

DIFERENCIACION DE RAZAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* POR ELECTROFORESIS DE ARIL ESTERASA\*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* race differentiation with the aryl esterase electrophoresis technique

Emira Garcés de Granada<sup>1</sup>, Martha Orozco de Amézquita<sup>1</sup> y Germán Arbeláez-Torres<sup>2</sup>

RESUMEN

En los últimos años, la separación por la técnica de electroforesis de las enzimas que presentan polimorfismo, ha sido utilizada para establecer diferencias entre poblaciones de microorganismos, cuando las características morfológicas no son distintivas. En este trabajo, se propuso la separación por electroforesis de la enzima aril esterasa obtenida a partir de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* de la raza 2 obtenidos de suelos y plantas de la Sabana de Bogotá, un aislamiento de la misma forma especial y raza procedente de Italia, aislamientos de las razas 1, 4 y 8 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aislamientos de *Fusarium oxysporum* no patogénicos y un aislamiento de *Phialophora cinerescens*. Los resultados muestran que mediante la separación electroforética de aril esterasa es posible determinar diferencias entre poblaciones del género *Fusarium*.

**Palabras claves:** Enzimas, Electroforesis, Polimorfismo, *Fusarium*, Aril esterasa.

SUMMARY

Recently, the study of protein polymorphism through isozyme analysis has proved useful to survey variation in many populations of microorganisms. The purpose of this study was to compare isozyme aryl esterase patterns among *Fusarium oxysporum* isolates. Fungi used in this study were race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolated from Sabana de Bogotá and Italy, races 1, 4 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phialophora cinerescens* and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. The results indicated that electrophoresis technique and staining for aryl esterase can be used to distinguish between *Fusarium oxysporum* isolates.

**Key words:** Enzymes, Electrophoresis, Polymorphism, *Fusarium*, Aryl esterase.

INTRODUCCION

Desde hace algún tiempo, para diferenciar poblaciones de *Fusarium oxysporum* se ha acudido a las pruebas de patogenicidad y a las características de virulencia. Sin embargo, los resultados de estos ensayos pueden ser influidos por la temperatura, la disponibilidad de agua, el sustrato de crecimiento de las plantas hospedantes, la variación genética de las plantas y la concentración del inóculo (Amstrong y Amstrong, 1981; Bosland, 1988). Según Bosland (1988), estas pruebas pueden acompañarse de estudios del polimorfismo de enzimas, análisis

\* Recibido: Febrero de 1997

1 Profesora Asociada, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá.

2 Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá

mediante técnicas de biología molecular, pruebas de compatibilidad vegetativa y fusión de protoplastos, ya que estas últimas técnicas dan la oportunidad de estudiar la conformación genética del hongo.

La separación electroforética de enzimas, que presentan polimorfismo y que están implicadas en la patogenicidad, ha sido utilizada para establecer diferencias fenotípicas entre las poblaciones de los hongos; además, esta prueba se ha utilizado para determinar la ubicación taxonómica de organismos cuando las características morfológicas no son distintivas (MacMillin, 1984; Bosland, 1988).

En experimentos realizados con razas de las formas especiales *vasinfectum*, *conglutinans* y *cubense* de *Fusarium oxysporum*, y con aislamientos de *Fusarium solani*, varios investigadores encontraron polimorfismo para algunas enzimas, siendo evidente la importancia potencial de la aril esterasa para evaluar diferencias entre especies, formas especiales y razas del género *Fusarium* (Belalcázar, 1984; Bosland y Williams, 1987; Biles y Martyn, 1988; Katan et al., 1991).

Se ha comprobado que las isoenzimas son constantes dentro de un individuo, que no están afectadas directamente por factores ambientales y que, a menudo, muestran diferencias considerables entre poblaciones, pues cada locus de una enzima puede ser usado como fuente independiente de información taxonómica (MacMillin, 1984; Bosland, 1988).

