

January 1996

Desarrollo de un Método Diagnóstico para *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* Utilizando Técnicas de Biología Molecular

Mario Alberto Posada

Universidad de La Salle, Bogotá, revista_uls@lasalle.edu.co

Patricia Del Portillo

Universidad de La Salle, Bogotá, revista_uls@lasalle.edu.co

Germán Arbelaez

Universidad de La Salle, Bogotá, revista_uls@lasalle.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/ruls>

Citación recomendada

Posada, M. A., P.Del Portillo, y G.Arbelaez (1996). Desarrollo de un Método Diagnóstico para *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* Utilizando Técnicas de Biología Molecular. Revista de la Universidad de La Salle, (23), 51-54.

This Artículo de Revista is brought to you for free and open access by the Revistas de divulgación at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de la Universidad de La Salle by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Perfil de los Proyectos Adelantados en CorpoGen

PATRICIA DEL PORTILLO
Microbióloga
Directora Científica
CORPOGEN

CorpoGen adelanta actualmente tres proyectos de investigación, dos en la línea de Diagnósticos Moleculares y uno en la línea de Interacción Hospedero-Patógeno. Dentro de los proyectos en Diagnósticos Moleculares, se está trabajando tanto en Salud animal como en salud Vegetal. A continuación, esbozaremos el perfil de estos proyectos y la metodología con las que se están desarrollando.

Desarrollo de un Método Diagnóstico para *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* Utilizando Técnicas de Biología Molecular

Investigadores Principales

Mario Alberto Posada¹, Patricia Del Portillo ¹ y Germán Arbelaez²

Resumen Ejecutivo.

En 1993 Colombia exportó 132,000 toneladas de flores cortadas las que

¹Corporación CorpoGen

²Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.

generaron ingresos por 380 millones de dólares. De este total, el 47% correspondió a las exportaciones de clavel y clavel miniatura (Aso-colflores, 1994). El hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianth* ataca este cultivo, y es una de las enfermedades que mayor pérdidas económicas causa en el cultivo de éste tipo de flor. El hongo en sus etapas iniciales causa un marchitamiento generalizado que conduce finalmente a la muerte de la planta, produciendo unas formas resistentes que perduran en el suelo por muchos años. Debido a esto, los flo-ricultores se ven en la necesidad de abandonar el terreno por sobreinfectación, o como ocurre en la mayoría de los casos, reemplazar el rentable cultivo del clavel por otro tipo de cultivo.

El hongo apareció en Colombia poco después de que se iniciará el cultivo de clavel y se cree que su arribo y propagación masiva se haya llevado a cabo en esquejes contaminados comprados a las casas fabricantes europeas y norteamericanas. Uno de los problemas más graves de las infecciones con *Fusarium oxysporum* es que una vez haya sido introducido en un invernadero, es casi imposible eliminarlo. El control de la enfermedad mediante la esterilización de suelos y la aplicación de fungicidas no es una medida confiable (Arbeláez, 1987). La mejor solución que se le podría dar actualmente a los cultivadores sería la

certificación de material de propagación libre de la enfermedad. Para ello es necesario contar con un método diagnóstico confiable que permita detectar la enfermedad en sus etapas iniciales, antes de que los esquejes del invernadero sean sembrados en el suelo.

Diagnóstico de la Enfermedad

Existen muchas formas especiales de *Fusarium oxysporum*: en 1981, Armstrong y Armstrong describieron por lo menos 120 formas especiales del hongo, de las cuales sólo la forma especial *dianthi* ataca el clavel. Para complicar aún más el panorama, el investigador italiano Garibaldi reportó en 1987 la existencia de al menos 8 razas diferentes dentro de la forma especial *dianthi*, con diferentes grados de patogenicidad para el clavel. Diagnosticar *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* es una labor

muy difícil y lenta con los métodos existentes. El diagnóstico es específico solamente a nivel de especie (*Fusarium oxysporum*), sin poder tener certeza a nivel de forma especial, lo cual implica que el diagnóstico no es certero. Si se quiere llegar a determinar la forma especial, es necesario inocular esquejes de clavel y analizar los resultados después de 20 semanas, lo que hace que éste diagnóstico sea lento y por lo tanto costoso y utilizado en muy pocas ocasiones. Por lo tanto es importante

"El hongo en sus etapas iniciales causa un marchitamiento generalizado que conduce finalmente a la muerte de la planta, produciendo unas formas resistentes que perduran en el suelo por muchos años. "

contar con un diagnóstico específico y rápido que identifique al hongo a nivel de forma especial, con el ánimo de certificar plantas de propagación libres de la enfermedad. Esta herramienta contribuiría en gran medida al control de esta enfermedad de gran importancia para el sector floricultor, no solo de nuestro país, sino de todos los países exportadores de flor cortada.

Los métodos de diagnóstico molecular, basados en la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, en principio parecen ser más complejos. Sin embargo, han demostrado ser más rápidos, específicos y sensibles que los métodos microbiológicos para la detección de organismos patógenos. El presente proyecto de investigación tiene como objetivo desarrollar un método diagnóstico molecular para la identificación de este importante patógeno del clavel a nivel de plantas madre y esquejes para propagación.

