

**RECONOCIMIENTO TAXONÓMICO PRELIMINAR DE *Fusarium roseum*  
(clasificación pendiente) RESPONSABLE DE LA PUDRICIÓN BASAL DEL  
CLAVEL COMERCIAL EN LA SABANA DE BOGOTÁ**

**CINDY MELISSA RINCÓN SANDOVAL**

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA APLICADA  
Bogotá, D.C.  
2010**

**RECONOCIMIENTO TAXONÓMICO PRELIMINAR DE *Fusarium roseum*  
(clasificación pendiente) RESPONSABLE DE LA PUDRICIÓN BASAL DEL  
CLAVEL COMERCIAL EN LA SABANA DE BOGOTÁ**

**CINDY MELISSA RINCÓN SANDOVAL**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Biólogo**

**Director: JUAN JOSÉ FILGUEIRA Dr.Sc.**

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA APLICADA  
Bogotá, D.C.  
2010**

### **ACUERDO 0066 DE 2003**

“Por el cual se expiden normas relacionadas con la presentación de tesis y trabajos de grado”

“El Autor Autoriza a la Universidad Militar Nueva Granada la reproducción parcial de este documento, con la debida cita de reconocimiento de la autoría y cede a la misma Universidad los derechos patrimoniales con fines de investigación, docencia e institucionales consagrados en el artículo 72 de la Ley 23 de 1982 y las normas que lo constituyen o modifiquen”

*A Dios y a la vida por darme la oportunidad  
de crecer como persona, de hacer lo que me gusta  
y de apreciar la majestuosidad de la naturaleza.*

*A mi familia por su incondicional apoyo en  
el desarrollo de mi trabajo.*

*A mi mamita por ser mi guía y fuente de  
inspiración para siempre alcanzar mis metas y objetivos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora expresa sus agradecimientos a:

La Universidad Militar Nueva Granada y Ceniflores por el apoyo y financiamiento de este trabajo incluido en el proyecto de Investigación Ceniflores-UMNG CIAS 295.

A mi director el Dr. Juan José Filgueira por su apoyo incondicional durante el desarrollo del trabajo, por su asesoría y dedicación en todo momento.

Al grupo de investigación de Fitopatología Molecular del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Militar Nueva Granada, en especial a: Carol Quinche quien me brindo su ayuda y me facilitó los aislamientos que debía caracterizar. A Johana Soto por sus enseñanzas, paciencia y dedicación. A Lorena Triana, Adriana Valero y Ma. De los Angeles mis amigas incondicionales del laboratorio, las cuales hicieron de las largas jornadas en el este algo divertido. A Carlos Martínez por sus consejos y asesorías en los momentos más críticos.

A Camilo López quien siempre con amor me brindo su apoyo, consejos y paciencia en mis largas jornadas de trabajo en el laboratorio.

A mis amigas (“las niñas”), compañeros y todos los que participaron con su amistad, compañía y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Conidias de cada una de las especies de <i>Fusarium roseum</i>	16
Figura 2. Diagrama de la región amplificada por PCR utilizando los primers ITS	25
Figura 3. Mapa de la región <i>Cox1</i> barcode	26
Figura 4. Esquema de la ubicación de los primers Bt2 que codifican para el gen nuclear de la Beta tubulina	26
Figura 5. Representación diagramática de la locación de los primers en un gen genérico de actina.	27
Figura 6. Síntomas externos en plantas de clavel causados por <i>Fusarium roseum</i>	31
Figura 7. Sintomatología interna de las plantas colectadas en la finca La Aurora	33
Figura 8. Sintomatología interna de las plantas colectadas en la finca Colibrí Flowers	34
Figura 9. Sintomatología interna de las plantas colectadas en la finca Aposentos.	35
Figura 10. Sintomatología interna de las plantas colectadas en la finca Papagayo.	36
Figura 11. Cultivo en PDA de los nueve aislamientos	41
Figura 12. Cultivo en Czapeck-Dox de los nueve aislamientos	44
Figura 13. Cultivo en Agar Avena de los nueve aislamientos	47
Figura 14. Cultivo en CLA.	49
Figura 15. Macroconidias de los aislamientos 1, 2 y 3	55
Figura 16. Macroconidias de los aislados 1, 2 y 3	56
Figura 17. Clamidosporas observadas en los aislamientos 4, 5 y 6	57

Figura 18. Macroconidias de los aislamientos 4, 5 y 6	57
Figura 19. Macroconidias de los aislados 4, 5 y 6	58
Figura 20. Macroconidias de los aislamientos 7, 8 y 9	58
Figura 21. Macroconidias de los aislados 7, 8 y 9	59
Figura 22. Macroconidias de <i>F.roseum</i>	60
Figura 23. Extracción de ADN	63
Figura 24. Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ITS FuF y ITS FuR.	66
Figura 25. Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ITS 1 y ITS 4.	67
Figura 26. Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ITS 4 y ITS 5.	68
Figura 27. Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers AHyF y AHyR.	69
Figura 28. Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers Bt2a y Bt2b.	70
Figura 29. Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ACTIN 5FWD ACT y ACTIN REVACT.	71
Figura 30. Filograma obtenido en MUSCLE con los primers ITS1/ITS4	82
Figura 31. Filograma obtenido en MUSCLE con los primers ITSFuF/ITSFuR	83
Figura 32. Filograma obtenido en MUSCLE con los primers Bt2a/Bt2b	84

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Valor de las exportaciones de flores Colombianas. Años 2003- 2008	6
Tabla 2. Información general acerca del lugar de procedencia del material vegetal.	20
Tabla 3. Información general de los primeros empleados en la amplificación por PCR	24
Tabla 4. Concentraciones y volúmenes de los componentes de la PCR para cada reacción.	27
Tabla 5. Descripción de los perfiles térmicos empleados para cada uno de los pares de primers empleados.	28
Tabla 6. Información general acerca de los nueve aislamientos empleados en el estudio	30
Tabla 7. Resumen de la sintomatología de la pudrición basal del Clavel	36
Tabla 8. Velocidad de crecimiento de las especies en cada uno de los medios de cultivo medida en cm/día	51
Tabla 9. Morfología de colonia	54
Tabla 10. Información general acerca de la especie a la cual correspondía cada uno de los aislamientos y la finca de procedencia de los mismos	61
Tabla 11. Resumen de las características microscópicas observadas en cada uno de los nueve aislamientos.	62
Tabla 12. Concentración de DNA	64
Tabla 13. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium graminearum</i> primers ITS1/ITS4.	74

Tabla 14. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium culmorum</i> primers ITS1/ITS4	74
Tabla 15. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium avenaceum</i> primers ITS1/ITS4	75
Tabla 16. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium graminearum</i> primers ITS FuF /ITS FuR	76
Tabla 17. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium culmorum</i> primers ITS FuF /ITS FuR	76
Tabla 18. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium avenaceum</i> primers ITS FuF /ITS FuR	77
Tabla 19. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium graminearum</i> primers Bt2a/Bt2b	78
Tabla 20. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium culmorum</i> primers Bt2a/Bt2b	79
Tabla 21. Alineamiento en NCBI-BLAST <i>Fusarium avenaceum</i> primers Bt2a/Bt2b	79

## INDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Secuencias consenso de los aislamientos de <i>Fusarium roseum</i> con los primers ITS1/ITS4	95
Anexo 2. Secuencias consenso de los aislamientos de <i>Fusarium roseum</i> con los primers ITSFuF/ITSFuR	96
Anexo 3. Secuencias consenso de los aislamientos de <i>Fusarium roseum</i> con los primers Bt2a/Bt2b	97

## RESUMEN

La pudrición basal del clavel, causada por *Fusarium roseum* (clasificación pendiente) ha cobrado gran importancia en los últimos años. Por esta razón, se están dirigiendo estudios hacia el manejo efectivo de la misma. Este trabajo pretendía realizar un reconocimiento taxonómico de *Fusarium roseum* a partir de muestras del patógeno colectadas en cultivos comerciales de clavel en la Sabana de Bogotá. Para lograr esto, se realizó el aislamiento de los patógenos *in vitro* a partir de plantas de clavel sintomáticas (clorosis, necrosis, deshidratación, pérdida de turgencia, pudrición seca, marchitamiento en verde y presencia de coloraciones rojizas) de las variedades Delphi y Nelson. Los aislamientos obtenidos, nueve en total, fueron caracterizados macroscópica, microscópica y molecularmente. La caracterización de especies para el género *Fusarium*, se basa en el concepto de especies morfológicas y especies filogenéticas. Para la caracterización de las especies morfológicas se tomaron en cuenta caracteres físicos tales como coloración de la colonia y forma de las macroconidias, y fisiológicos como velocidad de crecimiento; esto se hizo en los medios PDA, Czapek, Agar Avena y CLA. Se obtuvieron 3 especies morfológicas a partir de los nueve aislamientos: *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum*. Posteriormente se procedió a hacer la identificación de las especies filogenéticas a partir de secuencias de DNA obtenidas del producto de PCR purificado con seis pares de primers diferentes. Las especies filogenéticas obtenidas fueron: *Gibberella avenacea*, *Fusarium venenatum* y *Gibberella zeae*. *Gibberella avenacea* y *Gibberella zeae* corresponden al teleomorfo de *Fusarium avenaceum* y *Fusarium graminearum* respectivamente. La especie *Fusarium venenatum* se considera parte de la especie *Fusarium culmorum* por Nelson y colaboradores (1983). A partir de los resultados obtenidos puede decirse que la pudrición basal del clavel comercial en la Sabana de Bogotá es causada por las especies *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum*.

Palabras clave: Clavel, pudrición basal, *Fusarium roseum*, caracterización macroscópica-microscópica, PCR.

## CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE FIGURAS	III
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
1. OBJETIVOS	4
1.1. General	4
1.2. Específicos	4
2. ESTADO DEL ARTE	5
2.1. Estado del arte	5
2.1.1 La industria de la floricultura en Colombia	5
2.2 El clavel ( <i>Dianthus caryophyllus</i> )	6
2.2.1 Generalidades del clavel	6
2.2.2 Clasificación taxonómica	8
2.2.3 El clavel en Colombia	8
2.2.4 Cultivo y comercialización	9
2.2.5 Enfermedades del clavel	9
2.3. Pudrición basal del tallo	10
2.3.1 Síntomas generales	10
2.3.2 Patógeno	10
2.3.2.1 <i>Fusarium</i>	10
2.3.2.2 <i>Fusarium roseum</i>	11
2.4 Clasificación actual para <i>Fusarium roseum</i>	12
2.4.1 <i>Fusarium avenaceum</i>	12
2.4.2 <i>Fusarium culmorum</i>	14

2.4.3	<i>Fusarium graminearum</i>	15
2.4.4	<i>Fusarium venenatum</i>	17
2.5	Estudios de taxonomía molecular para el género <i>Fusarium</i>	17
2.5.1	Amplificación de actina	18
2.5.2	Amplificación de la citocromo oxidasa	18
2.5.3	Amplificación de ITS	18
2.5.4	Amplificación de $\beta$ -tubulina	19
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1	Material Biológico	20
3.1.1	Material vegetal. <i>Dianthus caryophyllus</i>	20
3.2	Obtención de cultivo monospórico de aislamientos de los hongos a partir de material infectado.	20
3.2.1	Recolección de muestras de material sintomático para evaluación <i>in vitro</i> .	20
3.2.2	Aislamiento de los hongos.	21
3.2.3	Morfología de colonia y microscopía óptica.	22
3.3	Caracterización molecular de los hongos.	23
3.3.1	Extracción de ADN fúngico	23
3.3.2	Identificación por PCR	23
3.3.2.1	Identificación del género <i>Fusarium</i> por amplificación de ITS	24
3.3.2.2	Identificación de especies del género <i>Fusarium</i> por amplificación de <i>Cox1</i>	25
3.3.2.3	Identificación de especies del género <i>Fusarium</i> por Amplificación de $\beta$ -tubulina	26
3.3.2.4	Identificación de especies del género <i>Fusarium</i> por Amplificación de $\beta$ -Actina	27
3.4	Secuenciación	28
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1	Aislamientos de <i>Fusarium roseum</i>	30

4.2 Sintomatología pudrición basal en plantas de clavel (variedades Delphi y Nelson)	30
4.2.1 Sintomatología externa	30
4.2.2 Sintomatología interna	32
4.2.2.1 Sintomatología interna finca La Aurora	33
4.2.2.2 Sintomatología interna finca Colibrí Flowers	33
4.2.2.3 Sintomatología interna finca Aposentos	34
4.2.2.4 Sintomatología interna finca Papagayo	35
4.3 Caracterización macroscópica	36
4.3.1 Cultivo en Potato Dextrose Agar (PDA)	37
4.3.2 Cultivo en Czapek-Dox sólido	41
4.3.3 Cultivo en Agar Avena	45
4.3.4 Cultivo en Carnation Leaf Agar (CLA)	48
4.3.5 Caracterización macroscópica de los aislamientos	52
4.4 Caracterización microscópica	55
4.4.1 Caracterización microscópica de los aislamientos 1, 2 y 3	55
4.4.2 Caracterización microscópica de los aislamientos 4, 5 y 6	56
4.4.3 Caracterización microscópica de los aislamientos 7, 8 y 9	58
4.4.4 <i>Fusarium roseum</i>	59
4.5 Caracterización molecular	63
4.5.1 Extracción de ADN fúngico	63
4.5.2 Evaluación de calidad y concentración de ADN fúngico	63
4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	64
4.5.3.1 PCR con los primers ITS FuF/ITS FuR	65
4.5.3.2 PCR con los primers ITS1/ ITS4	66
4.5.3.3 PCR con los primers ITS4/ ITS5	67
4.5.3.4 PCR con los primers AHyF/AHyR	69

4.5.3.5 PCR con los primers Bt2a/Bt2b	70
4.5.3.6 PCR con los primers ACTIN5FWAACT/ACTINREVACT	71
4.5.4. Identificación por PCR del género <i>Fusarium</i>	72
4.6. Secuenciación	73
4.6.1. Alineamientos de <i>F. roseum</i> con los primers ITS1/ITS4	74
4.6.2 Alineamientos de <i>F. roseum</i> con los primers ITSFuF/ITSFuR	76
4.6.3 Alineamientos de <i>F. roseum</i> con los primers Bt2a/Bt2b	78
4.6.4 Secuenciación de los productos de PCR de los nueve aislamientos	80
4.6.5 Relaciones filogenéticas	81
4.6.5.1 Relaciones filogenéticas de <i>F. roseum</i> primers ITS1/ITS4	81
4.6.5.2 Relaciones filogenéticas de la <i>F. roseum</i> primers ITSFuF/ITSFuR	82
4.6.5.3 Relaciones filogenéticas de la <i>F. roseum</i> primers Bt2a/Bt2b	83
4.6.6 Relaciones filogenéticas de <i>F. roseum</i>	84
5. CONCLUSIONES	86
6. RECOMENDACIONES	88
7. BIBLIOGRAFÍA	89
8. CONSULTA VIRTUAL	94
9. ANEXOS	95

## INTRODUCCIÓN

Por varias décadas el sector floricultor colombiano ha contribuido a la generación de divisas y empleo. Las últimas décadas han marcado la consolidación de la floricultura colombiana en el mundo. Según la Asociación Colombiana de Exportadores de Flores –Asocolflores-, Colombia ha logrado convertirse en el primer proveedor de flores cortadas en el mercado de los Estados Unidos, así como el segundo exportador de flores frescas a nivel mundial. Las estadísticas del 2009, publicadas por esta asociación indican que la floricultura representa en la actualidad el primer renglón de exportaciones agrícolas no tradicionales del país, con ventas que en el 2008 alcanzaron los US\$1.094 millones de dólares. Sin embargo, éste liderazgo en exportaciones, se ha reducido drásticamente, especialmente por enfermedades causadas por patógenos vasculares del género *Fusarium*, los cuales inducen altas pérdidas en los cultivos de clavel.

La fusariosis del clavel es el efecto adverso más significativo para el cultivo del clavel en el país, dado que esta enfermedad genera altos costos para el productor en gastos de pesticidas, desinfección de sustratos, montaje de sistemas semi-hidropónicos y otros tratamientos poco convencionales.

En los cultivos de clavel en Colombia, la enfermedad de la pudrición basal del tallo cuyo agente causal es el hongo *Fusarium roseum* ha cobrado gran importancia. Pese a su poca documentación en la literatura autores como Arbelaez (1974; 1987; 1993) y Ortíz (2000), han dirigido diversos estudios para documentar la misma en cultivos de clavel. Por lo mismo, como medida de control al manejo de esta enfermedad, se han orientado los estudios de la pudrición basal del tallo a la búsqueda de métodos para un manejo efectivo de

la misma, que sea de bajo costo y que no sea perjudicial para el medio ambiente, obteniendo así como opción más viable la producción de variedades resistentes a estos patógenos, sin dejar a un lado la importancia de la calidad de la flor y las características que deben tener las mismas para ser comercializadas.

Este trabajo presenta un enfoque dirigido a realizar el reconocimiento taxonómico preliminar de *Fusarium roseum* con el fin de establecer que especies se encuentran presentes en la Sabana de Bogotá afectando los cultivos comerciales de Clavel, y de encontrar diferentes especies, poder utilizar esto como una herramienta importante ya sea para el control individual de las especies encontradas atacando el cultivo o para determinar en posteriores estudios que genes confieren resistencia a este patógeno para la búsqueda de variedades de clavel resistentes al patógeno *Fusarium*.

## JUSTIFICACIÓN

Dentro de la línea de investigación del grupo de Fitopatología Molecular de la Universidad Militar Nueva Granada para la obtención de variedades de clavel resistentes a parásitos vasculares del género *Fusarium*, las investigaciones han ido derivando hacia la búsqueda de estrategias de manejo de la pudrición basal en variedades comerciales de clavel realizando seguimiento y evaluación de los síntomas y aislamiento e identificación del patógeno a partir de tejidos afectados.

En la actualidad se está trabajando en un proyecto con Ceniflores para determinar la presencia en clavel de tres hongos patógenos del género *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. roseum* y *F. verticilloides*) y establecer estrategias para el manejo integrado de la marchitez del clavel. Esto mediante la incorporación de líneas de clavel resistentes a los patógenos *Fusarium* o el manejo adecuado de prácticas culturales en campo para de esta forma evitar la propagación del patógeno.

Este trabajo, busca aportar información acerca de la taxonomía del patógeno *Fusarium roseum* causante de la pudrición basal del clavel para de esta forma diseñar estrategias para un manejo integrado de la enfermedad, por medio del control individual de cada una de las especies causantes de la pudrición basal.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo General:

1.1.1. Realizar el reconocimiento taxonómico de *Fusarium roseum* (clasificación pendiente) a partir de muestras del patógeno colectadas en cultivos comerciales de clavel en la Sabana de Bogotá.

### 1.2. Objetivos específicos:

1.2.1. Caracterizar los aislamientos de los parásitos de las plantas sintomáticas en diferentes fincas productoras en la Sabana de Bogotá para el hongo *Fusarium roseum* por cultivo *in vitro* (monospórico) del parásito.

1.2.2. Establecer las especies morfológicas correspondientes a cada uno de los nueve aislamientos por análisis de características físicas y fisiológicas.

1.2.3. Aplicar técnicas de PCR a partir de muestras de ADN de los hongos aislados con primers universales para el género y posteriormente realizar un análisis de las secuencias para identificar las especies filogenéticas.

## **2. ESTADO DEL ARTE**

### **2.1. Estado del arte**

#### **2.1.1. La industria de la floricultura en Colombia**

La floricultura colombiana se desarrolla a partir de la década de 1960, estableciéndose desde entonces como una actividad de rápido crecimiento (Solano, 2002). Esta se basa en un modelo de agricultura intensiva, lo que implica el uso de tecnología e insumos y optimización en el uso del espacio (Solano, 2002). En cuanto al empleo, la floricultura se caracteriza por ser la actividad agrícola con más mano de obra por hectárea y un elevado número de profesionales de diversas disciplinas trabajando en el sector (Solano, 2002). En Colombia, la floricultura se ha configurado como una actividad empresarial con un alto nivel de desarrollo y profesionalismo (Solano, 2002). Esto le ha permitido ser el mayor exportador de flores de corte del mundo después de Holanda y lograr que dos de cada tres flores que se venden en Estados Unidos sean colombianas (Solano, 2002).

Del total de las exportaciones de flores colombianas el 80.44% es comercializado a los Estados Unidos, un 11.12% es comercializado en toda Europa y el 8.44% restante es comercializado a otros lugares del mundo (Asocolflores, 2008). Actualmente Colombia cuenta con unas 7266 ha en cultivo de flores bajo invernadero, 2157 ha en rosa, 926 ha en clavel estándar, 488 ha en clavel miniatura, 549 ha en crisantemos y 3145 ha en otros tipos de flor (Asocolflores, 2008). De éstas 7266 ha, 5740 ha están ubicadas en la Sabana de Bogotá de donde se obtiene el 79% de la producción total, 1235 ha están en Antioquia y 291 ha están localizadas en otros sitios del país como el Valle, el Eje Cafetero y el Cauca (Asocolflores, 2008).

**Tabla 1.** Valor de las exportaciones de flores colombianas. Años 2003- 2008 (Asocolflores, reporte de internet 1).

Exportaciones	US\$
2003	681,3
2004	703,432
2005	906
2006	966,8
2007	1,114
2008	1,094

## 2.2. Clavel

### 2.2.1. Generalidades del clavel (*Dianthus caryophyllus*)

El género *Dianthus* pertenece a la familia dicotiledónea Caryophyllaceae dentro del orden Caryophyllales (Zipcodezoo, 2008). Esta familia esta constituida por unas 2070 especies, las cuales pueden ser anuales o perennes (Hickey *et al.*, 1997). El género esta dividido en dos grandes grupos de plantas conocidos en inglés, como “pinks” y “carnations” (OGTR, 2006).

El clavel es una planta herbácea anual o perenne con hojas opuestas, simples, enteras, lineales de color gris-verde a azul-verde, con base leñosa y tallo flexible constituido por nudos gruesos o hinchados donde se insertan las hojas y alcanzan una altura entre 45 a 60cm (OGTR, 2006). Las flores son bisexuales, con simetría radial, poseen de 4 a 10 estambres, presentan ovario súpero con placentación central o basal, la inflorescencia es terminal y vistosa, de olor intenso y agradable (Whealy, 1992).

Desde épocas remotas ha presentado una amplia gama de colores y formas, contando con variedades que han sido producto de hibridación natural y otros cruzamientos artificiales desconocidos. Sin embargo, la producción comercial de flores y la selección de tipos productivos llegó a ser una habilidad

profesional definitiva para alcanzar un lugar importante en el mercado (Sparnaaij y Demmink, 1983).

La historia de la investigación en clavel tiene dos periodos según Sparnaaij y Demmink en 1993:

- a. El desarrollo e introducción del clavel estándar, que se llevo a cabo en los países del Mediterráneo, mas tarde en Europa Occidental y los Estados Unidos. Este periodo finalizo con la introducción de variedades del ecotipo “sim”.
- b. Reactivación del mejoramiento sobre bases científicas, estimuladas por el incremento de problemas producidos por enfermedades y por la introducción del clavel miniatura.

Existen principalmente tres ecotipos de clavel:

Ecotipo Sim: derivado de las variedades “William Sim”. Producido en 1938 o 1939 al norte de Berwick, Maine, Estados Unidos. Plantas de flores rojas dieron mutaciones al blanco, rosado, naranja y varias formas variegadas. Se caracteriza por tener un cáliz cerrado que da forma circular a la flor, un tallo recio y rígido, una amplia variedad de colores con una gran diversidad de tonos y con una producción permanente y regular durante todo el año (Holley y Baker, 1963).

Ecotipo mediterráneo: producido entre 1955 y 1980 por cultivadores en Francia e Italia. Este es poco exigente con las temperaturas bajas y suelo, se caracteriza por tener hojas onduladas, tallos rígidos con entrenudos cortos, corolas con formas lisas, buen desarrollo central de pétalos, colores vivos, cáliz entero y corto (Holley y Baker, 1963).

Ecotipo Miniclavel o “Spray”: desarrollado en Estados Unidos por Thomson (1956), presenta tallo delgado y corto, con varias flores pequeñas de color intenso y profundo en cada tallo (Holley y Baker, 1963).

