COMPARACIÓN ENTRE ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* AISLADOS DE MELÓN (*Cucumis melo* L.)[1]

Comparison between DNA and morphological analysis for identification of *Fusarium* species isolated from muskmelon (*Cucumis melo* L.)

Fernando Riveros[2], Gastón Muñoz[3], Lucas González[4], Leonardo Rojas[2], Mario Alvarez[3] y Patricio Hinrichsen[3]

ABSTRACT

The genetic diversity of *Fusarium* strains isolated from muskmelons (*Cucumis melo* L.) was evaluated by RAPD and compared with classical taxonomy, morphological and pathogenicity based analyses. Eighteen isolates collected from commercial fields located between III and VI Regions, Chile, were studied. Morphological taxonomy identified eleven isolates as *F. oxysporum*, four as *F. semitectum,* one as *F. solani* and one as *F. subglutinans*. The *F. oxysporum* strains able to cause wilt in muskmelon plants were identified as *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom). DNA profiles obtained from RAPD assays and cluster analyses showed that the Fom population is genetically heterogeneous and complex. Two sub-populations, FomA y FomB, were observed. The results of the species identification obtained with RAPD and those obtained with morphological analyses were not consistent. One isolate identified via conventional methodology as the *F. solani* strain was genetically similar to the FomA group, while some strains identified as Fom were genetically similar to those identified as *F. semitectum*. The genetic diversity of *Fusarium* and these results show the need for more reliable and easier systems to identify *Fusarium* species within the genus. At the same time, the role of *F. semitectum* as a muskmelon pathogen in Chile should be considered.

Key words: *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, RAPD, genetic diversity.

RESUMEN

Se evaluó la diversidad de especies de *Fusarium* asociadas con la marchitez del melón (*Cucumis melo* L.) mediante RAPD, comparándose tales resultados con la identificación taxonómica en base a caracteres morfológicos y patogénicos. Se estudiaron 18 aislamientos colectados de cultivos comerciales de melón establecidos entre la III y IV Región, Chile. Las observaciones morfológicas determinaron que once aislamientos correspondían a *F. oxysporum*, cuatro a *F. semitectum*, uno

[1]Recepción de originales: 5 de abril de 2000.
Investigación realizada dentro del marco del proyecto FONDECYT N° 1970327 año 1997.
[2]Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi, Casilla 36 B, La Serena, Chile. E-mail: friveros@intihuasi.inia.cl
[3]Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.
[4]Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Blas Carrera 2715, Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

a *F. solani* y uno a *F. subglutinans*. Aislamientos identificados como *F. oxysporum* produjeron síntomas de marchitez solamente en plantas de melón, identificándolos, por lo tanto, como *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Fom). Los perfiles de ADN obtenidos mediante RAPD así como los análisis de agrupamiento basados en polimorfismos mostraron que la población Fom es genéticamente compleja y heterogénea, evidenciando al menos dos subpoblaciones FomA y FomB. Los resultados de identificación a nivel de especie obtenidos con RAPD, no fueron consistentes con aquellos obtenidos utilizando caracteres morfológicos. Un aislamiento identificado mediante metodología convencional como *F. solani* fue genéticamente similar a los aislamientos del grupo FomA, mientras que algunos aislamientos identificados como Fom fueron genéticamente similares a aquellos identificados como *F. semitectum*. La diversidad genética de las poblaciones de *Fusarium* y los resultados obtenidos demuestran la necesidad de disponer de sistemas más confiables y fáciles de aplicar para identificar especies dentro del género *Fusarium*. Al mismo tiempo sugieren la necesidad de evaluar el rol de *F. semitectum* como patógeno de melón en Chile.

Palabras claves: *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, RAPD, diversidad genética.

INTRODUCCIÓN

La marchitez del melón (*Cucumis melo* L.) fue descrita por primera vez en América del Norte por Leach y Currence en 1938, identificándose a *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* W.C. Snyder & H.N. Hansen, como el agente causal de esta enfermedad (Snyder y Hanssen, 1940). El patógeno suele provocar graves efectos sobre el cultivo y si bien existe resistencia varietal basada en dos genes, ésta es parcial puesto que se ha reconocido la existencia de por lo menos cuatro razas del patógeno (Banihashemi, 1968; Risser *et al.*, 1976), lo que ha determinado la constante búsqueda de nuevas fuentes de resistencia como estrategias de control. Dentro de este contexto, el conocimiento de las estructuras de las poblaciones del patógeno, es decir, el conocimiento de su diversidad genética y fenotípica, y sus cambios en el tiempo y espacio, son elementos de reconocida importancia para un manejo eficiente de la enfermedad (Leung *et al.*, 1993).