Teniendo en cuenta que en el trabajo realizado por Garcés et al (1993), se encontró que es posible determinar la variación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* por electroforesis de proteínas y enzimas, pero que es necesario profundizar en el manejo de estas técnicas, el presente trabajo tuvo como objetivo comparar los patrones electroforéticos para aril esterasa de los aislamientos 9; 15 y 56 de la raza fisiológica 2, de las razas 1, 4 y 8 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, de algunos aislamientos del género *Fusarium* y de un aislamiento de *Phialophora cinerescens*

## MATERIALES Y METODOS

La determinación de las isoenzimas de aril esterasa se realizó utilizando el método propuesto por Belalcázar (1984) y modificado por Garcés et al. (1993).

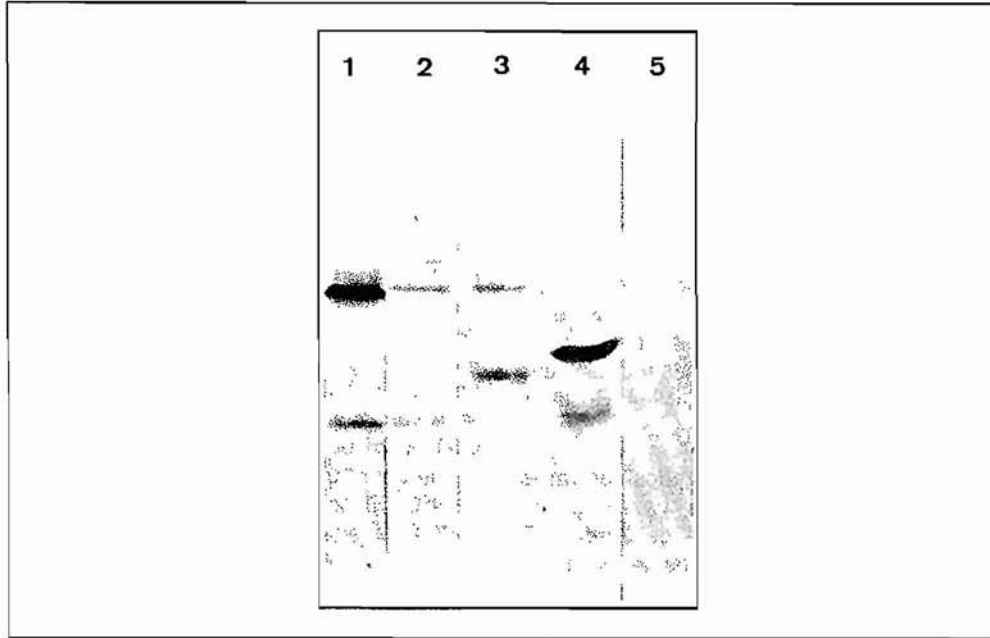
Para la obtención de las enzimas, el micelio de cada aislamiento se lavó tres veces con una solución Buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 mediante suspensión y centrifugación, durante 15 minutos, a 45000 gravedades. A cada gramo de peso seco del micelio se le agregó un ml de una solución Buffer Tris-HCl de pH 7,5, suplementado con sacarosa 0,5 M. A continuación, se hizo un macerado con 0,5 gramos de arena de cuarzo en un mortero, durante 10 minutos y a una temperatura de 4°C. El homogenizado se centrifugó a 14000 gravedades y 4°C durante 30 minutos. La solución obtenida se colocó inmediatamente a -20°C en solución Buffer. La electroforesis en geles de poliacrilamida se hizo en una cámara vertical minigel (8 x 7 cm) siguiendo la técnica para proteínas totales, incluyendo de 10 a 15 muestras por gel y agregando 15 ml del extracto por muestra.

La electroforesis se corrió a 100 voltios por 6 horas con un Buffer Tris borato (Tris 0,2 M, ácido bórico 0,017 M, pH 9) a 10 grados centígrados. Los geles se tiñeron y se incubaron a 37 grados centígrados, en oscuridad, utilizando Tris HCl, alfa naftil acetato y Fast Blue RR (Loxdale et al., 1983). Posterior a la tinción, los geles se lavaron con agua y con ácido acético al 7% por 10 minutos y, a continuación se almacenaron en etanol al 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La comparación electroforética de la enzima aril esterasa para los aislamientos 15 e Italia de la raza fisiológica 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium* sp. aislado de *Luffa cylindrica* permitió diferenciar cuatro patrones electroforéticos, correspondientes a cada uno de los aislamientos.