### 2.2.2. Clasificación taxonómica del clavel

<b>Dominio:</b>	Eukaryota	Whittaker y Margulis, 1978- eukaryotes
<b>Reino:</b>	Plantae	Haeckel, 1866 – Plantas
<b>Phylum:</b>	Magnoliophyta	Cronquist, Takhtajan & W. Zimmermann, 1966 – Plantas florales
<b>SubPhylum:</b>	Spermatophytina	(auct.) Cavalier-Smith, 1998 – Plantas con semilla
<b>InfraPhylum:</b>	Angiospermae	auct.
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida	Brongniart, 1843 – Dicotiledoneas
<b>SubClase:</b>	Caryophyllidae	Takhtajan, 1967
<b>Orden:</b>	Caryophyllales	Perleb, 1826
<b>Familia:</b>	Caryophyllaceae	Durande, 1782
<b>Género:</b>	<i>Dianthus</i>	Presentes los subgrupos Pink, Carnation

**Nombre Botánico:** *Dianthus caryophyllus* L.

(Fuente Judd *et al.*, (2002); ITIS (2001); Zipcodezoo, 2008).

### 2.2.3. El clavel en Colombia

Las condiciones climáticas y latitudinales de la Sabana de Bogotá favorecen el desarrollo del clavel. Dentro de estas condiciones se destacan: temperaturas

entre 4 y 8 °C en la noche y entre 11 y 22 °C en el día, su ubicación geográfica, con 4°LN y su altitud 2600 msnm. Hasta hace algunos años, en la Sabana de Bogotá se mantenía aproximadamente el 87% del área de clavel cultivada; la posición geográfica de Colombia por su cercanía de los mercados Norteamericanos a 3 horas de vuelo también favorecen el hecho de que el clavel sea una de los baluartes de la exportación en Colombia (Filgueira, 2007).

A pesar de estas buenas condiciones para el cultivo de clavel, el desarrollo de esta industria en Latinoamérica se ha desacelerado, principalmente por las enfermedades causadas por hongos parásitos (*Fusarium oxysporum* y *Fusarium roseum*). Sin embargo, la mano de obra barata combinado con facilidades arancelarias para la exportación así como facilidades para la importación de agroquímicos permitió un rápido desarrollo de la siembra del clavel en el país (Arbeláez, 1993).

#### **2.2.4. Cultivo y comercialización**

Los claveles se cultivan y comercializan como clavel estándar y clavel spray (Whealy 1992, Bailey 1928). El clavel estándar es producido por la eliminación de todos los brotes de flores laterales, dejando solo los brotes de las flores terminales mientras que el clavel spray, es formado por la eliminación de los brotes de flores terminales lo que resulta en un desarrollo de los brotes de las flores laterales. Aunque existen algunas diferencias entre los cultivares en respuesta al fotoperiodo (Whealy, 1992).

#### **2.2.5. Enfermedades del clavel**

Los cultivos de clavel en Colombia son afectados por múltiples patógenos dentro de los cuales se encuentran: *Peronospora dianthicola* causante del mildew vellosa, *Pseudomonas woodsii* causante de puntos bacterianos en las hojas, *Alternaria dianthi*, *Heterosporium echinulatum* y *Uromyces caryophyllinus*,

los cuales ocasionan puntos en las hojas; *Botrytis cinerea* agente causal de la pudrición en flores entre otras tantas enfermedades (Arbeláez, 1987).

Sin embargo, la enfermedad más frecuente es la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*., la que ha generado un mayor reto para los cultivadores y científicos, pues en la actualidad no existen métodos eficaces de control para patógenos de este género, la única y mejor alternativa ha sido la búsqueda de variedades resistentes (Arbeláez, 1987).

### **2.3. Pudrición basal del tallo**

#### **2.3.1. Síntomas generales**

Los primeros síntomas incluyen la presencia de manchas rojizas sobre la zona afectada, que pronto dan lugar a una clara pudrición que llega hasta los tejidos vasculares (Ortiz y Pizano, 2000). Lo anterior induce a una marchitez gradual de la planta caracterizado por una flacidez del follaje y por una disminución gradual del color verde normal que termina más tarde en la muerte del brote afectado, o toda la planta según la severidad de la infección (Arbeláez, 1974).

#### **2.3.2. Patógeno:**

##### **2.3.2.1. *Fusarium***

*Fusarium* pertenece a la división Ascomycota. Los estados sexuales (teleomorfos) de muchas de las especies más importantes están en *Giberella* (*Fusarium interactive key*).

Morfología: la forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de los *Fusarium*. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios. Los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en

ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre son producidos ambos tipos de esporas. Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Booth, 1971 citado por Carrillo, 2003). Algunas especies presentan clamidosporas terminales, laterales o intercalares, a veces formando cadenas. Las células conidiales ocasionalmente se transforman en clamidosporas (Carrillo, 2003).

### **2.3.2.2. *Fusarium roseum***

*Fusarium roseum* es un hongo cosmopolita de importancia fitopatológica y económica, principalmente en cultivos de cereales y clavel; aunque posee un amplio rango de hospedantes, el hongo es habitante del suelo y puede sobrevivir en asocio con materia orgánica en descomposición (Arbeláez y Rodríguez, 1995).

*Fusarium roseum* causa la pudrición seca del tallo sobre todo a nivel del suelo. En la actualidad la especie de *F. roseum* ha sido remplazada taxonómicamente por las especies *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* y *Fusarium graminearum* (Arbeláez y Rodríguez, 1995).

El hongo produce pudrición seca de la médula, haces vasculares y epidermis (Arbeláez y Rodríguez, 1995). Este hongo conocido es favorecido por la alta humedad del suelo, temperaturas mayores a 18°C y por un exceso de fertilización nitrogenada. Es incapaz de penetrar por sí solo en la planta, por lo tanto ingresa por heridas, posteriormente las hifas avanzan en forma intracelular y descomponen la celulosa de las paredes celulares de la planta causando la pudrición seca de color rojizo en el cuello de la planta, y se extiende a los tallos y brotes, donde la planta pierde turgencia y el color verde normal (Arbeláez, 1993; Rattink, 2000).

Los síntomas de *F. roseum* pueden distinguirse de los de *F. oxysporum* en que la decoloración vascular de éste último se presenta en un sector a lo largo del tallo afectado y casi siempre acompañada de fuerte clorosis en las hojas, todo esto en una porción lateral de la planta, mientras que en el primero ocurre sólo en la zona inmediatamente cercana a los tejidos podridos (Whealy, 1992). *Fusarium roseum* ocurre principalmente durante la propagación, la siembra y durante la producción donde se efectúan muchas heridas por la poda (pinch), desbotone, toma de esquejes y la cosecha del clavel. *Fusarium roseum* sobrevive como saprófito en el suelo y en sustratos hidropónicos con cascarilla de arroz quemada, vermiculita, fibra de coco o mezclas de éstos, puede ser diseminado en el suelo, por material vegetal infectado, labores culturales (uso de herramientas como tijeras de corte), por corrientes de aire y el agua (Arbeláez, 1993; Rattink, 2000).

#### **2.4. Clasificación actual para *Fusarium roseum***

Snyder y Hansen (Reportado por Leslie y Sumerell, 2006) reconocen que en ciertos casos, las subdivisiones morfológicas válidas pueden ser aceptables. Considerando que estas individualidades tienen una significancia taxonómica comparable a las variedades de plantas cultivadas. Ellos reconocen la existencia en *Fusarium roseum* de los cultivares Graminearum, Avenaceum, Culmorum, Sambucinum, Equiseti y Acuminatum.

Los cultivares de *F. roseum* pueden derivar de uno u otro por mutación ó hibridización (Leslie y Sumerell, 2006).

Snyder y Hansen tienen incluidos dentro de *Fusarium roseum*, las secciones de *Wollenwober Roseum*, *Arthosporiella*, *Gibbosum* y *Discolor* y tienen agrupados los patógenos de los cereales en f. sp. *cerealis* (Leslie y Sumerell, 2006).

##### **2.4.1. *Fusarium avenaceum* (Fries) Saccardo**

*Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* var. *avenaceum*

Estado sexual: *Gibberella avenacea* Cook

Sección: Roseum

Sinónimos comunes: *Fusarium avenaceum* ssp. *Avenaceum* (Sacc).

Se encuentra en regiones templadas como un saprófito del suelo y es un patógeno de legumbres, claveles, y varias especies de plantas perennes (Leslie y Summerell, 2006).

Características en medios de cultivo:

CLA: macroconidias rectas a ligeramente curvadas están formadas en esporodoquias naranja pálido sobre las hojas de clavel y en la superficie del agar. No se producen clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006).

PDA: las tasas de crecimiento varían de lento a relativamente rápido. Forma abundante micelio el cuál varía de blanco a amarillo pálido o rosa grisáceo. Abundantes esporodoquias de color naranja pálido a café forman una masa central de esporas. El pigmento formado en el agar es rosa grisáceo a borgoña pero puede aparecer café debido a la luz reflejada por la masa central de esporas (Leslie y Summerell, 2006).

Microconidios: fusoide de 1 a 2 septos; puede variar en tamaño. Se produce solo en algunos aislados y cuando se producen es raro (Leslie y Summerell, 2006).

Macroconidios: alargados y delgados; pared delgada, recto o ligeramente curvo; célula apical alargada y afilado en la punta, puede estar doblada, célula basal pronunciada, aunque algunos aislados puede tener forma de pie en su célula basal; usualmente de 5 septos aunque se pueden ver de 3 a 4 septos; moderadamente abundantes en esporodoquias (Ver Figura 1 a) (Leslie y Summerell, 2006).

#### **2.4.2. *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo.**

*Fusarium roseum* f.sp. *cerealis* var. *culmorum*

Sección: Discolor

Posición taxonómica (Bial *et al.*, 2002):

Phylum: Ascomycota

Clase: *Euscomycetes*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Hypocreaceae*

Estado sexual: ninguno conocido

Se encuentra en regiones templadas. La germinación de macroconidias de *F. culmorum* puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas (5-35°C) (Magan y Lacey, 1984 citados por Magan *et al.*, 2004).

Descripción micológica: Es un hongo filamentoso que presenta conidióforos simples, cortos, tabicados que terminan con varios macroconidios, alargados, estrechos, curvados y con extremos afilados (de 4-6 x 40-60 µm), con cinco a ocho septos transversales y pared fina y lisa. Microconidios ausentes (Bial *et al.*, 2002).

Colonias de crecimiento rápido, vellosas, algodonosas, inicialmente blancas, y, en algunos medios de cultivo, con una pigmentación rosa en el centro que se difunde a todo el cultivo. Las colonias pigmentadas tienen el centro rosa-naranja intenso, con zona marginal rosa pálido y bordes blancos. Reverso de color rosa-naranja intenso (Bial *et al.*, 2002)

Características en medios de cultivo:

CLA: macroconidias formadas de forma abundante en esporodoquias naranjas. Las macroconidias son cortas y robustas con pobre desarrollo de pie celular y célula apical redondeada. Las macroconidias están formadas por monofialides o conidióforos septados en esporodoquias y en menor medida en hifas (Leslie y Summerell, 2006).

PDA: crece rápidamente produciendo abundantes esporodoquias en una gran masa central de esporas (1 a 2cm de diámetro), que es inicialmente naranja pálido pero comienza a hacerse café a café oscuro con el tiempo. Muchas cadenas forman pigmentos rojos en el agar, pero algunos pueden producir micelio café oliva y pigmentos café oliva en el agar (Leslie y Summerell, 2006).

Microconidios: ausentes (Leslie y Summerell, 2006).

Macroconidios: robustos, relativamente cortos y pared gruesa; en el punto medio es mucho más amplio; lado dorsal un poco curvo pero el lado ventral es completamente recto; bastante ancho en relación con su longitud; célula apical redondeada y roma; célula apical pronunciada sin forma de pie distinguible, usualmente poseen de 3 a 4 septos; normalmente tienen el mismo tamaño y forma (Ver Figura 1 b) (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.4.3. *Fusarium graminearum* Schwabe**

*Fusarium roseum* f.sp. *cerealis* var. *graminearum*

Estado sexual: *Gibberella zeae* Schwein (Petch)

Sección: Discolor

Son cosmopolitas.

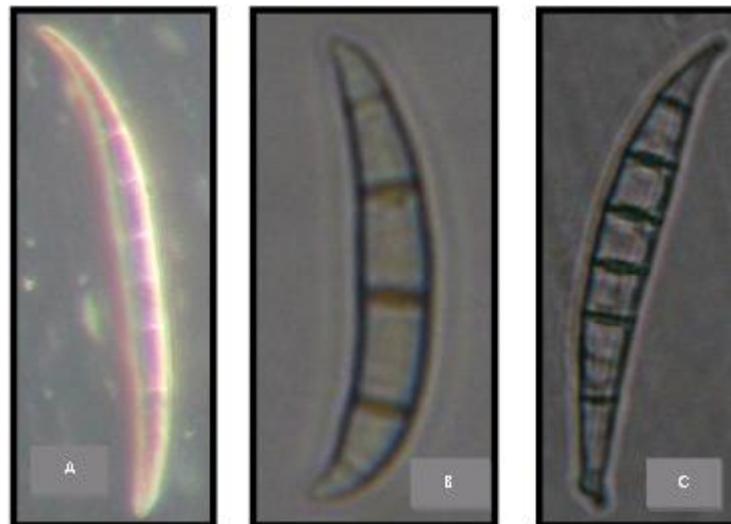
CLA: las esporodoquias algunas veces están esparcidas, pero cuando están presentes son naranja pálido y pueden estar escondidas bajo el micelio. Las macroconidias son relativamente delgadas, tienen forma de hoz a casi rectas,

paredes gruesas, 5 a 6 septas, con una célula apical estrecha y una célula basal de pie. Microconidias ausentes (Leslie y Summerell, 2006).

PDA: las colonias crecen rápidamente y producen relativamente gran cantidad de micelio denso que varía de blanco a naranja pálido o amarillo en color. Esporodoquias rojo-café a naranja son producidas despacio (> 30 días). Los cultivos forman pigmentos rojos en el agar (Leslie y Summerell, 2006).

Microconidios: ausentes (Leslie y Summerell, 2006).

Macroconidios: delgados, de pared gruesa, de longitud mediana; moderadamente curvado a recto en la superficie ventral y ligeramente curvo en la superficie dorsal; célula apical afilada y de vez en cuando estrecha en forma parecida a un hocico; célula basal muy bien desarrollada en forma de pie; de 5-6 septos; relativamente raras en abundancia pero se encuentran más en esporodoquios (Ver Figura 1 c) (Leslie y Summerell, 2006).



**Figura 1.** Conidias de cada una de las especies de *Fusarium roseum*: a. *Fusarium avenaceum*, b. *Fusarium culmorum*, c. *Fusarium graminearum*.

#### **2.4.4. *Fusarium venenatum* Nirenberg**

*Fusarium sambucinum*, *Fusarium sambucinum* var. *coeruleum*, *Fusarium torulosum*

Son cosmopolitas.

CLA: se encuentran abundantes macroconidias en esporoquios de color café rojizo ó café. Las macroconidias son relativamente cortas, delgadas, aproximadamente poseen 5 septos con una célula apical puntuda y una célula basal con forma de pie. Las clamidosporas son formadas en cortas cadenas con forma de gancho (Leslie y Summerell, 2006).

PDA: los cultivos crecen moderadamente rápido y producen relativamente gran cantidad de micelio algodonoso denso que varía de blanco a naranja, gris o rojo con la edad. Los cultivos forman pigmentos rojos en el agar (Leslie y Summerell, 2006).

Microconidios: ausentes (Leslie y Summerell, 2006).

Macroconidios: delgados, cortos y curvos y estrechos en una parte; célula apical puntuda; célula basal muy bien desarrollada en forma de pie; de 5 septos; abundantes en esporoquios (Leslie y Summerell, 2006).

#### **2.5. Estudios de taxonomía molecular para el género *Fusarium***

La aplicación del concepto de especies filogenéticas para *Fusarium* puede en algunas ocasiones clarificar las dificultades taxonómicas. Muchos estudios filogenéticos en hongos son basados a partir de secuencias de DNA obtenidas de aislamientos caracterizados. Entre los primers mayormente empleados se encuentran: ITS,  $\beta$ -tubulina, Citocromo oxidasa y Actina entre otros tantos.

### **2.5.1. Amplificación de actina:**

La actina es una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos. El gen que codifica para la actina es conservado a través de los eucariotas. Por lo tanto, éste ha recibido gran atención como un gen de “reloj molecular” para estudios de filogenia de organismos. Típicamente la actina es un gen altamente expresado, haciendo valioso el promotor de este gen en la fusión de genes heterologos. Los primers utilizados corresponden a secuencias de oxioligonucleotidos sintetizados basados en secuencias de ORF (open reading frame). Weiland y colaboradores en el año 2000, emplearon los primers diseñados para la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la proteína de actina en su identificación de los patógenos fúngicos que atacan la caña de azúcar; con estos primers identificaron patógenos del género *Fusarium*.

### **2.5.2. Amplificación de la citocromo oxidasa**

La citocromo oxidasa es una enzima oxido reductasa que interviene en la cadena transportadora de electrones. Los primers AHy fueron diseñados a partir de las secuencias de *Fusarium oxysporum* para amplificar un fragmento de 567bp de Cox1. Estos primers han sido empleados para la identificación de especies como *Fusarium graminearum* (Gilmore *et al.*, 2007).

### **2.5.3. Amplificación de ITS's**

Los primers ITS (internal transcribed spacer) son empleados para la identificación del género *Fusarium* (Sreenivasa *et al.*, 2007). Los genes de RNA ribosomal (rDNA) poseen características adecuadas para la detección de patógenos a nivel de especie. Estos rDNA son altamente estables y exhiben un mosaico de regiones diversas y conservadas dentro del genoma (Hibbet, 1992 citado por Abd-Elsalan *et al.*, 2003). Estos también se encuentran en múltiples copias, con más de 200 copias por genoma haploide (Bruns *et al.*,

1991; Yao *et al.*, 1992 citados por Abd-Elsalan *et al.*, 2003) dispuestos en tándem, donde cada repetición consiste en una subunidad pequeña 18S (SSU), y los genes de las subunidades grandes 5.8S y 28S (LSU). Las regiones ITS (internal transcribed spacer) han sido usadas acertadamente para generar primers específicos capaces de diferenciar especies de hongos relacionadas cercanamente. Los primers ITS-Fu-f y ITS-Fu-r fueron diseñados comparando secuencias alineadas de las regiones de los ITS a partir de un amplio rango de especies de *Fusarium* (Abd-Elsalam *et al.*, 2003). Estos primers muestran buena especificidad para el género *Fusarium*, y su producto de amplificación es de aproximadamente 389bp (Abd-Elsalam *et al.*, 2003).

#### **2.5.4. Amplificación de $\beta$ -tubulina**

La Beta tubulina es una proteína del citoesqueleto, altamente conservada a través de la evolución de los eucariotes (Gong *et al.*, 2005). A partir de las secuencias del gen nuclear de la  $\beta$ -tubulina se diseñaron una serie de primers que codifican fragmentos específicos del mismo. En este estudio se emplearon los primers Bt2 reportados por Louise y colaboradores en 1995 empleados en la amplificación de Ascomycetes filamentosos. Estos primers contienen secuencias altamente conservadas por lo cual son usados en estudios de taxonomía molecular.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material Biológico

##### 3.1.1. Material vegetal. Plantas sintomáticas de *Dianthus caryophyllus*.

El material vegetal (plantas sintomáticas de las variedades Nelson y Delphi) para la evaluación, procedió de fincas cultivadoras de clavel comercial de la Sabana de Bogotá (Tabla 2).

**Tabla 2.** Información general acerca del lugar de procedencia del material vegetal.

COMERCIALIZADORA	FINCA	UBICACIÓN
Aposentos Ltda.	Britania	Sopó
Papagayo	Malinche	Bojacá
La Aurora	Palmira	Suesca
Colibrí Flowers	Korito	Facatativá

#### 3.2 Obtención de cultivo monospórico de aislamientos de los hongos a partir de material infectado.

##### 3.2.1 Recolección de muestras de material sintomático para evaluación *in vitro*.

El material vegetal fue colectado por Quinche (2008). El procedimiento que se llevó a cabo para la colección del mismo fue el siguiente: a las plantas seleccionadas, se les realizó una caracterización sintomatológica tanto a nivel externo como interno teniendo en cuenta los síntomas de fusariosis en clavel reportados por varios autores como amarillamientos, necrosis, marchitamientos y deshidrataciones en diferentes tejidos. También se tuvo en cuenta en que parte de la planta se presentaron los síntomas (si estaban en la parte alta o baja de la planta).

El material vegetal seleccionado para los ensayos *in vitro* fue guardado y marcado apropiadamente para su posterior transporte y manejo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Militar Nueva Granada.

### **3.2.2 Aislamiento de los hongos**

Los tallos completos de las plantas enfermas fueron cortados longitudinalmente para poder hacer una observación y caracterización directa de la distribución del hongo sobre la médula, tomando un registro fotográfico de la misma.

Las partes de la médula que mostraron presencia del hongo fueron cortadas y desinfectadas superficialmente por inmersión, primero en hipoclorito al 5 % por 1 minuto, luego en alcohol al 70% por 1 minuto y finalmente tres enjuagues en agua destilada estéril (ADE), de un minuto cada uno. Luego se cortaron los fragmentos en condiciones estériles y se sembraron en medio sólido potato dextrose agar OXOID® (PDA) a 26°C durante 4 semanas bajo 6000 lx por 12 horas diarias.

Una vez crecido el hongo en el medio se procedió a realizar la evaluación de las características físicas de las colonias (color de la colonia, apariencia y color reverso), con el objeto de agruparlas según dichas características para su posterior identificación.

Se realizaron cultivos monospóricos de los aislamientos más representativos así:

1. Se tomó un inóculo de 1cm<sup>2</sup> a partir de los cultivos sólidos y se transfirió a un tubo con medio líquido Czapek Dox Broth (OXOID®), dejándolo en agitación e incubación a 30°C por una semana
2. Una vez transcurridos los 7 días, la suspensión fue filtrada a través de gasa estéril. Posteriormente el filtrado se centrifugó a 4000 rpm en una centrifuga ALC (multi speed centrifuge) PK 131R® durante 7 minutos; el

pellet obtenido (esporas del patógeno limpias y concentradas), se resuspendió en 10 mL de ADE para realizar así las subsecuentes diluciones hasta ajustar la concentración a  $1 \times 10^3$  esporas por mL de agua. Las esporas fueron contadas con ayuda de un hemocitómetro. A partir de dicha suspensión se tomaron 20  $\mu$ L y se inocularon en cajas Petri con medio PDA sólido (OXOID®), realizando dispersión con rastrillo con el fin de separar las esporas en el medio

3. 72 horas después, se tomo una espora individual y se sembró en medios de cultivos sólidos.

### **3.2.3 Morfología de colonia y microscopia óptica.**

Con el objeto de tener un patrón de comparación para el reconocimiento macroscópico y posteriormente el reconocimiento microscópico se procedió a sembrar cada uno de los nueve aislamientos en cuatro medios de cultivo sólidos diferentes. Estos fueron: PDA (Potato Dextrose Agar OXOID®), Czapek Dox (OXOID®), Agar Avena (Fórmula para 1L: 60.0g de Avena, 12.5g de Agar) y CLA (Preparado con fragmentos de hojas de clavel estériles en una caja de Petri con agar agua al 2%).

Se realizó microscopía óptica tomando micelio de cada uno de los medios de cultivo 4 semanas después de realizada la siembra para determinar así presencia, ausencia y tipo de micro y macroconidias, clamidosporas, fiálides y micelio; contrastando con la bibliografía, para la posible identificación del patógeno. El montaje de las láminas se hizo en agua, se observaron en un microscopio de luz Axioskop 2 Plus Carl Zeiss y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Canon PowerShot G5 adaptada al microscopio.

