

Área de Biotecnología Vegetal y Fitopatología

RELACIÓN ENTRE EL COLOR DE LA FLOR DEL CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*) Y LA TOLERANCIA A PATÓGENOS DEL GÉNERO *Fusarium*

RELATIONSHIP BETWEEN THE CARNATION COLOR (*Dianthus caryophyllus*) AND THE TOLERANCE TO PATHOGENS OF THE *Fusarium* GENUS

Johana Carolina Soto Sedano. cM.Sc¹

Francisco Eduardo Pabón Barreto. B.Sc²

Juan José Filgueira Duarte Dr. Sc.^{3,4}



Recibido 8 junio de 2009

Aceptado 11 octubre de 2009

1. Estudiante de Maestría en Biología Aplicada, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.
2. Biólogo, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.
3. Docente e investigador, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.
4. Autor para correspondencia: juan.filgueira@unimilitar.edu.co

RESUMEN

Colombia es el primer exportador mundial de clavel, sin embargo su producción presenta un problema de gran importancia, debido a la enfermedad de la muerte vascular producida por el parásito *Fusarium*. Estudios realizados muestran que la manera más eficaz de tratar el problema, es buscar la tolerancia natural de las plantas. Así, este trabajo buscó mediar la respuesta de 16 líneas híbridas y cuatro variedades comerciales de clavel frente a un aislamiento de *Fusarium oxysporum* y un aislamiento de *Fusarium culmorum*, aplicando dos metodologías *in vitro* y una bajo invernadero. Así mismo buscó, establecer una relación entre los niveles de tolerancia presentada para cada ensayo y el color de los pétalos de la flor. La primera metodología *in vitro* consistió en un cultivo dual, en donde callos de la línea híbrida o variedad comercial, fueron enfrentados al patógeno. Con este ensayo se buscó medir el desplazamiento del patógeno hacia el callo y una posible respuesta inhibitoria de éste hacia el crecimiento del hongo. En la segunda metodología, se infectaron microplántulas, permitiendo que el patógeno reconociera, infectara las raíces y ascendiera por el tallo, evaluando el nivel de colonización. Por otra parte, la medición de tolerancia bajo invernadero se realizó infectando plantas y evaluando la presencia o no de síntomas en el tiempo. Los datos obtenidos de la tolerancia a *Fusarium sp* y los parámetros de la evaluación floral, muestran una relación directa entre la distribución del color en la flor del clavel y la tolerancia a los dos aislamientos de *Fusarium*. Esta observación abre la puerta para iniciar estudios genéticos y moleculares, que logren relacionar la tolerancia con características de la flor.

Palabras clave: *Fusarium*, marchitez en clavel, pudrición basal, color de la flor.

ABSTRACT

Colombia is the world's leading exporter of carnation, however, its production presents a problem of great importance, because of the disease of the rot vascular produced by the parasite *Fusarium*. Studies, show that the most effective way of dealing with the problem, is to find the tolerance of the plants, thus, this work sought study the response of 16 hybrid lines and four commercial varieties of carnation compared to an isolate of *Fusarium oxysporum* and one isolate of *Fusarium culmorum*, implementing two methodologies *in vitro* and a one on greenhouse. It also sought to establish a relationship between the levels of tolerance submitted for each test and the color of the petals of the flower. The first methodology *in vitro* consisted of a "dual" cultivation, where calluses on the line hybrid variety or commercial, were confronted with the pathogen. With this assay, the translocation of the pathogen towards the host tissue was measured, as well as a possible inhibitory effect of the host towards the pathogen growth. With the second methodology, microplantulas were infected allowing the pathogen to recognize, to infect and to migrate in the stem, evaluating the colonization level.. In addition, tolerance was measured under greenhouse conditions, infecting plants and evaluating the presence or absence of symptoms. Data obtained on tolerance towards *Fusarium sp*, floral parameters evaluation, shows a direct relation between flower color distribution and tolerance towards two *Fusarium* isolates. These

results open the door to new genetic and molecular studies, which will link the tolerance with characteristics of the flower.

Keywords: *Fusarium* sp, carnation wilt and basal rot, flower color

INTRODUCCIÓN

La floricultura es uno de los sectores que genera más divisas en las exportaciones de Colombia, el 98% de la producción de flores es exportada, así, nuestro país se posiciona como el segundo exportador mundial de flores frescas cortadas y el primero en el caso del clavel (Asocolflores, 2007). Para el 2007 las exportaciones de clavel aumentaron en 20 millones de dólares y se proyectó que los valores aumentarían en el 2008 al abrir nuevos mercados en Europa y Rusia (Duque, G. 2007, Proexport 2007). Sin embargo, un problema de gran importancia para los claveleros de Colombia y el mundo, es la disminución en áreas cultivadas y en las ganancias aportadas, debido a la muerte vascular y muerte producida por el parásito *Fusarium* sp.

El patógeno del género *Fusarium* más importante dentro de las enfermedades del clavel es *Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi*. Este fitopatógeno produce amarillamiento asimétrico, marchitez ascendente, retraso en el desarrollo de la planta, doblamiento de brotes y flores y haces vasculares afectados (Arbeláez y Calderón, 1996; Arbeláez, 1987; 1992).

Por otro lado, en el sector floricultor colombiano se presenta otra enfermedad conocida como *Fusarium* de tallo o pudrición basal (Rodríguez y Arbeláez, 2005; Arbeláez, 1992). La sintomatología característica de esta enfermedad

es marchitez, pudrición seca en la base del tallo con aspecto café - rosado, necrosis y médula afectada. Esta patología es presuntamente causada por *Fusarium roseum* (Rodríguez y Arbeláez, 2005; Arbeláez, 1992; Whealy, 1992).

