

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Fusarium Oxysporum* SEGÚN EL POLIMORFISMO DEL DNA RIBOSOMAL Y EL DNA AMPLIFICADO ALEATORIAMENTE

Characterization of fusarium oxysporum isolates using rdna polymorphism and random amplifications

William Giovani Oliveros¹, Luis Eugenio Andrade² y Gerardo Gallego³.

RESUMEN

La región ITS1 del DNA ribosomal de seis aislados de *Fusarium* y dos de *Piricularia* se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento de DNA correspondiente a la región ITS1 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, raza 2 fue clonado y secuenciado. El estudio de su secuencia permitió deducir sitios de restricción para un análisis comparativo. Los patrones de restricción no mostraron diferencias entre los seis aislados de *Fusarium*, mientras que si lograron distinguir entre los dos de *Piricularia*. Por amplificación de DNA a partir del cebador aleatorio A13, se pudieron distinguir las razas 2 y 4 de *Fusarium oxysporum*.

ABSTRACT

The ribosomal DNA región ITS1 from six *Fusarium* isolates and two *Piricularia* isolates were amplified by polymerase chain reaction (PCR). *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* race 2, ITS1 DNA fragment was cloned and sequenced. Restriction sites were identified in order to perform comparative analysis. Restriction patterns showed no difference among the six *Fusarium* isolates, whereas they discrimina-

ted between two *Piricularia* isolates. By random primer amplification using primer A13 *Fusarium oxysporum*, races 2 and 4 were identified.

INTRODUCCIÓN

Colombia es el segundo país exportador de flores en el mundo. Entre los problemas que afectan la producción de clavel está el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Fusarium* es un género muy heterogéneo y su identificación y caracterización es difícil debido a la falta de estabilidad morfológica del grupo. Las caracterizaciones a nivel subespecífico, basadas en pruebas de patogenicidad y compatibilidad vegetativa, dan resultados ambiguos (Arbelaez, 1993).

El presente trabajo evalúa la utilidad de la región interna transcrita de los genes ribosomales (ITS-1), en la caracterización de las razas 2 y 4 (únicas presentes en Colombia) de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* mediante análisis de restricción de los productos de amplificación.

Igualmente, se evalúa la posibilidad de tipificar por medio de RADP (Polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente). Además de las razas antes mencionadas, se empleó también, un aislamiento de la especie de baja patogenicidad (618g) y uno no patógeno (c14), utilizados como control biológico de la enfermedad. Igualmente, se incluyó una forma especial diferente (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*), una especie diferente (*F. roseum*) y dos aislamientos de un género diferente (*Piricularia* sp.).

REVISIÓN DE LITERATURA

Uso del DNA ribosomal (rDNA) en estudios de sistemática molecular de hongos patógenos

El complejo génico ribosomal se comporta como un reloj molecular compuesto, útil en la determinación

¹ Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. A.A.23227. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

² Profesor Asociado. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 23227, Santafé de Bogotá, D.C. Colombia, S.A. Email: eandrade@ciencias.campus.unal.edu.co.

³ Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Palmira, Valle. Colombia.

de las relaciones filogenéticas. Los genes ribosomales están constituidos por regiones muy conservadas (Subunidad pequeña SSU y subunidad grande LSU), con una tasa de cambio muy lenta, que permiten hacer comparaciones entre organismos distantemente relacionados, y por regiones muy variables (NTS) y medianamente variables (ITS) que permiten comparar organismos cercanamente relacionados (Manicom, 1990); (Innis, 1990).

Los genes que codifican para los RNA ribosomales 5,8S; 18S y 25S se encuentran repetidos entre 60 a 220 copias por genoma haploide y ubicadas en un único cromosoma (Petes y Botstein 1979, citados por Martin, 1990). Cada unidad se encuentra separada por regiones espaciadoras no transcritas (NTS), cuya longitud es muy variable y cada una de las subunidades están separadas por secuencias espaciadoras internas transcritas (ITS).

Los genes que codifican para el rRNA 5S pueden encontrarse haciendo parte de la unidad repetitiva (Bell *et al.*, 1977) o en diferentes sitios del genoma (Selker *et al.*, 1981, citados por Martin 1990).