### **3.3 Caracterización molecular de los hongos.**

#### **3.3.1 Extracción de ADN fúngico (Cenis, 1992).**

Los hongos se inocularon en medio líquido Czapek Dox Broth (Sigma ®) y se mantuvieron durante 1 semana a 25°C en agitación. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas en una microcentrifuga (Eppendorf 5415D®) a 13000rpm durante 10 minutos, posteriormente se realizó un lavado con TE (10mM Tris HCl, pH8.0, 1mM EDTA), se centrifugó nuevamente en una microcentrifuga (Eppendorf 5415D®) a 13000rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el micelio por 10 minutos. Luego se maceró el micelio utilizando nitrógeno líquido, posterior a esto se adicionaron 300µl de buffer de lisis (200mM Tris HCl (pH8.5), 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS). A continuación se adicionaron 150µl de acetato de sodio 3M (pH5.2), los tubos fueron llevados a -20°C por 24 horas, para luego centrifugar en una microcentrifuga (Eppendorf 5415D®) a 13000rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo frío y se adicionó un volumen de 450µl de isopropanol. Las muestras se almacenaron a 4°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugó en una microcentrifuga (Eppendorf 5415D®) a 13000rpm durante 10 minutos, al pellet se le agregó etanol al 70% para retirar el exceso de sales, se centrifugó en una microcentrifuga (Eppendorf 5415D®) a 13000rpm durante 10 min (este procedimiento se realizó dos veces). Finalmente, el ADN se resuspendió en TE tibio y se le agregó 1µL de RNAsa A, se dejó en incubación a 37°C durante 2 horas y posteriormente se almacenó a -30°C.

#### **3.3.2 Identificación por PCR**

Con el fin de corroborar la pertenencia al género *Fusarium* de los aislamientos obtenidos, se realizó la amplificación del ADN de los 9 aislamientos obtenidos por medio de la PCR. Para este proceso se utilizaron 6 pares de primers

citados en la literatura en estudios de taxonomía molecular para el género *Fusarium* (ver Tabla 3).

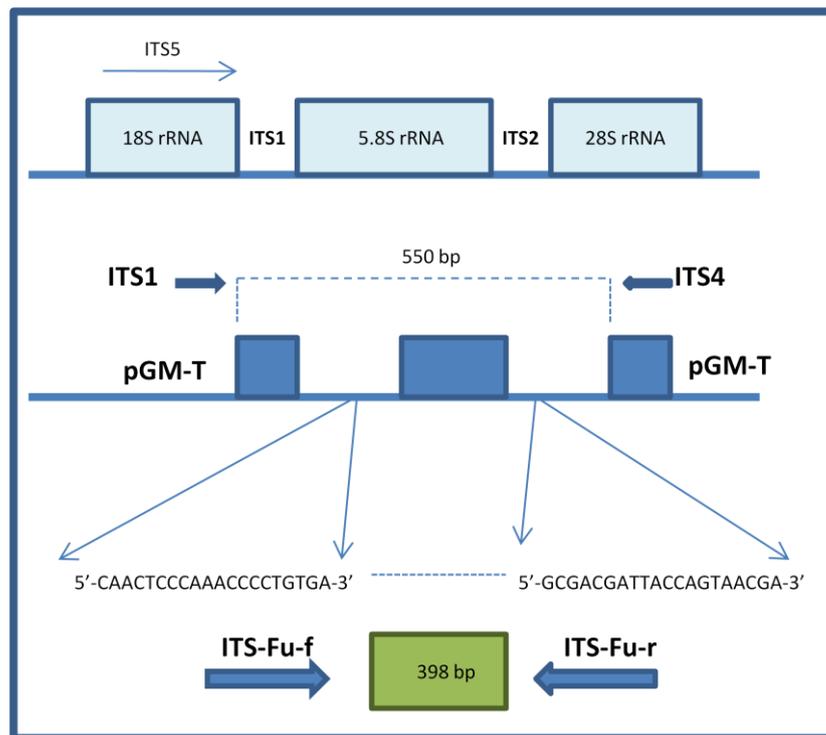
**Tabla 3.** Información general de los primers empleados en la amplificación por PCR

	SECUENCIA	Pb	TM	T° promedio	Tamaño pb Esperado
AHyFuF Barcode, Forward from <i>F. oxysporum</i> AY874423	5' CTT AGT GGG CCA GGA GTT CAA TA 3'	23	56,4	57,2	567
AHyFuR Barcode, Reverse from <i>F. oxysporum</i> AY874423	5' ACC TCA GGG TGT CCG AAG AAT 3'	21	58		
Actin 5FWDACT Weitland <i>et al.</i> , 2000	5' GTA TGT GCA AGG CCG GTT T 3'	19	56,1	54,45	1200
Actin REVACT Weitland <i>et al.</i> , 2000	5' TTA GAA GCA CTT GCG GTG 3'	18	52,8		
Bt2a Glass y Donaldson, 1995	5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3'	24	58,8	60,65	518
Bt2b Glass y Donaldson, 1995	5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'	24	62,5		
ITS FuR White <i>et al.</i> , 1990	5' GCG ACG ATT ACC AGT AAC GA 3'	20	54,6	56	398
ITS FuF White <i>et al.</i> , 1990	5' CAA CTC CCA AAC CCC TGT GA 3'	20	57,4		
ITS-1 White <i>et al.</i> , 1990	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'	19	59,5	55,8	570
ITS-4 White <i>et al.</i> , 1990	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	20	52,1		
ITS-4 White <i>et al.</i> , 1990	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	20	52,1	51,7	524
ITS-5 White <i>et al.</i> , 1990	5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3'	22	51,3		

### 3.3.2.1 Identificación del género *Fusarium* por amplificación de ITS's

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de fragmentos específicos del ADN, de las regiones espaciadoras de transcritos internos de ADN ribosomal (ITS1 e ITS2) que rodean la región codificante 5.8S ADNr, usando primers ITS FuF (5' CAA CTC CCA AAC CCC TGT GA 3' (Abd-Elsalam *et al.*, 2003)) e ITS FuR (5' GCG ACG ATT ACC AGT AAC GA 3' (Abd-Elsalam *et al.*, 2003)), los cuales codifican un fragmento específico para el género *Fusarium* de 398pb (Abd-Elsalam *et al.*, 2003). También se utilizaron los primers ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' (Abd-Elsalam *et al.*, 2003)) e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT

TGA TAT GC 3'(Abd-Elsalam *et al.*, 2003)), los cuales codifican un fragmento específico para el género *Fusarium* de 550-570pb (Abd-Elsalam *et al.*, 2003). Por último se usaron los primers ITS4 ((5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'(Reynoso *et al.*, 2008)) e ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3'(Reynoso *et al.*, 2008)), los cuales codifican un fragmento específico de 524pb para el género *Fusarium* (Reynoso *et al.*, 2008).

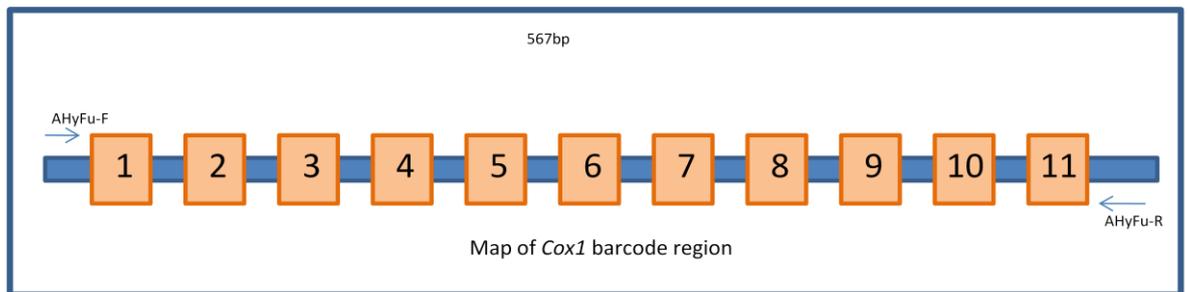


**Figura 2.** Diagrama de la región amplificada por PCR utilizando los primers ITS (Basado en Abd-Elsalam *et al.*, 2003).

### 3.3.2.2 Identificación de especies del género *Fusarium* por amplificación de la *Cox1*

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de fragmentos específicos del ADN para *Cox1* en *Hypochoeriales* usando los primers AHyF (5' CTT AGT GGG CCA GGA GTT CAA TA 3'(Gilmore *et al.*, 2007)) y AHyR (5' ACC TCA GGG TGT

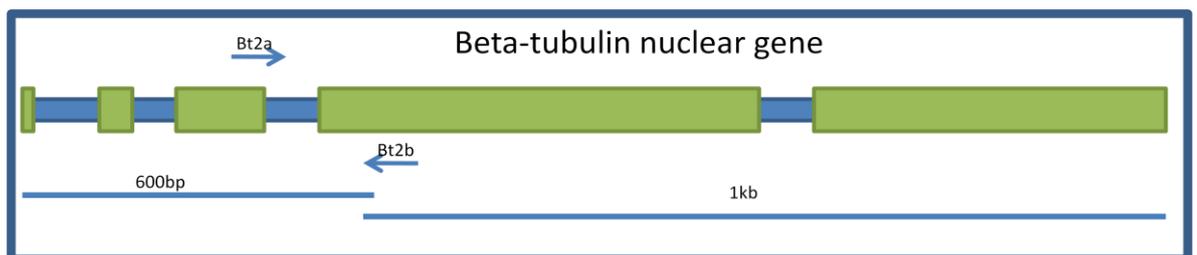
CCG AAG AAT 3'(Gilmore *et al.*, 2007)), los cuales codifican un fragmento específico de 567pb para el género *Fusarium* (Gilmore *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Mapa de la región *Cox1* barcode (Basado en Gilmore *et al.*, 2007). Las cajas naranja representan intrones. Las flechas indican la posición de los primers diseñados. No esta a escala.

### 3.3.2.3 Identificación de especies del género *Fusarium* por amplificación de Bt2

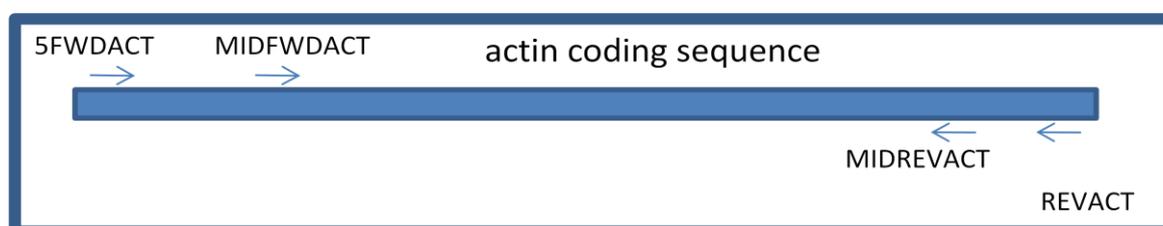
Se llevó a cabo la amplificación por PCR de fragmentos específicos del ADN para el gen nuclear de la beta tubulina usando los primers Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3'(Glass *et al.*, 1992)) y Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'(Glass *et al.*, 1992)), los cuales codifican un fragmento específico de 518pb para el género *Fusarium* (Glass *et al.*, 1992).



**Figura 4.** Esquema de la ubicación de los primers Bt2 que codifican para el gen nuclear de la Beta tubulina (Basado en Glass *et al.*, 1992).

### 3.3.2.4 Identificación de especies del género *Fusarium* por amplificación de Beta actina

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de fragmentos específicos del ADN para el gen de la beta actina usando los primers 5FWDACT (5' GTA TGT GCA AGG CCG GTT T 3'(Weiland *et al.*, 2000)) y REVACT (5' TTA GAA GCA CTT GCG GTG 3'(Weiland *et al.*, 2000)), los cuales codifican un fragmento específico para el género de 1200pb *Fusarium* (Weiland *et al.*, 2000).



**Figura 5.** Representación diagramática de la locación de los primers en un gen genérico de actina (Basado en Weiland *et al.*, 2000).

**Tabla 4.** Concentraciones y volúmenes de los componentes de la PCR para cada reacción.

	ITS		BETA TUBULINA		ACTINA		CITOCROMO OXIDASA	
	¶FINAL	VOLUMEN (µl)						
<b>Buffer</b>	1X	2	2X	4	1X	1,5	1X	2,25
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	6mM	2,4	2,4mM	0,96	5,5mM	1,65	2,5mM	1,25
<b>Primer1</b>	1mM	2	1mM	2	1mM	0,3	1mM	0,25
<b>Primer2</b>	1mM	2	1mM	2	1mM	0,3	1mM	0,25
<b>dNTP's</b>	10mM	1,6	10mM	0,6	10mM	0,3	10mM	0,5
<b>DNA Molde</b>	15ng	1	15ng	1	15ng	1	15ng	2
<b>Agua</b>	---	8,8	----	9,24	---	9,8	---	18,5
<b>Taq DNA Polimerasa</b>	7,5 <sup>-3</sup>	0,2	7,5 <sup>-3</sup>	0,2	7,5 <sup>-3</sup>	0,15	4,5 <sup>-3</sup>	0,15
<b>Vol.final reacción (µL)</b>		20		20		15		25

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador de referencia PTC-100 MJ Research® y la mezcla para cada reacción de PCR fue

preparada con productos Bioline® (MgCl<sub>2</sub> 50mM, Buffer 10X y Taq DNA polimerasa 0,75U).

**Tabla 5.** Descripción de los perfiles térmicos empleados para cada uno de los pares de primers empleados.

		denaturación inicial	Denaturación	annealing	extensión	extensión final	refrigeración
<b>Citocromo</b>	Temperatura (°C)	95	94	57,2	72	72	4
<b>Oxidasa</b>	Tiempo (min)	02:00	00:30	00:30	01:00	10:00	∞
<b>ITSFuF/</b>	Temperatura (°C)	95	94	56	72	72	4
<b>ITSFuR</b>	Tiempo (min)	02:00	01:00	00:30	01:00	10:00	∞
<b>ITS4/</b>	Temperatura (°C)	95	94	51,7	72	72	4
<b>ITS5</b>	Tiempo (min)	02:00	01:00	00:30	01:00	10:00	∞
<b>ITS1/</b>	Temperatura (°C)	95	94	55,8	72	72	4
<b>ITS4</b>	Tiempo (min)	02:00	01:00	00:30	01:00	10:00	∞
<b>Actin 5FWAACT/</b>	Temperatura (°C)	95	90	58,3	72	72	4
<b>Actin REVACT</b>	Tiempo (min)	05:00	01:00	01:00	02:00	10:00	∞
<b>Bt2a/</b>	Temperatura (°C)	95	94	60,65	72	72	4
<b>Bt2b</b>	Tiempo (min)	02:00	01:00	00:30	01:00	10:00	∞
				35 CICLOS			

Los productos obtenidos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio 0.5µg/mL. Como control negativo se utilizó ADN de *Botrytis cinerea* y como control positivo ADN de *Fusarium oxysporum*.

### 3.4. Secuenciación.

El producto de PCR con los seis pares de primers fue purificado usando el sistema Concert Rapid PCR Purification System de Gibco® y enviado a secuenciar tanto con el primer “reverse”, como con el “forward”, mediante el método Sanger en Cancer Research Center (Universidad de Chicago USA).

Con las secuencias obtenidas se generó una secuencia consenso de cada aislamiento usando el programa CLC Sequence Viewer6, posteriormente se realizó una comparación con el programa NCBI -BLAST, para luego determinar el nivel de similitud entre las secuencias de los aislamientos, mediante el programa ClustalW 2.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamientos de *Fusarium roseum*

La evaluación de los aislamientos obtenidos de las plantas sintomáticas de pudrición basal del tallo de las fincas productoras de clavel comercial de la Sabana de Bogotá, mostraron características típicas de *Fusarium roseum*.

Los aislamientos fueron designados de 1 a 9 para facilitar su manejo. La tabla 6 muestra la información general acerca de los aislamientos empleados en este trabajo.

**Tabla 6.** Información general acerca de los nueve aislamientos empleados en el estudio

<b>AISLAMIENTO No.</b>	<b>COMERCIALIZADORA</b>	<b>FINCA</b>	<b>UBICACIÓN</b>
1	Aposentos Ltda.	Britania	Sopo
2	Papagayo	Malinche	Bojacá
3	La Aurora	Palmira	Suesca
4	La Aurora	Palmira	Suesca
5	Colibrí Flowers	Korito	Facatativa
6	La Aurora	Palmira	Suesca
7	Colibrí Flowers	Korito	Facatativa
8	La Aurora	Palmira	Suesca
9	La Aurora	Palmira	Suesca

### 4.2 Sintomatología pudrición basal en plantas de clavel (Variedades Delphi y Nelson)

#### 4.2.1 Sintomatología externa

En las plantas evaluadas de las variedades Delphi y Nelson, se observaron los síntomas característicos de pudrición basal del tallo: clorosis, necrosis, deshidratación que conlleva a la pérdida de turgencia y la flacidez, marchitez y pudrición seca.



**Figura 6.** Síntomas externos en plantas de clavel variedades Delphi y Nelson causados por *Fusarium roseum*. Clorosis total, marchitamiento, pudrición seca, (Fotografías tomadas por Quinche, 2009). A. Pudrición basal, flacidez del follaje; B. Pudrición seca en la base del tallo; C. Marchitamiento del follaje en verde.

Pudo observarse en campo el marchitamiento gradual de la planta afectada, caracterizada por la flacidez del follaje y la disminución gradual del color verde normal, la cual termina con la muerte de la planta, observándose una pudrición seca en la parte basal de la misma.

El ataque de *Fusarium roseum* es caracterizado por el marchitamiento del follaje en verde (Figura 6 C). En la base del tallo se presenta una pudrición seca de la zona afectada; las hojas alrededor de esta presentan marchitez y necrosis (Figura 6 A). Este hongo produce pudrición seca de la médula, haces vasculares y epidermis (Figura 6 B).

En algunas ocasiones pudo observarse en las pudriciones coloraciones rojizas; el tipo de pudrición generado por la sección *roseum* no progresa desde la base del tallo hacia arriba del mismo, como es el caso de *F. oxysporum* sino que

donde llega el patógeno causa pudrición sin ascender por el tallo (Quinche (2009), comunicación personal).

#### **4.2.2 Sintomatología interna**

Dentro de la sintomatología que se encontró, a nivel interno de los tallos, pudo observarse pudriciones de la médula representadas por manchas necróticas las cuales en algunas ocasiones generaban cavernosidades. También se pudo observar pudriciones medulares continuas desde la base de los tallos acompañados en ocasiones por manchas rojizas, y si esta pudrición se encontraba en un estado muy avanzado podía observarse la presencia de micelio algodonoso de coloración blanco rojizo.

En los cortes de los tallos puede observarse que los hongos de estudio, entran por las heridas producidas generalmente en los tallos secundarios de las plantas como por ejemplo por los puntos de corte.

Los cortes longitudinales de los tallos infectados mostraron varias zonas café decoloradas, clorosis y pudrición medular. La pudrición medular estaba representada por manchas necróticas; algunas veces estas manchas presentaban cavernosidades (Figuras: 7. C, 8. H, 9. I-J-K, 10. L-M). También se observaron otras pudriciones medulares continuas desde la base de los tallos mucho más avanzadas acompañadas algunas veces por manchas rojizas y en estados más avanzados acompañadas por micelio blanco rojizo (Figuras: 7. A-B-D y 8. E-F-G). Pudo observarse también que el patógeno entraba a la planta por heridas producidas generalmente en los tallos secundarios de las plantas como por ejemplo puntos de corte ó heridas mecánicas de la planta (Figura 7A).

#### 4.2.2.1 Sintomatología interna finca La Aurora

La sintomatología interna observada en las muestras obtenidas de la comercializadora La Aurora (Figura 7), presentaba plantas con una pudrición basal muy avanzada, dado a la presencia de micelio algodonoso de coloración blanca rojiza en las cavernosidades producidas en la medula de la planta. Puede observarse en los cortes longitudinales necrosis, pudrición seca y ahuecamientos acompañados de micelio en los estados avanzados de la enfermedad.



**Figura 7.** Sintomatología interna de las plantas de clavel variedades Delphi y Nelson colectadas en La Aurora Cl. Se puede observar pudrición seca (D), necrosis (C) y presencia de micelio en la medula (A, B), (Fotografías tomadas por Quinche, 2009). Las flechas indican las cavernosidades, las cuales en algunos casos presentan micelio. El círculo indica la pudrición medular.

#### 4.2.2.2 Sintomatología interna finca Colibrí Flowers

La sintomatología interna observada en las muestras obtenidas de la comercializadora Colibrí Flowers (Figura 8), presentaba plantas en estado avanzado de la enfermedad de la pudrición basal del tallo. En las muestras colectadas se observaba una pudrición seca que abarcaba una gran porción

del tallo desde su parte basal, así como pudrición medular con cavernosidades en las cuales se observaba la presencia de abundante micelio blanco rojizo.



**Figura 8.** Sintomatología interna de las plantas de clavel variedades Delphi y Nelson colectadas en Colibrí Flowers. Se puede observar pudriciones medulares (E, F), manchas necróticas (H) y presencia de micelio en los haces vasculares (E, F, G, H), (Fotografías tomadas por Quinche, 2009). Las flechas indican la presencia de micelio en los haces vasculares. Los círculos indican la forma en que se presenta la pudrición seca en el tallo afectado.

#### **4.2.2.3 Sintomatología interna finca Aposentos**

La sintomatología interna observada en las muestras obtenidas de la comercializadora Aposentos (Figura 9), estuvo caracterizada por necrosis y pudrición seca que abarcaba un gran porcentaje del tallo a nivel longitudinal.



**Figura 9.** Sintomatología interna de las plantas de clavel variedades Delphi y Nelson colectadas en Aposentos. Se puede observar pudrición seca (I,J) y necrosis (K), (Fotografías tomadas por Quinche, 2009). Las flechas indican los ahuecamientos en los tallos afectados.

#### **4.2.2.4 Sintomatología interna finca Papagayo**

La sintomatología interna observada en las muestras obtenidas de la comercializadora Papagayo (Figura 10), estuvo caracterizada por necrosis y pudrición medular. En esta comercializadora no se observó un estado avanzado de la enfermedad, puesto que las plantas sintomáticas analizadas no presentaron micelio en las cavernosidades.



**Figura 10.** Sintomatología interna de las plantas de clavel variedades Delphi y Nelson colectadas en Papagayo. Se puede observar necrosis y pudrición medular (L, M) (Fotografías tomadas por Quinche, 2009). Las flechas indican necrosis en los tallos afectados.

**Tabla 7.** Resumen de la sintomatología de la pudrición basal del clavel

Sintomatología externa	Sintomatología interna
Clorosis	Necrosis
Necrosis	Cavernosidades
Deshidratación	pudrición medular
perdida de turgencia	micelio algodonoso blanco-rojizo
pudrición seca en la base del tallo	
marchitamiento del follaje en verde	

#### 4.3 Caracterización macroscópica

Para realizar la caracterización macroscópica de los aislamientos se procedió a realizar el cultivo monospórico de cada uno de estos y posteriormente se

sembraron en cuatro medios de cultivo diferentes con el objeto de observar las características macroscópicas más relevantes (coloración de la colonia y velocidad de crecimiento), (Ver numeral 3.2.3 Materiales y Métodos).

#### **4.3.1 Cultivo en PDA (Potato Dextrose Agar), (Ver Figura 11)**

Las fotografías del crecimiento de los hongos que pueden observarse en la Figura 11 corresponden a cultivos de 4 semanas de edad (la edad corresponde al tiempo transcurrido a partir del día de la siembra).

La descripción de las coloraciones del micelio y las pigmentaciones sobre el medio PDA producidas por los hongos se realizó con base en la carta de colores RHS COLOUR CHART (The Royal Horticultural Society).

La velocidad de crecimiento fue estimada con base en observaciones semanales acerca de que tan colonizada estaba la caja en ese periodo de tiempo y a partir de datos diarios durante veinte días acerca del diámetro de crecimiento del hongo en la caja de Petri.

