

## Variación genética y patogénica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en España

J. L. ANDRÉS, M. J. VICENTE, J. L. CENIS, J. COLLAR, J. TELLO Y D. CIFUENTES

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la variabilidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en España, se realizó un estudio de un total de 53 aislados de este hongo, colectados en Galicia y el Sureste, junto con un grupo de ocho cepas de referencia. Se caracterizó la raza de cada aislado mediante la reacción de patogenicidad en hospedantes diferenciales, y se determinaron sus grupos de compatibilidad vegetativa y sus pautas de amplificación mediante RAPD-PCR. De los 53 aislados, 49 fueron patogénicos, perteneciendo 46 a la raza 2, dos a la raza 4 y uno a la raza 1. Este gran predominio de la raza 2 es similar al observado en otros países. Todos los aislados de la misma raza, pertenecieron al mismo VCG y presentaron una pauta RAPD-PCR muy similar. Tres aislados no patogénicos del Sureste, presentaron cada uno un VCG y una pauta RAPD-PCR específica. La gran consistencia de los datos de VCGs y RAPD-PCR con la reacción de patogenicidad de *F. o. dianthi*, pone de manifiesto el interés de estos métodos para una determinación rápida de determinadas razas de este hongo.

J. L. ANDRÉS<sup>a</sup>, M. J. VICENTE<sup>b</sup>, J. L. CENIS<sup>c</sup>, J. COLLAR<sup>c</sup>, J. TELLO<sup>d</sup> Y D. CIFUENTES<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña)

<sup>b</sup> E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena

<sup>c</sup> Laboratorio Fitopatológico de Galicia, Mabegondo (A Coruña)

<sup>d</sup> E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Universidad de Almería

<sup>e</sup> CIDA. 30150 La Alberca (Murcia)

Palabras clave: clavel, fusariosis, VCG, RAPD-PCR

### INTRODUCCIÓN

El marchitamiento vascular del clavel (*Dianthus cariophyllus* L.), causado por *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *dianthi* (Prill. & Delacr.) Snyder & Hansen es la enfermedad más importante de este cultivo a nivel mundial. En España se detectó por primera vez en 1970, en cultivos del Sureste (TELLO y LACASA, 1990). A partir de este momento los daños se agravaron hasta limitar seriamente el cultivo en la zona. Posteriormente, apareció en Galicia, donde el clavel empezó a cultivarse por los años 80. En esta región, los daños producidos por el

hongo fueron también importantes, llegando a ser el principal problema fitopatológico del cultivo (ANDRÉS, 1993).

Una característica importante de *F.o.* f.sp. *dianthi* es su gran variabilidad patogénica. Esta variabilidad se manifiesta en la existencia de numerosas razas fisiológicas, detectables a través de su reacción patogénica frente a cultivares diferenciales. En base a estas reacciones, GARIBALDI describió la existencia de ocho razas (GARIBALDI, 1975; 1977; 1981; 1983).

La disponibilidad de nuevas herramientas de análisis de la variabilidad genética ha contribuido a clarificar de forma muy nota-

ble la compleja situación planteada por las numerosas formas especializadas y razas de *Fusarium oxysporum* y en particular, por *F. o. dianthi*. Una de estas herramientas es la determinación de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs). Los VCGs permiten agrupar a los distintos aislados según su capacidad de anastomosarse revelando así su grado de afinidad genética (PUHALLA, 1985). Esta técnica ha sido ampliamente aplicada a *F. o. dianthi* (KATAN *et al.*, 1989, 1994; BAAYEN y KLEIJN, 1989; ALOI y BAAYEN, 1993; ELENA y TJAMOS, 1995; BAAYEN *et al.*, 1997). Otro grupo de técnicas de gran interés es el derivado de la tecnología de ácidos nucleicos. En este campo se han aplicado con éxito los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) (MANICOM *et al.*, 1987, 1990; MANICOM y BAAYEN, 1993; BAAYEN *et al.*, 1997), y sobre todo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en su variante RAPD-PCR (WILLIAMS *et al.*, 1990). Esta técnica se basa en la amplificación de fragmentos de ADN distribuidos al azar en todo el genoma, mediante la utilización de un cebador corto de secuencia arbitraria. La simplicidad de la técnica y la gran cantidad de polimorfismos que detecta han provocado que su utilización haya sido abundante en el estudio de la variabilidad de *F. o. dianthi* (MANULIS *et al.*, 1994; KALC WRIGHT *et al.*, 1996; MIGHELI *et al.*, 1996).