Martin (1990) determinó los mapas de restricción de la unidad repetitiva de rDNA de dos especies del género *Pythium* (*P. paroecandrum* y *P. spinosum*), encontrando polimorfismos entre aislamientos originados a partir de una sola espóra. Para *P. paroecandrum*, encontró dos formas principales y para *P. spinosum*, cuatro, presentes en proporciones aproximadamente iguales en cada una de las especies. Los mapas de restricción diferían en la región no transcrita (NTS), tanto en su longitud, como en la presencia/ausencia de sitios de restricción para algunas de las enzimas empleadas.

Kistler *et al.* (1991) realizaron digestiones de rDNA provenientes de *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *F. oxysporum* f. sp. *mathioi* y *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, hibridizando los productos con una sonda elaborada a partir del rDNA de *F. oxysporum* c., encontrando que los patrones de hibridación agrupaban juntos los aislamientos provenientes de una misma forma especial y separaban estas últimas entre sí.

Trabajando con secuenciación de rRNAs de 51 cepas de algunas especies de *Fusarium*, Guadet *et al.* (citados por Peterson, 1991) encontraron que las especies del género que tenían estado sexual en *Giberella* agrupaban juntas y separadas de aquellas con estado sexual en el género *Nectria*, logrando, así, caracterizar estos dos géneros teleomorfos de *Fusarium* con base en su rRNA. En 1991, Nazar *et al.* encontraron que *Verticillium albo-atrum* y *V. dahliae* se podían distinguir por 5 di-

ferencias nucleotídicas ubicadas en las regiones intergénicas del rDNA, sintetizando oligonucleótidos que amplificaban diferencialmente cada una.

Cubeta *et al.*, en 1991, trataron de encontrar relaciones entre grupos de compatibilidad vegetativa (capacidad de los aislamientos de reconocerse y fusionarse uno con el otro por anastomosis) y los RFLPs del rDNA en especies del género de hongos *Rhizoctonia*. Amplificando una secuencia de rDNA de aislamientos de *Rhizoctonia* spp. equivalente a una región de 1500 pb. de la subunidad grande del gen ribosomal de *Saccharomyces cerevisiae*, encontraron, que los patrones de RFLPs se agrupaban de acuerdo con los grupos de compatibilidad vegetativa. En otro estudio similar, Liu y Sinclair (1992), trabajando con la especie *R. solani* y mediante RFLPs de la porción de rDNA equivalente a las regiones intergénicas ITS 1, ITS 2 y la subunidad 5,8S identificaron 5 subgrupos diferentes dentro de un mismo grupo de compatibilidad vegetativa. Los resultados tuvieron correlación con el hospedero; no se encontró variación dentro de cada uno de los subgrupos, independientemente del origen geográfico de los aislamientos.

En 1992, Chen pudo observar polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, tanto interespecíficos, como intraespecíficos, en tres especies del género *Pythium* (*P. heterothallicum*, *P. splendens* y *P. sylvaticum*), al amplificar la región de rDNA correspondiente al ITS 1, ITS 2 y la subunidad 5,8S. Las diferencias intraespecíficas no, solamente, fueron de fragmentos de restricción sino, también, de la longitud total del fragmento evaluado y resultaron mucho más evidentes en el DNA nuclear que en el mitocondrial.

Gardes *et al.* (1990) reportó notables diferencias en los patrones de RFLPs del DNA total en los hongos *Laccaria laccata* y *L. bicolor* a nivel intraespecífico y al hibridar con rDNA del hongo *Armillaria ostoyae*, además, de la misma forma, encontró diferentes patrones que permitían separar entre sí las especies *L. próxima*, *L. amethystina*, *L. bicolor* y *L. laccata*. Resultados similares fueron obtenidos por Martín *et al.* (1990), quienes amplificaron por PCR la unidad completa de rDNA de las especies *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. próxima* y *L. tortilis*, los patrones de RFLPs obtenidos les permitieron diferenciar aislamientos de estas especies y, además, agrupar, de acuerdo con el origen geográfico, aislamientos pertenecientes a una misma especie.