Una primera condición en estudios epidemiológicos o de poblaciones, es la correcta identificación del patógeno aislado. Para identificar especies del género *Fusarium* se han propuesto diferentes sistemas taxonómicos, los cuales se basan principalmente en caracteres morfológicos, tales como tamaño y forma de macroconidias; tamaño, presencia o ausencia de microconidias; formación de clamidosporas y estructura de conidióforos (Nelson, 1991; Windels, 1992). Sin embargo, muchas veces, especies muy relacionadas entre sí difieren en un solo carácter, forma de la conidia o conidióforo, por ejemplo, lo que puede inducir a una mala identificación. Por otra parte, la aplicación de esta técnica tradicional es laboriosa y requiere de gran cantidad de material, lo que dificulta la identificación de un gran número de muestras a la vez que requiere de gran experiencia taxonómica para obtener resultados correctos. Esta labor podría complicarse debido a la alta variabilidad morfológica que presentan aislamientos de *Fusarium* en cultivos de laboratorio.

Las técnicas moleculares, principalmente aquellas basadas en análisis de ADN, corresponden a metodologías más rápidas, precisas, objetivas y aplicables a un gran número de muestras. Este tipo de metodologías permite diferenciar genotipos y de esta forma establecer la variabilidad genética existente dentro de una población (MacLean *et al.*, 1993; Leung *et al.*, 1993). Una metodología de análisis de ADN denominada RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams *et al.*, 1990) genera patrones de bandas que corresponden a fragmentos de ADN, algunos de los cuales son compartidos por un grupo de genotipos, estando ausentes en otros. Este tipo

de polimorfismo genético permite desarrollar marcadores moleculares para la identificación de individuos, realizar mapeo genómico y realizar estudios de genética de poblaciones (Edel *et al.*, 1995; MacDonald, 1997). En el caso del género *Fusarium*, se ha utilizado la metodología de RAPD para determinar la estructura de poblaciones de diversas formas especiales (Kelly *et al.*, 1994; Woo *et al.*, 1996; Vakalounoakis y Fragkiadakis, 1999). Esta metodología ha permitido encontrar marcadores moleculares para identificar especies tales como *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* (Schilling *et al.*, 1996), *F. poae* (Parry y Nicholson, 1996) y aislamientos pertenecientes a la raza 2 de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Manulis *et al.*, 1994).

El presente trabajo se realizó en el marco del Proyecto FONDECYT 1970327 año 1997, cuyo objetivo general es el control de enfermedades de suelo en melón mediante el uso de porta injertos tolerantes. El objetivo específico de este estudio fue evaluar la metodología de RAPD para la identificación de especies de *Fusarium* patógenas para melón (*Cucumis melo* L.) y comparar sus resultados con la metodología tradicionalmente empleada, basada en caracteres morfológicos. Adicionalmente a esto, se evaluó la diversidad genética existente en un grupo de aislamientos identificados preliminarmente como *F. oxysporum* f. sp. *melonis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los aislamientos estudiados

El material experimental fue colectado desde cultivos comerciales de melón establecidos en localidades de la III a la VI Región, incluyendo la Región Metropolitana. El material colectado correspondió a tejido radicular fino, tejido radicular grueso y tejido de vasos conductores (cuello, corona y tallo), que en la mayoría de los casos presentaba síntomas de infección. El origen geográfico de los aislamientos utilizados en este estudio se presenta en el Cuadro 1. Para los análisis de RAPD se incluyeron los aislamientos *F. moniliforme* NRRL 2284 y *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Aislamiento y mantención del patógeno