A diferencia de lo que ocurre con otras formas especializadas de *F. oxysporum*, los distintos enfoques experimentales utilizados han producido resultados muy consistentes. Ello ha llevado a definir un modelo global que explica la variabilidad observada en *F. o. dianthi*, y que ha sido descrito de forma muy clara por BAAYEN *et al.*, (1997). Según este modelo, las ocho razas de *F. o. dianthi* descritas por GARIBALDI en base a su patogenicidad frente a hospedantes diferenciales, se encuadran en seis VCGs. El VCG 0020 incluye sólo aislados de la raza 4, el VCG 0021 aislados de las razas 2, 5, 6 y 7 y el VCG 0022 a los aislados de las razas 1 y 8. Los aislados de raza 3, pertenecen en reali-

dad a la especie, *Fusarium redolens* f.sp. *dianthi*. Por último, se describe la existencia de otras tres razas: la 9, que se adscribe al VCG 0028, la 10, al VCG 0027, y la 11, al VCG 0025 respectivamente.

Por lo que respecta a la situación en España, se dispone de la caracterización racial de cierta cantidad de aislados del Sureste (TELLO y LACASA, 1990) y de Galicia (ANDRÉS, 1993). Sin embargo, poco se sabe en este momento acerca de la variabilidad molecular y de los grupos VCG de los aislados encontrados en estas zonas de cultivo. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es proceder a dicha caracterización para conseguir un conocimiento más ajustado que revele la distribución y pautas de migración de los genotipos presentes y favorezca el control del hongo mediante la utilización de variedades resistentes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Aislados fúngicos*

En este estudio se han analizado 61 aislados de plantas de clavel, caracterizados como *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Tabla 1). De ellos, 13 aislados procedían de la colección de J. Tello (Universidad de Almería), a partir de prospecciones realizadas en cultivos de las provincias de Alicante, Murcia y Almería. Cuarenta aislados procedían de la colección de J.L. Andrés (Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, A Coruña), formada a partir de prospecciones en las provincias de Pontevedra, Orense y A Coruña. Como referencia de las diferentes razas, fueron utilizados ocho cepas de la colección de A. Garibaldi (Universidad de Turín) y del INRA de Antibes.

Los aislados se cultivaron en un medio selectivo para *Fusarium* (KOMADA, 1975) incubado a 26-27°C durante 7 días. De cada aislado se obtuvieron cultivos monospóricos, para asegurar la pureza genética, en el medio de cultivo no selectivo PDA (patata, dextrosa y agar). El medio PDA también se utilizó para mantener el cultivo y para crecer

los inóculos necesarios para las pruebas de patogeneicidad y los análisis VCGs.

### *Pruebas de patogeneicidad*

La patogeneicidad de los aislados se determinó en los cultivares diferenciales de clavel Sarinah, Lena o Tanga, Juanito, Pallás y Elsy. Los cultivares de clavel se inocularon según el método de inmersión de raíces en una suspensión de conidias ( $10^5$  conidias/ml). Tras ello, los esquejes se plantaron en bandejas de plástico conteniendo suelo (arena, perlita y humus a partes iguales) esterilizado al vapor, a razón de 10 esquejes/maceta. Las bandejas se pusieron sobre bancadas en un invernadero a 20-30°C en condiciones de luz natural. Se hicieron 3 parcelas, de 10 esquejes por parcela, para cada combinación cultivar-aislado. Como control se utilizaron 2 esquejes/cultivar. Transcurridas unas 19 semanas de la inoculación se examinaron las plantas para medir la manifestación de la enfermedad. Ésta se cuantificó en el tallo principal mediante la escala de síntomas descrita por DEMMINK *et al.*, (1989) que va desde 0, equivalente a planta sana hasta 7, equivalente a planta muerta.