En la Figura 1, se presentan, en los carriles 1; 2; 3 y 4, los corridos electroforéticos respectivos, en los cuales se evidencian las



**Figura 1.** Variación de los patrones electroforéticos para la enzima aril esterasa. De izquierda a derecha: aislamientos 15 e Italia de la raza fisiológica 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium* sp. y *Phialophora cinerescens*.

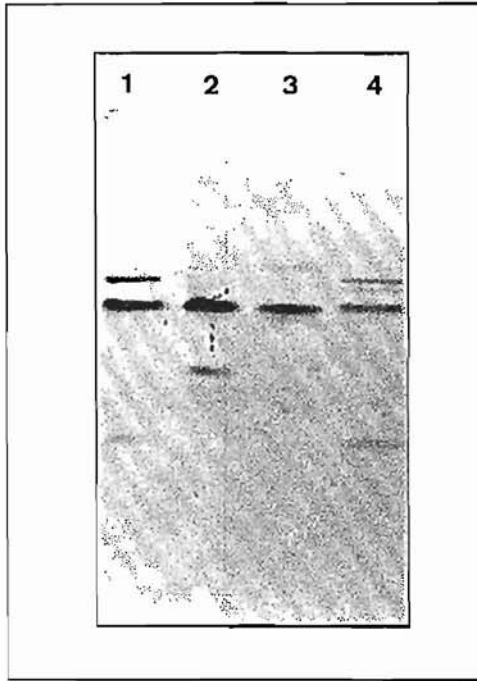
diferencias entre los aislamientos, tanto en el número como en la intensidad de las bandas. El carril 5 de la misma figura estuvo ocupado por una muestra de proteínas de un aislamiento de *Phialophora cinerescens*; para este aislamiento, no fue evidente la presencia de la aril esterasa, posiblemente debido a que el medio de cultivo para inducir crecimiento del hongo no fue apropiado, pues todos los aislamientos utilizados en este ensayo, se sembraron en el medio de Czapeck suplementado con peptona al 0,5%, el cual es recomendado por Belalcázar (1984) para especies de *Fusarium*, formas especiales de *Fusarium oxysporum* y razas de diferentes formas especiales del patógeno, pero no se ha establecido como un medio adecuado para el género *Phialophora*.

Los resultados obtenidos señalan que las muestras de aril esterasa, después de la separación electroforética, permiten diferenciar especies del género *Fusarium* y formas especiales de *Fusarium oxysporum*. Las di-

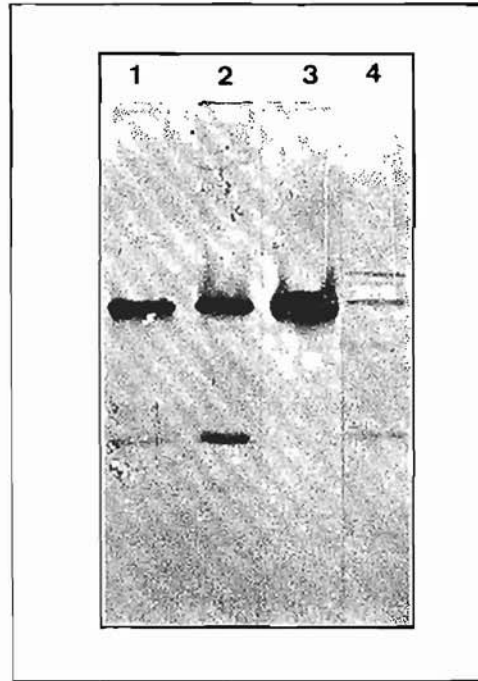
ferencias entre formas especiales fueron menores que las que se encontraron entre especies, ya que muestran una banda en común, localizada en el primer tercio del gel y que se observa en los carriles 1, 2 y 3 (Figura 1).