Los procedimientos utilizados para el aislamiento de *Fusarium sp.* correspondieron a la metodología desarrollada y utilizada por el *Fusarium* Research Center de la Universidad de Pennsylvania y la utilizada por el *Fusarium* Laboratory de la Universidad de Sidney (Nelson *et al.*, 1983; Burgess *et al.*, 1994). El tejido radicular fino de plantas de melón fue esterilizado parcialmente, mediante lavado continuo en agua corriente por un lapso de 3 h, enjuagado en agua estéril tres veces y secado en flujo laminar de aire estéril. El tejido radicular más grueso y el material proveniente de cuello, corona y tallo fue esterilizado superficialmente en una solución de etanol por 1 min, para posteriormente ser tratado en una solución de hipoclorito de sodio al 5 %, enjuagado 3 veces en agua estéril para secar posteriormente en flujo de aire laminar estéril. Una vez desinfectados, pequeños trozos de tejido radicular (con o sin cortex) y segmentos de tejido conductor obtenido a nivel de cuello y tallo, fueron sembrados sobre medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) e incubados a 25 °C durante 7 días.

Desde cada una de las colonias obtenidas se realizaron cultivos monospóricos. Para esto, se utilizó medio de cultivo agar agua al 1,5%, con agregado de sulfato de estreptomicina (0,5 g L^{-1}), sobre el cual se colocaron 6 gotas de agua estéril en las que se había disgregado y homogeneizado micelio del patógeno. Después de un período de incubación de 24 h a 25 °C, se determinó presencia de conidios germinados bajo lupa estereoscópica (40X). Mediante el uso de aguja histológica, un conidio fue transferido a un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo agar clavel y guardado en refrigerador a 5 °C hasta su utilización en pruebas de patogenicidad e identificación. Para almacenamientos prolongados, los aislamientos fueron guardados como suspensión de esporas en 20% de glicerol a –20 °C.

Cuadro 1. Origen, identificación taxonómica y grupo genético de los aislamientos de *Fusarium* estudiados
Table 1. Origin, taxonomic identification and genetic groups of the *Fusarium* isolates used in this study

Aislamiento	Origen geográfico[1]	Hospedero	Identificación taxonómica según morfología	Grupo genético según RAPD
F2	LP Ovalle	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	Fs
F3	Nancagua	Melón	*F. subglutinans*	[2]
F4	LP Ovalle	Melón	*F. semitectum*	Fs
F6	LP Ovalle	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomA
F7	Cárcamo	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomB
F8	Ramuco	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomA
F9	Santa Cruz	Melón	*F. solani*	FomA
F11	LP Ovalle	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomA
F12	Cárcamo	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomA
F15	LP Ovalle	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	Fs
F16	Cárcamo	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomA
F17	LP Ovalle	Melón	*F. semitectum*	Fs
F18	LP Ovalle	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	Fs
F19	San Gregorio	M. Tuna	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomA
F22	LP Ovalle	Melón	*F. semitectum*	Fs
F23	LP Ovalle	Melon	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	Fs
F24	Til Til	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomB
F25	El Tambo	Melón	*F. oxysporum* f. sp. *melonis*	FomA

[1]LP: Embalse La Paloma, Ovalle; Cárcamo, Illapel; Ramuco, Illapel; San Gregorio, Santa Cruz; El Tambo, Vicuña.
[2]Sin agrupamiento.

Identificación taxonómica de los aislamientos de *Fusarium*

Para la identificación taxonómica de los aislamientos se utilizaron como base metodologías y claves de identificación elaboradas por Nelson *et al.* (1983), las cuales consideraron la observación de características microscópicas, mediante la técnica de microcultivo en cámara húmeda (Onnions *et al.*, 1971). En cada placa Petri se colocó un disco de papel filtro, una varilla de vidrio en forma de U y un portaobjeto. La totalidad de estos elementos fueron esterilizados a 121 °C por 30 min. Paralelamente a esto, se prepararon trozos de agar clavel sólido de 1 cm^2 x 2 mm de espesor, los cuales se colocaron en el centro del portaobjeto apoyado en la varilla de vidrio. Se inocularon los 4 lados del bloque de agar clavel con material proveniente de cultivo monospórico de cada uno de los aislamientos a identificar y se cubrió con un cubre objeto de mayor tamaño que el trozo de agar. Sobre el papel filtro se agregaron 2 mL de agua destilada y se incubaron a 25 °C. Diariamente se realizaron observaciones bajo microscopio con el objeto de determinar presencia de cadenas de microconidios, tipo de fiálides y presencia o ausencia de clamidosporas. Para observar características morfológicas de cada colonia, desde cultivo monospórico se inocularon placas conteniendo APD y se incubaron a 25 °C.