Para la identificación taxonómica de estos patógenos, uno de los métodos más usados es la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR), por sus siglas en inglés (Abd et al., 2003; Schilling, et al., 1996; Edel et al., 1995). Esta técnica precisa y rápida, ayuda en el diagnóstico al usar cebadores específicos para el género *Fusarium*. El uso de estos métodos moleculares, ha sido efectivo en la diferenciación de especies, formas especiales y razas en patógenos como *Fusarium* (Hernández et al., 1998; Schilling et al., 1996; Kalc et al., 1996; Edel et al., 1995; Manicom y Baayen, 1993).

Por otro lado, los patógenos del género *Fusarium* han aumentado su importancia, debido a que han ampliado el rango de hospederos y desarrollan tolerancia a tratamientos químicos (Abeywickrawa y Beal, 1992). Numerosos estudios se han realizado en centros de investigación de las principales universidades del mundo y Colombia, para entender las interacciones entre *Fusarium* sp y sus hospederos, además de buscar la manera de controlar este hongo. Los resultados muestran que una de las maneras más eficaces de tratar el problema es buscar la tolerancia natural de las plantas (Arbeláez, 1987).

Por otra parte, cultivadores del sector floricultor, han comunicado la posibilidad de que existan ciertas características de la flor de clavel, como el color, relacionadas con la tolerancia a la marchitez causada por *Fusarium* sp. Así, el objetivo de este estudio fue establecer la

existencia de una posible relación entre la tolerancia a dos aislamientos del género *Fusarium* y el color presentado por 16 líneas híbridas y cuatro variedades comerciales de clavel, utilizando dos metodologías *in vitro* de evaluación de tolerancia. La primera, un cultivo dual entre células indiferenciadas callos de la línea o variedad comercial de clavel y el aislamiento y la segunda, una medición del nivel de colonización del patógeno en microplántulas *in vitro*. Además, de una tercera metodología de evaluación de tolerancia bajo invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material evaluado corresponde a cuatro variedades comerciales (Bagatel, Lady green, Candy y Kaly), suministradas por La Gaitana Farms C.I. y 16 líneas híbridas de clavel (UM102, UM225, UM226, UM227, UM251, UM253, UM462, UM464, UM471, UM485, UM493, UM494, UM495, UM503, UMRojosol y UMCRS), provenientes del programa de producción de nuevas variedades comerciales de clavel del grupo de investigación en Biotecnología vegetal de la Universidad Militar "Nueva Granada".

El material vegetal se propagó *in vitro* cada cuatro semanas, empleando como medio de cultivo MS, (Murashige y Skoog 1962), solidificado con agar 13g/L, pH 5.8. Las condiciones del cuarto de cultivo fueron 26° C y fotoperiodo de 16 horas luz con intensidad lumínica de 6000lx. A través de la propagación vegetativa se obtuvieron los clones del material vegetal que fueron usados en los ensayo de colonización en microplántulas *in vitro* y evaluación de tolerancia bajo invernadero.

Por otro lado, la producción de callos empleados en el ensayo *in Vitro* de cultivo dual, se realizó utilizando explantes de hojas, tomados de plántulas *in vitro* de 4 semanas. Se usó como medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), sacarosa 30g/L, pH 5.8, semisólido, phytigel 3g/L, suplementado con hormona (2,4-D), ácido 2,4- diclorofenoxiacético 1ppm. Aproximadamente a las ocho semanas se obtuvieron callos disponibles para la evaluación.

Aislamientos del género *Fusarium*

Se contó con dos aislamientos de patógenos provenientes de plantas de clavel infectadas y sintomáticas para la marchitez causada por *Fusarium sp*, de dos zonas cultivadoras de clavel de la Sabana de Bogotá. El primer aislamiento se obtuvo de plantas con síntomas de pudrición basal, marchitamiento en verde y pudrición seca en zonas afectadas, generalmente en el tallo, proveniente de una finca cultivadora del municipio de Chía. El otro aislamiento se obtuvo de plantas de clavel con síntomas de marchitamiento vascular causado por *F. oxysporum*, como son, amarillamiento ascendente, amarillamiento asimétrico, haces vasculares afectados, retraso en el desarrollo de las plantas y necrosis, este último aislamiento proviene de una finca cultivadora del municipio de Tocancipá Cundinamarca.

El aislamiento de los patógenos se hizo *in vitro*, tomando los tallos de plantas sintomáticas, perfilándolas y lavándolas con agua destilada estéril (ADE). Luego se desinfectaron por inmersión en etanol al 70% durante 1 minuto, inmersión en hipoclorito al 5% por 1 minuto y tres lavados consecutivos con ADE. Se cortaron fragmentos de tallo de 3mm de longitud y

se sembraron en medio Potato Dextrosa Agar (PDA), a 26° C durante siete días, tiempo en el cual se observaron colonias del patógeno, de estos cultivos sólidos se tomó un inóculo y se transfirió a medio líquido Czapek Dox®, dejándolo en agitación por una semana. La patogenicidad de los aislamientos se comprobó a través del protocolo de los postulados de Koch en ensayos bajo invernadero.

La suspensión de cada patógeno se pasó a través de gasa estéril, recogiendo el filtrado en un vaso de precipitados. El filtrado se centrifugó a 4000rpm por 5 minutos, al pellet se le adicionó 50mL de ADE y se centrifugó a 4000rpm por 5 minutos, en el pellet se obtuvieron las esporas del patógeno limpias.