Hipótesis

Todo organismo debe tener características genéticas que determinen su identidad. Por lo tanto, debe poseer secuencias de ADN especie-específicas las cuales pueden ser detectadas por técnicas moleculares.

Aproximación al problema

El objetivo de este proyecto es desarrollar un método diagnóstico basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (Saiki, y col 1988). La

técnica amplifica «in vitro» un fragmento de ADN el cual puede ser fácilmente visualizado por métodos bioquímicos. Sin embargo, para llegar a desarrollar este método, se requiere identificar y caracterizar previamente la secuencia que se quiere amplificar.

Como se menciona anteriormente, existen muchas formas especiales de *Fusarium oxysporum*. Por lo tanto para identificar una secuencia de ADN especie-específica de la forma especial *dianthi*, se utilizará una técnica conocida como RAPD o Amplificación Arbitraria de Fragmentos Polimórficos de ADN (Welsh y col, 1990), la cual es una modificación de la técnica de PCR. El RAPD permite la amplificación aleatoria de diferentes fragmentos de ADN. Dependiendo de las variaciones genéticas los fragmentos amplificados varían en número y tamaño, por lo que esta técnica es muy útil para distinguir cepas de microorganismos estrechamente relacionados (ver Fig. 1). El resultado esperado es la identificación de una secuencia que amplifique una secuencia específica de ADN en todos los aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y no amplifique en aislados de otras formas especiales del hongo. Una vez identificado, este fragmento de material genético será caracterizado molecularmente, y con base en la información obtenida se desarrollara un sistema de identificación por PCR.

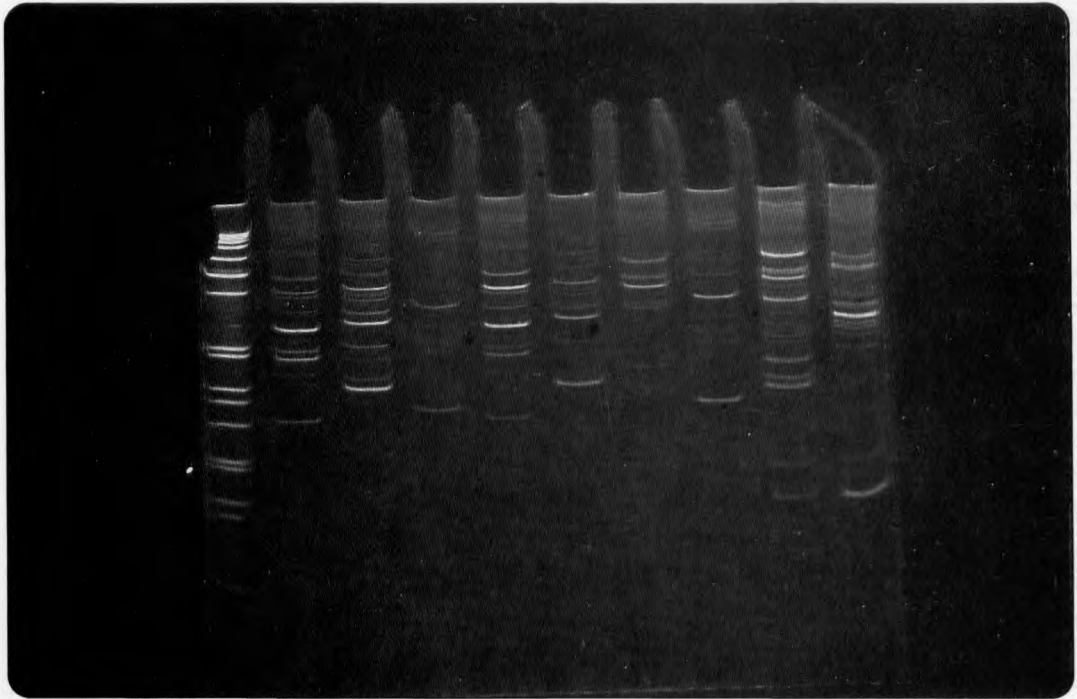
Estado actual de la Investigación

Hasta el momento se han logrado recolectar más de 50 aislados de diferentes formas especiales de

Fusarium oxysporum (en especial de f.sp. *dianthi*) provenientes de Colombia y de diferentes partes del mundo.

Las extracciones de ADN y los

RAPDs han sido estandarizados y se tienen resultados muy alentadores. Se espera concluir con la primera etapa de ésta investigación a mediados de 1997.



Amplificación aleatoria de diferentes formas especiales del hongo *Fusarium oxysporum*

Fig. No 1

Bibliografía

- ASOCOLFLORES. 1994. Departamento de Estadísticas. Suministradas por el Centro de Referencia.
- ARBELÁEZ, G. 1987. Fungal and bacterial diseases on carnation in Colombia. *Acta Horticulturae* 216:151-157
- ARMSTRONG GM and Armstrong JK. 1981. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In: *Fusarium diseases, biology and taxonomy*: pag. 391-399. Nelson PE, Toussoun TA and Cook RJ, eds. The Pennsylvania State University Press, University Park.
- GARIBALDI A and Gullino MM. 1987. *Fusarium* wilt of carnation: recent situation, problems and perspectives. *Acta Horticulturae*. 216:125-129
- SAIKI RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487-491
- WELSH J and McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18:7213-7218