Identificación de *F. oxysporum* f. sp. *melonis*

Para determinar la forma especial del patógeno se utilizó la metodología propuesta por Jacobson y Gordon (1988). Para esto, se inoculó una suspensión de esporas (10^6 conidios mL^{-1}) de cada aislamiento de *F. oxysporum* en plantas de: zapallo butternut (*Cucurbita moschata*) cv. Supreme, zapallo italiano (*C. pepo*) cv. Negro Chileno, sandía (*C. lannatus*) cv. Klondike, pepino (*C. sativus*) cv. Marketmore y melón (*C. melo*) cv.

Hales Best Jumbo. Para evaluar su reacción al patógeno luego de su inoculación el material se mantuvo bajo invernadero en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (25 °C y 85% de HR).

Obtención del ADN del hongo

Cada aislamiento fue cultivado por 3 días en medio líquido agitado a 200 rpm y 23 °C. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 40 mL del siguiente medio de cultivo: glucosa 3%, KH_2PO_4 0,3%, $MgSO_4$ 0,03%, casoaminoácidos 0,5%, extracto de levadura 0,1% y extracto de malta 0,1%. Cada matraz fue inoculado con micelio y esporas del hongo previamente cultivado en agar clavel y colectados con un asa bacteriológica. El micelio obtenido fue colectado por filtración, lavado con agua destilada estéril, congelado a -80 °C y liofilizado. Una vez secado, el micelio fue molido directamente en un tubo de Eppendorff y luego, su ADN genómico fue extraído utilizando el método descrito por Bainbridge *et al.* (1990). La calidad del ADN obtenido fue analizado electroforéticamente en geles de agarosa al 0,8% en TBE y cuantificado espectrofotométricamente a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

Condiciones de las reacciones de RAPD

Los partidores fueron adquiridos en la empresa Operon Technologies Inc. (Alameda, California, USA), y correspondieron a los denominados OPA11, OPC4, OPD6, OPU14 y OPW18. Las reacciones de amplificación (en un volumen de 20 mL), así como las condiciones de amplificación y posterior análisis electroforético fueron las descritas previamente por Muñoz *et al.* (1999).

Análisis de las bandas polimórficas

El perfil de bandas que generó cada partidor fue analizado para cada aislamiento mediante el registro para presencia ("1") o ausencia ("0") de bandas de ADN de tamaño similar. El criterio utilizado para identificar una banda como polimórfica fue su presencia o ausencia en forma consistente en dos amplificaciones independientes. Estos resultados permitieron construir una matriz binaria que combinó todos los polimorfismos detectados en los aislamientos en estudio, con los 5 partidores anteriormente descritos. Esta matriz fue luego analizada utilizando el software computacional NTSYS 2.0 (Rohlf, 1996). Para cada par de aislamientos se determinó el grado de similitud utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, Dice o bien single matching (Sneath y Sokal, 1973), para luego construir un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA. Para evaluar la consistencia de los agrupamientos representados en el dendrograma, se determinó el valor de la correlación entre la matriz de los valores cofenéticos de los datos de similitud y la misma matriz de similitud. Adicionalmente, los datos de RAPD fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA). Estos dos últimos tipos de análisis se realizaron utilizando las subrutinas adecuadas del programa NTSYS 2.0.

RESULTADOS

Identificación mediante análisis morfológicos de las especies de *Fusarium*

A partir de la colecta realizada sobre cultivos comerciales de melón establecidos entre la III y VI Región de Chile, se obtuvieron 80 aislamientos de *Fusarium* spp., de los cuales se seleccionaron 18 aislamientos según las características morfológicas de las colonias sobre medio de cultivo agar papa dextrosa (Cuadro 1). Los análisis taxonómicos permitieron establecer que la mayoría de estos aislamientos correspondían a *F. oxysporum,* seguido de *F. semitectum.* Excepcionalmente, se identificó un aislamiento como *F. solani* y otro como *F. subglutinans* (Cuadro 1).