- Aislamientos 7, 8, 9: Figura 11 A. Presentó un crecimiento lento. Cada uno de los tres aislados formó abundante micelio el cual varió de una coloración blanca (White Group) a café (Greyed-Yellow Group) y rosa (Greyed-Red Group) en el anverso. Por el reverso las coloraciones variaron de amarillo (Yellow Group) a café (Greyed-Yellow Group). El aislamiento 7 (Figura 11 Aa), presentó abundante micelio aéreo de coloración White Group C 155; en el lado reverso se observaron dos coloraciones las cuales fueron desde el borde de la caja al centro de la misma Yellow-White Group A 158 y Greyed-Orange Group B 163 respectivamente. El aislamiento 8 (Figura 11 Ab), presentó cuatro coloraciones entre las cuales se pudieron distinguir cuatro halos de crecimiento principales, de la parte más externa de la caja a la más interna fueron: poco micelio de coloración Greyed-White Group D 156, Red-Group C 51, White Group C 155 y Greyed-Yellow Group C 161; en

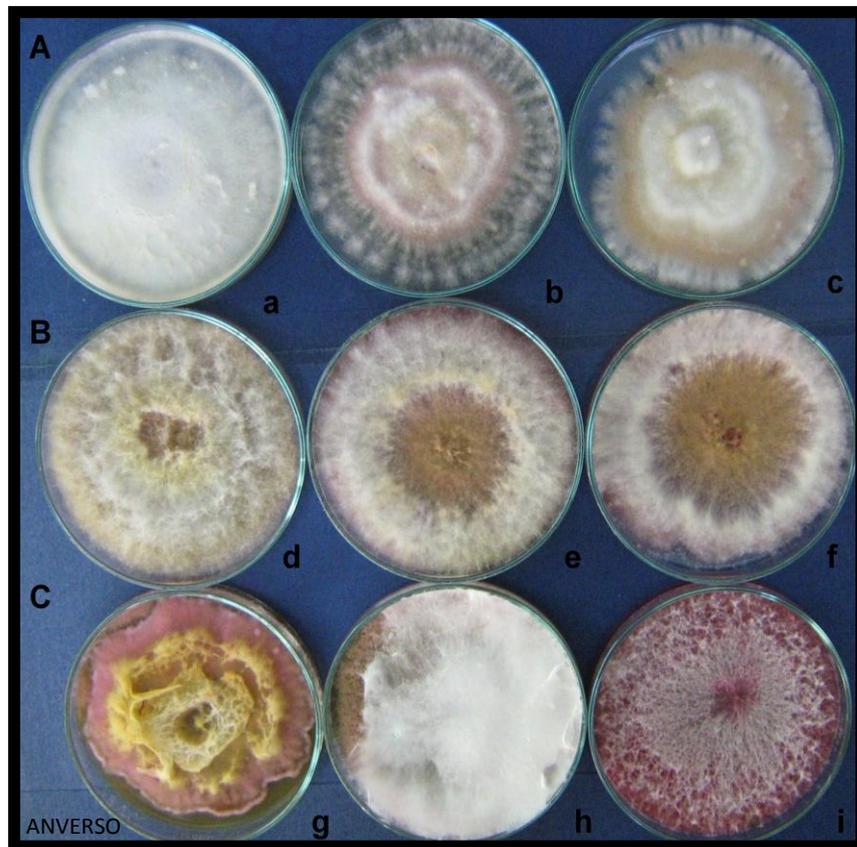
el reverso se podían observar cuatro coloraciones diferentes, de la parte más externa de la caja hasta la más interna fueron: White Group D 155, Greyed-Orange Group C 163, Greyed-Orange Group B 165 y Greyed-Orange Group A 166 respectivamente. El aislamiento 9 (Figura 11 Ac), presentó un tipo de crecimiento irregular, es decir, al medir el diámetro desde el centro a cualquier borde, la medida no era la misma. Este aislado presentó cinco coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: White Group D 155, Greyed-Orange Group B 164, Greyed-Yellow Group D 161, White Group B 155 y White Group D 155 respectivamente. Por el reverso podían observarse tres pigmentaciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: White Group D 155, Greyed-Orange Group B 165 y Greyed-Orange Group B 166 respectivamente.

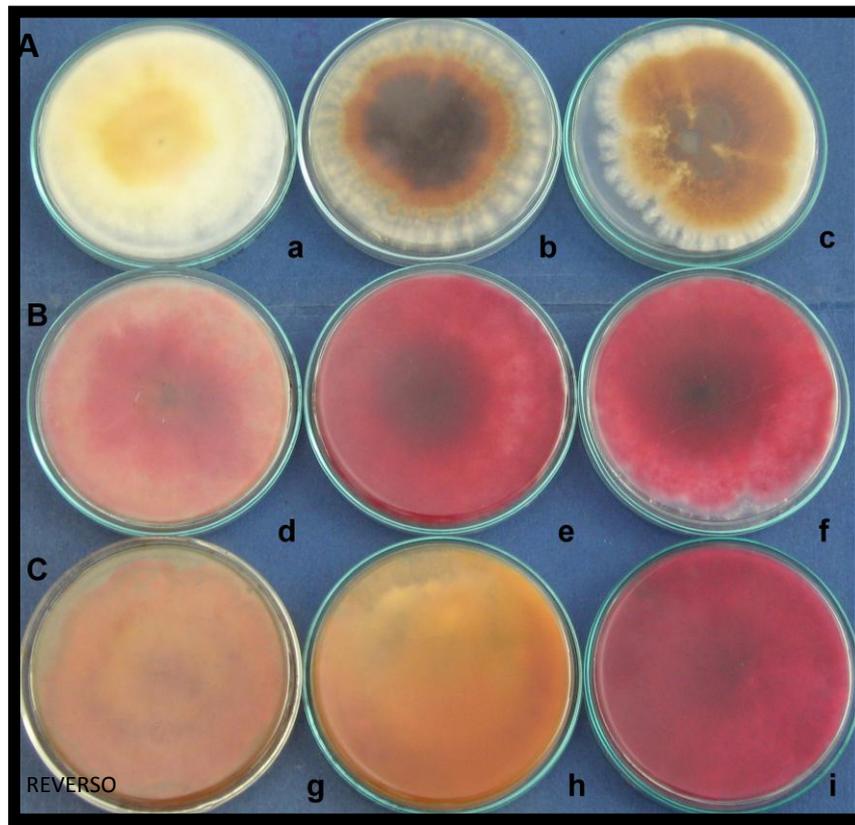
- Aislamientos 4, 5, 6: Figura 11 B. Presentó un crecimiento rápido. La coloración varía con la edad del cultivo. Inicialmente el cultivo presenta coloraciones naranja pálido (Greyed-Red Group) a rojizas (Red Group), posteriormente toman una coloración café oscuro (Greyed-Orange Group A 166). Forman abundante micelio. El aislamiento 4 (Figura 11 Bd), presentó abundante micelio donde podían observarse cuatro coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Greyed-Orange Group C 164, White Group C 155, Greyed-Orange Group C 163 y Greyed-Orange Group B 166 respectivamente; por el reverso podían observarse dos pigmentaciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Greyed-Red Group C 179 y Red Group D 53 respectivamente. El aislamiento 5 (Figura 11 Be), presentó abundante micelio donde podían observarse cuatro coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes:

Red-Purple Group C 59, White Group D 155, Greyed-Orange Group C 163 y Greyed-Orange Group A 174 respectivamente; por el reverso podían observarse dos pigmentaciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Red Group C 53 y Red Group A 53 respectivamente. El aislamiento 6 (Figura 11 Bf), presentó micelio donde podían observarse tres coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Red-Purple Group B 70, White Group D 155 y Greyed-Orange Group B 165 respectivamente; por el reverso podían observarse dos pigmentaciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Red Group C 53 y Red Group A 53 respectivamente.

- Aislamientos 1, 2, 3: Figura 11C. Presentó un crecimiento rápido. Produjeron relativamente grandes cantidades de micelio muy denso cuyas coloraciones variaron de blanco (White Group), amarillo (Yellow Group) y rojo (Red Group). El aislamiento 1 (Figura 11 Cg), presentó un tipo de crecimiento irregular, es decir, el radio de crecimiento era diferente al tomarse este en diferentes puntos; se observó abundante micelio donde podían observarse dos coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Red-Purple Group C 70 y Yellow-Orange Group A 22 respectivamente; por el reverso podían observarse una pigmentación de color Greyed-Orange Group D 172. El aislamiento 2 (Figura 11 Ch), presentó abundante micelio donde podían observarse dos coloraciones diferentes, una en la base y la otra del abundante micelio aéreo que fueron las siguientes: Greyed-Orange Group B 166 y White Group C 155 respectivamente; por el reverso podían observarse una pigmentación de color Greyed-Orange Group C 167. El aislamiento 3 (Figura 11 Ci), presentó escaso micelio donde podían observarse dos coloraciones

diferentes, una en la base y la otra de escaso micelio algodonoso dispuesto en pequeñas agrupaciones, estas fueron: Greyed-Purple Group D 187 y Greyed-White Group D 156 respectivamente; por el reverso podían observarse una pigmentación de color Red-Purple Group C 60.





**Figura 11.** Cultivo en PDA de los nueve aislamientos. Anverso (superior) y Reverso (inferior).  
 a. Aislamiento 7 (Korito); b. Aislamiento 8 (Palmira); c. Aislamiento 9 (Palmira);  
 d. Aislamiento 4 (Palmira); e. Aislamiento 5 (Korito); f. Aislamiento 6 (Palmira);  
 g. Aislamiento 1 (Britania); h. Aislamiento 2 (Malinche); i. Aislamiento 3 (Palmira).

#### 4.3.2 Cultivo en Czapek-Dox

Las fotografías del crecimiento de los hongos que pueden observarse en la Figura 12 corresponden a cultivos de 4 semanas de edad (la edad corresponde al tiempo transcurrido a partir del día de la siembra).

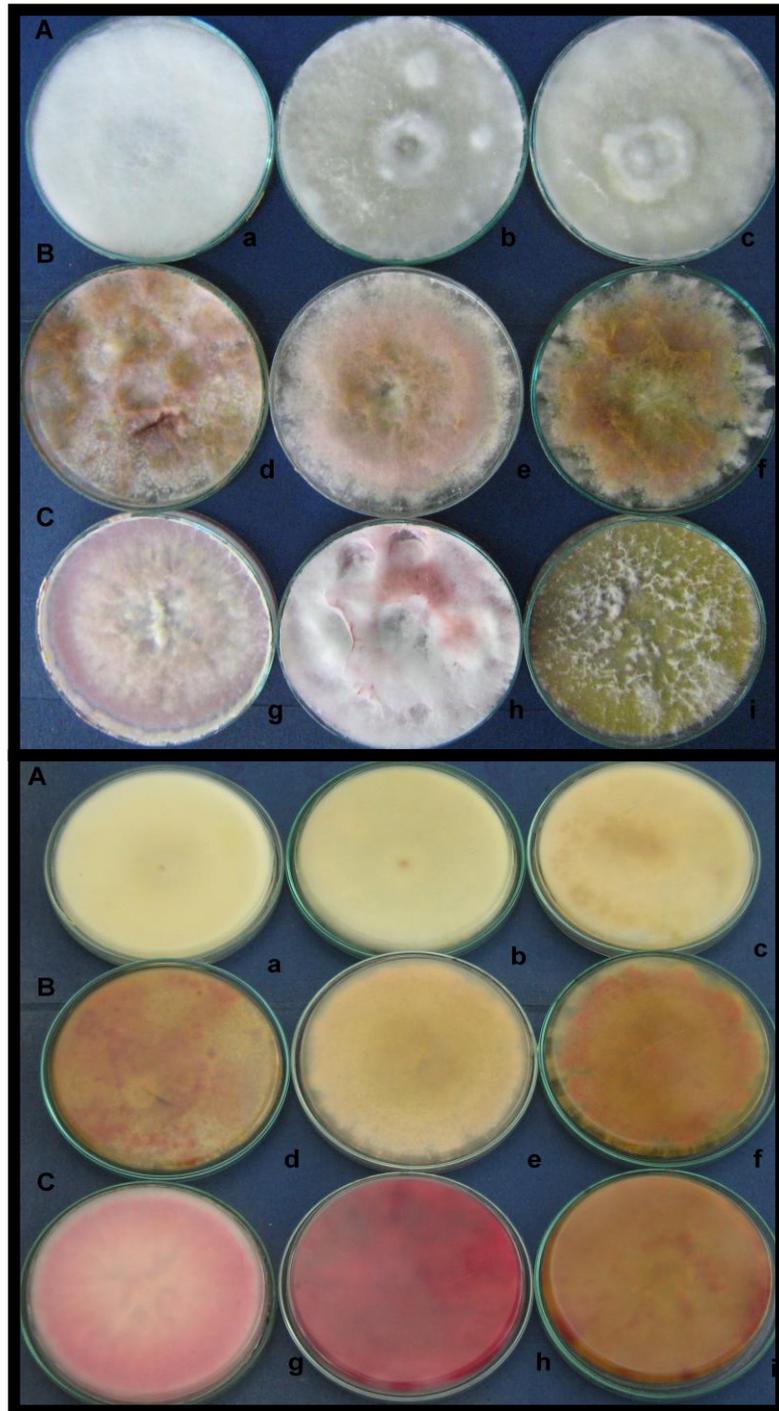
La descripción de las coloraciones del micelio y las pigmentaciones sobre el medio Czapek producidas por los hongos se realizó con base en la carta de colores RHS COLOUR CHART (The Royal Horticultural Society).

La velocidad de crecimiento fue estimada con base en observaciones semanales acerca de que tan colonizada estaba la caja en ese periodo de tiempo y a partir de datos diarios durante veinte días acerca del diámetro de crecimiento del hongo en la caja de Petri.

- Aislamientos 7, 8, 9: Figura 12 A. Rápido crecimiento. Abundante micelio de coloración blanca (White Group). El aislamiento 7 (Figura 12 Aa), presentó abundante micelio de color White Group D 155; la pigmentación observada en el reverso fue Yellow-White Group D 158. El aislamiento 8 (Figura 12 Ab), presentó abundante micelio de color White Group C 155; la pigmentación observada en el reverso fue Yellow-White Group C 158. El aislamiento 9 (Figura 12 Ac), presentó abundante micelio de color White Group B 155; la pigmentación observada en el reverso fue Orange-White Group D 159 con manchas de color Greyed-Orange Group B 164.
- Aislamientos 4, 5, 6: Figura 12 B. Presentó rápido crecimiento. Las coloraciones varían de blanco, rosa pálido a café. El aislamiento 4 (Figura 12 Bd), presentó varias masas de esporas de coloración Greyed-Orange Group A 164, una coloración base Red-Purple Group B 69 y puntos de color White Group C 155; por el reverso podían observarse dos pigmentaciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Greyed-Orange Group B 165 y Orange-Red Group B 34 respectivamente. El aislamiento 5 (Figura 12 Be), presentó abundante micelio donde podían observarse tres coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: White Group B 155, Red-Purple Group B 69 y Greyed-Orange Group C 165; por el reverso podía observarse una pigmentación Orange-White Group B 159. El aislamiento 6 (Figura 12 Bf), presentó un crecimiento irregular, es decir, al medir el diámetro

desde el centro a cualquier borde, la medida no era la misma. Contó con abundante micelio donde podían observarse tres coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: White Group C 155, Greyed-Orange Group A 164 y Yellow-Orange Group A 20; por el reverso podían observarse dos pigmentaciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Greyed-Orange Group B 165 y Orange-Red Group B 34 respectivamente.

- Aislamientos 1, 2, 3: Figura 12 C. Presentó rápido crecimiento. Abundante micelio cuya coloración varió entre blanco (White Group), rosa pálido (Purple-Red Group) y amarillo (Greyed-Orange Group). El aislamiento 1 (Figura 12 Cg), presentó abundante micelio con una coloración Red-Purple Group C 69; el agar tomó una pigmentación Red-Purple Group D 62. El aislamiento 2 (Figura 12 Ch), presentó abundante micelio de coloración White Group D 155 con manchas de color Red-Purple Group D 70; por el reverso podían observarse una combinación de dos pigmentaciones diferentes, las cuales fueron las siguientes: Red-Purple Group B 64 y Red-Purple Group A 64. El aislamiento 3 (Figura 12Ci), presentó escaso micelio de coloración Yellow-Green Group D 153 con varias masas de esporas de coloración White Group D 155; por el reverso podían observarse una combinación de dos pigmentaciones diferentes, las cuales fueron las siguientes: Greyed-Orange Group B 165 y Orange-Red Group B 34.



**Figura 12.** Cultivo en Czapek-Dox de los nueve aislamientos. Anverso (superior) y Reverso (inferior).  
a. Aislamiento 7 (Korito); b. Aislamiento 8 (Palmira); c. Aislamiento 9 (Palmira); d. Aislamiento 4 (Palmira); e. Aislamiento 5 (Korito); f. Aislamiento 6 (Palmira); g. Aislamiento 1 (Britania); h. Aislamiento 2 (Malinche); i. Aislamiento 3 (Palmira).

### 4.3.3 Cultivo en Agar avena:

Las fotografías del crecimiento de los hongos que pueden observarse en la Figura 13 corresponden a cultivos de 4 semanas de edad (la edad corresponde al tiempo transcurrido a partir del día de la siembra).

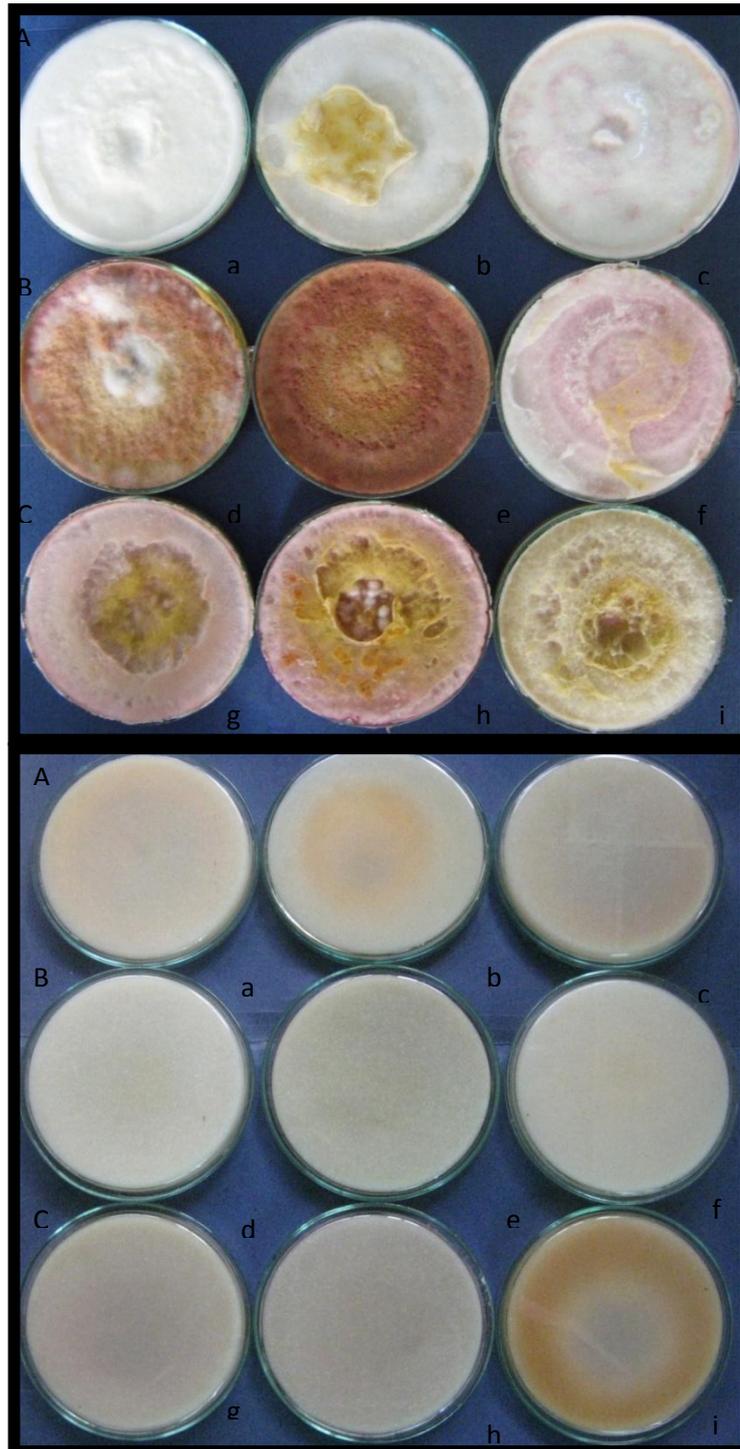
La descripción de las coloraciones del micelio y las pigmentaciones sobre el medio Agar Avena producidas por los hongos se realizó con base en la carta de colores RHS COLOUR CHART (The Royal Horticultural Society).

La velocidad de crecimiento fue estimada con base en observaciones semanales acerca de que tan colonizada estaba la caja en ese periodo de tiempo y a partir de datos diarios durante veinte días acerca del diámetro de crecimiento del hongo en la caja de Petri.

- Aislamientos 7, 8, 9: Figura 13 A. Presentó rápido crecimiento. El aislamiento 7 (Figura 13 Aa), presentó abundante micelio de color White Group D 155; la pigmentación observada en el reverso fue Orange-White Group A 159 y Greyed-White Group D 156. El aislamiento 8 (Figura 13 Ab), presentó abundante micelio de color White Group C 155; la pigmentación observada en el reverso fue Greyed-Orange Group D 173 y Greyed-White Group D 156. El aislamiento 9 (Figura 13 Ac), presentó abundante micelio de color White Group B 155 y manchas de color Red-Purple Group C 69; no se observó ningún tipo de pigmentación en el reverso su color siguió siendo Greyed-White Group D 156.
- Aislamientos 4, 5, 6: Figura 13 B. Presentó rápido crecimiento. Presentaron coloraciones blancas (White Group), rojizas (Red-Purple Group) y café (Greyed-Orange Group). En el aislamiento 4 (Figura 13 Bd), podían observarse tres coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Greyed-Orange Group C 168, Greyed-Orange Group C 172 y White Group D 155 respectivamente; por el reverso la coloración no

cambio, siguió teniendo la coloración Greyed-White Group D 156. El aislamiento 5 (Figura 13 Be), presentó una coloración café rojiza oscura. El aislamiento 6 (Figura 13 Bf), presentó abundante micelio con una mezcla de dos coloraciones White-Group B 155 y Red-Purple Group C 65; por el reverso la coloración no cambio, siguió teniendo la coloración Greyed-White Group D 156.

- Aislamientos 1, 2, 3: Figura 13 C. Rápido crecimiento con abundante micelio. Presentaron coloraciones blancas (White Group), amarillas (Greyed-Orange y Greyed-Yellow Group) y rosa pálido (Purple-Red Group). En el aislamiento 1 (Figura 13 Cg), podían observarse dos coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Red-Purple Group A 69 y Greyed-Orange Group B 163 respectivamente; por el reverso la coloración no cambio, siguió teniendo la coloración Greyed-White Group D 156. En el aislamiento 2 (Figura 13 Ch), podían observarse tres coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Red-Purple Group B 163, Greyed-Orange Group A 163 y White Group D 155; por el reverso la coloración no cambio, siguió teniendo la coloración Greyed-White Group D 156. En el aislamiento 3 (Figura 13 Ci), podían observarse tres coloraciones diferentes, las cuales fueron de la parte más externa de la caja hasta la más interna de la misma las siguientes: Greyed-Yellow B 162, Greyed-Orange Group B 163 y White Group D 155; por el reverso la coloración fue Greyed-Orange Group B 164 con Greyed-White Group D 156.