### *Análisis de los VCGs*

Siguiendo la metodología descrita por PUHALLA (1985), se transfirieron 20 pequeños bloques de micelio de cada aislado desde el medio PDA a medio MM, medio mínimo suplementado con  $KClO_3$  y *L*-asparagina (PUHALLA, 1985), y se incubaron a 27°C durante 15-20 días. Muchos aislados fueron relativamente insensibles al clorato, así es que se aumentó la concentración de  $KClO_3$  a 30%. Durante el período de incubación los sectores clorato-resistentes de crecimiento rápido que emergieron de las colonias de crecimiento restringido se transfirieron a medio MM, y se examinaron después de 4 días de incubación a 27°C. Las colonias con crecimiento poco denso pero expansivo se consideraron mutantes *nit* (PUHALLA, 1985), que son incapaces de reducir el nitrato y frecuentemente acom-

pañan a la tolerancia al clorato. Posteriormente, los mutantes sin micelio aéreo fueron identificados como *nit1*, *nit3* y *NitM* según su crecimiento en medios con nitrato, nitrito o hipoxantina (CORRELL *et al.*, 1987). La complementación entre los mutantes *nit* fue testada en medio MM. La formación del heterocarión se manifiesta como un crecimiento aéreo y denso, tipo salvaje, en la zona en donde dos mutantes complementarios se encuentran (PUHALLA, 1985). Para las pruebas de compatibilidad vegetativa se utilizaron mutantes *nit* complementarios y representativos de cada aislado. Para identificar los VCGs se emplearon *nit tester* del VCG 0020 (Fino), VCG 0021 (WCS 856) y VCG 0022 (F100), procedentes de la colección de referencia del DLO Research Institute for Plant Protection IPO-DLO, (Wageningen, Países Bajos).

### *Análisis RADP-PCR*

El ADN de los aislados se extrajo según el protocolo descrito por CENIS (1992). La reacción RAPD-PCR se llevó a cabo en 25 µl de una mezcla de reacción que contenía 25 ng de ADN genómico del hongo, 1 unidad de ADN polimerasa Replitherm (Epicentre, Madison, WI, USA), 0.2 mM de dNTPs, 15 ng de cebador, tampón de reacción 1X (50 mM Tris-HCl, 20 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 2.5 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl) y 0.1% Triton X-100. La amplificación se realizó en un termociclador (Perkin Elmer 9600, Norwalk, CT, EE.UU.) programado para 35 ciclos con los siguientes parámetros: desnaturalización a 94°C durante 1 min, anillamiento a 36°C durante 1 min y polimerización 72°C durante 1 min. Después de la PCR se cargaron 12 µl del producto amplificado en un gel de agarosa 1.4% y tras una electroforesis a 5 V/cm, se visualizaron las bandas de ADN mediante tinción con bromuro de etidio. Los cebadores fueron decámetros de secuencia arbitraria suministrados por Operon Technologies Inc (Alameda, CA, EE.UU.). Se probaron 40 cebadores, elegidos al azar, de los kits A, B, C y D del mencionado fabricante.

### Análisis de los resultados RAPD-PCR

La similaridad genética (GS) entre pares de aislados fue calculada de acuerdo al coeficiente de Dice (SNEATH y SOKAL, 1973).  $GS(ij) = 2a/(2a+b+c)$ , donde  $GS(ij)$  es la medida de la similaridad genética entre los individuos  $i$  y  $j$ ,  $a$  es el número de bandas polimórficas que comparten  $i$  y  $j$ ,  $b$  es el número de bandas presentes en  $i$  y ausentes en  $j$ , y  $c$  es el número de bandas presentes en  $j$  y ausentes en  $i$ . Con los resultados de similaridad genética se hizo un dendrograma usando el método UPGMA del programa NTSYS, versión 1.8 (ROHLF, 1993).