Se clasificó como *F. oxysporum* a aquellos aislamientos que produjeron abundantes microconidias a partir de falsas cabezas, unido a la producción de abundantes macroconidias que presen-

taban una célula apical bastante atenuada y una célula basal formando un pie. Los conidióforos de esta especie fueron del tipo monofiálides, cortos no ramificados. Microcultivos de estos aislamientos siempre presentaron formación rápida de clamidosporas, individuales o en pares. Sobre medio de cultivo agar papa dextrosa, todos los aislamientos manifestaron un rápido crecimiento de micelio aéreo y blanco, que en algunas colonias varió a púrpura. En algunos casos se presentó una abundante formación de esporodoquios, adquiriendo la colonia un color crema. La coloración de estos en la superficie posterior del cultivo casi siempre fue púrpura oscura. Algunos aislamientos requirieron más tiempo para la formación de clamidosporas.

Se identificó como *F. solani* a un aislamiento (F9), colectado en Santa Cruz. Sus principales características distintivas de *F. oxysporum* fueron: microconidios más largos, de pared más gruesa y producidos en menor cantidad. Sus macroconidios fueron más gruesos y de forma cilíndrica. Sus monofiálides fueron ramificadas o simples, mucho más largas y elongadas que las de *F. oxysporum.* Este aislamiento presentó abundante formación de clamidosporas las que aparecieron simples o en pares. Sobre APD formó rápidamente colonias de color crema con presencia de esporodoquios.

Se identificó como *F. subglutinans* a un aislamiento (F3), colectado sobre un cultivo de melones en Nancagua (VI Región). Este aislamiento presentó abundantes microconidias, de forma oval y producidas sobre cabezas falsas. Se observaron abundantes macroconidias con superficies dorsal y ventral casi paralelas, célula basal en forma de talón, presencia de polifiálides y monofiálides, y ausencia de clamidosporas. Sobre medio de cultivo agar papa dextrosa formó colonias con micelio aéreo de color blanco.

Se identificaron como *F. semitectum* cuatro aislamientos (F4, F17, F22 y F23), colectados sobre un cultivo de melones en Nancagua (VI Región). Estos aislamientos presentaron abundantes microconidias, de forma oval, producidas sobre cabezas falsas. Abundantes macroconidias, con superficies dorsal y ventral casi paralelas, célula basal en forma de talón, presencia de polifiálides y monofiálides. Estos aislamientos no formaron clamidosporas. Sobre medio de cultivo agar papa dextrosa formaron colonias con micelio aéreo de color blanco.

Identificación de *F. oxyporum* f. sp. *melonis*

Los aislamientos identificados como *F. oxysporum* f. sp. *melonis* al ser inoculados en las plantas indicadoras demostraron una reacción patogénica altamente específica con el hospedero. Esta reacción varió desde una marchitez progresiva y consistente hasta un colapso violento y definitivo. Este tipo de reacción fue solamente observada en plántulas de *C. melo,* resultados que concuerdan con el comportamiento señalado para *F. oxysporum* f. sp. *melonis.*

Diversidad genética de los aislamientos evaluada mediante RAPD

Para estos estudios se incorporaron dos aislamientos, uno correspondiente a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) y otro a *F. moniliforme* (Fm), los que se utilizaron como controles en los análisis de agrupamiento.

Los 5 partidores utilizados en los ensayos de RAPD, OPA11, OPC4, OPD6, OPU14 y OPW18, generaron 22, 20, 24, 19 y 22 bandas polimórficas, respectivamente, determinando un total de 107 bandas. Estos resultados sugieren la existencia de una gran diversidad genética dentro de la población analizada, resultado esperable, considerando las diferentes especies que componían el grupo de aislamientos de este estudio, según los resultados de los análisis morfológicos.

El análisis visual de los patrones de bandas evidenció un grado de similitud entre algunos aislamientos, permitiendo establecer grupos genéticos. Tal como se aprecia en la Figura 1, aislamientos identificados taxonómicamente como

F. semitectum, presentaron patrones de bandas similares entre sí, formando parte de un grupo que se denominó Fs. Para el caso de los aislamientos identificados taxonómicamente como *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, se distinguieron dos grupos. Un grupo mayoritario, denominado FomA, presentó un perfil de bandas conservados y un segundo grupo, denominado FomB, formado por los aislamientos F7 y F24, presentó patrones distintos tanto entre sí como con el resto de la población analizada. Sin embargo, algunos aislamientos identificados taxonómicamente como *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (F15, F18, y F2 en Figura 1) presentaron un perfil de bandas similar al grupo de aislamientos identificados como *F. semitectum*. Otra inconsistencia entre los perfiles de bandas y la identificación taxonómica se presentó con el aislamiento F9, identificado previamente como *F. solani*, el cual presentó un perfil de bandas similar a los obtenidos por aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. Estos resultados indicarían la posibilidad de una identificación taxonómica incorrecta de la especie en algunos de estos aislamientos.