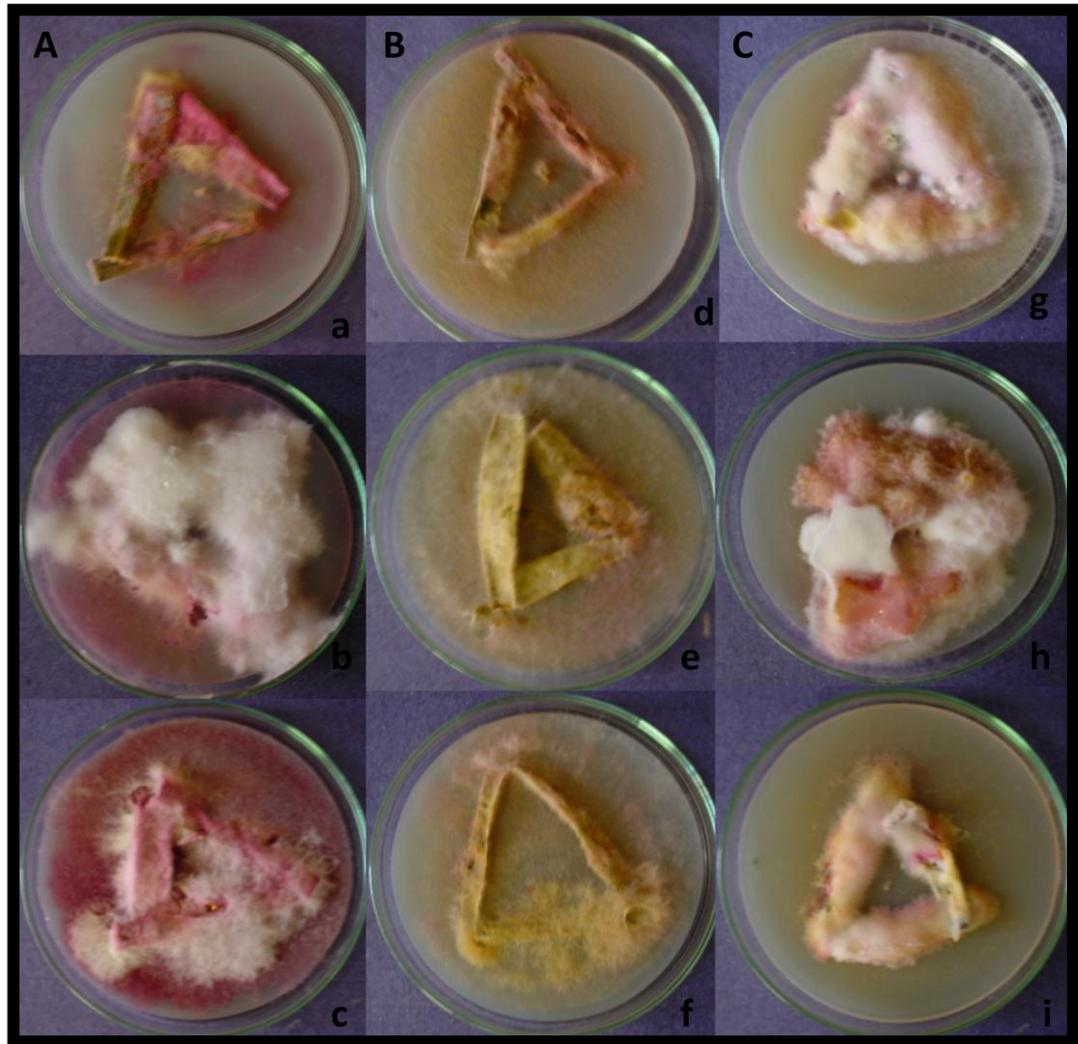


**Figura 13.** Cultivo en Agar Avena de los nueve aislados. Anverso (superior) y Reverso (inferior).  
a. Aislamiento 7 (Korito); b. Aislamiento 8 (Palmira); c. Aislamiento 9 (Palmira); d. Aislamiento 4 (Palmira); e. Aislamiento 5 (Korito); f. Aislamiento 6 (Palmira); g. Aislamiento 1 (Britania); h. Aislamiento 2 (Malinche); i. Aislamiento 3 (Palmira).

#### **4.3.4 Cultivo en CLA (Carnation Leaf-Piece Agar):**

Se realizó un cultivo en CLA para el cual cuatro semanas después de la siembra se observó una mayor colonización por parte de los aislamientos 1, 2, 3, 7, 8 y 9 que por parte de los aislamientos 4, 5 y 6.

Los aislamientos 1, 2 y 3 (Figura 14 A: a, b, c), presentaron un abundante crecimiento de micelio con coloración blanca (White Group) y roja (Red Group), el cual cubrió los fragmentos de hoja de clavel en su totalidad; las macroconidias se encontraban en esporodoquios de color naranja dispuestos bajo el micelio. Los aislamientos 4, 5 y 6 (Figura 14 B: d, e, f), presentaron un crecimiento moderado de micelio de coloración marrón (Greyish-Yellow Group); este no cubrió la totalidad de los fragmentos de hoja; se encontraban abundantes macroconidias en esporodoquios de color naranja. Los aislamientos 7, 8 y 9 (Figura 14 C: g, h, i), presentaron un abundante crecimiento de micelio con coloración blanca-marrón (White-Group y Greyed-Yellow Group), el cual cubrió los fragmentos de hoja de clavel en su totalidad; las macroconidias se encontraban en esporodoquios de color naranja pálido sobre las hojas dispuestas en el agar.



**Figura 14.** Cultivo en CLA.

a. Aislamiento 1 (Britania); b. Aislamiento 2 (Malinche); c. Aislamiento 3 (Palmira); d. Aislamiento 4 (Palmira); e. Aislamiento 5 (Korito); f. Aislamiento 6 (Palmira); g. Aislamiento 7 (Korito); h. Aislamiento 8 (Palmira); i. Aislamiento 9 (Palmira).



	PDA			CZAPEK			OATMEAL		
DÍA	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
1	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
2	1,8	2,4	1,1	2,9	3,2	3,1	3,8	4	3,6
3	2,7	3,8	1,7	3,6	4,6	4,4	4,7	5,7	5,2
4	3,1	4,8	2,4	4,3	5	5,7	5,8	7,4	6,3
5	4,1	5,7	3,2	5,8	5,7	6,3	6,5	8,2	7,7
6	5	6,8	4,5	6,3	6,8	7,6	7,5	8,6	8,2
7	6,3	7,8	6,1	7,8	7,6	8,2	8,4	9	8,7
8	6,5	9	6,5	8,1	8,3	8,7	9	9	9
9	6,6	9	7	8,6	8,9	9	9	9	9
10	6,8	9	7,5	9	9	9	9	9	9
11	7,2	9	8,2	9	9	9	9	9	9
12	7,4	9	8,8	9	9	9	9	9	9
13	7,6	9	9	9	9	9	9	9	9
14	7,9	9	9	9	9	9	9	9	9
15	8,1	9	9	9	9	9	9	9	9
16	8,3	9	9	9	9	9	9	9	9
17	8,6	9	9	9	9	9	9	9	9
18	8,8	9	9	9	9	9	9	9	9
19	8,9	9	9	9	9	9	9	9	9

**Tabla 8.**

20	9	9	9	9	9	9	9	9	9
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Velocidad de crecimiento de las especies en cada uno de los medios de cultivo medida en cm/día

#### 4.3.4 Caracterización macroscópica de los aislamientos

La morfología de colonia para los nueve aislamientos colectados varía en coloración, velocidad de crecimiento y cantidad de micelio generado en cada uno de los medios de cultivo.

En términos generales los tres medios de cultivo presentaban rasgos característicos para cada uno de los aislamientos. La velocidad de crecimiento (Ver tabla 8) para todos los aislamientos fue mayor en Agar Avena, lo cual se debe a sus componentes nutritivos. En el medio Czapek la velocidad de crecimiento fue rápida y por lo mismo se observó abundante micelio denso y compacto para cada uno de los nueve aislamientos. El medio PDA tuvo la menor velocidad de crecimiento comparado con el medio Czapek y el Agar Avena, y fue el medio de cultivo en el cual la producción de micelio era más escasa. En los tres medios de cultivo pudo observarse pigmentaciones características de las especies en las cuales se reclasificó *F. roseum* como es reportado en la bibliografía (The *Fusarium* Laboratory Manual). Se pudo observar diferencias significativas en cuanto a las coloraciones del cultivo basado en la carta de colores RHS COLOUR CHART (The Royal Horticultural Society) y masas de esporas en cada uno de los tres aislamientos para cada especie, lo cual es debido a cambios alternados en la temperatura e intensidad lumínica a la cual están sometidos los medios de cultivo. También las diferentes pigmentaciones observadas en el reverso de las cajas de Petri (agar), son debidas a la luz reflejada por las diferentes masas de esporas.

En el caso de los aislamientos 1, 2 y 3, se observó un rápido crecimiento en los tres medios de cultivo empleados, observándose mayor velocidad de crecimiento en Agar Avena y Czapek; en estos dos medios de cultivo pudo observarse abundante micelio algodonoso compacto en su mayor parte con coloraciones amarillas y rosas. En el caso del medio PDA, la cantidad de micelio no era abundante ni compacto, las coloraciones variaban entre blanco,

amarillo y rosa. En Czapek y PDA las pigmentaciones del medio eran similares ya que oscilaban entre coloraciones amarillas y rojizas.

En el caso de los aislamientos 4, 5 y 6, se observó un rápido crecimiento en los tres medios de cultivo empleados, observándose mayor velocidad de crecimiento en Agar Avena, Czapek y PDA respectivamente. Dado a que la velocidad de crecimiento tuvo ese comportamiento los aislados sembrados en Agar Avena y Czapek envejecieron más rápido; esto puede decirse dado a las coloraciones rojizas intensas y cafés que presentó el micelio en estos medios de cultivo. En los tres medios de cultivo pudo observarse la presencia de micelio algodonoso, muy abundante en las primeras semanas y escaso a medida que el cultivo era más viejo. En los medios de cultivo en Czapek podía observarse concentración de esporodoquios en micelio aéreo vistos como parches cafés sobre el micelio blanco-rosa.

Con respecto a las coloraciones se observó que la coloración del micelio para los aislamientos 7, 8 y 9, en medio Czapek y Agar Avena eran muy similares, pues el micelio era blanco, sin embargo en medio PDA se encontraron diferencias en la coloración del micelio para los aislamientos 8 y 9 siendo muy similares en estos dos, teniendo una gama de color entre el amarillo, café y blanco. En el medio de Agar Avena la velocidad de crecimiento fue mucho mayor que en los medios PDA y Czapek, en este medio se generó abundante micelio en muy poco tiempo después de la siembra, es decir, a la semana de realizada la siembra la caja de Petri estaba totalmente colonizada lo cual no sucedió en el medio PDA que fue en el cual se presentó menor cantidad de micelio. El micelio obtenido en los medios Czapek y Agar Avena era muy denso y compacto a diferencia del observado en el medio PDA que era escaso.

**Tabla 9.** Morfología de colonia. Cuadro comparativo de las características encontradas en los nueve aislamientos diferentes a partir del material colectado en las fincas productoras de clavel en la Sabana de Bogotá, por medio de morfología de colonia.

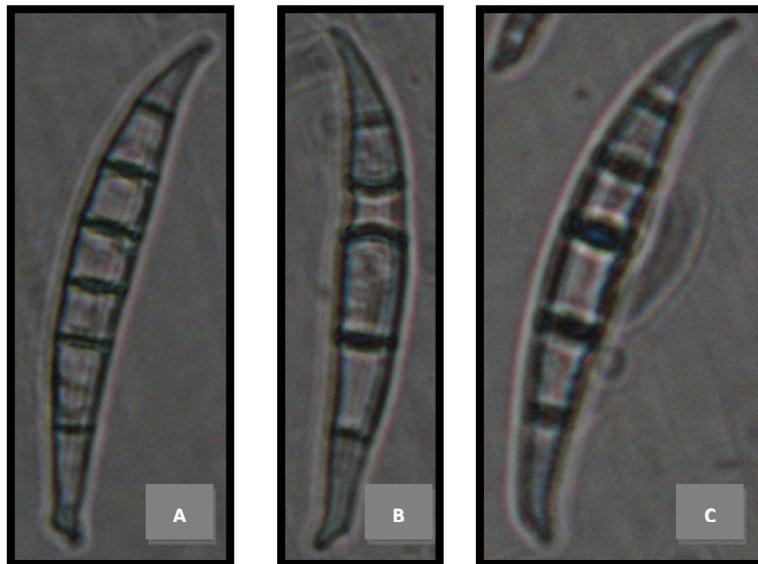
	AISLAMIENTO 1 Britania	AISLAMIENTO 2 Malinche	AISLAMIENTO 3 Palmira	AISLAMIENTO 4 Palmira	AISLAMIENTO 5 Korito	AISLAMIENTO 6 Palmira	AISLAMIENTO 7 Korito	AISLAMIENTO 8 Palmira	AISLAMIENTO 9 Palmira
color-colonia (PDA)	amarillo-rojo	Blanco	blanco-rojo	blanco-café	café-blanco-rojo	café-blanco-rojo	blanco	blanco-rojo-café	blanco-café
color-reverso (PDA)	Marrón	Marrón	Rojo	rojo-naranja	Rojo	rojo	amarillo-blanco	café-blanco	café-blanco
color-colonia (Czapek-Dox)	rosado-blanco	blanco-rojo	amarillo-blanco	café-rosado-blanco	café-rosado-blanco	amarillo-café-blanco	blanco	blanco	blanco
color-reverso (Czapek-Dox)	rosado-blanco	Rojo	café-rojo	café-amarillo	amarillo	café-rojo	amarillo	Amarillo	amarillo-café
color-colonia (Agar Avena)	rosado-amarillo	rosado-amarillo	amarillo	Café	Café	blanco-rosado	blanco	Blanco	blanco
color-colonia (CLA)	Rojo	rojo-blanco	rojo-blanco	Café	Café	café	blanco-rojo-amarillo	blanco-rojo-amarillo	blanco-rojo-amarillo
velocidad de crecimiento PDA	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	rápida	rápida	Lenta	Lenta	lenta
velocidad de crecimiento Czapek	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	rápida	rápida	Rápida	Rápida	rápida
velocidad de crecimiento Agar Avena	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	rápida	rápida	Rápida	Rápida	rápida

#### 4.4 Caracterización microscópica

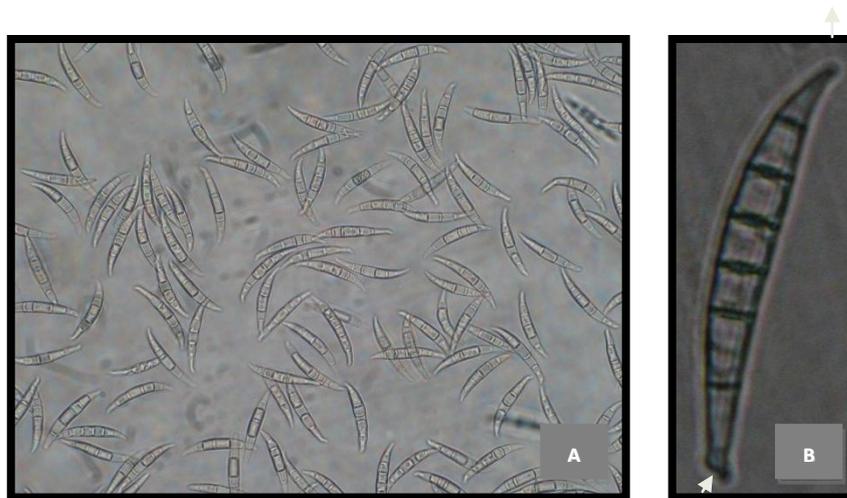
La evaluación de los aislamientos por microscopia óptica se hizo mediante el montaje de láminas a partir de aislamientos de más de 4 semanas con el objeto de identificar estructuras claves para la identificación como macroconidias.

##### 4.4.1 Caracterización microscópica de los aislamientos 1, 2 y 3

Microscópicamente los aislamientos 1, 2 y 3 se caracterizaron por tener abundantes macroconidias delgadas pero no tan delgadas como las observadas en los aislamientos 7, 8 y 9. Presentan una pared gruesa, de longitud media, moderadamente curvadas a rectas en su parte ventral como puede observarse en la Figura 15.



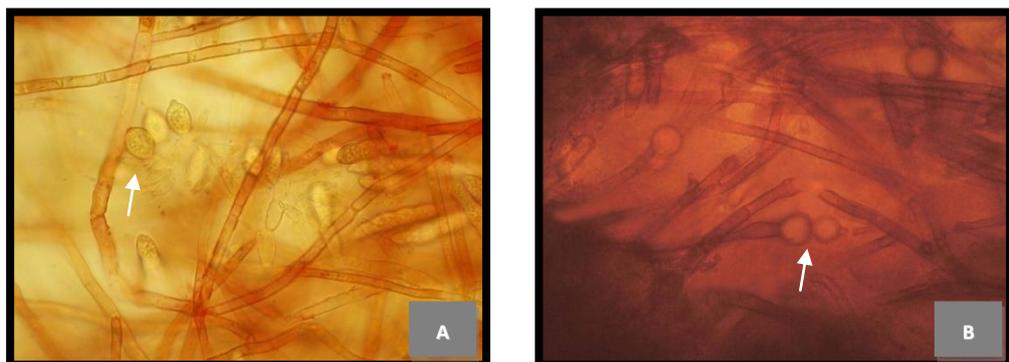
**Figura 15.** Macroconidias de los aislamientos 1, 2 y 3 (100X x 2.5 x 10). A. Aislamiento 1 (Britania); B. Aislamiento 2 (Papagayo); C. Aislamiento 3 (Aurora).

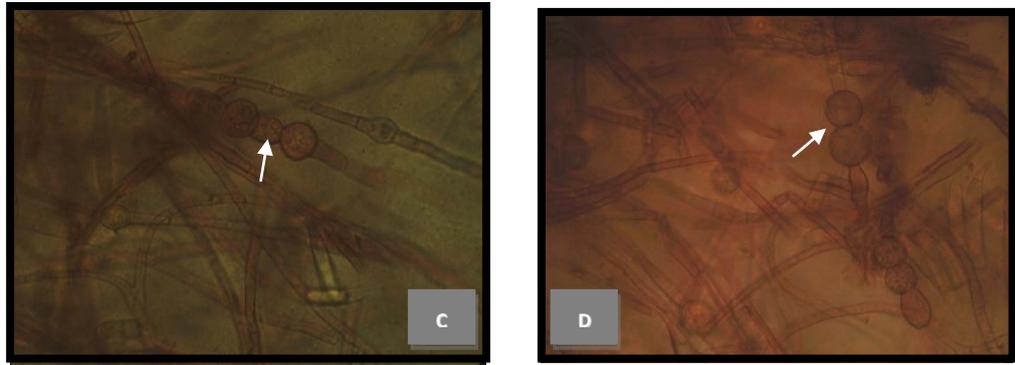


**Figura 16.** Macroconidias de los aislados 1, 2 y 3. A (100X x 2.5 x 4.0 ), B. (100X x 2.5 x 10 B). A. Las macroconidias son delgadas, poseen una pared gruesa, tienen una longitud media y poseen entre 5 y 6 septos. B. Macroconidias moderadamente curvas dorsalmente y ventralmente son rectas o levemente arqueadas. B. La célula apical (flecha) tiene forma de hocico y la célula basal tiene un pie bien desarrollado.

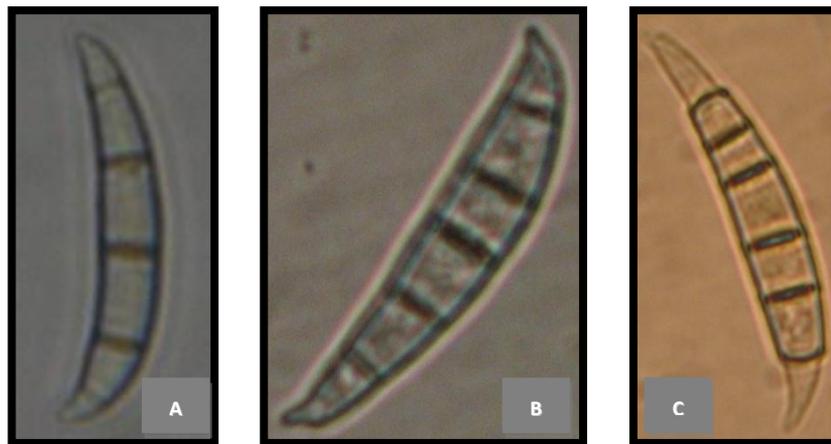
#### 4.4.2 Caracterización microscópica de los aislamientos 4, 5 y 6

Microscópicamente los aislamientos 4, 5 y 6 se caracterizaron por tener macroconidias robustas, relativamente cortas con pared gruesa como se ve en la Figura 18. En ninguno de los aislamientos se encontraron microconidias, pero si se observó la presencia de clamidosporas de diferentes tipos como puede observarse en la Figura 17.

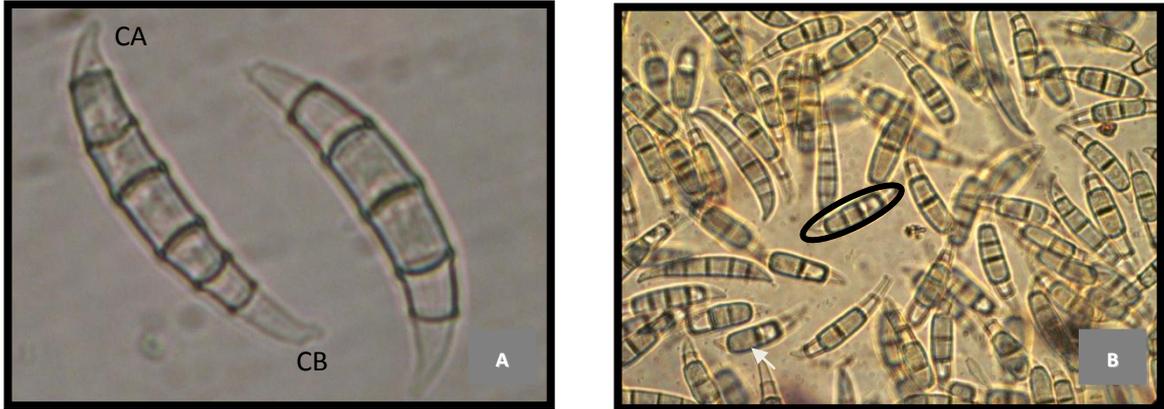




**Figura 17.** Clamidosporas (señaladas con flechas) observadas en los aislamientos 4, 5 y 6 (100X x 2.5 x 4.0). Pueden observarse: A. clamidosporas sencillas, C-D. clamidosporas en cadena, B. clamidosporas pareadas, B. clamidosporas lisas y C. clamidosporas verrugosas.



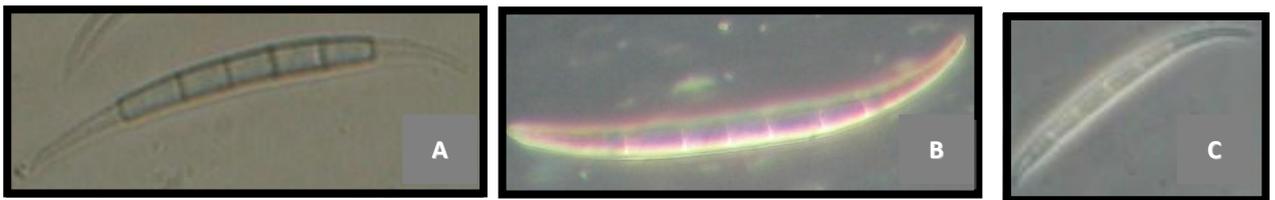
**Figura 18.** Macroconidias de los aislamientos 4, 5 y 6 (100X x 2.5 x 10). A. Aislamiento 4 (Aurora); B. Aislamiento 5 (Korito); C. Aislamiento 6 (Aurora).



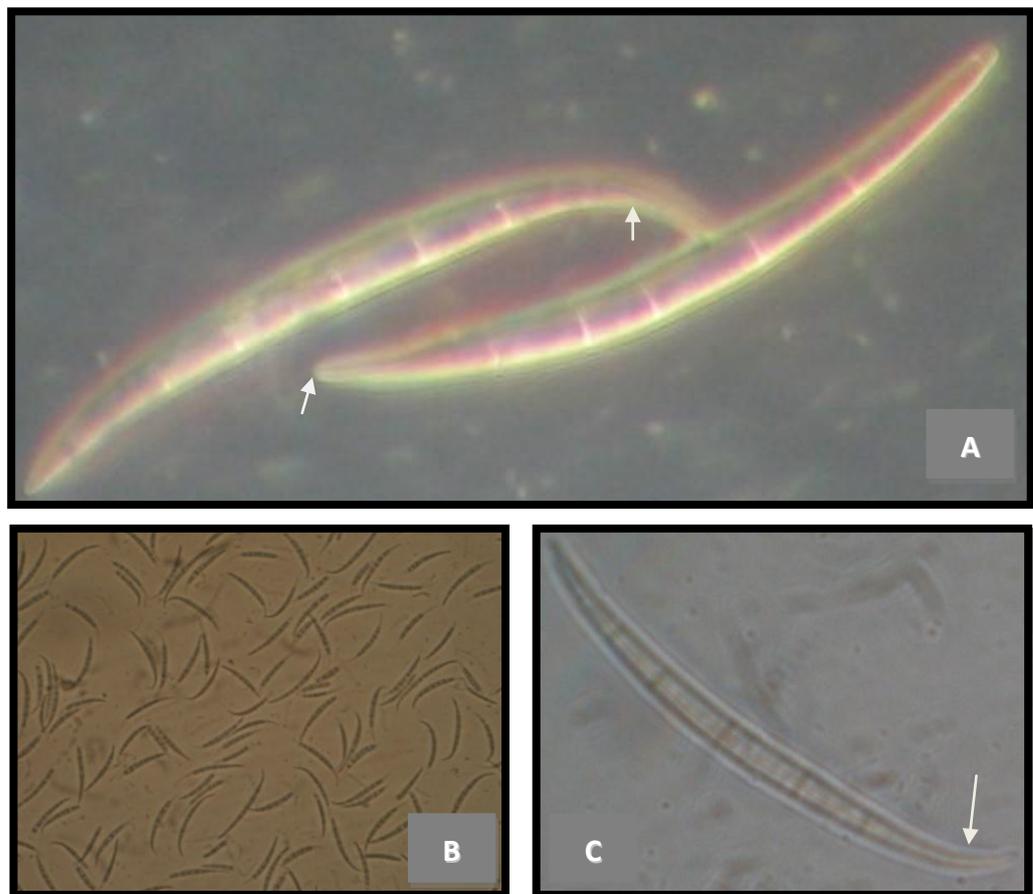
**Figura 19.** Macroconidias de los aislados 4, 5 y 6. Las macroconidias son muy robustas (A y B), relativamente cortas, muy anchas en la parte media (A), el lado dorsal es algo curvo, pero el lado ventral es casi recto (B). La célula apical (CA) es redondeada y roma y la célula basal (CB) tiene una muesca sin un pie definido (A). Usualmente poseen 3 a 4 septos (circulo), pero en algunos casos pueden encontrarse macroconidias con 5 septos (A). A (100X x 2.5 x 10), B (100X x 2.5 x 5.6).