## RESULTADOS

### Patogeneidad y compatibilidad vegetativa de los aislados de *F.o. f.sp. dianthi*

De los 53 aislados cuya patogeneidad se caracterizó, 49 resultaron patogénicos y 4 no patogénicos. La raza de cada uno de los aislados se presenta en la Tabla 1. La mayoría de los aislados produjo la reacción patogénica en hospedantes diferenciales típica de la raza 2. Dos aislados de Galicia, el Gsa 2 y el Gri 1 se comportaron según la reacción esperable de la raza 4, y un aislado (Sur 27) de Vúcar (Almería) produjo una reacción propia de la raza 1 (Tabla 2). De los 46 aislados de la raza 2, 37 quedaron incluidos dentro del VCG 0021 y 9 fueron autoincompatibles. Los dos aislados de la raza 4 se agruparon en el VCG 0020 y el aislado de raza 1 fue el único componente del VCG 0022, tal como cabría esperar. Los cuatro aislados no patogénicos provinieron todos del Sureste. Uno de ellos (Sur 23) fue autoincompatible y los otros tres pertenecieron a un VCG diferente cada uno (1, 2 y 3 en Tabla 1), que no coincidieron con ninguno de los cultivos *tester* utilizados.

### Variación RAPD-PCR

La mayoría de los cebadores usados amplificaron correctamente el ADN de los diferentes aislados (Figura 1). De todos los cebadores ensayados, los que permitieron las

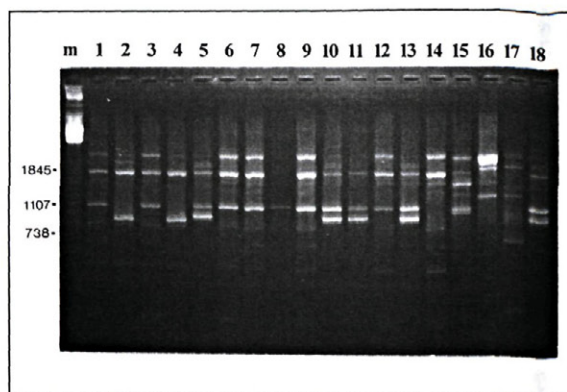


Figura 1.—Ejemplo de amplificación de ADN de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* mediante reacción RAPD-PCR con el cebador OPA-01. Calle m: Marcador peso molecular, 123 bp ladder. Carril 1: aislado Gsa 1, 2: Gsa 2, 3: Gbe 9, 4: Gri 1, 5: F1, 6: F2S, 7: F75, 9: F256, 10: F276, 11: F310, 12: Sur 1, 13: Sur 27, 14: Sur 2, 15: Sur 5, 16: Sur 8, 17: Sur 23, 18: F276.

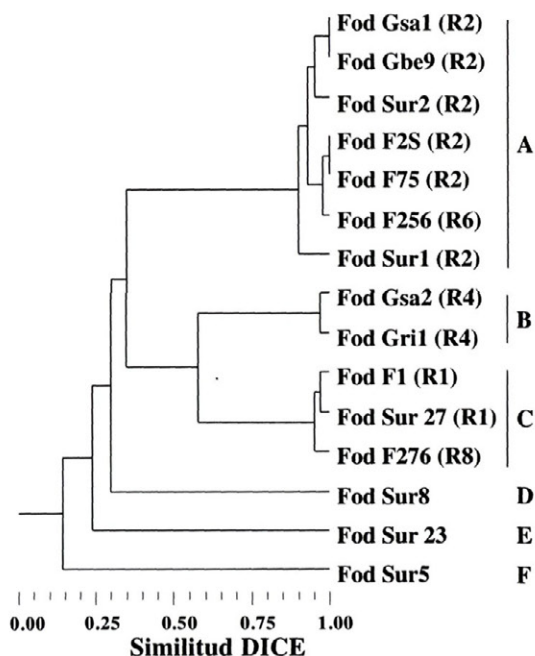


Figura 2.—Dendrograma UPGMA a partir del coeficiente Dice, que muestra la similitud genética de los aislados representativos de Galicia, Sureste y de referencia (Raza de los aislados entre paréntesis).