Los análisis visuales de las bandas no detectaron ninguna banda común a todos los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* que pudiera ser potencialmente utilizable como un marcador molecular para identificar estos aislamientos. Sin embargo, en el grupo Fs se detectaron bandas que eventualmente podrían ser utilizadas con fines de identificación de la especie. Un ejemplo de esto lo representa la banda de rápida movilidad electroforética indicada en la Figura 1.

Los polimorfismos detectados fueron analizados utilizando distintos coeficientes de similitud, para luego comparar los dendrogramas de agrupamientos obtenidos. Al utilizar los coeficientes de Single Matching, Jaccard y Dice, se obtuvieron agrupamientos similares (Figura 2). Este agrupamiento presentó un valor para la correlación cofenética de 0,96 indicando una buena consistencia. Adicionalmente a esto, los grupos identificados por este análisis mostraron buena correlación con aquellos establecidos visualmente según los perfiles de bandas de ADN (Figura 1).

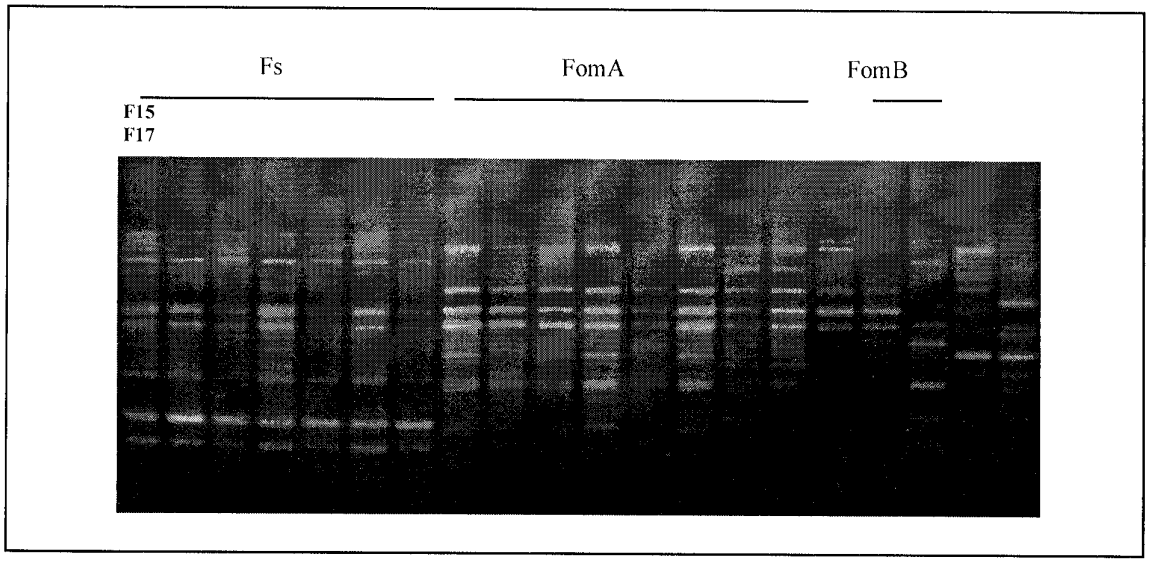

Figura 1. Perfiles de bandas de ADN obtenidos en una reacción de RAPD utilizando el partidor OPU14. En cada carril se indican los aislamientos estudiados y el grupo genético asignado. A la izquierda se indica una banda de ADN específica para el grupo Fs.

Figure 1. Band profile of the DNA obtained in the RAPD assay using the primer OPU14. In each lane the strain and the main genetic groups assigned are indicated. On the left side indicates a DNA band specific to the Fs group.