Caracterización subespecífica de hongos, según el polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)

Mediante PCR, pueden obtenerse marcadores polimórficos de DNA amplificado al azar, empleando primeros aleatorios no específicos. Estos tienen un tamaño de 9 a 10 pares de bases (pb) y un contenido de GC del 50 al 80 % y no poseen secuencias palindrómicas. El número de fragmentos amplificados depende, tanto del primer, como del DNA utilizado. Los polimorfismos pueden deberse a cambios de un solo par de bases, a deleciones en sitios de unión del cebador, a inserciones que puedan incrementar la separación entre los sitios de unión y a pequeñas inserciones o deleciones que ocasionan cambios en el tamaño de los productos de amplificación. Varios marcadores pueden ser producidos a partir de un sólo primer. La técnica puede ser empleada para marcar cromosomas o genes, para caracterizar genomas y para producir mapas genómicos. Las ventajas de su uso son: 1- Un grupo universal de "primeros" puede emplearse para todas las especies y 2- no se requiere el empleo de sondas, radioactividad, hibridizaciones o información de la secuencia del "primer".

En la amplificación mediante RAPDs se emplea, solamente, un "primer" de naturaleza arbitraria a diferencia del PCR común, en el cual se emplean dos "primeros" específicos por reacción. Por lo tanto, la amplificación se da en cualquier lugar del genoma que contenga dos secuencias complementarias al "primer" y que estén entre los límites de longitud (3kpb. aproximadamente).

Genomas de plantas y animales ya han sido caracterizados mediante RAPDs, usando primeros de 5 a 21 pb. Variedades de cultivo de maíz pudieron distinguirse y seis híbridos mostraron patrones de PCR complementarios a los de las variedades parentales. La eficacia del método se demostró mediante la detección de seis polimorfismos en variedades de cultivo de soja con un sólo cebador. Este resultado es muy interesante, si se tiene en cuenta que, mediante análisis de RFLPs, se encontró que la soja es genéticamente estable y altamente homocigótica.

Crowhurst *et al.* (1991), valiéndose de la amplificación aleatoria de DNA, encontró variabilidad genómica en 21 aislamientos de las razas 1 y 2 del hongo *F. solani* f. sp. *cucurbitae*. El estudio les permitió separar dos grandes grupos de aislamientos que coincidían con poblaciones compatibles vegetativamente. Todos los cebadores empleados revela-

ron polimorfismos por lo cual concluyeron que el nivel de diferenciación entre ellos era muy alto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material biológico

Las cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* razas 2 y 4 (FODr2 y FODr4), de *F. oxysporum* c14 y 618g (FOc14 y FO618g) y de *F. roseum* (FR) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, el aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) fue suministrado por el CIMIC de la Universidad de los Andes (Colombia) y los micelios liofilizados de los aislamientos corredora 1 y cica 9 de *Piricularia oryzae* (PO1 y PO9), por el Laboratorio de Fitopatología del CIAT (Palmira, Colombia).

Métodología

Se obtuvieron cultivos monospóricos mediante siembra en PDA de diluciones seriadas en agua estéril. Estas eran incubadas por dos ó tres días a 26°C hasta que se evidenciaban colonias individuales, momento en el cual se aislaba la colonia procedente de la máxima dilución, la cual se repurifica por medio de una nueva dilución seriada. El micelio congelado se liofilizó y se almacenó a -20°C hasta el momento de la extracción.

El liofilizado se homogenizó con nitrógeno líquido y se sometió a dilución en Tris 100 mM, EDTA 100 mM, NaCl 250 mM. Posteriormente, se adicionó SDS a concentración final 1%. Se incubó a 65°C por 30 minutos y se le añadió acetato de potasio a concentración final de 0,3M pH 4,8. La muestra se centrifugó a 10.000 rpm. La fase acuosa se extrajo con cloroformo - alcohol isoamílico (24:1), los desechos celulares se eliminaron centrifugando a 10.000 rpm por cinco minutos y los ácidos nucleicos se recuperaron de la fase superior mediante precipitación con acetato de sodio e isopropanol.

