

**DETERMINACIÓN DE RAZAS FISIOLÓGICAS DE
Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi* EN SUELOS CULTIVADOS
Y EN VARIEDADES DE CLAVEL
EN LA FINCA "FLORES LAS PALMAS".**

**Determination of the physiological races of *Fusarium oxysporum* f.sp.
dianthi in soils and in carnation varieties
in the farm "flores las palmas".**

Joaquín L. Benavides¹, Emira Garcés De Granada², Germán Arbeláez³,
Frank Dukuara⁴

RESUMEN

El problema fitosanitario más limitante del cultivo del clavel en Colombia es el marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* con pérdidas económicas muy importantes. El objetivo del trabajo fue la determinación de las razas fisiológicas del patógeno en la finca "Flores Las Palmas", localizada en el Municipio de Tocancipá, Cundinamarca, a partir de muestras de plantas de clavel afectadas y de suelo. La investigación consistió en la obtención de 50 aislamientos del hongo a partir de plantas afectadas por la enfermedad y de 50 aislamientos de suelo, los cuales se inocularon en las variedades diferenciales de clavel Ibiza, Taiga, Raggio di Sole, Pink Calypso, Niki y San Remo. Los resultados mostraron que 41 (82%) de los 50 aislamientos del hongo obtenidos de plantas enfermas de clavel estándar se clasificaron como raza 2 del patógeno, cinco aislamientos (10%) se caracterizaron como de baja patoge-

nidad, por lo cual no fue posible determinar la raza a la cual pertenecen y cuatro aislamientos (8%) se caracterizaron por no ser patogénicos en plantas de clavel. De los 50 aislamientos del hongo obtenidos a partir de muestras de suelo, solamente uno de ellos (2%) fue patogénico en plantas de clavel y se clasificó como raza 2, siendo los demás aislamientos no patogénicos en plantas de clavel.

SUMMARY

Vascular wilt of carnation, induced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, is the most limiting phytosanitary problem of this crop in Colombia, where it causes very important economic losses. This work was done to determine which physiological races of the pathogen are present in the farm "Flores Las Palmas" located in Tocancipá, Cundinamarca. The research consisted in the collection of 50 isolates of the fungus from diseased plants and 50 isolates from the soil. Three isolates were inoculated on six differential varieties, namely Ibiza, Taiga, Raggio di Sole, Pink Calypso, Niki and San Remo. Forty one of the isolates (82%) were identified as race 2 of the pathogen. Five isolates (10%) showed low level of pathogenicity and could not be identified within known races, and four isolates (8%) were not pathogenic on carnation plants. Out of 50 isolates of the fungus from the soil, only one (2%) was pathogenic on carnation plants and was classified as race 2, the other 49 isolates (98%) being not pathogenic.

INTRODUCCIÓN

Los problemas fitosanitarios constituyen uno de los aspectos más importantes en el cultivo del clavel en Colombia con un incremento en su disemina-

- 1 Licenciado en Biología, Postgrado de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.
- 2 Profesora Asociada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490. Santafé de Bogotá, D. C., Colombia S.A.
- 3 Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490. Santafé de Bogotá D.C., Colombia, S.A.
- 4 Microbiólogo. Departamento de Investigación y Desarrollo. Floramérica S.A.. Santafé de Bogotá, D. C., A.A. 52717.

ción, debido al aumento considerable y progresivo de las áreas sembradas.

Una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo del clavel es el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, debido a las grandes pérdidas que ocasiona, la facilidad de propagación a través de esquejes infectados, su alta persistencia en el suelo y el elevado costo de las medidas de control utilizadas. Estos factores han ocasionado la sustitución del clavel por otros tipos de flores y el desplazamiento de su cultivo a otras áreas geográficas (Arbeláez 1992).

El conocimiento del patógeno y la frecuencia de sus razas fisiológicas es un aspecto importante para el manejo de la enfermedad o para entender el comportamiento de las variedades cultivadas y para trabajos de mejoramiento genético del clavel (Garibaldi y Rossi, 1987). Además, la determinación y el conocimiento de las razas fisiológicas del patógeno en una región o en una finca en particular permite al productor la escogencia de las variedades más convenientes para cada situación en especial.

En el mundo, se han encontrado, por lo menos, ocho razas fisiológicas del patógeno, entre las cuales, la raza 2 es la de mayor virulencia y la más frecuente en diferentes países (Garibaldi y Rossi, 1987).