#### 4.4.3 Caracterización microscópica de los aislamientos 7, 8 y 9

Microscópicamente los aislamientos 7, 8 y 9 se caracterizaron por tener abundantes macroconidias largas y delgadas. Las macroconidias tienen pared delgada, son rectas a ligeramente curvadas como puede observarse en la Figura 20. En los aislamientos no se observaron microconidias. No tenían clamidosporas.



**Figura 20.** Macroconidias encontradas en los aislamientos 7, 8 y 9. A. Aislamiento 7 (Korito); B. Aislamiento 8 (Aurora); C. Aislamiento 9 (Aurora). (100X x 2.5 x 10)



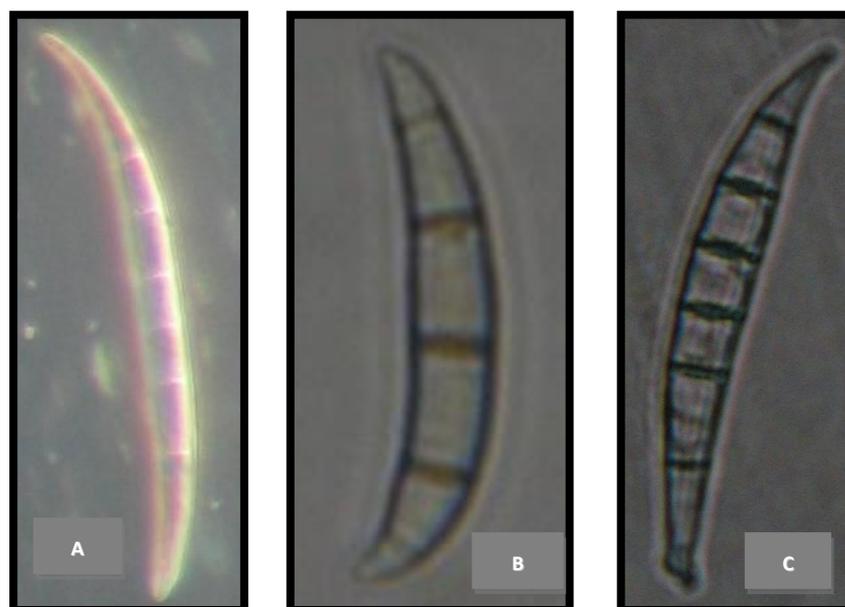
**Figura 21.** Macroconidias de los aislamientos 7, 8 y 9. Las macroconidias son largas y delgadas (B), la pared es delgada (C). Presentan entre 5 y 7 septos (A). La célula apical es alargada, afilada y doblada (flechas) y la célula basal tiene un pie desarrollado. A (100X x 2.5 x 10), B (40X x 2.5 x 4.0), C (100X x 2.5 x 10).

#### 4.4.4 *Fusarium roseum*

La evaluación de morfología de colonia y microscopía óptica de los aislamientos obtenidos de las fincas productoras de clavel comercial en la Sabana de Bogotá, mostraron características típicas de *F. roseum* (*Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum*), tal como se esperaba dado a la sintomatología típica de pudrición basal encontrada en las plantas de clavel de las variedades Delphi y Nelson colectadas en campo. Cada uno de los aislamientos presentaron las características típicas de la

sección como coloración, velocidad de crecimiento y estructuras microscópicas, observándose un alto grado de similitud en cada uno de los 3 aislamientos de cada una de las 3 especies (Ver Tabla 9).

La caracterización microscópica de la sección *roseum* se hizo por medio de la identificación de estructuras como macroconidias (Ver Figura 22). Las macroconidias son esporas producidas en los hongos a partir de reproducción vegetativa. Cada una de las especies de *Fusarium roseum* presenta macroconidias con características propias, es decir, algunas son largas y delgadas, medianas y delgadas o son robustas y pequeñas. También se observó en las macroconidias el grosor de la pared, el número de septos, la curvatura dorsal y ventral y la morfología de la célula basal y de la célula apical. Al tener la información de cada uno de los parámetros acerca de la morfología de las macroconidias se prosiguió a la comparación de los mismos con la información del Manual de Laboratorio de *Fusarium* de Leslie y Sumerell (2006). En la Tabla 11 se resumen las características microscópicas observadas para cada uno de los nueve aislamientos.



**Figura 22.** Macroconidias de la sección *roseum* (100X x 2.5 x 10). Macroconidias de A. *Fusarium avenaceum* B. *Fusarium culmorum* C. *Fusarium graminearum*.

**Tabla 10.** Información general acerca de la especie (morfológica) a la cual correspondía cada uno de los aislados y la finca de procedencia de los mismos.

<b>AISLAMIENTO No.</b>	<b>FINCA</b>	<b>ESPECIE MORFOLÓGICA</b>
1	Britania	<i>Fusarium graminearum</i>
2	Malinche	<i>Fusarium graminearum</i>
3	Palmira	<i>Fusarium graminearum</i>
4	Palmira	<i>Fusarium culmorum</i>
5	Korito	<i>Fusarium culmorum</i>
6	Palmira	<i>Fusarium culmorum</i>
7	Korito	<i>Fusarium avenaceum</i>
8	Palmira	<i>Fusarium avenaceum</i>
9	Palmira	<i>Fusarium avenaceum</i>

El concepto de especie morfológica esta basado en la idea que un tipo morfológico o individual puede representar la variación dentro la especie completa. Para definir estas especies morfológicas, se utilizaron caracteres fisiológicos (velocidad de crecimiento) y físicos (coloración colonia, forma macroconidias) que permitieron distinguir las especies de *Fusarium*. A partir de la caracterización macroscópica y microscópica se pudo realizar la caracterización de la especie morfológica a la cual correspondía cada aislamiento basados en los caracteres físicos y fisiológicos. Los resultados obtenidos permitieron identificar que las especies morfológicas causantes de la pudrición basal del clavel eran: *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum*.

**Tabla 11.** Resumen de las características microscópicas observadas en cada uno de los nueve aislamientos.

	AISLAMIENTO 1 <i>Fusarium graminearum</i> Britania	AISLAMIENTO 2 <i>Fusarium graminearum</i> Malinche	AISLAMIENTO 3 <i>Fusarium graminearum</i> Palmira	AISLAMIENTO 4 <i>Fusarium culmorum</i> Palmira	AISLAMIENTO 5 <i>Fusarium culmorum</i> Korito	AISLAMIENTO 6 <i>Fusarium culmorum</i> Palmira	AISLAMIENTO 7 <i>Fusarium avenaceum</i> Korito	AISLAMIENTO 8 <i>Fusarium avenaceum</i> Palmira	AISLAMIENTO 9 <i>Fusarium avenaceum</i> Palmira
Longitud	Media	Media	Media	Corta	Corta	Corta	Larga	larga	larga
Contextura	Delgada	Delgada	Delgada	Robusta	Robusta	Robusta	Delgada	delgada	delgada
Grosor de la pared	Gruesa	Gruesa	Gruesa	Gruesa	Gruesa	Gruesa	Delgada	delgada	delgada
No. de septos	5 a 6	5 a 6	5 a 6	3 a 5	3 a 5	3 a 5	5 a 7	5 a 7	5 a 7
Forma célula apical	Hocico	Hocico	Hocico	redondeada-roma	redondeada-roma	redondeada-roma	alargada, afilada, doblada	alargada, afilada, doblada	alargada, afilada, doblada
Forma célula basal	pie bien desarrollado	pie bien desarrollado	pie bien desarrollado	pie no definido	pie no definido	pie no definido	pie bien desarrollado	pie bien desarrollado	pie bien desarrollado

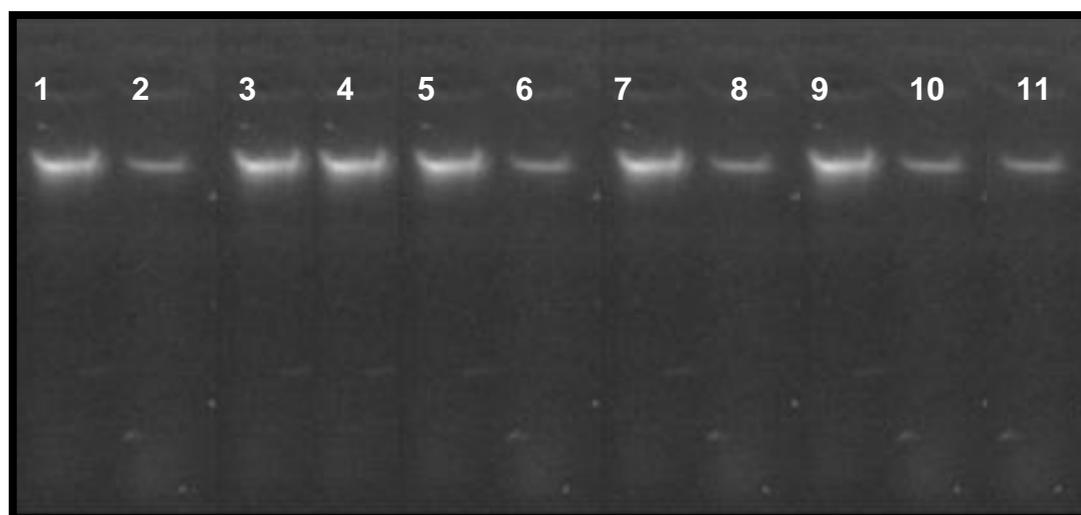
## 4.5 Caracterización molecular

### 4.5.1 Extracción de ADN fúngico

Como primer paso para lograr una exitosa extracción de ADN fúngico, se realizó la estandarización del protocolo incluyendo en este la maceración de abundante micelio para lo cual se dejó crecer el cultivo en Czapek líquido por una semana a 30°C y en agitación. La maceración se realizó con nitrógeno líquido (sumergiendo el micelio colectado de cada aislado durante 30 segundos en el nitrógeno líquido) ya que este facilita realizar la ruptura celular para la recolección del ADN.

### 4.5.2 Evaluación de calidad y concentración de ADN

En la figura 19 se observan las muestras de ADN extraídas mediante el método de Cenis (1992), modificado.



**Figura 23.** Extracción de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1. *Fusarium graminearum* (Britania); 2. *Fusarium graminearum* (Malinche); 3. *Fusarium graminearum* (Palmira) 4. *Fusarium culmorum* (Palmira); 5. *Fusarium culmorum* (Korito); 6. *Fusarium culmorum* (Palmira); 7. *Fusarium avenaceum* (Korito); 8. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 9. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 10. Control positivo *Fusarium oxysporum*; 11. Control negativo *Botrytis cinerea*.

El método utilizado para obtener valores cuantitativos de la concentración de ADN fue el de la medición en el fluorómetro, obteniéndose las concentraciones de la Tabla 9. para cada una de las muestras:

**Tabla 12.** Concentración DNA. (\*Controles positivo y negativo respectivamente)

Aislado No.	Concentración ng/ $\mu$ L
1	293
2	280
3	290
4	284
5	305
6	295
7	315
8	298
9	395
<i>*F. oxysporum</i>	286
<i>*Botrytis cinérea</i>	270

Los anteriores datos permiten afirmar que el protocolo empleado para la extracción de ADN es eficiente.

Pueden observarse diferentes concentraciones de ADN en cada uno de los nueve aislamientos (Ver Figura 23) obtenidos con el protocolo modificado de Cenis (1992), lo cual puede deberse a la cantidad de micelio puesto a crecer en el medio Czapek líquido ó a pérdidas de micelio durante la maceración con nitrógeno líquido. Sin embargo, se obtuvo buena cantidad de ADN, y a partir de los valores obtenidos por mediciones en el fluorómetro se realizaron los cálculos de la cantidad de ADN necesaria para usar en los ensayos de PCR.

#### 4.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa

El método de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), provee una base simple, sencilla, precisa y rápida para determinar la presencia de secciones

específicas en ciertos genes para el género *Fusarium* en este caso. Se tenía como objetivo identificar las especies de *Fusarium* y para lograrlo se llevaron a cabo PCR's con seis pares de primers diferentes en un termociclador PTC -100 MJ Research Inc y en un termociclador Multigene Labnet International Inc para los nueve aislamientos obtenidos.

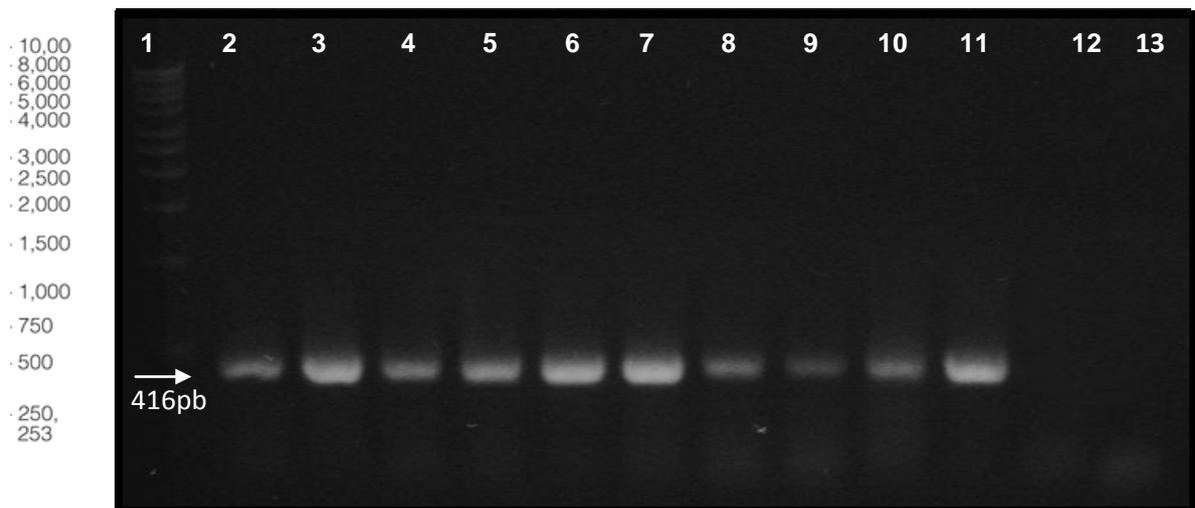
Se utilizaron tres controles diferentes en las diferentes PCR's para asegurar la confiabilidad de los productos de amplificación obtenidos. Los controles fueron: 1) Control positivo: ADN de *Fusarium oxysporum*, 2) Control negativo: ADN de *Botrytis cinerea*, y 3) Control Agua: el cual contenía la mezcla empleada en la reacción de PCR sin ADN molde.

Se obtuvieron amplicones de los tamaños esperados para cada uno de los nueve aislamientos y el control positivo para cada una de las seis reacciones en cadena de la polimerasa que se llevaron a cabo. Los controles negativos fueron consistentemente negativos en todas las reacciones.

#### **4.5.3.1 PCR con los primers ITS FuF/ ITS FuR**

Se obtuvieron productos de amplificación de 416 pares de bases aproximadamente para cada uno de los nueve aislamientos y el control positivo. El tamaño esperado del único amplicon según lo reportado por Abd-Elsalam y colaboradores (2003), es de 398pb (Figura 24).

En la Figura 24 pueden observarse diferentes intensidades en las bandas obtenidas del producto de PCR, lo cual puede deberse a la calidad del molde inicial. Para los aislamientos de *Fusarium avenaceum*, la nitidez de las bandas puede deberse a posibles inhibidores y calidad del molde de DNA puesto que se hicieron los cálculos para emplear una concentración de 15ng de DNA para cada reacción a partir de la medición hecha en el fluorómetro del producto de extracción.



**Figura 24.** Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ITS FuF y ITS FuR (Abd-Elsalam *et al.*, 2003). 1. Marcador de peso molecular (1Kb ladder PROMEGA); 2. *Fusarium graminearum* (Britania); 3. *Fusarium graminearum* (Malinche); 4. *Fusarium graminearum* (Palmira) 5. *Fusarium culmorum* (Palmira); 6. *Fusarium culmorum* (Korito); 7. *Fusarium culmorum* (Palmira); 8. *Fusarium avenaceum* (Korito); 9. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 10. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 11. Control positivo *Fusarium oxysporum*; 12. Control negativo *Botrytis cinerea*; 13. Control agua.

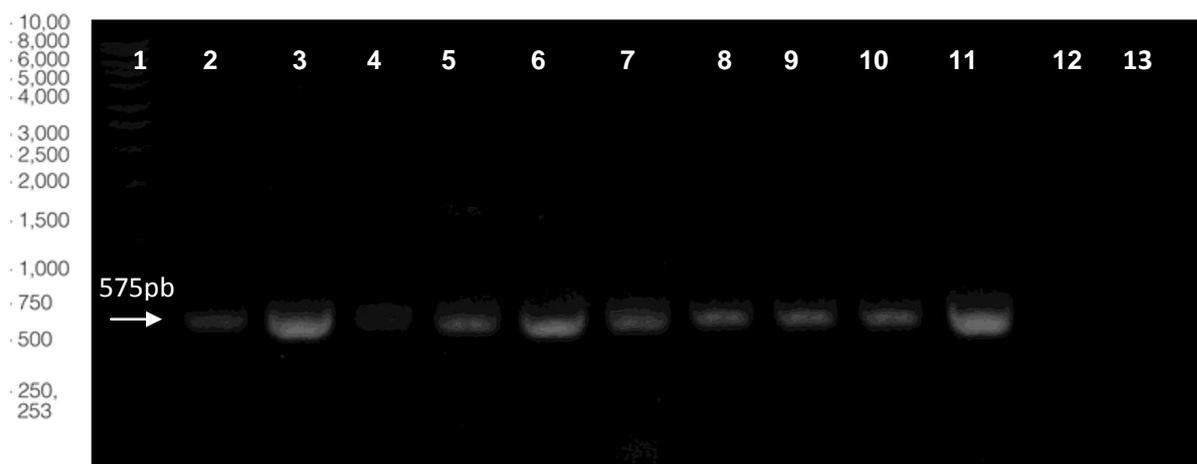
Los parámetros optimizados en la reacción de PCR para la amplificación específica usando los primers ITS FuF y ITS FuR fueron 56° para la temperatura de annealing, una concentración de 6mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1mM de concentración para cada primer.

#### 4.5.3.2 PCR con los primers ITS1/ ITS4

Se obtuvieron productos de amplificación de 575 pares de bases aproximadamente para cada uno de los nueve aislamientos y el control positivo. El tamaño esperado del único amplicon según lo reportado por Demirel y colaboradores (2008), es de 570 pares de bases (Figura 26). Para los aislados 4 y 5 pueden observarse amplificaciones inespecíficas de más de

1500 pares de bases, sin embargo, estos aislados presentaron el tamaño del amplicon que se esperaba.

En la Figura 25 pueden observarse bandas de diferente calidad, por ejemplo, para el aislado 2 la calidad del molde de DNA influyo en la calidad de la banda del amplicon.



**Figura 25.** Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ITS 1 y ITS 4 (Demirel *et al.*, 2008). 1. Marcador de peso molecular (1Kb ladder PROMEGA); 2. *Fusarium graminearum* (Britania); 3. *Fusarium graminearum* (Malinche); 4. *Fusarium graminearum* (Palmira) 5. *Fusarium culmorum* (Palmira); 6. *Fusarium culmorum* (Korito); 7. *Fusarium culmorum* (Palmira); 8. *Fusarium avenaceum* (Korito); 9. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 10. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 11. Control positivo *Fusarium oxysporum*; 12. Control negativo *Botrytis cinerea*; 13. Control agua.

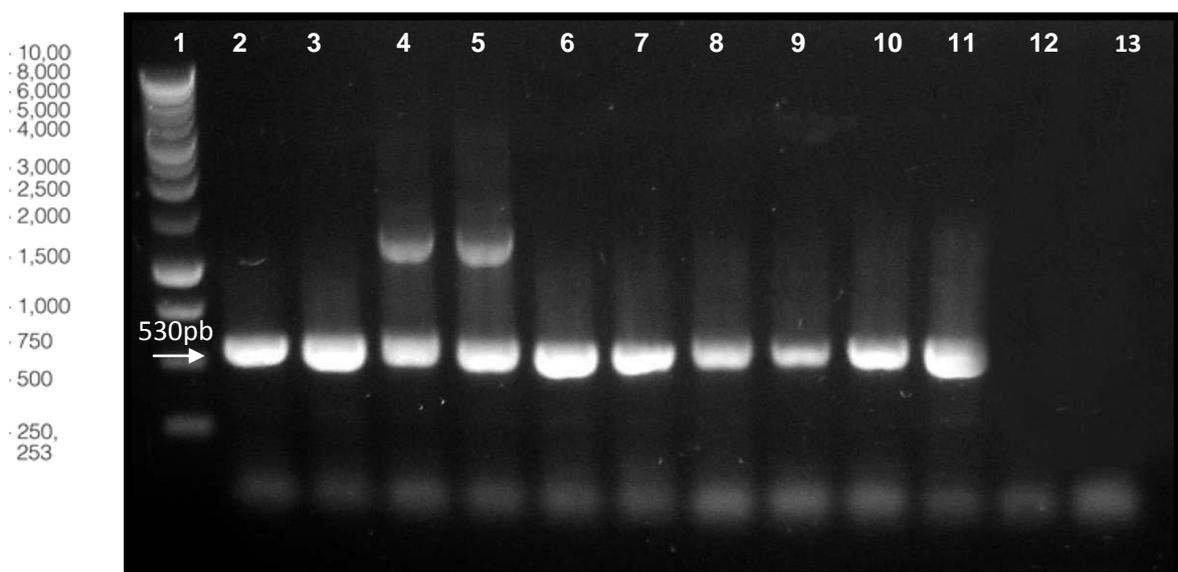
Los parámetros optimizados en la reacción de PCR para la amplificación específica usando los primers ITS1 y ITS4 fueron 55.8° para la temperatura de annealing, una concentración de 6mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1mM de concentración para cada primer.

#### 4.5.3.3 PCR con los primers ITS4/ ITS5

Se obtuvieron productos de amplificación de 530 pares de bases aproximadamente para cada uno de los nueve aislamientos y el control positivo. El tamaño esperado del único amplicon según lo reportado por

Reynoso y colaboradores (2008), es de 524 pares de bases (Figura 26). Para los aislados 3 y 4 pueden observarse amplificaciones inespecíficas de más de 1500 pares de bases, sin embargo, estos aislados presentaron el tamaño del amplicon que se esperaba.

En la Figura 26 se observan bandas de gran grosor para cada uno de los nueve aislados y el control positivo, lo cual indica gran afinidad por parte de los primers con los moldes empleados en la PCR; sin embargo, se observa un poco de barrido y una nube de residuos de la PCR en la parte inferior del gel.