mejores amplificaciones fueron los siguientes: OPA-01, -03, -05, -11, -15, -16, -17, OPB-06, -10, -11, -13 y -15. Mediante la utilización de éstos 12 cebadores se obtuvieron un total de 90 bandas, con las que se elaboró una matriz de presencia/ausencia de las mismas en los diferentes aislados analizados. El dendrograma que resulta del análisis de similitud de dichas bandas aparece en la Figura 2. Los aislados estudiados se distribuyen en seis grupos según su similitud. A cada uno de estos seis grupos, comenzando por la parte superior, se le asignó una letra, apareciendo la asignación de los aislados estudiados a cada uno de estos grupos en la Tabla 1. Tres de los grupos (D, E y F) corresponden a cada uno de tres aislados no patogénicos: Sur 8, Sur 23 y Sur 5, respectivamente. El grupo que abarca mayor número de aislados (A), incluye 5 haplotipos. Todos los aislados de este grupo son los caracterizados como pertenecientes a la raza 2, excepto el F256, proveniente de la colección de A. Garibaldi como perteneciente a la raza 6. El segundo grupo (B) está compuesto por los dos aislados, Gsa 2 y Gri 1, caracterizados en el ensayo de patogenicidad como pertenecientes a la raza 4. Por último, el tercer grupo (C) incluye una cepa de referencia de la raza 1 (F 1), una cepa de referencia de la raza 8 (F 276), y un aislado procedente del Sureste, clasificado como raza 1 (Sur 27). Todos los aislados de Galicia de la raza 2 se incluyeron en un único haplotipo RAPD, mientras que los provenientes del Sureste se distribuyeron en dos haplotipos. Los aislados de Galicia de la raza 4 fueron ligeramente diferentes entre sí.

## DISCUSIÓN

La Tabla 1 resume toda la información obtenida acerca de la variabilidad de la colección de aislados de *F. o. dianthi* estudiada. Es interesante observar la gran consistencia de las dos herramientas de estudio utilizadas, RAPDs y VCGs, con la identidad racial de los aislados. Este hecho no es sor-

prendente dado que está demostrado que en *F. o. dianthi* existe una relación muy estrecha entre VCG y raza. Todos los aislados de las razas 2, 5, 6 y 7, que en la práctica se consideran como una dada la dificultad para verificar diferencias en la virulencia entre ellas, pertenecen al VCG 0021. Los aislados de la raza 4 pertenecen al VCG 0020 y los aislados de las razas 1 y 8, se encuadran en el VCG 0022 (ALOI y BAAYEN, 1993; BAAYEN *et al.*, 1997). Por otra parte, cada VCG es claramente distinguible mediante pautas de amplificación RAPD. Este hecho también ha sido demostrado previamente para las pautas de RFLPs y RAPDs en *F. o. dianthi* en estudios realizados por MANICOM y BAAYEN, (1993), MANULIS *et al.*, (1994), KALC WRIGHT *et al.*, (1996) y BAAYEN *et al.*, (1997). En la colección de aislados del Sureste se observa un aislado (Sur 27) de la raza 1, que aparece en el mismo grupo RAPD que las cepas de referencia de la raza 1 (F 1) y de la raza 8 (F 276), lo cual confirma la estrecha relación genética entre estas dos razas (BAAYEN *et al.*, 1997).

Los datos de variabilidad de *F. o. dianthi* en España indican la gran homogeneidad genética existente en Galicia. El 95% de los aislados de esta región pertenecen a la raza 2 y sólo un 5% pertenecen a la raza 4. Todos los aislados de la raza 2 de Galicia son genéticamente idénticos en cuanto a la pauta de amplificación RAPD. Por el contrario, en los aislados del Sureste se detecta una mayor variabilidad. En esta zona encontramos hasta seis haplotipos diferentes, aunque esto se deriva sobre todo de la presencia de cuatro aislados no patogénicos, tres de los cuales presentan marcadas diferencias genéticas entre sí. Aún así, los aislados del Sureste de raza 2 presentan pequeñas diferencias en cuanto a las pautas RAPD, y no son totalmente idénticos como ocurría en Galicia. El hecho de que se detecte una mayor variabilidad del hongo en el Sureste no es sorprendente, por cuanto el cultivo de clavel tiene una tradición más larga en dicha zona y se ha importado mayor cantidad de material vegetal,

Tabla 1.—Razas, haplotipos RAPD y VCGs de los aislados de *F. o. dianthi* estudiados