En varios estudios realizados en Colombia, se encontró que la raza 2 del patógeno es la más prevalente, mientras que la raza 4 es de muy baja frecuencia (Cevallos et al, 1990; Arbeláez y Calderón, 1992).

El objetivo de la presente investigación fue la determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en la finca "Flores Las Palmas" a partir de muestras de plantas de clavel afectadas y de suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se efectuó en la finca "Flores Las Palmas" de la empresa Floramérica S. A., localizada en la vereda El Porvenir del Municipio de Tocancipá, con una temperatura promedio de 14°C.

La obtención de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* se llevó a cabo en dos fases, en las cuales se tomaron 50 muestras de plantas de diversas variedades de clavel estándar afectadas por la enfermedad y 50 muestras de suelo.

La fase 1 del experimento se inició durante el segundo semestre de 1992, cuando se tomaron 25 muestras de suelo sembrado con clavel y con algún nivel de infestación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* y 25 plantas de clavel estándar afecta-

das por el mismo patógeno y que tuvieran entre 17 y 40 semanas de cultivo. Este muestreo cubrió un 25% del área total cultivada de la finca. Las muestras de suelo se tomaron con un barreno a una profundidad de 20 cm. A partir de estas muestras, se obtuvieron en el laboratorio los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

Las muestras de suelo se tomaron de cada bloque, para lo cual, éste se dividió en zonas que comprendieron de cuatro a cinco naves en promedio y, de cada una de las zonas, se obtuvieron en promedio de cinco a ocho submuestras, con las cuales se conformó una muestra.

Para las muestras de plantas, se escogieron al azar por cada zona aquéllas que presentaran los síntomas típicos de la enfermedad hasta completar 25 muestras en cada una de sus fases, para someterlas a análisis en el Laboratorio de Fitopatología de Floramérica, donde se aisló el patógeno a partir de las plantas, para lo cual se les retiró el follaje y, sólo dejaron los tallos con la presencia del marchitamiento vascular.

De tales tallos, se tomaron fragmentos de su parte superior y se desinfectaron con una solución de Prepodine al 20% y, después de enjuagarlos con agua destilada, se trataron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante dos y medio minutos y se volvieron a enjuagar con agua destilada y, después, con agua estéril acidificada a pH 2,5 con ácido bórico y, luego, se secaron con papel filtro estéril.

De cada fragmento se hicieron cortes transversales que, de nuevo, se secaron con papel filtro estéril y se sembraron cinco en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo de Komada (Komada, 1975) y, después de someterlos a incubación a 27°C durante siete días, se resembraron en papa dextrosa agar (PDA).

De las muestras de suelo se hicieron diluciones a 10⁻¹ y 10⁻² y, de cada una de ellas, se tomó 1 ml. que se colocó en cajas de Petri con el medio de cultivo de Komada, las cuales se incubaron a 27 °C durante siete días.

Después de que produjo el crecimiento del patógeno en las cajas de Petri, por medio de las características macro y microscópicas, se seleccionaron las colonias correspondientes a *Fusarium oxysporum* y, luego de sus traspasos a PDA, se extrajeron, con un sacabocados de 0,5 mm. de diámetro, dos cilindros, los cuales se colocaron en tubos de ensayo con suelo estéril para formar el cepario para los estudios posteriores.

Para las pruebas de patogenicidad, se preparó el inóculo tomando, con un sacabocados de 0,5 mm. de diámetro, dos cilindros de cada colonia que creció en caja de Petri con PDA y se colocaron en erlenmeyers que contenían 250 ml. de medio líquido de caseína hidrolizada con agitación constante (175 rpm) durante 7-10 días y a una temperatura de incubación de 27°C (Arbeláez y Calderón, 1992).

Después del desarrollo del hongo, con un hemacítometro, se efectuaron recuentos de la cantidad total de conidias producidas y, luego de establecer su concentración por mililitro, se efectuaron las diluciones hasta obtener una concentración final de 10^6 conidas por mililitro (Arbeláez y Calderón, 1992).

Para las pruebas de patogenicidad en las dos fases de la investigación, se utilizaron 6.712 esquejes enraizados de clavel de las variedades diferenciales Taiga, Ibiza, Raggio di Sole, Pink Calypso, Niki y San Remo y su respectiva inoculación se efectuó mediante la inmersión de sus raíces en una suspensión conidial de *Fusarium oxysporum* de 10^6 conidias/ml, inmediatamente antes de la siembra, durante 15 segundos y, después, se sembraron en bolsas de polietileno negro con perforaciones laterales; las bolsas se llenaron con una mezcla de suelo y cascanilla de arroz previamente desinfectada con Telone C-17 (1-3 Diclóropropeno 74% y Cloropicrina 17%). Los esquejes, después de sembrados, se trasladaron a un invernadero cubierto con polietileno, en donde permanecieron durante 20 semanas. En total, se utilizaron 64 unidades, de las cuales cuatro se destinaron a los testigos que se inocularon con agua destilada estéril.