En este gel no es clara la respuesta de los dos aislamientos de la raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (carriles 1 y 2), ya que se presentan diferencias entre los patrones electroforéticos, debidas, posiblemente, a su origen geográfico y/o a diferencias en patogenicidad.

En la Figura 2, se presenta el gel en el cual se depositaron las muestras de proteínas de los aislamientos de las razas 1; 2; 4 y 8 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y se observa que las distintas razas del patógeno presentaron patrones electroforéticos diferentes (carriles 1; 2; 3; y 4) y seis formas de aril esterasa. En este gel, se evidenció el polimorfismo de la enzima y la importancia de esta técnica para diferenciar razas del patógeno.



**Figura 2.** Patrones electroforéticos para la enzima aril esterasa. De izquierda a derecha: aislamientos de las razas fisiológicas 1; 2; 4 y 8 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.



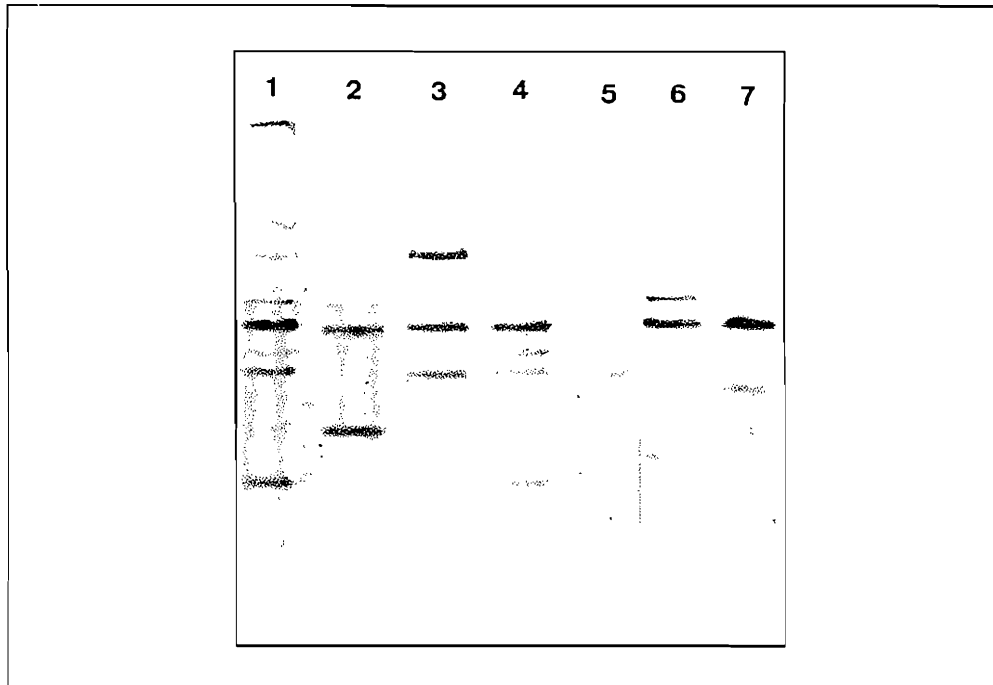
**Figura 3.** Variación de los patrones electroforéticos para la enzima aril esterasa. De izquierda a derecha: aislamientos 56; 15; 9 e Italia de la raza fisiológica 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

En la Figura 3, se comparan los aislamientos 56; 15 y 9 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* considerados por Arbeláez y Calderón (1992) como variantes de raza 2 y un aislamiento de la raza 2 del mismo patógeno proveniente de Italia. En esta figura, se observa que los cuatro aislamientos tienen una banda común y que los aislamientos 56, 15 y el de raza 2 de Italia presentan dos bandas en igual posición (carriles 1, 2 y 4). Los aislamientos colombianos presentan un menor número de bandas, pero la intensidad de la tinción en ellas es mayor, lo cual generalmente, se ha relacionado con una mayor actividad de la enzima. El aislamiento 9 de la raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, (carril 3) presenta únicamente la banda de aril esterasa común para todos, pero con mayor intensidad. En general, se observa que los patrones electroforéticos de los aislamientos de raza 2 presentan ligeras diferencias

sin que ello permita situarlos en razas diferentes, como se comprobó en las pruebas patológicas realizadas.