Códigoe	Origen	Raza	RAPD	VCG
F1	Colección de A. Garibaldi (Turin)	1	C	0022
I	Colección INRA (Antibes, Francia)	1		0022
F2S	Colección INRA (Antibes, Francia)	2	A	0021
F75	Colección de A. Garibaldi (Turin)	2	A	0021
F165	Colección de A. Garibaldi (Turin)	5		0021
F256	Colección de A. Garibaldi (Turin)	6	A	0021
F276	Colección de A. Garibaldi (Turin)	8	C	0022
F310	Colección de A. Garibaldi (Turin)	4		0020
Sur 1	Crevillente (Alicante)	2	A	SI*
Sur 2	Crevillente (Alicante)	2	A	0021
Sur 3	Aguilas (Murcia)	2	A	0021
Sur 5	San Pedro (Alicante)	no pat.	F	1
Sur 6	San Pedro (Alicante)	no pat.	E	2
Sur 8	San Pedro (Alicante)	no pat.	D	3
Sur 10	San Pedro (Alicante)	2	A	0021
Sur 12	La Campana (Murcia)	2	A	0021
Sur 17	La Campana (Murcia)	2	A	0021
Sur 23	San Pedro (Alicante)	no pat.	E	SI
Sur 24	P. Lumbreras (Murcia)	2	A	0021
Sur 26	P. Lumbreras (Murcia)	2	A	0021
Sur 27	Vicar (Almería)	1	C	0022
Gsa 1	Salnés (Pontevedra)	2	A	0021
Gsa 2	Salnés (Pontevedra)	4	B	0020
Gsa 3	Salnés (Pontevedra)	2	A	SI
Gsa 4	Salnés (Pontevedra)	2	A	0021
Gsa 5	Salnés (Pontevedra)	2	A	0021
Gsa 6	Salnés (Pontevedra)	2	A	0021
Gsa 7	Salnés (Pontevedra)	2	A	SI
Gre 1	Redondela (Pontevedra)	2	A	0021
Gre 2	Redondela (Pontevedra)	2	A	0021
Gre 3	Redondela (Pontevedra)	2	A	0021
Gre 4	Redondela (Pontevedra)	2	A	0021
Gre 5	Redondela (Pontevedra)	2	A	SI
Gre 6	Redondela (Pontevedra)	2	A	0021
Gre 7	Redondela (Pontevedra)	2	A	SI
Gro 1	Rosal (Pontevedra)	2	A	0021
Gro 2	Rosal (Pontevedra)	2	A	0021
Gro 3	Rosal (Pontevedra)	2	A	0021
Gro 4	Rosal (Pontevedra)	2	A	0021
Gro 6	Rosal (Pontevedra)	2	A	0021
Gro 7	Rosal (Pontevedra)	2	A	0021
Gro 8	Rosal (Pontevedra)	2	A	0021
Gbe 1	Betanzos (A Coruña)	2	A	SI
Gbe 2	Betanzos (A Coruña)	2	A	0021
Gbe 3	Betanzos (A Coruña)	2	A	0021
Gbe 4	Betanzos (A Coruña)	2	A	SI
Gbe 5	Betanzos (A Coruña)	2	A	SI
Gbe 6	Betanzos (A Coruña)	2	A	0021
Gbe 7	Betanzos (A Coruña)	2	A	0021
Gbe 9	Betanzos (A Coruña)	2	A	0021
Gri 1	Ribadavia (Orense)	4	B	0020
Gri 2	Ribadavia (Orense)	2	A	0021
Gri 3	Ribadavia (Orense)	2	A	0021
Gri 4	Ribadavia (Orense)	2	A	0021
Gri 8	Ribadavia (Orense)	2	A	0021
Gri 9	Ribadavia (Orense)	2	A	0021
Gpa 1	Padrón (A Coruña)	2	A	0021
Gpa 2	Padrón (A Coruña)	2	A	SI
Gpa 3	Padrón (A Coruña)	2	A	0021
Gpa 4	Padrón (A Coruña)	2	A	SI
Gpa 5	Padrón (A Coruña)	2	A	0021

\*SI: aislados autoincompatibles.

Tabla 2.—Gravedad de la enfermedad producida por tres aislados de *F. o. dianthi* en los cultivares diferenciales de clavel Sarinah, Lena, Juanito, Pallas y Elsy.