Las plantas que, al final del experimento, sobrevivieron se cortaron en su base con una tijera podadora para observar, en sus tallos, los daños presentados en los haces vasculares.

Para la identificación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en las seis variedades diferenciales de clavel inoculadas, se utilizó la reacción propuesta por Garibaldi (Garibaldi, 1975; Garibaldi y Rossi, 1987; Arbeláez et al (1993)) y su respuesta se presenta en el Cuadro 1.

Para la evaluación del índice de la enfermedad, se efectuaron observaciones semanales de la sintomatología de las plantas y se aplicó la siguiente escala propuesta por Cevallos et al (1990):

Cuadro 1. Respuesta de las variedades diferenciales de clavel a razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

Variedad	Raza			
	1	2	4	8
Taiga	R	R	R	R
Ibiza	R	R	R	R
Raggio di Sole	R	S	R	R
Pink Calypso	R	S	S	R
Niki	R	R	R	S
San Remo	S	S	S	S

R = Resistente S = Susceptible

0 = Planta sana

1 = Planta con síntomas en el tercio inferior

2 = Planta con síntomas en el tercio medio

3 = Planta con síntomas en el tercio superior

4 = Planta muerta

La fase 2 de la investigación se efectuó en el segundo semestre de 1993 y su metodología, en todos los aspectos y etapas, fue exactamente igual a la seguida y realizada en la fase 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las Razas Fisiológicas

De los aislamientos obtenidos en las dos fases de la investigación, mediante observaciones de las características macroscópicas y microscópicas propuestas por Bosland y Williams (1987), se identificó el hongo *Fusarium oxysporum*, con lo cual se corrobora la presencia de este patógeno en los sitios en los cuales se obtuvieron los aislamientos.

De los 50 aislamientos provenientes de plantas enfermas, 44 se clasificaron como pertenecientes a la raza fisiológica 2 del patógeno, lo cual se debió a la respuesta de resistencia que presentaron las variedades Taiga, Niki e Ibiza y de susceptibilidad de las variedades San Remo, Pink Calypso y Raggio di Sole (Cuadro 2).

La presencia de la Raza Fisiológica 2 del patógeno, en los aislamientos obtenidos de las plantas enfermas fue de 82%, lo cual concuerda con los resulta-

dos obtenidos por Cevallos et al (1990) y Arbeláez y Calderón (1991) y, en ninguno de los casos, se determinaron las razas 1, 4 y 8, lo cual coincide con lo encontrado por Arbeláez y Calderón (1991).

De las muestras de suelo, únicamente se presentó un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, Raza 2; los demás aislamientos correspondieron a formas no patogénicas de *F. oxysporum* en clavel o a formas patogénicas de *F. oxysporum* diferentes a la forma especial *dianthi*.

y Camargo (1993), Serrano et al (1994), trabajos en los cuales se demostró que la población de *Fusarium oxysporum* no patogénico es mayor en el suelo que la población patogénica de *Fusarium oxysporum*.

Las plantas de las variedades Niki, Taiga e Ibiza no mostraron reacción alguna a los aislamientos de la raza 2 del patógeno, pues, al terminar las observaciones en la semana 18a. después de la siembra, no se detectó algún daño en su exterior, lo mismo que en su interior, al realizar cortes de la base de sus tallos al finalizar los experimentos.

De los aislamientos obtenidos a partir de las plantas enfermas, cinco fueron de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* de baja patogenicidad en las plantas de las variedades San Remo, Pink Calypso y Raggio di Sole y cuatro aislamientos fueron *Fusarium oxysporum* no patogénicos para las plantas de todas las variedades diferenciales en estudio.