A partir de las esporas limpias se establecieron suspensiones con ADE de 1×10^3 esporas/mL, de esta suspensión se tomaron 20µl y se sembraron en medio PDA, dispersando con rastrillo. Transcurridas 72 horas se observó el crecimiento separado de las esporas, se aisló una de ellas y se sembró en medio PDA. Del cultivo monospórico, se tomó un fragmento del medio y se transfirió a medio líquido Czapek Dox®, dejándolo en agitación por una semana. Estas suspensiones fueron usadas en los diferentes ensayos de evaluación de tolerancia y en la identificación molecular.

Identificación molecular de aislamientos por PCR

Los aislamientos fueron identificados molecularmente a través de reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés. La extracción de ADN fúngico se hizo siguiendo el protocolo descrito por Cenis (1992). Se amplificaron regiones de ADN ribosomal (ITS1 e ITS2),

que rodean la región codificante 5.8S ADNr, usando los primers ITS-fu-f (5'-CAACTCCCA-AACCCCTGTGA-3') e ITS-fu-r (5'-GCGAC-GATTACCAGTAACGA-3'), los cuales codifican un fragmento específico para el género *Fusarium* de aproximadamente 400pb. El perfil térmico de la PCR fue, denaturación inicial de 2 minutos a 95° C, 30 ciclos de 94° C por 1 minuto, 0.5 minutos a 54° C y 1 minuto a 72° C. El producto de la PCR fue observado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Como control negativo se usó ADN de *Botrytis cinerea*.

Los amplicones de PCR fueron purificados usando el sistema Concert Rapid PCR Purification System de Gibco® y enviados a secuenciar por duplicado en Macrogen (Corea). Con las secuencias obtenidas se generaron secuencias consenso de cada aislamiento y se compararon usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Ensayo *in vitro* de cultivo dual

El cultivo dual consistió en situar 1.5g de callo friable en uno de los extremos de una caja de Petri, con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), sacarosa 30g/L, pH 5.8, semisólido, phytigel 3g/L, suplementado con 1ppm de ácido 2,4- diclorofenoacético. Transcurrida una semana se inoculó 15µl de una suspensión de 1×10^6 esporas/mL del hongo sobre un círculo de papel filtro estéril de 0.7cm de diámetro, el cual se ubicó opuesto al callo. El cultivo se mantuvo por 15 días, bajo condiciones de oscuridad y temperatura de 25°C +/- 2. Se tomó registro en centímetros del crecimiento de la colonia del hongo los días 9, 12 y 15. Los datos

fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA) por fechas, con el programa estadístico R, (Ihaka y Gentleman, 1996), para cada uno de los cinco aislamientos y para las tres repeticiones realizadas.

La evaluación con el aislamiento de *F. oxysporum* (Tocancipá) tuvo como control las variedades de clavel Candy y Kaly reportadas como tolerante y susceptible, respectivamente. El desplazamiento presentado por el hongo entre estas dos variedades se tomó como línea media entre una posible respuesta de inhibición de crecimiento del hongo por parte de la línea o variedad de clavel, o la carencia de dicha respuesta. Es decir, las variedades cuyos desplazamientos del hongo se presentaron por debajo de la línea media, se catalogaron como variedades que presentaron una respuesta inhibitoria para el crecimiento del patógeno, por el contrario, aquellos desplazamientos que exhibieron una tendencia mayor a la de la línea media, se catalogaron como variedades que no presentaron respuesta inhibitoria evidente para el crecimiento del hongo.

Por otro lado, no existen reportes de variedades de clavel tolerantes o susceptibles para la pudrición basal, así que la línea media se tomó del desplazamiento entre las líneas o variedades cuyo desplazamiento presentó la menor y la mayor tendencia.

Ensayo de colonización en microplántulas *in vitro*

Se tomaron dos frascos con microplántulas *in vitro* enraizadas de cuatro entrenudos y cuatro semanas de edad, en el centro del frasco y sobre un círculo de papel filtro se inocularon

20µl de 1×10^6 esporas/mL de la suspensión del hongo. Se dejaron por una semana bajo condiciones de cuarto de cultivo, transcurrido este tiempo, se tomaron cinco microplántulas de cada línea y variedad, se les retiró las hojas y las raíces con cuidado de no romper el tallo, este, se desinfectó superficialmente por inmersión en etanol al 70% durante 1 minuto, posterior inmersión en hipoclorito al 5% por 1 minuto y tres lavados consecutivos con ADE. Luego se segmentó el tallo en cuatro partes, esterilizando el bisturí en cada corte y cuidando la orientación del mismo, cada corte fue ubicado retirados uno del otro en el centro de una caja Petri sobre medio PDA. A cada cuarto de tallo se le asignó una categoría de 0.25, para un total de 1 por tallo. Transcurridos siete días, se registró el número de cuartos de tallo que presentaron colonia del patógeno.

Los datos obtenidos en este ensayo fueron procesados a manera de índice y las repeticiones se promediaron. Se catalogó como nivel de colonización bajo las líneas o variedades que presentaron un promedio menor a 0.40 para las cinco repeticiones, y promedios mayores a 0.40 se catalogaron como nivel de colonización alto.

Como controles se usaron las variedades comerciales reportadas como tolerante y susceptible, Candy y Kaly respectivamente. Los resultados obtenidos se analizaron aplicando una prueba estadística de varianza por rangos Kruskal y Wallis, con el fin de revelar diferencias significativas entre las categorías asignadas dentro del ensayo.