Aislado	Raza	Cultivar				
		Sarinah	Lena	Juanito	Pallas	Elsy
Sur 27	1	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0
Gro 3	2	7.0	7.0	5.5	5.4	0.0
Gri 1	4	3.5	4.0	0.0	6.0	0.0

0: planta sana; 7: planta muerta

principal medio de propagación del hongo a grandes distancias (KATAN *et al.*, 1989). El hongo ha tenido un tiempo más largo para experimentar una cierta diversificación genética y además, han podido ocurrir diversos episodios de introducción. Por el contrario, la uniformidad de todos los aislados gallegos de la raza 2 podría indicar que son derivados clonales de un solo aislado introducido en Galicia, mientras que los dos únicos aislados de raza 4, provendrían de un episodio de introducción diferente. La situación de las razas de *F. o. dianthi* en otras áreas de España donde se cultiva clavel, tales como Cataluña y Valencia, no ha sido estudiada en profundidad. Hay estudios no publicados que indican que la raza 2 es predominante en dichas zonas, con la detección ocasional de la raza 1 en Cataluña (V. Cebolla, IVIA, comunicación personal).

El predominio de la raza 2, o del VCG 0021, en España se corresponde bien con la situación observada en otros países tales como Israel (KATAN *et al.*, 1989; MANULIS *et al.*, 1994), Grecia (ELENA y TJAMOS, 1995) y Australia (KALC WRIGHT *et al.*, 1996). Esta raza tiene la más amplia distribución geográfica en el mundo, habiéndose encontrado también en Inglaterra, Holanda, Francia, Italia, Colombia y Japón (ALOI y BAAYEN 1993; BAAYEN *et al.*, 1997). Por el contrario las razas 1 y 4 parecen mucho más restringidas en su distribución. Fuera de Italia, probable centro de origen de ambas, la raza 4 se ha encontrado

ocasionalmente en Israel, California y Colombia y la raza 1 en Francia (ALOI y BAAYEN, 1993; BAAYEN *et al.*, 1997). La presencia de las razas 1 y 4 en España, ya había sido mencionada por GARIBALDI (1977), ALOI y BAAYEN (1993) y BAAYEN *et al.*, (1997).

Los datos presentados ponen de manifiesto la relativamente baja variabilidad de *F. o. dianthi* en España, sobre todo en Galicia, y la similitud de su estructura racial con la observada en otros países. Los datos también sugieren la posibilidad de identificar la raza de los aislados de una forma más rápida que la de inoculaciones en hospedantes diferenciales a través de los VCGs, dada la buena correlación entre éstos y las razas. Las pruebas de patogenicidad clásicas sí serían necesarias para separar las razas 2, 5, 6 y 7 dentro del VCG 0021 o las 1 y 8 dentro del VCG 22. No obstante, las escasas diferencias de patogenicidad que se observan entre las razas dentro de cada VCG hace que esta separación no sea tan importante en la práctica. La diferenciación racial mediante RAPDs es también posible, siempre que se introduzcan en el ensayo un conjunto de aislados de referencia. Ello es necesario dado que la escasa reproducibilidad de la técnica entre laboratorios impide el desarrollo de una clave diagnóstica de validez general. Por otra parte, la técnica RAPD revela un gran potencial para estudios de genética poblacional de este importante hongo.

## ABSTRACT

In order to determine the level of variability of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Spain, a study was made on 53 isolates of this fungus, collected in Galicia and the Southeast, together with a group of eight reference strains. Race determinations of the isolates were made by screening isolates on differential hosts, vegetative compatibility groups and amplification patterns by RAPD-PCR. From the 53 isolates, 49 were pathogenic on carnation, 46 of them belonging to race 2, two to race 4 and one to race 1. This preponderance of race 2 is similar to that found in most of the countries where the fungus is present. All the isolates of the same race, belonged to the same VCG and had a very similar RAPD pattern. Three non-pathogenic isolates from the Southeast, had a specific VCG and RAPD pattern each. The great consistency of VCG and RAPD data with the pathogenicity reaction of *F.o. dianthi* suggest the interest of these methods for a fast characterization of races of this fungus.

