias, K.S. and R.W. Schneider. Isozyme analysis of races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and nonpathogenic strains of *F. oxysporum*. (Abstr.) *Phytopathology* 78: 1543. 1988.
12. Elmer, W.H. and C.T. Stephens. Classification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* into vegetative compatible groups. *Phytopathology* 79: 88-93. 1989.
13. Garibaldi, A. Resistenza di cultivar di garofano nei confronti di otto patogeni di *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyd. et Hans. *Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana* 67: 261-270. 1983.
14. Katan, T. and J. Katan. Vegetative-compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. *Phytopathology* 78: 852-855. 1988.
15. Katan, T., E. Hadar and J. Katan. Vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* from carnation in Israel. *Plant Pathology* 38: 376-381. 1989.
16. Kistler, H.C., E.A. Momol and U. Benny. Repetitive genomic sequences for determining relatedness among strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 8: 331-336. 1991.
17. Jacobson, D.J. and T.R. Gordon. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Phytopathology* 78: 668-672. 1988.
18. Leach, J. and O.C. Yoder. Heterokaryon incompatibility in the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *J. Hered.* 74: 149-152. 1983.
19. Manicon, B.Q., M. Bar-Joseph, A. Rosner, H. Vigodsky-Haas and J.M. Kotze. Potential application of DNA probes and restriction fragment length polymorphism in the taxonomy of the Fusaria. *Phytopathology* 77: 669-672. 1987.
20. Papas, K.E. Heterokaryon incompatibility in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* 78: 98-101. 1986.
21. Ploetz, R.C. and J.C. Correll. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Plant Disease* 72: 325-328. 1988.
22. Puhalla, J.E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179-183. 1985.
23. Rodríguez, J.C., P. Rodríguez y G. Arbeláez. Control biológico del marchitamiento vascular del clavel miniatura ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp.

- dianthi* con aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum*. Agronomía Colombiana 9: 19-29. 1992.
24. Sánchez, J.L. y J. Rojas. Control del marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en clavel estándar (*Dianthus caryophyllus* L.) con aislamientos no patógenos de *Fusarium oxysporum*. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1992.
25. Van der Plank, J.E. Host-pathogen interactions in plant disease. Academic Press. New York. 1982.
26. Wright, K.G., I. Pascoe, R. van Heeswijck, D. Guest and S. Wimalajeewa. Characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* from carnation in Victoria. Acta Horticulturae 307: 65-72. 1992.