Evaluación de tolerancia bajo invernadero

Se tomaron seis microplántulas de cada línea y variedad, provenientes de cultivo *in*

in vitro, se ambientaron a condiciones exteriores en bandejas de germinación sembradas en turba estéril. Transcurridas tres semanas y cuando las plantas desarrollaron su sistema radicular, se sembraron en bandejas de germinación, usando como sustrato cascarilla de arroz quemada y tierra estéril en relación 3:1. En estas bandejas las plantas permanecieron cuatro semanas, en la bandeja base se mantuvo una solución fertilizante e hidrosoluble Master® 13-40-13, preparada con ADE. Al cabo de las cuatro semanas se inoculó junto con la solución fertilizante, una suspensión del hongo en concentración final de 1×10^6 esporas/mL.

El seguimiento de los síntomas se inició a la semana de la inoculación y durante ocho semanas, de acuerdo con una escala de síntomas según la patología: Marchitez vascular causada por *F. oxysporum* (Tocancipá): O. No síntomas, 1. Pérdida de turgencia, 2. Amarillamiento, 3. Marchitamiento y 4. Muerte. Pudrición basal causada por *F. roseum* (Chía, sin clasificar): O. No síntomas, 1. Pérdida de turgencia, 2. Marchitamiento, 3. Pudrición seca por zonas y 4. Muerte.

Como control se realizaron ensayos en donde no hubo inoculación del patógeno en la solución fertilizante. Terminado el tiempo de observación se tomó una planta de cada ensayo y se le realizó aislamiento del patógeno, con el fin de corroborar el ingreso del patógeno a la planta.

Relación entre el color de la flor y la tolerancia

Se ambientaron plántulas provenientes de cultivo *in vitro*, estas se establecieron bajo

condiciones de invernadero y se llevaron hasta floración. Inicialmente las plántulas permanecieron en el laboratorio por dos semanas, sembradas en bandejas germinadoras y usando como sustrato turba estéril, se garantizó la condición de humedad relativa alta, a través de cúpulas de plástico. Transcurridas dos semanas en laboratorio, las plantas fueron transferidas a condiciones de invernadero contenido, donde permanecieron por cuatro semanas antes de ser transplantadas a materas de 1kg de capacidad. Como sustrato se usó cascarilla de arroz quemada y tierra en relación 1:1, previamente esterilizada. El riego empleando fue con agua microfiltrada y la fertilización se realizó tres veces por semana con solución nutritiva Master 30-40-30.

Alrededor de la quinta semana de la siembra se procederá a retirar la parte apical de las plantas (pinch), para estimular la brotación. A las cuatro semanas del pinch se seleccionaran cuatro brotes por planta, con el fin de obtener cuatro tallos florales por planta

Una vez las plantas llegaron a floración, se realizó la evaluación de 12 tallos florales por línea y variedad la cual consistió en el registro de los siguientes caracteres: 1. Tono fuerte o claro en el color base de la flor. 2. Presencia de rojo en el color base. 3. Distribución del color (entero o más de un color).

La evaluación del color se realizó usando como referencia la Carta de Colores de la Sociedad de Horticultura Inglesa. Las relaciones entre los caracteres de color floral y los resultados de evaluación de tolerancia de los ensayos *in vitro* y bajo invernadero se determinaron a través de una prueba T-student con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de los aislamientos usando la técnica de PCR corroboró que estos pertenecen al género *Fusarium*, pues los amplicones obtenidos correspondieron al peso molecular esperado de 400pb para este género. *Botrytis cinerea*, como control negativo, no mostró amplificación, debido a que los primers usados codifican una región conservada de regiones de ADN ribosomal, específica para este género (Abd et al., 2003) (Figura 1).

Una vez obtenidas las secuencias consenso de las secuencias de los dos aislamientos de *Fusarium sp* y realizada la comparación de estas utilizando el programa BLAST del NCBI (Tabla 1), se determinó que las secuencias pertenecientes al aislamiento obtenido de plantas con sintomatología de marchitez vascular causada por *F. oxysporum*, presentan similitud del 99% a secuencias pertenecientes a la misma especie reportadas en la base de datos del NCBI.

Así mismo, las secuencias correspondiente al aislamiento obtenido de plantas con síntomas de la pudrición basal, presentó similitud del 99% con secuencias reportadas para *Fusarium culmorum*. Esta especie ha sido reportada como sinonimia de "*Fusarium roseum*", nombre que por