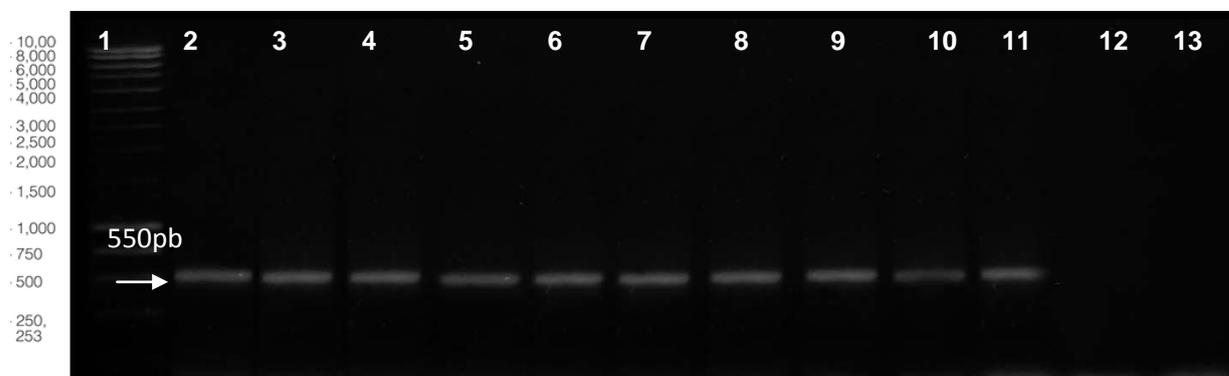
**Figura 26.** Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ITS 4 y ITS 5 (Reynoso *et al.*). 1. Marcador de peso molecular (1Kb ladder PROMEGA); 2. *Fusarium graminearum* (Britania); 3. *Fusarium graminearum* (Malinche); 4. *Fusarium graminearum* (Palmira) 5. *Fusarium culmorum* (Palmira); 6. *Fusarium culmorum* (Korito); 7. *Fusarium culmorum* (Palmira); 8. *Fusarium avenaceum* (Korito); 9. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 10. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 11. Control positivo *Fusarium oxysporum*; 12. Control negativo *Botrytis cinerea*; 13. Control agua.

Los parámetros optimizados en la reacción de PCR para la amplificación específica usando los primers ITS4 y ITS5 fueron 51.7° para la temperatura de annealing, una concentración de 6mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1mM de concentración para cada primer.

#### 4.5.3.4 PCR con los primers AHyF/AHyR

Se obtuvieron productos de amplificación de 550 pares de bases aproximadamente para cada uno de los nueve aislados y el control positivo. El tamaño esperado del único amplicon según lo reportado por Gilmore y colaboradores (2007) es de 567 pares de bases (Figura 27).

Los amplicones observados en la Figura 27 presentan alta calidad, tienen gran nitidez, poco barrido y el bandeo es definido.



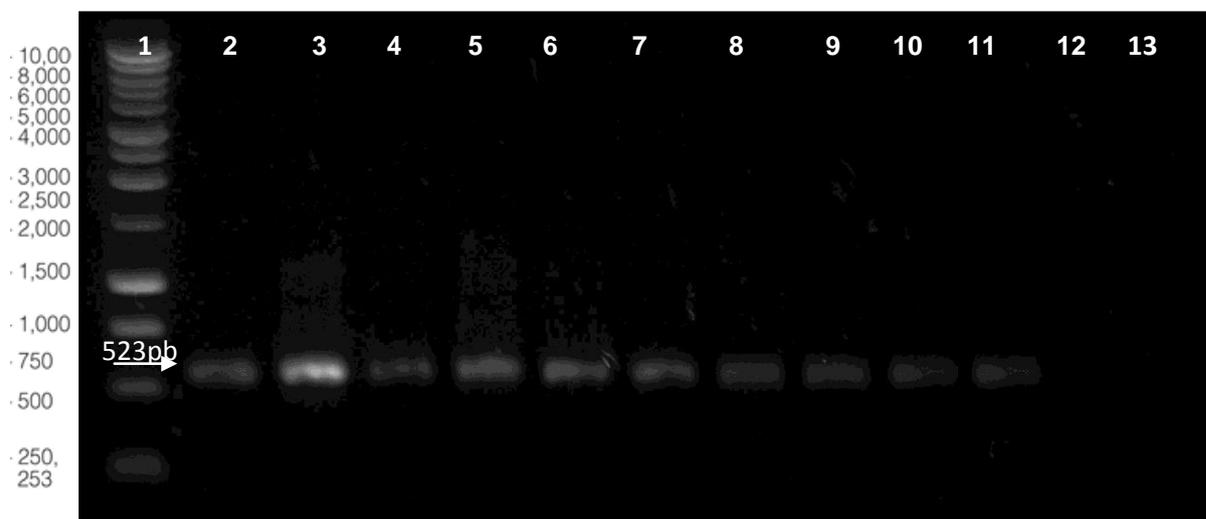
**Figura 27.** Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers AHyF y AHyR (Gilmore *et al.*, 2007). 1. Marcador de peso molecular (1Kb ladder PROMEGA); 2. *Fusarium graminearum* (Britania); 3. *Fusarium graminearum* (Malinche); 4. *Fusarium graminearum* (Palmira) 5. *Fusarium culmorum* (Palmira); 6. *Fusarium culmorum* (Korito); 7. *Fusarium culmorum* (Palmira); 8. *Fusarium avenaceum* (Korito); 9. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 10. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 11. Control positivo *Fusarium oxysporum*; 12. Control negativo *Botrytis cinerea*; 13. Control agua.

Los parámetros optimizados en la reacción de PCR para la amplificación específica usando los primers AHyF y AHyR fueron 57.2° para la temperatura de annealing, una concentración de 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1mM de concentración para cada primer.

#### 4.5.3.5 PCR con los primers Bt2a/Bt2b

Se obtuvieron productos de amplificación de 523 pares de bases aproximadamente para cada uno de los nueve aislados y el control positivo. El tamaño esperado del único amplicon según lo reportado por Glass y colaboradores, (1995) es de 518 pares de bases (Figura 28).

Pueden observarse en la Figura 28 amplicones definidos, sin barrido y de buena calidad.



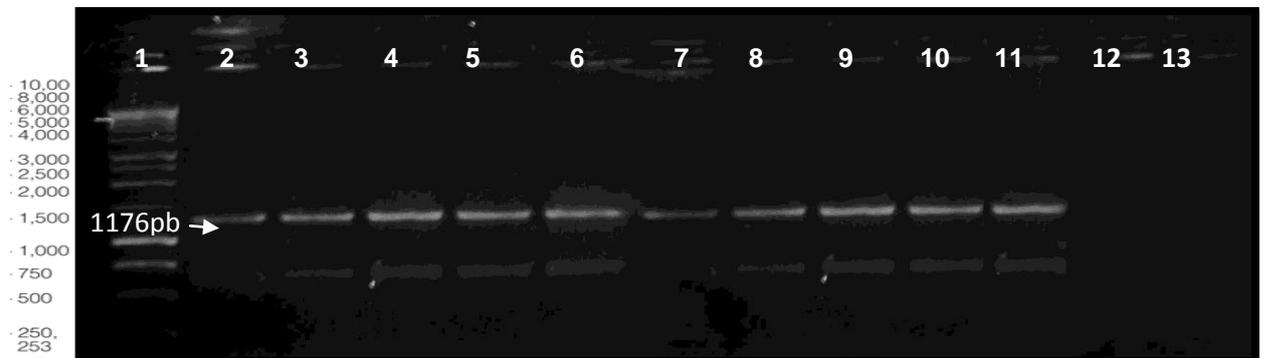
**Figura 28.** Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers Bt2a y Bt2b (Glass *et al.*, 1995). 1. Marcador de peso molecular (1Kb ladder PROMEGA); 2. *Fusarium graminearum* (Britania); 3. *Fusarium graminearum* (Malinche); 4. *Fusarium graminearum* (Palmira) 5. *Fusarium culmorum* (Palmira); 6. *Fusarium culmorum* (Korito); 7. *Fusarium culmorum* (Palmira); 8. *Fusarium avenaceum* (Korito); 9. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 10. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 11. Control positivo *Fusarium oxysporum*; 12. Control negativo *Botrytis cinerea*; 13. Control agua.

Los parámetros optimizados en la reacción de PCR para la amplificación específica usando los primers Bt2a y Bt2b fueron 60.65° para la temperatura de annealing, una concentración de 2.4mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1mM de concentración para cada primer.

#### 4.5.3.6 PCR con los primers ACTIN 5FWAACT/ACTIN REVACT

Se obtuvieron productos de amplificación de 1176 pares de bases aproximadamente como el amplicon de interés para cada uno de los nueve aislados y el control positivo. Se observan amplicones de aproximadamente 600 pares de bases mucho más tenues como lo reporta Weiland y colaboradores (2000). El tamaño del amplicon esperado según lo reportado por este autor es de 1200 pares de bases (Figura 29). La aplicación de la técnica de PCR usando los primers 5FWDACT y REVACT sobre hongos genera diferentes productos de DNA.

En la Figura 29 se observan amplicones de diferentes tamaños, los de mayor migración menos nítidos que los de menor migración, lo cual es específico de los primers empleados. Se observan bandas de buena calidad.



**Figura 29.** Producto de amplificación de la PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR usando los primers ACTIN 5FWDACT y ACTIN REVACT (Weiland *et al.*, 2000). 1. Marcador de peso molecular (1Kb ladder PROMEGA); 2. *Fusarium graminearum* (Britania); 3. *Fusarium graminearum* (Malinche); 4. *Fusarium graminearum* (Palmira) 5. *Fusarium culmorum* (Palmira); 6. *Fusarium culmorum* (Korito); 7. *Fusarium culmorum* (Palmira); 8. *Fusarium avenaceum* (Korito); 9. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 10. *Fusarium avenaceum* (Palmira); 11. Control positivo *Fusarium oxysporum*; 12. Control negativo *Botrytis cinérea*; 13. Control agua.

Los parámetros optimizados en la reacción de PCR para la amplificación específica usando los primers ACTIN 5FWDACT y ACTIN REVACT fueron

58.3° para la temperatura de annealing, una concentración de 1.65mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1mM de concentración para cada primer.

#### **4.5.4. Identificación por PCR del género *Fusarium***

Para los ensayos de PCR realizados con los seis pares de primers diferentes pudo observarse que la concentración de ADN empleada fue suficiente para una fiable amplificación específica de la PCR con los primers seleccionados para el estudio. Los controles negativos procesados simultáneamente fueron consistentemente negativos en todas las reacciones realizadas. Para lograr una amplificación óptima se requirió una estandarización previa de condiciones específicas para la reacción de PCR con los moldes de ADN de la sección *roseum* como lo son concentración de MgCl<sub>2</sub>, concentración de primers y temperatura de annealing pese a la abundante literatura acerca de las dinámicas y estequiometría para los reactivos y condiciones de PCR.

ITS's: Los genes rRNA, comúnmente usados en identificación y en estudios taxonómicos fueron confirmados en este estudio por ser apropiados en el propósito de proveer secuencias blanco de detección molecular para el género *Fusarium*. Las diferencias existentes en la región ITS permitieron el diseño de diferentes pares de primers que amplifican ADN selectivamente; por esta razón se emplearon los primers ITSFuF/ITSFuR, ITS1/ITS4 y ITS4/ITS5 para identificar el nivel de divergencia de las secuencias de la región ITS dentro de las especies de *F. roseum*.

Cox1: Los primers AHyFuF y AHyFuR, que codifican para el gen *Cox1* diseñados a partir de secuencias del genoma de *Fusarium oxysporum* al ser empleados en reacciones de PCR con moldes de ADN de la sección *roseum* amplifican un fragmento aproximado a los 567pb lo que significa que la secuencia no posee intrones, puesto que si estos estuvieran presentes el tamaño del amplificado oscilaría entre 2000 y 3000 pb según lo reportado por Gilmore y colaboradores en el 2007.

Bt: En este estudio se obtuvo amplificación específica de amplicones de 523pb, no se observaron diferencias en el tamaño de los amplicones por lo que se puede decir que no hay diferencias en el número de intrones en el gen de la  $\beta$ -tubulina entre los hongos pertenecientes a la sección *roseum* y *Fusarium oxysporum*.

ACTIN: El gen que codifica para actina es altamente conservado a través de los eucariotas y por esto es empleado en estudios filogenéticos. Típicamente la actina es un gen altamente expresado, por esto sus secuencias son empleadas para el diseño de primers los cuales posteriormente se convierten en una herramienta útil en la detección de hongos patógenos. Los primers 5FWDACT y REVACT resultaron una herramienta útil para la identificación de los hongos causantes de la pudrición basal del clavel al amplificar fragmentos de 1176pb aproximadamente.

#### **4.6. Secuenciación**

Los productos de amplificación de los nueve aislados con ITS's, *Cox1*, Bt2 y ACTIN fueron purificados y enviados a secuenciar al Cancer Research Center-Universidad de Chicago con el primer Forward y el primer Reverse. Se presentaron problemas con el envío de las muestras por lo cual al momento de la secuenciación no se obtuvieron secuencias. Se cree que hubo un problema de contaminación en las mismas por lo que solo se obtuvieron N's. Posteriormente se enviaron a secuenciar nuevamente el producto purificado de amplificación de PCR con los primers ITS1/ITS4, ITSFuF/ITSFuR y Bt2a/Bt2b.

Una vez obtenidas las secuencias consenso con el software CLC Sequence Viewer 6 (Version 6.2) para los primers ITS1/ITS4 (Anexo1), ITSFuF/ITSFuR (Anexo 2), Bt2a/Bt2b (Anexo 3) y se realizó el BLAST de estas en NCBI (National Center for Biotechnology Information).

**4.6.1 Alineamientos de *Fusarium roseum* (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*) con los primers ITS1/ITS4 (Ver Anexo 1)**

**Tabla 13. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium graminearum* primers ITS1/ITS4.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium graminearum* (Query length 307).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
GU327636.1	Gibberella zeae strain ATCC MYA-4620 18S ribosomal RNA gene	99%	4e-157	100%
GU183128.1	Giberella zeae strain NRRL 52414 internal transcriber spacer 1	99%	4e-157	100%
FJ210626.1	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56630-9-43 S ITS	99%	4e-157	100%
FJ210625.1	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56643-6-43 E ITS	98%	4e-157	100%
FJ210619.1	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56071-4-10 LL ITS	98%	4e-157	100%
FJ210617.1	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56071-4-10 LL ITS	98%	4e-157	100%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (ITS1) y del primer reverse (ITS4) para cada uno de los tres aislados clasificados como *Fusarium graminearum* por observaciones macroscópicas y microscópicas arrojaron un 99% de máxima identidad con secuencias de *Giberella zeae*, la cual corresponde al estado sexual de *Fusarium graminearum*. Se puede observar un Evalue de 4e-157 lo cual puede deberse a la calidad de la secuencia.

**Tabla 14. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium culmorum* primers ITS1/ITS4.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium culmorum* (Query length 420).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
FJ746660.1	Fusarium venenatum strain ATCC 20334 18S ribosomal RNA gene	96%	7e-145	100%
FJ545225.1	Fusarium venenatum strain ATCC 200562 18S	96%	7e-145	100%

ribosomal RNA gene				
<b>DQ026011.1</b>	Giberella pulicaris AHS-481-246 18S ribosomal RNA gene	96%	7e-145	100%
<b>AY842395.1</b>	Fusarium sp. 04M 160 small subunit ribosomal RNA gene	96%	7e-145	100%
<b>AF006359.1</b>	Fusarium venenatum NRRL 26228 internal transcriber spacer 1	96%	7e-145	100%
<b>AF006358.1</b>	Fusarium venenatum NRRL 26139 internal transcriber spacer 1	96%	7e-145	100%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (ITS1) y del primer reverse (ITS4) para cada uno de los tres aislados clasificados como *Fusarium culmorum* por observaciones macroscópicas y microscópicas arrojaron un 96% de máxima identidad con secuencias de *Fusarium venenatum*, el bajo porcentaje de identidad puede deberse a la mala calidad de las secuencias obtenidas. Se puede observar un Evalue de 7e-145 lo cual puede deberse a la calidad de la secuencia.

**Tabla 15. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium avenaceum* primers ITS1/ITS4.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium avenaceum* (Query length 476).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
<b>AB369418.1</b>	Gibberella avenacea genes for ITS1	100%	0.0	100%
<b>EU255804.1</b>	Gibberella avenacea isolate FA14 18S ribosomal RNA gene	100%	0.0	100%
<b>EU255802.1</b>	Gibberella avenacea isolate FA12 18S ribosomal RNA gene	100%	0.0	100%
<b>AF009185.2</b>	Gibberella avenacea internal transcriber spacer 1	100%	0.0	100%
<b>GQ922561.1</b>	Fusarium tricinctum isolate d9 18S ribosomal RNA gene	100%	0.0	100%
<b>GU480953.1</b>	Fusarium sp. HMA-16 18S ribosomal RNA gene	100%	0.0	100%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (ITS1) y del primer reverse (ITS4) para cada uno de los tres aislados clasificados como *Fusarium avenaceum* por observaciones macroscópicas y microscópicas

arrojaron un 100% de máxima identidad con secuencias de *Fusarium* y *Giberella avenacea*, la cual corresponde al estado sexual de *Fusarium avenaceum*.

#### 4.6.2 Alineamientos de *Fusarium roseum* (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*) con los primers ITSFuF/ITSFuR (Ver Anexo 2)

**Tabla 16. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium graminearum* primers ITS FuF/ITS FuR.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium graminearum* (Query length 380).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
GQ221858.1	Giberella zeae strain NRRL 31250 internal transcribed spacer 1	99%	0.0	100%
EF421239.1	Fusarium culmorum from Chia internal transcribed spacer 1	99%	0.0	100%
GU327636.1	Giberella zeae strain ATCC MYA-4620 18S ribosomal RNA gene	99%	0.0	99%
FJ210626.1	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56630-9-43-S internal transcribed spacer	99%	0.0	99%
FJ210625.1	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56643-6-43-E internal transcribed spacer	99%	0.0	99%
FJ210618.1	Fusarium sp. JJP-2009a isolate 56689-2-45-E internal transcribed spacer	99%	0.0	99%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (ITSFuF) y del primer reverse (ITSFuR) para cada uno de los tres aislados clasificados como *Fusarium graminearum* por observaciones macroscópicas y microscópicas arrojaron un 99% de máxima identidad con secuencias de *Giberella zeae*, la cual corresponde al estado sexual de *Fusarium graminearum*.

**Tabla 17. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium culmorum* primers ITS FuF/ITS FuR.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium culmorum* (Query length 369).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
FJ746660.1	Fusarium venenatum strain ATCC 20334 18S ribosomal RNA gene	99%	0.0	99%
FJ545225.1	Fusarium venenatum strain ATCC 200562 18S ribosomal RNA gene	99%	0.0	99%
EU853843.1	Fusarium venenatum strain ATCC 20334 18S ribosomal RNA gene	99%	0.0	99%
AY842395.1	Fusarium sp. 04M 160 small subunit ribosomal RNA gene	99%	0.0	99%
AF111063.1	Fusarium venenatum strain BBA68425 internal transcribed spacer 1	99%	0.0	99%
AF006359.1	Fusarium venenatum QP internal transcribed spacer 1	99%	0.0	99%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (ITSFuF) y del primer reverse (ITSFuR) para cada uno de los tres aislados clasificados como *Fusarium culmorum* por observaciones macroscópicas y microscópicas arrojaron un 99% de máxima identidad con secuencias de *Fusarium venenatum*.

**Tabla 18. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium avenaceum* primers ITS FuF/ITS FuR.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium avenaceum* (Query length 476).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
AB369418.1	Gibberella avenacea genes for ITS1, 5.8S Rna	100%	0.0	100%
EU255804.1	Gibberella avenacea isolate FA14 18S ribosomal RNA gene	100%	0.0	100%
EU255802.1	Giberella avenacea isolate FA12 18S ribosomal RNA gene	100%	0.0	100%
AF009185.2	Giberella avenacea internal transcribed spacer	100%	0.0	99%
GQ922561.1	Fusarium tricinctum isolate d9 18S ribosomal RNA gene	100%	0.0	99%
AB470843.1	Fusarium tricinctum genes for 18S rRNA	100%	0.0	99%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (ITSFuF) y del primer reverse (ITSFuR) para cada uno de los tres aislados clasificados como

*Fusarium avenaceum* por observaciones macroscópicas y microscópicas arrojaron un 100% de máxima identidad con secuencias de *Fusarium* y *Giberella avenacea*, la cual corresponde al estado sexual de *Fusarium avenaceum*.

#### 4.6.3 Alineamientos de *Fusarium roseum* (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*) con los primers Bt2a/Bt2b (Ver Anexo 3)

**Tabla 19. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium graminearum* primers Bt2a/Bt2b.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium graminearum* (Query length 248).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
AF314496.1	Giberella zeae strain MRC1113 beta-tubulin gene	98%	1e-121	100%
AF314495.1	Giberella zeae strain CMW962 beta-tubulin gene	98%	1e-121	100%
AF314495.1	Giberella zeae strain CMW961 beta-tubulin gene	98%	1e-121	100%
DQ459636.1	Giberella zeae strain NRRL29149 beta-tubulin gene	98%	5e-120	100%
DQ459635.1	Giberella zeae strain NRRL38371 beta-tubulin gene	98%	5e-120	100%
DQ459634.1	Giberella zeae strain NRRL38393 beta-tubulin gene	98%	5e-120	100%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (Bt2a) y del primer reverse (Bt2b) para cada uno de los tres aislados clasificados como *Fusarium graminearum* por observaciones macroscópicas y microscópicas arrojaron un 98% de identidad con secuencias de *Giberella zeae*, la cual corresponde al estado sexual de *Fusarium graminearum*, y un E-value menor por lo cual se toman estos resultados como los más óptimos.

**Tabla 20. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium culmorum* primers Bt2a/Bt2b.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium culmorum* (Query length 151).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
<b>GQ915449.1</b>	<i>Fusarium venenatum</i> strain FRC R-09186 beta-tubulin (TUB2) gene	99%	9e-71	100%
<b>AF006379.1</b>	<i>Fusarium venenatum</i> beta-tubulin gene	99%	9e-71	100%
<b>AF006378.1</b>	<i>Fusarium venenatum</i> beta-tubulin gene	99%	9e-71	100%
<b>AF006377.1</b>	<i>Fusarium venenatum</i> beta-tubulin gene	99%	9e-71	100%
<b>AF006376.1</b>	<i>Fusarium venenatum</i> beta-tubulin gene	99%	9e-71	100%
<b>AF006375.1</b>	<i>Fusarium venenatum</i> beta-tubulin gene	99%	9e-71	100%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (Bt2a) y del primer reverse (Bt2b) para cada uno de los tres aislados clasificados como *Fusarium culmorum* por observaciones macroscópicas y microscópicas arrojaron un 99% de máxima identidad con secuencias de *Fusarium venenatum*. Se puede observar un Evalue de 9e-71 lo cual puede deberse a la calidad de la secuencia.

**Tabla 21. Alineamiento en NCBI-BLAST *Fusarium avenaceum* primers Bt2a/Bt2b.** Obtenido al comparar la secuencia consenso de los aislamientos caracterizados macroscópica y microscópicamente como *Fusarium avenaceum* (Query length 136).

No. Accesion	Organismo	Max ident	E Value	Query coverage
<b>GQ915436.1</b>	<i>Fusarium avenaceum</i> strain FRC R-09495 beta-tubulin (TUB2) gene	83%	8e -36	99%
<b>EU490255.1</b>	<i>Fusarium avenaceum</i> isolate ICMP12585 beta-tubulin gene	83%	8e -36	99%
<b>EU490254.1</b>	<i>Fusarium avenaceum</i> isolate ICMP11864 beta-tubulin gene	83%	8e -36	99%
<b>EU490252.1</b>	<i>Fusarium avenaceum</i> isolate ICMP12044 beta-tubulin gene	83%	8e -36	99%
<b>EU490250.1</b>	<i>Fusarium avenaceum</i> isolate ICMP10088 beta-tubulin gene	83%	8e -36	99%
<b>EU490245.1</b>	<i>Fusarium avenaceum</i> isolate MTT92015 beta-tubulin gene	83%	8e-36	99%

El alineamiento realizado con las secuencias del primer forward (Bt2a) y del primer reverse (Bt2b) para cada uno de los tres aislados clasificados como *Fusarium avenaceum* por observaciones macroscópicas y microscópicas arrojaron un 83% de máxima identidad con secuencias de *Fusarium avenaceum*, el bajo porcentaje se debe a que la secuencia obtenida es muy corta y no es de buena calidad dado a que contiene N's. Se puede observar un Evalue de  $8e-36$  lo cual puede deberse a la calidad de la secuencia.

#### **4.6.4 Secuenciación de los productos de PCR de los nueve aislamientos**

Mediante el análisis de datos de secuencias de DNA se puede llegar a encontrar la especie filogenética.