Cuadro 2. Cantidad total de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* obtenidos de plantas y de suelo

Procedencia	Número muestras	Raza 2 Patógeno	Baja Patogenicidad	No. Patogénico
Plantas	50	41	5	4
Suelo	50	1	0	49
Total	100	42	5	53

Es necesario aclarar que la alta frecuencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en las muestras de plantas no indica que este patógeno se halle en la misma proporción en el suelo, lo cual se debe a la variación de la dinámica poblacional presente en este medio. Esta situación coincide con los resultados obtenidos por Reuven et al. (1992), Sanabria

En cuanto a los aislamientos del hongo obtenidos a partir del suelo, 49 del total de 50 resultaron pertenecer a *Fusarium oxysporum* no patogénico, ya que no ocasionaron ningún tipo de síntoma externo o interno en las plantas de las seis variedades diferenciales utilizadas en el experimento, lo cual

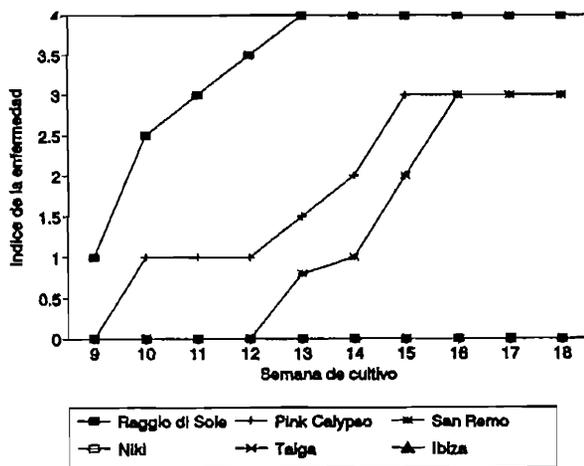


Figura 1. Respuesta de las plantas de seis variedades diferenciales de clavel a la inoculación del aislamiento 1087, obtenido a partir de una planta e identificado como Raza 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Reacción de resistencia en las plantas de las variedades Taiga, Niki e Ibiza y de susceptibilidad en las plantas de las variedades San Remo, Raggio di Sole y Pink Calypso. Este aislamiento mostró una alta agresividad.

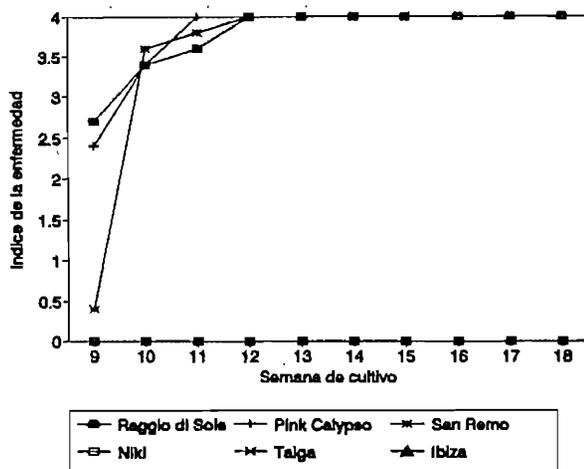


Figura 2. Respuesta de las plantas de seis variedades diferenciales de clavel a la inoculación del aislamiento 58581, obtenido a partir de una muestra de suelo e identificado como Raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Reacción de resistencia en las plantas de las variedades Taiga, Niki e Ibiza y de susceptibilidad en las plantas de las variedades San Remo, Raggio di Sole y Pink Calypso.

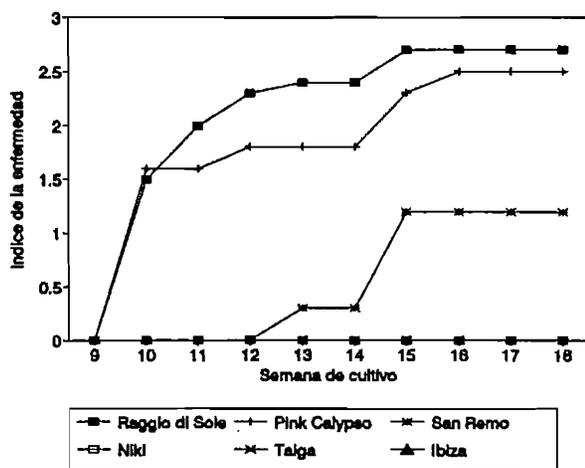


Figura 3. Respuesta de las plantas de seis variedades diferenciales de clavel a la inoculación del aislamiento 58619, obtenido a partir de una planta e identificado como Raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Reacción de resistencia en las plantas de las variedades Taiga, Niki e Ibiza y de susceptibilidad en las plantas de las variedades San Remo, Raggio di Sole y Pink Calypso. Este aislamiento mostró una mediana agresividad.

coincide con lo encontrado en Colombia por Sanabria y Camargo (1993) y Serrano et al. (1994).