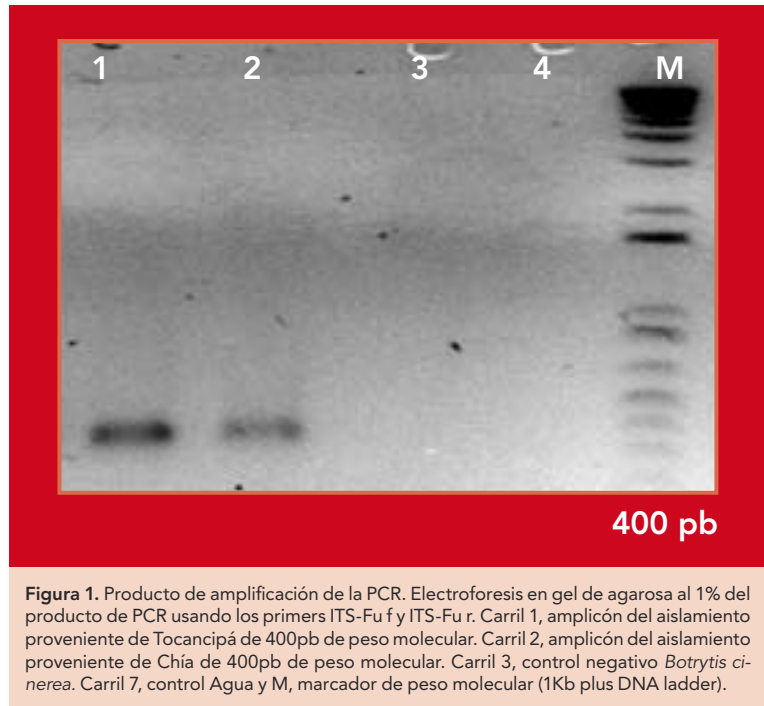


Figura 1. Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ITS-Fu f y ITS-Fu r. Carril 1, amplicón del aislamiento proveniente de Tocancipá de 400pb de peso molecular. Carril 2, amplicón del aislamiento proveniente de Chía de 400pb de peso molecular. Carril 3, control negativo *Botrytis cinerea*. Carril 4, control Agua y M, marcador de peso molecular (1Kb plus DNA ladder).

años se le ha dado a la enfermedad de la pudrición basal en la sabana de Bogotá.

Por otra parte, en la evaluación de inhibición de crecimiento *in vitro* en cultivo dual, los dos aislamientos de *Fusarium sp* mostraron inhibición en el crecimiento de la colonia frente a los callos de 10 de las líneas evaluadas y una variedad comercial, mostrando un comportamiento de tolerancia (Tabla 2). El aislamiento de *F. oxysporum* - Tocancipá, mostró inhibición en el crecimiento *in vitro*

Aislamiento	similitud 99%	No. de accesión NCBI	Referencia Bibliográfica
<i>F. oxysporum</i> (Tocancipá)	<i>Fusarium oxysporum</i>	EF421237	Promptutha et al., 2007
<i>F. roseum</i> (Chía)	<i>Fusarium culmorum</i>	EF421239	Tan y Niessen, 2003

Tabla 1. Alineamiento en BLAST- NCBI
Comparación de secuencias consensos de los dos aislamientos del género *Fusarium* con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI.

ante los callos de 12 líneas híbridas y dos variedades comerciales (Tabla 2).

En los ensayos con el aislamiento de *F. culmorum* (Chía), se observó inhibición de crecimiento ante callos de 12 líneas y la variedad comercial Bagatel. Ninguno de los dos aislamientos mostró respuesta inhibitoria del crecimiento *in vitro* ante callos de la variedad comercial Kaly, usada como control de susceptibilidad. De la misma forma, los callos de la variedad Candy, variedad usada como control de tolerancia, tuvieron una respuesta inhibitoria para el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum* (Tocancipá), pero no se presentó en los ensayos con el aislamientos de *F. culmorum* (Chía), (Tabla 2).

Este resultado coincide con la respuesta observada en campo de estas dos variedades, frente a los patógenos. El análisis de varianza realizado para las respuestas en los días de observación en cada aislamiento y en las 20 líneas híbridas y variedades, mostró altas diferencias significativas ($P < 0.001$), (Tabla 3).

El principio del ensayo dual se basa en una respuesta química, en donde se espera que el reconocimiento del patógeno por parte del callo, active el metabolismo de defensa en los componentes de la pared celular en el hospedero (Storti, et al., 1990). De esta manera, se espera que las células indiferenciadas de la línea, que poseen algún tipo de tolerancia hacia el patógeno, inhiban el crecimiento *in vitro* de las colonias de los aislamientos, a través de la producción y liberación

de moléculas antifúngicas por parte del callo al medio, deteniendo el avance del patógeno. Este tipo de respuesta *in vitro* ha sido estudiada anteriormente, caracterizando líneas de células de tomate y evaluando su respuesta a *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi*, encontrando una correlación entre la producción de fitoalexinas y la inhibición del crecimiento del hongo (Storti et al., 1989).

Así mismo, es conocido que la defensa de las plantas frente a los patógenos incluye la producción de enzimas, proteínas y fitoalexinas, así, el tipo de respuesta tolerante de un

Variedad o línea	Aislamiento Fusarium Tocancipá	Aislamiento Fusarium Chía
Bagatel	RI	RI
Lady green	NRI	NRI
Candy	RI	NRI
Kaly	NRI	NRI
UM102	RI	RI
UM225	RI	RI
UM226	NRI	NRI
UM227	RI	RI
UM251	RI	RI
UM253	NRI	NRI
UM462	RI	NRI
UM464	RI	RI
UM471	RI	RI
UM485	RI	NRI
UM493	NRI	RI
UM494	RI	RI
UM495	RI	RI
UM503	RI	RI
UMRojosol	RI	RI
UMCRS	NRI	RI

Tabla 2. Resultados ensayo de cultivo dual
Comportamiento de las diferentes líneas evaluadas con cada uno de los aislamientos de *Fusarium* sp. (RI) respuesta inhibitoria. (NRI) variedad o línea sin respuesta inhibitoria.