De acuerdo con los datos obtenidos en los alineamientos para cada uno de los aislamientos clasificados como *F. avenaceum*, *F. culmorum* y *F. graminearum* por caracterización macroscópica y microscópica (especie morfológica) se puede decir lo siguiente:

- *Fusarium graminearum*: Al realizar el BLAST de los alineamientos de las secuencias se obtuvieron máximas identidades para *Fusarium* sp., y *Giberella zeae*. La bibliografía reporta que *Giberella zeae* es el estado sexual conocido para *Fusarium graminearum*. Con los anteriores resultados y los obtenidos mediante caracterización macroscópica y microscópica se puede decir que los aislamientos 1, 2 y 3 pertenecen a la especie *Fusarium graminearum*.
- *Fusarium culmorum*: Pese a que la caracterización macroscópica y microscópica permitió clasificar los aislamientos 4, 5 y 6 como pertenecientes a *Fusarium culmorum*, al realizar los alineamientos con cada una de las secuencias obtenidas se obtuvieron identidades del 99% con *Fusarium venenatum*. Esto podría caracterizar a los aislamientos 4, 5 y 6 como *Fusarium culmorum* la especie morfológica y *Fusarium venenatum* la especie filogenética. Sin embargo, al revisar en

la bibliografía acerca de la taxonomía de *Fusarium venenatum*, se encontró que Wollenweber y Reinking (1935) incluyen esta especie como *Fusarium culmorum* var. *cerealis* y Nelson y colaboradores (1983) incluyen esta especie de *Fusarium venenatum* en *Fusarium culmorum*. Por tanto el reconocimiento taxonómico realizado para los aislamientos 4, 5 y 6 indica que estos pertenecen a *Fusarium culmorum*.

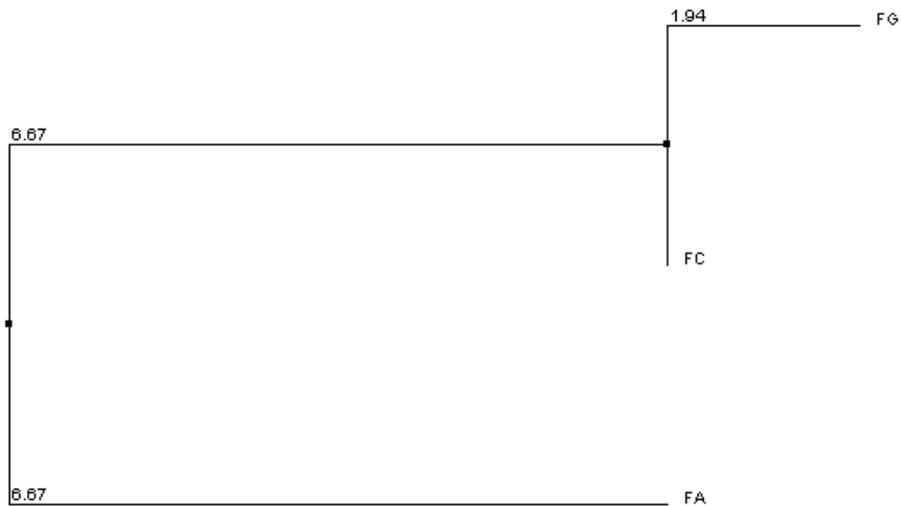
- *Fusarium avenaceum*: Al realizar el BLAST de los alineamientos de las secuencias se obtuvieron máximas identidades para *Fusarium* sp., *Giberella avenacea* y *Fusarium avenaceum*. La bibliografía reporta que el estado sexual de *Fusarium avenaceum* es *Giberella avenacea* (Cook), por tanto, con los resultados de caracterización molecular sumados con los resultados de caracterización macroscópica y microscópica puede corroborarse que los aislamientos 7, 8 y 9 pertenecen a *Fusarium avenaceum*.

#### **4.6.5 Relaciones filogenéticas**

Se realizó un alineamiento múltiple con cada una de las secuencias consenso obtenidas para los aislamientos estudiados con el fin de obtener las relaciones filogenéticas de *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum*. Se realizó un alineamiento múltiple para cada par de primers mediante el método de Neighbor Joining (NJ) usando porcentaje de identidad, tomando en cuenta el filograma con mayor parsimonia, con el cual se obtuvieron las secuencias: ITS1/ITS4, ITSFuF/ITSFuR y Bt2a/Bt2b. Estos alineamientos se hicieron por medio del software MUSCLE (**M**U**l**tiple **S**equence **C**omparison by **L**og-**E**xpectation).

##### **4.6.5.1 Relaciones filogenéticas de *F. roseum* con los primers ITS1/ITS4**

Mediante el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con los primers ITS1/ITS4, se obtuvo el siguiente filograma.

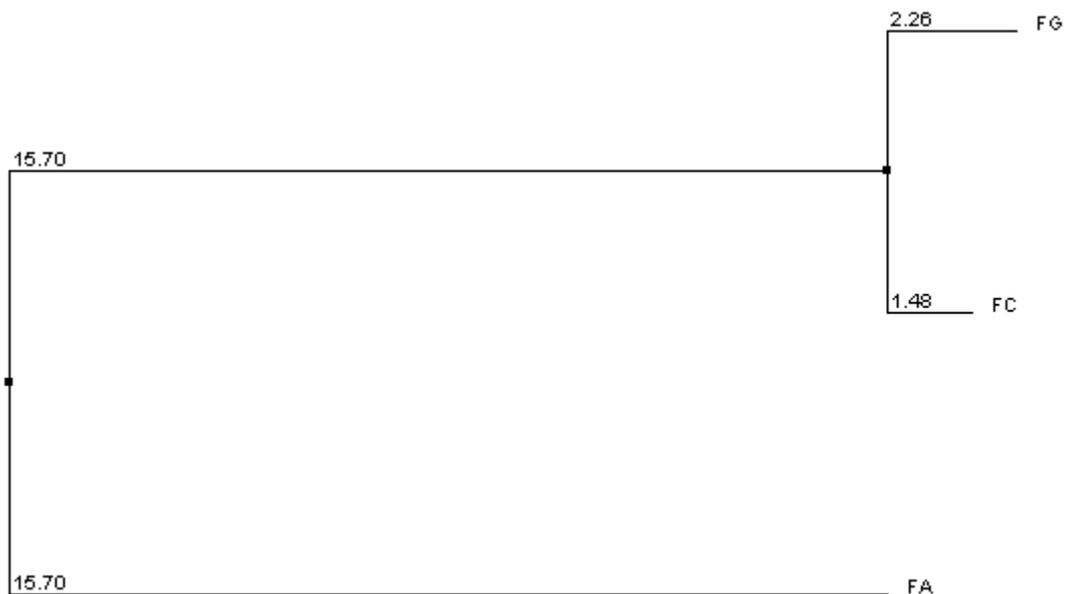


**Figura 30.** Filograma obtenido en MUSCLE con los primers ITS1/ITS4 para FG: *Fusarium graminearum*, FC: *Fusarium culmorum* y FA: *Fusarium avenaceum*.

De acuerdo a la longitud de las ramas puede observarse una menor divergencia del gen para *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*, esto puede inferirse a partir de los valores obtenidos en el árbol filogenético y la distancia entre estas especies y *Fusarium avenaceum*.

#### **4.6.5.2 Relaciones filogenéticas de *Fusarium roseum* con los primers ITSFuF/ITSFuR**

Mediante el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con los primers ITSFuF/ITSFuR, se obtuvo el siguiente filograma.



**Figura 31.** Filograma obtenido en MUSCLE con los primers ITSFuF/ITSFuR para FG: *Fusarium graminearum*, FC: *Fusarium culmorum* y FA: *Fusarium avenaceum*.

De acuerdo a la longitud de las ramas puede observarse una menor divergencia del gen para *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*, esto puede inferirse a partir de los valores obtenidos para cada una de las ramas en el árbol filogenético y la distancia de las ramas de cada una de estas especies y la rama de *Fusarium avenaceum*.

#### 4.6.5.2 Relaciones filogenéticas de *Fusarium roseum* con los primers Bt2a/Bt2b

Mediante el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con los primers Bt2a/Bt2b, se obtuvo el siguiente filograma.



**Figura 32.** Filograma obtenido en MUSCLE con los primers Bt2a/Bt2b para FG: *Fusarium graminearum*, FC: *Fusarium culmorum* y FA: *Fusarium avenaceum*.

De acuerdo a la longitud de las ramas puede observarse una menor divergencia del gen para *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*, esto puede inferirse a partir de los valores obtenidos para cada una de las ramas en el árbol filogenético y la distancia de las ramas de cada una de estas especies y la rama de *Fusarium avenaceum*.

#### 4.6.6 Relaciones filogenéticas de *Fusarium roseum*

Para cada uno de los alineamientos múltiples realizados en MUSCLE, se obtuvo un filograma. Los árboles fueron construidos usando una matriz de distancia usando neighbor-joining, y puede observarse una raíz identificada. Los filogramas obtenidos indican por medio de la longitud de las ramas de los árboles la cantidad de cambio evolutivo inferido, es decir que existe una menor distancia filogenética entre *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* lo cual puede deberse a los caracteres morfológicos (reportado por Leslie y Sumerell (2006) como por ejemplo la producción de micoproteínas y la pertenencia a la misma sección Discolor. La longitud de la rama de *Fusarium avenaceum* indica una mayor distancia filogenética en relación a *Fusarium*

*graminearum* y *Fusarium culmorum*; puede decirse también que estas diferencias evolutivas pueden observarse intrínsecamente en cada una de las diferencias morfológicas de cada especie.

## 5. CONCLUSIONES

La pudrición basal del clavel comercial en la Sabana de Bogotá de las variedades Delphi y Nelson es causada por tres especies: *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum*. Externamente la sintomatología es caracterizada por clorosis, necrosis, deshidratación, pérdida de turgencia, pudrición seca en la base del tallo en donde pueden observarse coloraciones rojizas y marchitamiento del follaje en verde. Internamente estas especies causan necrosis, cavernosidades y pudrición medular seca.

Morfológicamente, *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum* se caracterizan por la producción de fuertes pigmentaciones en los medios de cultivo característica típica de la sección Discolor. *Fusarium avenaceum*, no produce fuertes pigmentaciones en el medio ni coloraciones fuertes en el micelio, característico de la sección Roseum. La velocidad de crecimiento (carácter fisiológico) varía para cada una de las especies; *Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum* presentan una mayor velocidad de crecimiento que *Fusarium avenaceum*. Sin embargo, en el medio de cultivo CLA pudo corroborarse lo observado en campo en cuanto a una mayor colonización por parte de *Fusarium avenaceum* y *Fusarium graminearum* que por parte de *Fusarium culmorum* pese a que este es el que presenta una mayor velocidad de crecimiento *in vitro*. La forma, longitud y abundancia de las macroconidias es diferente para cada una de las especies. La forma del pie, la longitud y la robustez de las macroconidias son los factores claves para la caracterización de cada uno de los aislamientos, dado que pudo observarse que de acuerdo a la longitud, las macroconidias más alargadas pertenecen a *Fusarium avenaceum*, las más robustas a *Fusarium culmorum* y las que tienen la célula apical en forma de hoz y tienen un tamaño intermedio pertenecen a *Fusarium graminearum*.

Mediante el alineamiento y posterior análisis de secuencias por medio de BLAST en NCBI se obtuvo la identidad de las especies filogenéticas causantes de la pudrición basal. *Gibberella avenacea* y *Gibberella zeae* corresponden al estado sexual de *Fusarium avenaceum* y *Fusarium graminearum* respectivamente. Los otros aislamientos presentaron mayor identidad con *Fusarium venenatum*. Sin embargo, autores como Nelson incluyen a *Fusarium venenatum* dentro de la especie *Fusarium culmorum*.

Las relaciones filogenéticas de la sección *roseum* indican un mayor parentesco entre *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* pertenecientes a la misma sección, mientras que *Fusarium avenaceum* es más alejado de estos filogenéticamente.

## 6. RECOMENDACIONES

Es preciso realizar ensayos de PCR con otros pares de primers como FUM1 (gen de la biosíntesis de la fumonisina diseñados por Bluhm *et al.*, 2004) y enviar a secuenciar los productos de amplificación de los mismos, para de esta forma precisar el estado taxonómico de la sección *roseum*.

Realizar ensayos en plantas sanas de clavel comercial para identificar la forma de ataque de cada una de las tres especies estudiadas para de esta forma establecer la relación directa entre síntoma presente en la planta y tipo de parasito que la infecta.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ABD-ELSALAM, K, ALY, I; ABDEL-SATAR, M; KHALIL, M. & VERREET, J. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. En: African Journal of Biotechnology. Vol.; 2. No 4 (2003); p. 82-85.
- AGRIOS, G. Plant pathology. Editorial Elsevier Academic Press. Quinta Edición. San Diego, California, 2005. 425-429p.
- ARBELÁEZ, G. Enfermedades del clavel. Colombia. (1974); p. 23-24.
- ARBELÁEZ, G. Fungal and bacterial disease on Carnation in Colombia. En: Acta Horticulturae (ISHS). Vol.; 216 (1987); p.151-156.
- ARBELÁEZ, G. 1993. Enfermedades vasculares del clavel en Colombia y en el mundo. En: Agronomía Colombiana. Vol.; 10. No. 1 (1993); p.12-16.
- ARBELÁEZ, G Y RODRIGUEZ, M.H. Marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp *dianthi* y pudrición basal del tallo ocasionado por *Fusarium roseum* en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*).Bogotá, 1995. Tesis de maestria. Universidad Nacional de Colombia.
- BAILEY, L.H. The estandar cyclopedia of horticulture. Editorial Mac Millan. New York, 1928. Vol 1; 665-667p.
- BIAL, ARISTEGUI. *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo. En: Revista Iberoamericana de Micología (2002); p. 31-32.
- CARRILLO, L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad

Nacional de Salta (2003); p.70-80.

- CENIS, J. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Department of Vegetal Protection, CIT-INIA. Madrid, Spain. En: Nucleic Acid Research. Vol. 20. No. 9 (1992); p.2380.
- DEMIREL, R, YILMAZ, N, ÍLHAN, S. PCR Identification of *Fusarium* species isolated from agricultural soils in Eskisehir province. En: 10<sup>th</sup> International *Fusarium* Workshop and *Fusarium* genomics Workshop. Alghero Sardinia (Italy) (2008).
- FILGUEIRA, J.J QUINCHE, C y SOTO, J. ¿*Fusarium verticillioides* es el responsable del decaimiento de la variedad Nelson en la Sabana de Bogotá?. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Biología, Universidad Militar “Nueva Granada”. En: Asocolflores No 69; p. 51-56.
- FILGUEIRA J.J, ARBELÁEZ, G y CLAVIJO, M. Estudio y Manejo de la Pudrición Basal Producida por *F. roseum* y *F. verticillioides* En Clavel Comercial en la Sabana de Bogotá. Elaborado para Ceniflores (2008).
- FILGUEIRA, J.J. Técnicas para el mejoramiento del clavel. Comunicación personal (2007).
- GLASS, N, DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes (1995).
- GILMORE, S, GRÄFENHAN, T, SEIFERT, K. Multiple copies of Cox1 in species of the Fungal Genus *Fusarium*. Canada (2007).

- GONG, Q, HAN, F, DAI, J, LIU, H, GUAN, H, YU, W. Rapid isolation and sequence analysis of the beta-tubulin gene from *Porphyra yezoensis* (Rodophyta). Journal of Applied Phycology. Vol.; 17 (2007); p.1-5.
- HICKEY, M., KING, C. Common Families of Flowering Plants. Cambridge University Press (1997).
- HOLLEY, W., BAKER, R. Carnation production. Grower Publications (1963).
- JUDD, W, CAMPBELLI, C, KELLOG, E, STEVENS, P y DONOGHUE, M. Plant systematic. Second edition (2002).
- LESLIE, J, SUMMERELL, B. The *Fusarium* Laboratory manual. Blackwell Publishing (2006).
- LOUISE, N, DONALDSON, G. Development of Primer Sets designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology. Vol.; 61. (1995); p. 1323-1330.
- MAGAN, N, HOPE, R, ALDRED, D. Ecophysiology of *Fusarium culmorum* and mycotoxin production (2004).
- MARTINEZ, J, MONTES, E, TENJO, F. Comportamiento reciente (2000-2005) del sector floricultor Colombiano (2006).
- OGRT (Office of the Gene Technology Regulator). The Biology and Ecology of *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology regulator. En: Australian Government. No18 (2006).

- ORTÍZ, L.F Y PIZANO, M. Pudrición *Fusarium* (*Fusarium roseum*). Clavel. Ed hortitecnia Ltda. Bogotá- Colombia. (2000); p. 107-110.
- QUINCHE, C. Evaluación de técnicas in vitro para establecer valores de resistencia en el clavel híbrido al ataque de los hongos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium roseum*. Bogotá, 2006. Tesis de. Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias.
- RATTINK, H. Aspectos generales de la enfermedad de la marchites por *Fusarium* del clavel. Editorial Hortitecnia. Bogotá –Colombia (2000).
- REYNOSO, M, CASASNOVAS, F, CHULZE, S, LESLIE, J, TORRES, A. Phylogenetic analysis of a population of *Fusarium solani* associated with peanut brown root rot in Argentina (2008).
- RONCERO, M, HERA, C, RUIZ-RUBIO, M, GARCIA, F, MADRID, M, CARACUEL, Z, CALERO, F, DELGADO, F, ROLDÁN, R, MARTÍNEZ, A, NELASCO, C, ROA, J, MARTÍN, M, CÓRDOBA, D, DI PIETRO, A. Review: *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. Physiological and molecular Plant Pathology. Vol.; 62 (2003); p. 87-98.
- SOLANO, A. Guía Ambiental para la Floricultura. Documento informativo. Presidente ejecutivo de Asocolflores, Augusto Solano Mejia (2002).
- SOTO, J.C. Y PABON, F. Relación entre el color de las flores de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y la resistencia a parásitos vasculares. Bogotá, 2006. Tesis de grado. Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias Básicas.

- SPARNAAIJ, L.D y DEMMINK, JF. Carnation of the future (Dianthus breeding, modern horticulture techniques). En: Acta Horticulture (1983).
- SREENIVASA, M.Y., SHARMILA, A.P., CHARITH, R., y JANARDHANA, G.R. PCR Method for the detection of genus *Fusarium* and Fumonisin-producing isolates from freshly harvested sorghum grains grown in Karnataka, India. En: Journal of Food Safety. Vol.; 28 (2008); p. 236-247.
- WEILAND, J, SUNDSBAK, J. Differentiation and Detection of Sugar Beet Fungal Pathogens Using PCR Amplification of Actin Coding Sequences and the ITS Region of the rRNA Gene. USA (2000).
- WHEALY, C.A. En: Introduction to floriculture. R. A. Larson Second edition. Academic Press Inc. New York. No 2(1992);p. 43-65.

## 8. CONSULTA VIRTUAL

- ASOCOLFLORES. Quienes somos/Datos de la floricultura. {En línea}. 2008. {Septiembre 28 de 2008}. Disponible en <http://www.asocolflores.org/>.
- ZIPCODEZOO. *Dianthus caryophyllus* {En línea}. ©2004-2008. {Febrero 5 de 2010}. Disponible en <http://zipcodezoo.com/plants>
- *Fusarium interactive key*. (Agr & Agri-Food Canada). {En línea}. {Diciembre 15 de 2009}.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information. {En línea}. {Febrero de 2010}. Disponible en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
- Edgar, Robert C. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97. {En línea}. {Abril 25 de 2010}. Disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Secuencias consenso de los aislamientos de *Fusarium roseum* con los primers ITS1/ITS4

### >Aislamientos *Fusarium graminearum*

CCCGCGCCCCGTAAAAAGGGAGGCCCGCCGCANGAACCCCTAAACTCTGT  
TTTTAGTGGAACCTTCTGAGTATAAAAAACAAATAAATCAAAACTTTCAACAA  
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAG  
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC  
GCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCT  
CAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCCTGCTGCACTCCCCAAATA  
CATTGG

### >Aislamientos *Fusarium culmorum*

AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC  
AAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT  
GAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGC  
GTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGGTTGGGAGCTGTTTTAGTTAACA  
CTCCCCAAATTGATTGGGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTATAATTTACA  
CGTCTGGTAATCGACGCGGCCCGCCGTTAACCCCAACTTCTGAATGTGAC  
CTCGGA

### >Aislamientos *Fusarium avenaceum*

CTNCNAACCCCTGTGANATACCTTAANGTNGCCTCGGNGNATCAGCCNNG  
NCCCNNAAAAAGGGNNGNCCNGCGAGAGNACCCTAANTNTANTGTTTNTT  
GTTACTTNTGAGAAAAAAAAAAAAAAAAANCAAACTNNCAACAACNGNTCT  
CTTGGTTCTGGCATCGATGAANAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGA  
ATTGNNGAATTCANTGAAGAATCNAATCTTTNAACGCACATTGNNNCCGCN  
GGTNNTCCGGCGGGCATGCCTGTTNAGNGTCATTTCAACCCTCNAGCCC  
CCGGGTTTGGGGTTGGGGATCGGCTCTGCCTTCTGGCNGTGCCGCCCCC

NAAATNCATNGGNGGTCTCGCTGCAGCCTCNATTGCNTNGTANCTNACAC  
NTNNCANNTGGAACGCGGCGCGGCCAGCCGTAAAACCCCAACTTCTGANT  
GTTNACCTCG

**Anexo 2.** Secuencias consenso de los aislamientos de *Fusarium roseum* con los primers ITS FuF/ITS FuR

**>Aislamientos *Fusarium graminearum***

TCAACTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGC  
CCGCGCCCCGTAAAAAGGGACGGCCCGCCGCAGGAACCCTAAACTCTGT  
TTTTAGTGGAACCTTCTGAGTATAAAAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAA  
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAG  
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC  
GCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCT  
CAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGCAGTCCTGCTGCACTCCCCAAATA  
CATTGGCGGTCACGTCGAGCTTACCA

**>Aislamientos *Fusarium culmorum***

TGATCAGCCCGTTCCTCACGGAACGGCCCGCCGCAGGACCCCTAAACTCT  
GTTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAAAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACA  
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAA  
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACC  
CTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGAGCTGTTTTAGTTAACACTCCCCAAATT  
GATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACACATCGTTAC  
TGGTAATCGTCGCA

**>Aislamientos *Fusarium avenaceum***

TTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCC  
GAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTTACGGCATGGCCGCGCCGCGTTCC  
CAGTTGCGAGGTGTTAGCTACTACGCAATGGAGGCTGCAGCGAGACCCGC

CAATGTATTTTCGGGGGCGGCACCGCCAGAAGGCAGAGCCGATCCCCAAC  
ACCAAACCCGGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC  
CGCCGGAATACCAGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAC  
TGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTTGTTTA  
CTCAGAAGTTACAATAAGAAACATTAGAGTTTGGGTCCTCTGGCGGGCCGT  
CCCGTTTTACGGGGCGCGGGCTG

**>Aislamiento *Fusarium oxysporum***

CCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTG  
TTTCTATATGTA ACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAA  
CGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAG  
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC  
GCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCT  
CAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCCAAATTGA  
TTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGT TACTG  
GTAATCGTCGCA

**Anexo 3.** Secuencias consenso de los aislamientos de *Fusarium roseum* con los primers Bt2a/Bt2b

**>Aislamiento *Fusarium graminearum***

CTGGCGAGCACGGTCTTGACAGCAATGGTGT TTTACAACGGCACCTCTGAG  
CTCCAGCTCGAGCGCATGANCGTTTACTTCAACGAGGTTTGTTCAGTCACT  
ACTGCCACGAAAAATACAAGCTCACGCATGTAGGCCTCCGGTAACAAGTAT  
GTTCCCCGTGCCGTCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGT  
CCGTGCTGGTCCTTTTCGGACAGCTTTTCCGACCCGACA ACTTCGTT

**>Aislamiento *Fusarium culmorum***

AAAAACACAAGCTCACGTGTGTAGGCCTCTGGTAACAAGTATGTTCCCCGT  
GCCGTCCTCGTTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCG  
GTCCCTTCGGACAGCTTTTCCGACCCGACAACCTTCGGTTTCGGTCAATCC  
G

**>Aislamiento *Fusarium avenaceum***

TTACTTGTTGCCGGAAGCCTATGTGCGTCNGCCTACNNTTCTCGTGGAATC  
AANTATCTGAAACATACCTCGTTTAANTAGACNTTNTGNCNCTCNTGCTGAA  
GCNCCNAGTNGCCGNTNNANACNCCATTGCTGT