PERÍODO DE INCUBACIÓN

En estos ensayos, el período de incubación de la enfermedad mostró variaciones, lo cual dependió fundamentalmente de la reacción de las plantas de las variedades diferenciales que se utilizaron para la inoculación con los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

En las fases 1 y 2, los primeros síntomas de la enfermedad se presentaron en las plantas de la variedad Raggio di Sole en la novena semana después de la inoculación y siembra de los esquejes, mientras que, en las plantas de las variedades San Remo y Pink Calypso, se observaron, con algunas excepciones, entre la decima y la doceava semana.

La variación patogénica observada en las diferentes fases del ensayo en las plantas de las variedades diferenciales inoculadas con los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* fue totalmente independiente de la variación morfológica de ta-

los aislamientos, lo cual es similar a lo observado por Messiaen y Cassini (1981) y Arbeláez y Calderón (1992).

CONCLUSIONES

- De los 50 aislamientos obtenidos a partir de muestras de plantas enfermas, 41 (82%) presentaron reacción de susceptibilidad en plantas de las variedades diferenciales Raggio di Sole, Pink Calypso y San Remo y reacción de resistencia en las variedades Ibiza, Taiga y Niki y, por consiguiente se identificaron como pertenecientes a la raza fisiológica 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.
- El 8% de los aislamientos obtenidos a partir de las plantas enfermas no fueron patogénicos en las seis variedades diferenciales de clavel inoculadas.
- De los 50 aislamientos obtenidos a partir de las plantas enfermas, cinco (10%) mostraron baja patogenicidad en las plantas de las variedades diferenciales Raggio di Sole, Pink Calypso y San Remo y reacción de resistencia en las variedades Ibiza, Taiga y Niki y, por lo tanto, no se pudieron clasificar dentro de ninguna de las razas conocidas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.
- Solamente uno (2%) de los 50 aislamientos obtenidos a partir del suelo, fue patogénico en plantas de clavel y se clasificó como Raza 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.
- El 98% de los aislamientos obtenidos a partir del suelo (49) resultaron pertenecer a *Fusarium oxysporum* no patogénico, en las variedades diferenciales de clavel utilizadas.

LITERATURA CITADA

1. ARBELAEZ, G. 1992. Avances en el manejo del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Agronomía Colombiana 9: 188-191.
2. ARBELAEZ, G. & CALDERON, O. L. 1992. Determination of the physiological races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* on carnation in Colombia. Acta Horticulturae 307: 43-49.
3. ARBELAEZ, G., CALDERON, O. L., CEVALLOS, F., & GONZALEZ, D. 1993. Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en clavel en la Sabana de Bogotá. Agronomía Colombiana 10: 19-21.

4. BOSLAND, P. W. & WILLIAMS, P. H. 1987. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isoenzyme polymorphism, vegetative compatibility and geographical origin. Canadian Journal of Botany 65: 2067-2073.
5. CEVALLOS, J. F., GONZALEZ, D. & ARBELAEZ, G. 1990. Determinación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en clavel en la Sabana de Bogotá. Agronomía Colombiana 7: 33-39.
6. GARIBALDI, A. 1975. Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyd. et Hans. First contribution. Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent 40: 531-537.
7. GARIBALDI, A. & ROSSI, G. 1987. Osservazioni sulla resistenza del garofano nei confronti *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Notiziario Tecnico Scientifico 5-9.8. KOMADA, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant Protection Res. 8: 114-125.
9. MESSIAEN, C. M., & CASSINI, R. 1981. Taxonomy of *Fusarium*. pp. 427-445. In P. E. Nelson., T. A. Toussoun, & R. J. Cook (Eds.). *Fusarium*. diseases, biology and taxonomy. The Pennsylvania State University Press. University Park & London.
10. REUVEN M., NITZANI, Y., SZMULEWICH, Y. & BEN-YEPHET, Y. 1992. Distribution of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* inoculum in carnation greenhouses. Acta Horticulturae 307: 50-55.
11. SANABRIA, J. C., & CAMARGO, O. 1993. Estudio de algunos aspectos epidemiológicos del marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y dinámica de las poblaciones del hongo en el suelo de un cultivo comercial. Tesis de Grado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.
12. SERRANO M., CASTILLO, N. & GARCES DE GRANADA, E. 1994. Búsqueda y evaluación de cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* para posible control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. p. 41. Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias. Afines, Memorias XV Congreso, Agosto 31 a Septiembre 2, Santafé de Bogotá.