Aislamiento	Día	F value	Pr (>F)
<i>F. oxysporum</i> (Tocancipá)	9	12.995	1.295e-11 ***
	12	39.111	< 2.2e-16 ***
	15	52.507	< 2.2e-16 ***
<i>F. roseum</i> (Chía)	9	3,2807	0.0007673 ***
	12	9,0873	3.244e-09 ***
	15	15.392	8.103e-13 ***

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA)
Análisis de varianza de los días de observación (9, 12 y 15) del crecimiento en cm de la colonia de cada aislamiento de *Fusarium sp.* ante callos de las 20 líneas híbridas y variedades de clavel.
*** valor $P = 0.0001$

cultivar de clavel ha sido atribuido a su capacidad para la producción de estas fitoalexinas, característica que se mantiene en tejidos y células en suspensión (Reinhard y Matern, 1989; Trillas, 1995). Del mismo modo, el uso de células y tejidos vegetales en cultivo *in vitro*, ha sido ampliamente implementado en estudios de mecanismos de defensa de las plantas ante patógenos, algunos de estos estudios han buscado exitosamente evaluar la producción *in vitro* de metabolitos secundarios asociados con tolerancia en clavel (Higuera, 2000; Curir et al., 2003; Hrubcova et al., 1992).

Por otra parte, en la evaluación del nivel de colonización en microplántulas *in vitro*, la restricción del avance del patógeno dentro del hospedero, se adjudicó a la respuesta de defensa que tiene como objetivo detener su avance a través de los tejidos de la planta (Ardila et al., 2007).

Se observaron niveles de colonización altos para los dos aislamientos de *Fusarium sp* en las líneas UM227, UM462 y UM485 y en la variedad comercial Kaly, usada como control de susceptibilidad. Particularmente, las líneas UM225, UM253 y UM464, presentaron niveles de colonización altos ante el aislamiento de *F.*

oxysporum. Kaly presentó niveles de colonización alto para los dos aislamientos y Candy solo mostró niveles de colonización bajos para el aislamiento de *F. oxysporum*. En los ensayos con *F. culmorum* (Chía) se observaron niveles de colonización alta en las líneas UM471 y en la variedad comercial Bagatel.

Todas las líneas o variedades comerciales mostraron algún tipo de nivel de colonización para al menos

uno de los aislamientos del patógeno, sugiriendo que se presenta colonización por parte del patógeno aun en ausencia de susceptibilidad. Esta observación fue reportada, inicialmente por Baayen (1987), quien demostró la entrada de microconidias en raíces de clavel por medio de transporte pasivo y en estudios realizados a cultivos de clavel en Israel, determinando, que aunque se presenta un transporte pasivo de microconidias a través de los haces conductores, las variedades tolerantes detienen esta colonización en las partes basales de las plantas (Ben et al., 1997).

El análisis estadístico entre las categorías asignadas dentro del ensayo reveló que existen diferencias significativas ($P < 0.05$), para los índices de colonización obtenidos en las plántulas *in vitro* para los dos aislamientos en las 16 líneas y cuatro variedades comerciales.

Por otra parte, en la evaluación bajo invernadero, la incidencia promedio fue del 98% en las líneas susceptibles, del 93% de las plantas de estas líneas murieron finalizando el tiempo de observaciones. Para los ensayos con el aislamiento de *F. oxysporum* (Tocancipá), la mortalidad de plantas susceptibles se dio alrededor

de la cuarta semana, mientras que para el caso del aislamiento de *F. culmorum* (Chía), la muerte de las plantas se presentó entre la séptima y octava semana, mostrando una mayor agresividad del aislamiento de *F. oxysporum* con respecto al de *F. culmorum* (Chía).

De las 20 líneas evaluadas, UM253, UM226 y UM462, mostraron sintomatología y por ende susceptibilidad para los dos aislamientos, por otro lado, las líneas UMRojosol, UM102, UM471, UM464, UM503, UM495 y la variedad comercial Bagatel, no mostraron sintomatología con ninguno de los aislamientos (Figura 2).

Los síntomas causados en las plantas por el aislamiento de *F. oxysporum* comenzaron a presentarse en líneas susceptibles en la primera semana. Por el contrario los síntomas en las inoculaciones con el aislamiento de *F. culmorum*, se observaron a partir de la tercera semana de realizada la inoculación. Esto pudo deberse a diferencias en los tipos de patogenicidad que presenta *F. oxysporum* con respecto a otras especies del género *Fusarium*. Al realizar los

aislamientos del patógeno, los resultados corroboraron el ingreso del patógeno a las plantas susceptibles.

Por otro lado, con el producto de las evaluaciones florales (Tabla 4), se generaron comparaciones tomando las respuestas de las 16 líneas y cuatro variedades comerciales frente a los dos aislamientos de *Fusarium sp*, en los dos ensayos *in vitro* y el ensayo bajo invernadero, procesándolos mediante un análisis de comparaciones con prueba de T-student para varianzas desiguales (Tabla 5).

Parámetros de color floral que fueron relacionados con la tolerancia presentada a los dos aislamientos, en las 20 líneas de clavel.

Las comparaciones se realizaron con el resultado de cada ensayo. Para el caso del cultivo dual, se separaron los comportamientos de respuesta inhibitora vs. líneas sin respuesta inhibitora, al igual que para el ensayo de colonización, se agruparon las líneas en niveles de colonización bajos vs. altos, y para el ensayo bajo invernadero se dividió en líneas que presentaban síntomas vs. líneas no sintomáticas. Finalmente esta respuesta binaria se contrastó con cada parámetro floral evaluado (Tabla 5).

Prueba T-student, valor crítico de 3.1692, hallado con 10 grados de libertad para dos colas. Las últimas dos columnas muestran la característica del parámetro floral que mostró tendencia tolerante y tendencia susceptible. El único parámetro floral que presentó significancia ($P= 0,0001$) con respecto a los resultados de las evaluaciones con los patógenos fue la distribución del color de la flor.