Keywords: carnation, fusariosis, VCG, RAPD-PCR

## REFERENCIAS

- ALOI, C. y R.P. BAAAYEN, 1993: Examination of the relationships between vegetative compatibility groups and races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Plant Pathology* **42**: 839-850.
- ANDRÉS, J.L., 1993: La fusariosis vascular del clavel en Galicia. Seminario de Estudios Galegos. *Cuadernos del Area de Ciencias Agrarias* **13**: 71-82.
- BAAAYEN, R.P. y J. KLEIJN, 1989: The *Elegans* Fusaria causing wilt disease of carnation. II. Distinction of vegetative compatibility groups. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **95**: 185-94.
- BAAAYEN, R.P., F. VAN DREVEN, M.C. KRIJER y C. WALWIJK, 1997: Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* and *Fusarium redolens* f.sp. *dianthi*. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 395-408.
- CENIS, J.L., 1992: Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* **20**: 2380.
- CORRELL, J.C., C.J.R. KLITTECH y J.F. LESLIE, 1987: Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **77**: 1640-1646.
- DEMMINK, J.F., R.P. BAAAYEN y L.D. SPARNAAIJ, 1989: Evaluation of the virulence of races 1, 2 and 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation. *Euphytica* **42**: 55-63.
- ELENA, K. y E.C. TIAMOS, 1995: Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* from plants and the rhizosphere of carnation in Greece. *Plant Pathology* **44**: 148-152.
- GARIBALDI, A., 1975: Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyder et Hans. First contribution. *Medelingen Fakulteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* **40**: 531-7.
- GARIBALDI, A., 1977: Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and varietal susceptibility. *Acta Horticulturae* **71**: 97-101.
- GARIBALDI, A., 1981: Ulteriori ricerche sulla specializzazione biologica di *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyder et Hans. *Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana* **65**: 353-358.
- GARIBALDI, A., 1983: Resistenza di cultivar di garofano nei confronti di otto patotipi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyder et Hans. *Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana* **67**: 261-270.
- KALC WRIGHT, G.F., D.L. GUEST, D.L.S. WIMALAJEWA y R. VAN HEESWIJK, 1996: Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolates from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 451-457.
- KATAN, T., R. BERLINER y J. KATAN, 1994: Vegetative compatibility in populations of *Fusarium oxysporum* from wild carnation. *Mycological Research* **98**: (12): 1415-1418.
- KATAN, T., E. HADAR y J. KATAN, 1989: Vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* from carnation in Israel. *Plant Pathology* **38**: 376-381.
- KOMADA, H., 1975: Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research* **8**: 114-125.
- MANICOM, B.Q. y R.P. BAAAYEN, 1993: Restriction fragment length polymorphisms in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and other fusaria from *Dianthus* species. *Plant Pathology* **42**: 851-857.
- MANICOM, B.Q., M. BAR-JOSEPH, J.M. KOTZE y M.M. BECKER, 1990: A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Phytopathology* **80**: 336-339.
- MANICOM, B.Q., M. BAR-JOSEPH, A. ROSNER, H. VIGODSKY-HAAS y J.M. KOTZE, 1987: Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the *Fusaria*. *Phytopathology* **77**: 669-672.
- MANULIS, S., N. KOGAN, M. REUVEN y Y. BEN-YEPHET, 1994: Use of RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. *Phytopathology* **84**: 98-101.
- MIGHELLI, Q., E. BRIATORE, M. ANDRINA y A. GARIBALDI, 1996: Physiological race determination in *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* by RAPD-PCR. *Proceedings of the Fourth International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology: Diagnosis and identification of Plant Pathogens, Bonn, 9-*



- 12 September 1996. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherland.*
- PUHALLA, J.E., 1985: Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* **63**: 179-183.
- ROHLF, F.J., 1993: NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8. *Exeter Publications, Setauket, New York.*
- SNEATH, P.H.A. y R.R. SOKAL, 1973: The principles and practice of numerical classification. *W.H. Freeman, San Francisco.*
- TELLO, J.C. y A. LACASA, 1990: *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral Mediterráneo de España. Fases parasitaria (Fusariosis vasculares del tomate y clavel) y no parasitaria. *Boletín de Sanidad Vegetal Fuera de Serie* **19**: 190 pp.
- WILLIAMS, G.K., A.R. KUBELIK, K.F. LIVAK, J.A. RAFALSKI y S.V. TINGEY, 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.

(Recepción: 6 junio 2001)  
(Aceptación: 18 junio 2001)