Los ensayos de amplificación se realizaron en las siguientes condiciones de reacción: *Taq* ADN polimerasa (Promega) 1 U/50 µl, dNTPs (Biolabs) 0,4 mM, MgCl₂ 2,5 mM, *Taq* ADN pol buffer (10X: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 1% Triton X100) 1:10, BSA (Albumina de suero de bovino) 0,1 %g/µl, primeros (Biolabs) 0,8 %M c/u (2 por ensayo), DNA muestra 1 ng/µl.

Los cebadores ensayados fueron:

NS7 5'GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC 3'

NS8 5'TCCGCAGGTTACCTACGGA 3'

ITS1 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGT 3'

ITS2 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'

ITS3 5'GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'

ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

ITS5 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'

En cada reacción se empleó una pareja diferente de cebadores, así: ITS1/2; ITS3/4; ITS5/2; ITS1/4; NS7/8, para amplificar individualmente el ADN extraído de cada uno de los aislamientos utilizados (FODr2, FODr4, FODc14, FOD618g, FOC, FR, PG1 y PG9) y un blanco sin DNA.

Se realizaron 35 ciclos de amplificación en un termociclador MJ Research PTC 100 de acuerdo al siguiente esquema:

1. Un minuto 10°C, seguido de una rampa térmica durante la cual se aumentaba la temperatura 1°C cada cinco segundos hasta 47°C.
2. Desnaturalización. 92oC por un minuto.
3. Reasociación 55°C por un minuto.
4. Extensión. 72°C por 1:30 minutos.

Los amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1,5%. El fragmento amplificado fue purificado con el Wizard Clean Up System (Promega) y se clonó en el vector PCR script (Stratagene). La obtención de fragmentos con extremos romos para la ligación se hizo por tratamiento con el fragmento Klenow en presencia de dNTPs. Los plásmidos recombinantes se utilizaron para transformar células competentes DH5alfa de *E. coli*. La secuenciación se realizó por el método de Sanger, usando Sequenasa. Las enzimas empleadas fueron *Bam*H I, *Ecc*R I, *Hae*III, *Hind*III, *Pst*I, *Sau*96I y *Sau*3A I. Las digestiones fueron evaluadas en geles de poliacrilamida al 12% y se revelaron con bromuro de etidio.

Los ensayos de amplificación, a partir de "primeros" aleatorios, se efectuaron en las siguientes condiciones de reacción:

Taq ADN polimerasa (Promega) 1 U/50 ul, dNTPs (Biolabs) 0,4 mM

MgCl₂ 2,5 mM, *Taq* ADN pol buffer (10X: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 1% Triton X100) 1:10,

BSA (Albúmina de suero de bovino) 0,1 %g%, "primeros" (Biolabs). 0,8 %M. DNA muestra 1 ng/%.

Los primeros ensayados fueron:

A2 (TGCCGAGCTG),

A10 (GTGATCGCAG),

A11 (CAATCGCCGT),

A13 (CAGCACCCAC),

A16 (AGCCAGCGAA),

B7 (GGTGACGCAG),

B10 (CTGCTGGGAC),

B16 (TTTGCCCGGA),

B17 (AGGGAACGAG),

B19 (ACCCCGAAG),

B20 (GGACCCTTAC),

C1 (TTCGAGCCAG).

En cada reacción, se empleaba un primer diferente, para amplificar el ADN total de cada una de las muestras y un blanco sin DNA.

Se realizaron 45 ciclos de amplificación de acuerdo al siguiente esquema:

1. Desnaturalización 94°C por un minuto. 2. Reasociación 36°C por un minuto. 3. Extensión 72°C por 2 minutos. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los amplificados obtenidos con los "primeros" ITS 3/4 y NS 7/8 fueron del mismo tamaño en las ocho muestras, postulándose que la región comprendida entre éstos es de naturaleza conservada. La región amplificada por el par de "primeros" NS 7/8 es el extremo 3' del gen que codifica para la subunidad pequeña de rRNA y la amplificada por ITS 3/4 consta del gen de la subunidad 5,8S junto con la ITS2. Ambas regiones poseen secuencias correspondientes a porciones funcionales en el RNA. Las electroforesis de las amplificaciones con los "primeros" ITS 1/4, ITS 5/2 y ITS 1/2 mostraban que el fragmento obtenido a partir de PO1 tenía un tamaño de 120 pb mayor que los otros.