El análisis estadístico reveló una relación significativa entre la distribución del color de flores de clavel de las 20 líneas evaluadas y la



Figura 2. Respuesta de planta susceptible y tolerante en ensayo bajo invernadero. A. Planta susceptible de la línea híbrida UM253. B. Planta tolerante de la línea UM495 al ataque de *F. oxysporum*.

Línea o variedad	Color base de la flor*	Grupo color*	Disposición del color en la flor
Bagatel	155C	White	Entera
Lady green	145C	Yell-Green	Entera
Candy	5B	Green-Yell	No Entera
Kaly	155B	White	Entera
UM102	45B	Red	Entera
UM225	53C	Red	No Entera
UM226	58A	Red-Purple	No Entera
UM227	62D	Red-Purple	No Entera
UM251	71A	Red-Purple	No Entera
UM253	36A	Red	No Entera
UM462	46C	Red	Entera
UM464	42A	Red	Entera
UM471	39D	Red	Entera
UM485	65B	Red-Purple	Entera
UM493	53A	Red	Entera
UM494	46B	Red	Entera
UM495	46B	Red	Entera
UM503	58B	Red-Purple	Entera
UMRojosol	16D	Yell-Orange	No Entera
UMCRS	32D	Orange-Red	No Entera

Tabla 4. Resultado de las evaluaciones florales
* Carta de colores de la sociedad de Horticultura Inglesa

tolerancia a los dos aislamientos de *Fusarium sp*, así, el parámetro de colores enteros en la flor de clavel, mostró relación directa con la condición de tolerancia a los patógenos de *Fusarium sp*. evaluados.

En cuanto a la característica de distribución de color no entero y los parámetros del tono del color fuerte o claro y la presencia de rojo en el color base de la flor, estos no presentaron una relación clara con la condición de susceptibilidad o tolerancia.

Las flores de las líneas híbridas UM102, UM464, UM471, UM494, UM495, UM503, y la variedad comercial Bagatel presentan colores enteros, característica floral que se encontró relación con tolerancia, a su vez, estas líneas exhibieron respuesta inhibitoria para el crecimiento de los aislamientos, niveles bajos de colonización en el ensayo con microplántulas, y ausencia de síntomas en el ensayo bajo invernadero.

Cultivadores del gremio floricultor han comunicado, que variedades con ciertas características de color, presentan un nivel de tolerancia mayor que otras. Sin embargo, esta relación entre el color de las flores de una variedad de clavel y la tolerancia, que ésta pueda presentar ante el ataque de *Fusarium sp*, no había sido estudiado anteriormente. Aunque en los modelos sorgo – *Fusarium*

Parámetro de color floral	Ensayo <i>in vitro</i> de cultivo dual	Ensayo Nivel de colonización <i>in vitro</i>	Ensayo bajo invernadero	Tendencia tolerante	Tendencia susceptible
Tono base fuerte o claro	-2,1140	-0,3326	1,5565	Entero	No Entero
Color base rojo	-0,2454	-0,7851	-1,0528		
Distribución del color	3,6556***	-0,7313	4,3822***		

Tabla 5. Relación entre parámetros del color floral y la tolerancia a patógenos del género *Fusarium*.
*** valor $P = 0.0001$

sp y sorgo – *Alternaria*, ha sido estudiada la relación entre el color de la planta y pericarpio, con la tolerancia presentada a estos dos hongos, concluyendo que hay evidencia que pigmentos en partes no reproductivas de la planta pueden proteger el grano de sorgo de la colonización o infección por *Fusarium sp* (Funnell y Pedersen, 2006).

A pesar que la síntesis de algunos pigmentos vegetales se realice bajo la ruta metabólica fenilpropanoide y a su vez, el hecho de que esta ruta contenga productos y enzimas que intervienen en la vía metabólica de producción de fitoalexinas, no existe evidencia, extraíble de este trabajo, que indique que existe una relación entre la tolerancia presentada en líneas con flor de color rojo, con respecto a los otros colores, ni tampoco flores de colores claros vs. colores fuertes. Sin embargo, los análisis evidencian que líneas con flores de colores enteros son más tolerantes que aquellas líneas cuyas flores presentan patrones de coloración, encontrándose así una relación entre el color y la tolerancia.

Una hipótesis para las relaciones encontradas entre los parámetros medidos y la tolerancia, es que los genes que codifican para estas características se encuentren físicamente dentro de un mismo cromosoma y además a distancias cercanas, asegurando que se segreguen juntos (Griffiths et al., 2000). Las relaciones entre tolerancia y algunos parámetros florales encontradas en este trabajo, deben ser llevadas a estudios de genética, mediante cruces o búsqueda de genes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Militar Nueva Granada por la financiación de esta investigación a través del proyecto CIAS 2004-013.