En la Figura 4, en los carriles 1, 2, 3, 4 y 5 se corrió la electroforesis para aril esterasa de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* Fo15, Fo28, Fo18, Fo42, y Fo47, los cuales fueron no patogénicos para las variedades New Pink Ember, U. Conn y Raggio di Sole en el trabajo realizado por Serrano y Castillo (1994), y, en los carriles 6 y 7, se corrieron las muestras de proteínas de las razas fisiológicas 1 y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. En esta figura, se presentan, para aril esterasa, seis patrones electroforéticos diferentes en número, posición e intensidad de las bandas.

Los aislamientos Fo15 y Fo42 (carriles 1 y 4) presentaron patrones electroforéticos iguales. Los anteriores resultados muestran



**Figura 4.** Comparación de los patrones electroforéticos para la enzima aril esterasa. De izquierda a derecha: aislamientos Fo15; Fo18; Fo42 se *Fusarium oxysporum* no patógeno, raza 1 y raza 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

que existen pocas diferencias entre los aislamientos considerados como no patógenicos, mientras que las respuestas para los aislamientos de las razas 1 y 4 fueron muy diferentes, pudiendo, por lo tanto, diferenciarlos fácilmente.

Los anteriores resultados evidencian la posibilidad de determinar diferencias entre poblaciones del género *Fusarium*, mediante la separación electroforética de aril esterasa, siempre y cuando la técnica se estandarice.

#### BIBLIOGRAFIA

**AMSTRONG, G. M. y AMSTRONG, J. K.** 1981. Another approach to race classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *psii*. *Phytopathology* 71: 474-478.

**ARBELAEZ, G. y CALDERÓN, O. L.** 1992. Determination of the physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* on camation in Colombia. *Acta Horticulturae* 307: 43-49.

**BELALCAZAR, S.** 1984. 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. Intitut fur Pflanzenschutz der Georg August-Universitat Gottingen, Gottingen.

**BILES, C. L. y MARTYN, R. D.** 1988. Isozyme analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* races and selected *Fusarium* spp. *Phytopathology* 78: 625.

**BOSLAND, P. W.** 1988. *Fusarium oxysporum*, a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology* 6: 281-289.

**BOSLAND, P. W. y WILLIAMS, P. H.** 1987. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polimorphism, vegetative compatibility and geographical origin. *Canadian Journal of Botany* 65: 2067-2073.

**CEVALLOS, J. F., GONZÁLEZ, D. y ARBELÁEZ, G.** 1990. Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en clavel en la Sabana de Bogotá. *Agronomía Colombiana* 7: 40-46.

**GARCES DE G., E., OROZCO DE A., M., ACOSTA, O., PEÑARANDA, J. y ARBELÁEZ, G.** 1993. Contenido de proteínas solubles, caracterización de isoenzimas, respuesta al benomil y crecimiento micelial de diversos aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana* 10(1): 33-44.

**KATAN, T., ZAMIR, D., SARFATTI, M. y KATAN, J.** 1991. Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 81: 225-262.

**LOXDALE, H. D., CASTAÑERA, H. D. y BROOKES, C. P.** 1983. Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations. 1. Electrophoretic techniques and staining systems for characterizing isoenzymes from six species of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae). *Bull. Ent. Res.* 73: 645-657.

**McMILLIN, D. E.** 1984. Plant isozymes: A historical perspective. In S. D. Taksley and T. J. Orton (Eds.). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A.* Elsevier Publ. Amsterdam. p. 3-13.

**SERRANO, M. B. y CASTILLO, N. I.** 1994. Búsqueda y evaluación de cepas no patogénicas de *Fusarium* sp. para un posible control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.