El fragmento ITS1 de la unidad de ADNr amplificado por PCR mostró diferencias entre el aislamiento corredora 1 de *Piricularia oryzae* los seis aislamientos de *Fusarium* analizados (*F. oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2, *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 4, *F. oxysporum* 618g, *F. oxysporum* c14, *F. oxysporum* c14).

porum f. sp. *cupense* y *F. roseum*) y el cica 9 de *P. oryzae*. Dicho fragmento posee un tamaño de 450 pb. a diferencia del registrado en los otros, el cual fue de 330 pb. Es decir, que el fragmento de ITS1 amplificado a partir de ADN de los aislamientos del género *Fusarium* no mostró diferencias de tamaño que permitieran diferenciarlos entre sí o con el aislamiento cica 9 de *Piricularia oryzae*

Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, se eligió la región denominada ITS 1 de FOD2 (amplificada por el par de primers ITS 1/2) para realizar la secuenciación, ya que ésta fue la única que mostró algún tipo de polimorfismos, es decir, diferencias en el tamaño del amplificado de una de las muestras (PO1). La secuencia correspondiente a la región intergénica ITS 1 de FOD2, ubicada entre la subunidad pequeña de rADN (NSrADN) y la 5,8S, presenta un tamaño total de 227 pb y su contenido de AT fue de 51,1% y el de GC, de 48,9%. La secuencia fue analizada por el programa DNASIS, con el fin de encontrar las enzimas de restricción que cortaban el fragmento por lo menos en dos sitios. Se encontraron un total de 36 enzimas, de las cuales 11 cortan el fragmento en más de dos sitios: *AccI*, *AlwI*, *BspI*, *Cfr13I*, *DpnI*, *DpnII*, *HaeIII*, *MboI*, *MnlI*, *Sau3AI* y *Sau96I*.

Se eligieron las enzimas *HaeIII*, *Sau96I* y *Sau3AI* para realizar el análisis de restricción del ITS 1 de las ocho muestras. Además, se incluyeron las enzimas *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* y *PstI*, que no tienen sitios de corte en el fragmento secuenciado, con el fin de evaluar si digerían las otras muestras no secuenciadas. Tales enzimas no cortaron ninguno de los ocho fragmentos evaluados.

Este es el primer reporte de la secuencia de la región ITS1 del gen ribosomal de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. (El "primer" ITS1 se encuentra en el extremo 5' y el "primer" ITS2 se encuentra en el extremo 3'). Esta secuencia fue reportada por nosotros al Gene Bank y tiene el número de acceso BankIT 11964 ITS U33878.

5'TCCGTAGGTG AACCTGCGGA GGGATCATT
CCGAGTTTAC AACTCCCAA

CCCCTGTGAA CATACCAATT GTTGCCCTCGG
CGGATCAGCC CGCTCCCGGT

AAAACGGGAC GGCCCGCCAG AGGACCCCTA
AACTCTGTTT CTATATGTAA

CTTCTGAGTA AAACCATAAA TAAATCAAAA
CTTTCAACAA CGGATCTCTT

GGTTCGGCA TCGATGAAGA ACGCAGC 3'

Las enzimas *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* y *PstI* no cortaron el fragmento ITS1 de ninguno de los aislamientos analizados. La enzima *HaeIII* tiene un sitio de corte en la posición 113 del ITS1 de FOD2, por lo tanto, se esperaban dos fragmentos de 113 y 114 pb. En las digestiones realizadas, la enzima cortó el fragmento de las ocho muestras (FOD2, FOD4, FOc14, FO618g, FOC, FR y PO1), excepto el de PO9. La enzima *Sau96I* tiene dos sitios de corte en los nucleótidos 112 y 123 del ITS1 de FOD2 y se esperaban tres fragmentos de 112, 104 y 11 pb. Esta enzima cortó el fragmento de todas las muestras, excepto el de PO9 y produjo dos bandas de, aproximadamente, el mismo tamaño en todas las muestras digeridas. La enzima *Sau3AI* tiene tres sitios de corte en las posiciones 23, 83 y 193 del fragmento ITS1 de FOD2, de tal forma, que se esperan 4 fragmentos de 110, 60, 34 y 23 pb. Se observó que esta enzima cortó, de igual manera seis de las muestras (FOD2, FOD4, FOc14, FO618g, FOC y FR) en cuatro fragmentos. El fragmento ITS1 de PO9 fue cortado una sola vez por la enzima, observándose, solo, dos bandas en la electroforesis. Aunque fue difícil establecer el tamaño exacto de los fragmentos en las digestiones, éste se confirmó según la secuencia del ITS1 de FOD2, la cual permitió predecir los tamaños de los fragmentos esperados en las digestiones.