BIBLIOGRAFIA

1. Abeywickrawa, A and Beal, S. 1992. The *Fusarium* relation races. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 32: 89 – 92.
2. Abd, K., Aly, I., Abdel, M., Abdel, M., Khalil, M and Verreet, J. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*. 2, 4: 82-85.
3. Arbeláez, G. 1987. Fungal and bacterial disease on carnation in Colombia. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 216: 151-17.
4. Arbeláez, G. 1992. Avances en el manejo del marchitamiento vascular del clavel, ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana*. Volumen 2. No 2:188
5. Arbeláez, G y Calderon. 1996. Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* del clavel en Colombia. *Fitopatología Colombiana*. Volumen 17 No 2: 73 – 79.
6. Ardila H., Baquero, B y Martínez, S. 2007. Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonioliasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Revista Colombiana de Química*. 36, 2: 151- 167.
7. Baayen, R and Maat, A. 1987. Passive transport of microconidia of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in carnation after root inoculation. *Netherland Journal of Plant Pathology*. 93: 3-13.
8. Ben, Y., Reuven, M and Shtienberg, D. 1997. Complete resistance by carnation cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* race 2. *Plant Disease*. 81, 7:777 -780.
9. Cenis, J. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20, 9: 2380.
10. Curir, P., Dolci, M., Dolci, P., Lanzotii, V and De Cooman. 2003. Fungitoxic phenols from carnation (*Dianthus caryophyllus*) effective against *Fusarium oxysporum* f.sp *dianthi*. *Phytochemistry Analysis*. 14: 8-13.
11. Edel, V., Steinberg, C., Avelange I., Laguerre, G and Alabouvette, C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology*. 85, 5: 579 – 585.
12. Funnell, D and Pedersen, J. 2006. Association of plant color and pericarp color with colonization of grain by members of *Fusarium* and *Alternaria* in near-isogenic sorghum lines. *Plant disease*. 90:411-418.

13. Griffiths, J., Miller, J., Suzuki, J., David, T., Lewontin, C and Gelbart, W. 2000. An Introduction to Genetic Analysis. Editorial Freeman. Séptima edición. Capítulo 5: 148.
14. Hernández, J., Arbelaez, G., Junta, H., Posada, M y Del portillo, P. 1998. Identificación de marcadores genéticos del agente causal del marchitamiento del clavel *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* mediante amplificación arbitraria de fragmentos polimórficos de ADN. Revista Colombiana de Biotecnología. 1, 2: 51–57.
15. Higuera, B. 2000. Estudio por HPLC de la acción de los elicitors bióticos sobre la producción *in vitro* de metabolitos secundarios en células de clavel. (*Dianthus caryophyllus*). Revista Colombiana de Química. 29: 1, 9-16.
16. Hrubcova, M., Cvikbova, M., Meravy, L., Eder, J and Binarová. 1992. Phenolic accumulation and peroxidase activity in *in vitro* selected alfalfa callus cultures resistant to filtrate of *Fusarium* spp. Biologia Plantarum. 34, 3-4: 203-211.
17. Ihaka, R and Gentleman, R. 1996. R: A language for data analysis and graphics. Journal of Computational and Graphical Statistics. 5: 299–314.
18. Kalc, G., Guest, D., Wimalajeewa, D and Heeswijck, R. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. European Journal of Plant Pathology. 102: 451 – 457.
19. Manicom, Q and Baayen, P. 1993. Restriction fragment length polymorphisms in *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* and other fusaria from *Dianthus* species. Plant Pathology. 42: 851 – 857.
20. Murashige, T and Skoog, E. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15: 473–97.
21. Promputtha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., Hüge, E., McKenzie, C., Hyde, K and Jeewon, R. 2007. A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host Senescence. Microbial Ecology. 53: 579–590
22. Reinhard, K and Matern, U. 1989. The biosynthesis of phytoalexins in *Dianthus caryophyllus* L. cell cultures: induction of Benzoyl – CoA: Anthranilate N-Benzoyltransferase activity. Archives of Biochemistry and Biophysics. 275,1: 285-301.
23. Rodríguez, M y Arbeláez, G. 2005. Marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y pudrición basal causada por *Fusarium roseum* en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Trabajo de grado para optar al título de Master en agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.
24. Schilling, A., Moller, E and Geiger, H. 1996. Polymerase Chain reaction based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. Phytopathology. 86, 5: 515 – 522.
25. Storti, E., Buiatti, M., Bettini, P., Pellegrini, M., Bogani, P., Mateo, M and Simeti, C. 1990. Active defense process and *in vitro* selection for resistance to pathogens. Acta horticulturae. 280: 361-366.
26. Tan, M and Niessen, L. 2003. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. Mycological Research. 107: 811-821.
27. Trillas, M and Azcon, J. 1995. Short and long term effects of *Fusarium oxysporum* elicitors on respiration of carnation callus. Plant Physiological Biochemistry. 33, 1: 47-53.
28. Whealy, A. 1992. Carnations. En: Introduction to floriculture. Second Edition. Academic Press. 43-65.
29. Xu, L., Zhou, L., Zhao, J., Li, J., Li, X and Wang, J. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. Letters in Applied Microbiology. 46: 68 – 72.

CONSULTA VIRTUAL

30. Asocolflores. 2007. Floriculture for export September 2007. <http://www.asocolflores.org/asocolflores/servlet/download?idexternalfile=2368name=floriculture.PDF>. 11-2-2008.
31. Duque, G. 2007. Portafolio. Comercio exterior. Café y flores salvaron el semestre de ventas para la agroindustria a EU. - Especial Portafolio Miami 3 de agosto de 2007. http://www.portafolio.com.co/port_secc_online/porta_econ_online/2007-08-03/articulo-web-nota_interior_porta-3595115.html. Consultado 7-Dic-2007. 1-feb-2008.
32. Proexport 2007. Exportación de flores colombianas.  Mas de lo mismo?. <http://www.proexport.com.co/vbecontcnt/library/documents/docnews-no8844documentno7309.PDF>. 1-Feb-2008.