A pesar de los reportes de polimorfismos interespecíficos e intraespecíficos en el DNA ribosomal encontrados en otros géneros de hongos (Nazar *et al.*, 1991; Egger y Fortin, 1989; Martín, 1990, 1992; Nicholson y Rezanoor, 1993; Cubeta *et al.*, 1991; Liu y Sinclair, 1992; Gowan y Vilgalys, 1991; Chen, 1992; Gardes *et al.*, 1990 y Hintz *et al.*, 1988), no se obtuvieron resultados similares en la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Los únicos resultados satisfactorios reportados referentes a la caracterización intraespecífica de *Fusarium* han sido los obtenidos por Kistler *et al.*, 1991.

La secuencia ITS1 parece ser muy conservada en los aislamientos de la especie estudiada (*F. oxysporum* f. sp. *dianthi*); tal falta de variabilidad en organismos cercanamente relacionados puede deberse a su papel en la maduración de transcritos primarios de RNA ribosomal. Mediante arreglos en su estructura secundaria, las secuencias ITS hacen que los extremos de las subunidades NS, NL, y 5,8S del precursor del RNA ribosomal se mantengan muy cercanos para su procesamiento, indicando que esta región se haya sometida a algún tipo de restricción funcional (Weallauer *et al.*, 1974 citados por Baldwin, 1992).

De los 12 "primeros" aleatorios empleados, la mitad (seis) (A2, A10, A13, A16, B7 y B10) produjeron patrones diferentes en los DNAs amplificados los cuales permiten distinguir, al menos, dos y hasta siete aislamientos cada uno. El DNA del aislamiento FO618g produjo patrones diferentes con cinco de los cebadores excepto el A13. Con los "primeros" A13 y A16, fue posible diferenciar estos dos aislamientos entre sí, sin embargo, no sucedió así con los primeros A2 y A10 en los cuales el patrón de amplificación fue muy similar. Los "primeros" A10, B7 y B10 produjeron patrones distinguibles con el DNA de *Fusarium roseum* que permiten distinguir este aislamiento de los otros analizados. Los aislamientos FOc14 y FOC pudieron caracterizarse al amplificar su DNA total con los "primeros" B7, B10 y A13. Este último primer fue el único que permitió distinguir entre los aislamientos FOD2 y FOD4. Con los otros "primeros", estos aislamientos produjeron patrones muy similares entre sí que impiden su discriminación.

CONCLUSIONES

La digestión del fragmento ITS1 con las enzimas *Hae* III, *Sau* 96I y *Sau* 3A I produjeron el mismo patrón en las cepas de *Fusarium* analizadas, por lo cual no se pudieron establecer diferencias entre razas o entre aislamientos con diferentes niveles de patogenicidad.

Tales digestiones diferenciaron los aislamientos de *Fusarium* de los de *Piricularia oryzae*. Además, produjeron patrones diferentes en los dos aislamientos utilizados de esta última especie; por esto la región ITS1, posiblemente, sea un buen marcador molecular dentro del género *Piricularia*.

El fragmento ITS1 de la unidad de sDNA nuclear parece ser altamente conservado en la especie *F. oxysporum*, por lo tanto, no es un marcador molecular intraespecífico indicado en este organismo.

La amplificación de ADN total de por medio de RAPDs mostró ser un método promisorio en la caracterización de cepas de *F. oxysporum*, en especial, con el cebador A13, el cual amplificó diferencialmente la raza 2 y la raza 4 de la forma especial *dianthi*.

Ya que la región ITS1 no fue un marcador molecular útil en la caracterización de las razas 2 y 4 del hongo *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, la búsqueda en otras regiones del rDNA sujetas a una menor restricción funcional como las secuencias intergénicas no transcritas (NTS) puede mostrar diferencias que permitan la separación de estos aislamientos con base en sus

genes ribosomales. Esto, también, podría ser posible si se utiliza una región mayor del rDNA, como por ejemplo la ubicada entre los ITS 1 y 2 incluyendo el gen de la subunidad 5,8S.

La secuencia del ITS1 obtenida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2 sirve como pauta para futuros trabajos, si se obtiene la secuencia de la misma región de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 4. Lo anterior revelaría diferencias que permitan la síntesis de cebadores específicos que amplifiquen el rDNA de forma diferencial en estos aislamientos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Colciencias, entidad que tiene como propósito promover el desarrollo científico y tecnológico en Colombia. Proyecto # 1101-05-105-90. Agradecemos el apoyo del Dr. Joe Thomé del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira (V).

LITERATURA CITADA

1. ARBELÁEZ, G., CALDERÓN, O., CEVALLOS, J. & GONZÁLEZ, D. 1993. Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* del clavel en Colombia. Agronomía Colombiana 10(1): 19-27.
2. BALDWIN, B. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. Molecular Phylogenetics and Evolution 1: 3-16.
3. CHEN, W. 1992. Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterotallitic *Pythium* species. Phytopathology 82:1467-1472.
4. CROWHURST, R., HAWTHORNE, B., RIKKERINK, E. & TEMPLETON, M. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. Curr. Genet. 20: 391-396.
5. CUBETA, M., ECHANDI, E., ABERNETHY, T., & VILGALYS, R. 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an ampli-

- fied ribosomal RNA gene. *Phytopathology* 81: 1395-1400
6. **EGGER, K. & FORTIN, J.** 1989. Identification of taxa of Ectomycorrhizal fungi by restriction fragment analysis. *Can. J. Bot.* 68: 1482-1488.
 7. **GARDES, M., FORTIN, J., MUELLER, G., & KROPP, B.** 1990. Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp. *Phytopathology* 80: 1312-1317.
 8. **GOWAN, S. & VILGALYS, R.** 1991. Ribosomal DNA length polymorphisms within populations of *Xylaria magnoliae* (Ascomycotina). *American Journal of Botany*. 78: 1603-1607.
 9. **HINTZ, W., ANDERSON, J., & HORGAN, P.** 1988. Relatedness of three species of *Agaricus* inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of the ribosomal DNA repeat and mitochondrial DNA. *Genome* 32: 173-178.
 10. **INNIS, M., GELFAND, D., SNINSKY, J., & WHITE, T.** 1990. PCR protocols. Academic Press, San Diego, California. pp.3-12, 189-195, 282-322.
 11. **KISTLER, H., MOMOL, E., & BENNY, U.** 1991. Repetitive genomic sequences for determining relatedness among strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 331-336.
 12. **LIU, Z. & SINCLAIR, J.** 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology*. 7: 778-787.
 13. **MANICOM, B., BAR-JOSEPH, M., KOTZE, J., & BECKER, M.** 1990. A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Phytopathology* 80: 336-339.
 14. **MANICOM, B., BAR-JOSEPH, M., & KOTZE, J.** 1990. Molecular methods of potential use in the identification and taxonomy of filamentous fungi, particularly *Fusarium oxysporum*. *Phytophylactica* 22: 233-239.
 15. **MARTÍN, F.** 1990. Variation in the ribosomal DNA repeat unit within single oospore isolates of the genus *Pythium*. *Genome* 33: 585-591.
 16. **NAZAR, R., HU, X., SCHMIDT, J., CULHAM, D., & ROBB, J.** 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of verticillium wilt pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 1-11.
 17. **NICHOLSON, P., REZANOOR H., & HOLLINS, T.** 1993. Classification of a world-wide collection of isolates of *Pseudocercospora herpotricoides* by RFLP analysis of mitochondrial and ribosomal DNA and host range. *Plant Pathol.* 42: 58-66.
 18. **PETERSON, S.** 1991. Phylogenetic analysis of *Fusarium* species using ribosomal RNA comparisons. *Phytopathology* 81: 1051-1054.