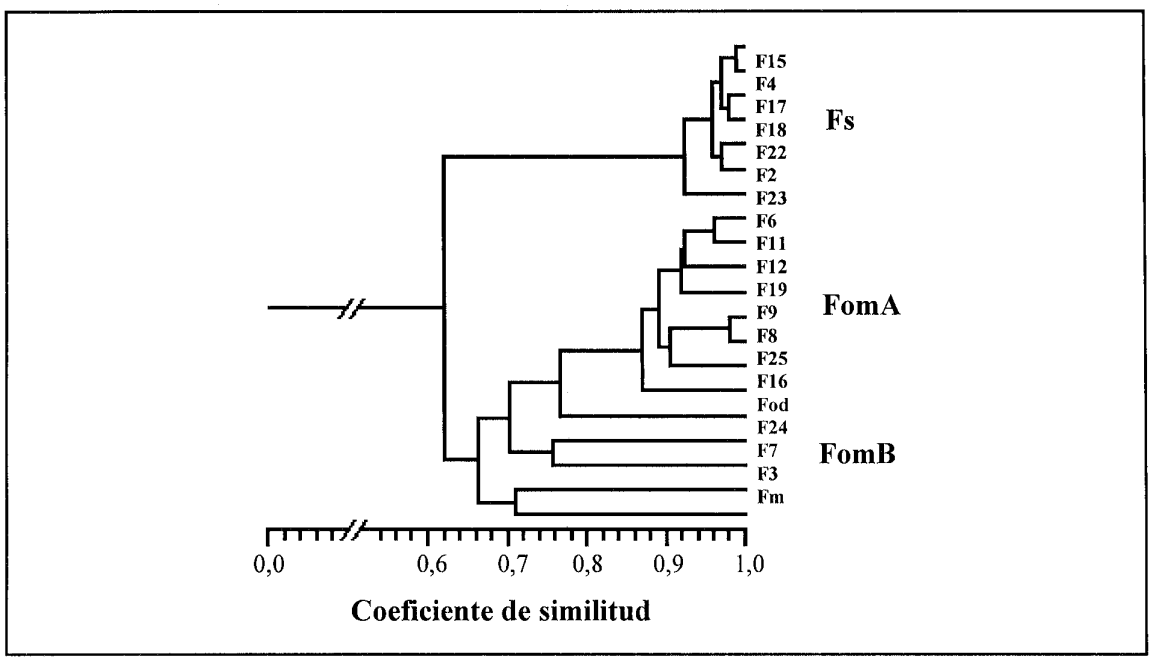

Figura 2. Dendrograma del agrupamiento según la similitud genética de los aislamientos de *Fusarium* estudiados obtenidos a partir de los polimorfismos de RAPD mediante el algoritmo UPMGA y el coeficiente de similitud de Simple Matching. A la derecha se indican los aislamientos estudiados y los principales grupos identificados.

Figure 2. Grouping dendrogram according to the genetic similarity of the isolates of *Fusarium* studied derived from polymorphic bands of the RAPD assays. The clustering analysis was conducted by UPGMA using the coefficient of similarity for Simple Matching. On the right, the studied strains of *Fusarium* as well as the main genetic groups detected are indicated.

Al someter datos de polimorfismos a un análisis de componentes principales (Figura 3), las relaciones genéticas se mantuvieron. Los aislamientos de *F. oxysporum* se presentaron como un conjunto genéticamente heterogéneo, evidenciándose dos grupos. El grupo FomA fue genéticamente más homogéneo que el grupo FomB. Los aislamientos F7 y F24, pertenecientes al grupo FomB fueron genéticamente más similares a aislamientos de *Fusarium* no patogénicos a melón, tal como el aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi,* utilizado como un control en los análisis de agrupamiento. Como era de esperar, el aislamiento de *F. moniliforme* (Fm) utilizado como control fuera de grupo y el identificado como *F. subglutinans* (F3) mostraron ser bastante diferentes entre sí y diferentes al resto de la población estudiada.

DISCUSIÓN

F. oxysporum Schlechtend. Fs. es una de las especies con mayor variabilidad dentro del género *Fusarium,* la cual incluye poblaciones patogénicas y no patogénicas. Los aislamientos patogénicos causan marchitez vascular con gran especificidad de huésped, lo que condujo a proponer el concepto de forma especial (Snyder y Hanssen, 1940), informándose más de 120 formas especiales de acuerdo a la reacción específica frente a hospederos diferenciales (Amstrong y Amstrong, 1981). Para el caso de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* la identificación es bastante laboriosa, ya que primero requiere observaciones microscópicas para identificar la especie de *F. oxysporum,* para luego realizar inoculaciones sobre hospederos diferenciales que determinan reacciones patogénicas específicas para confirmar la forma

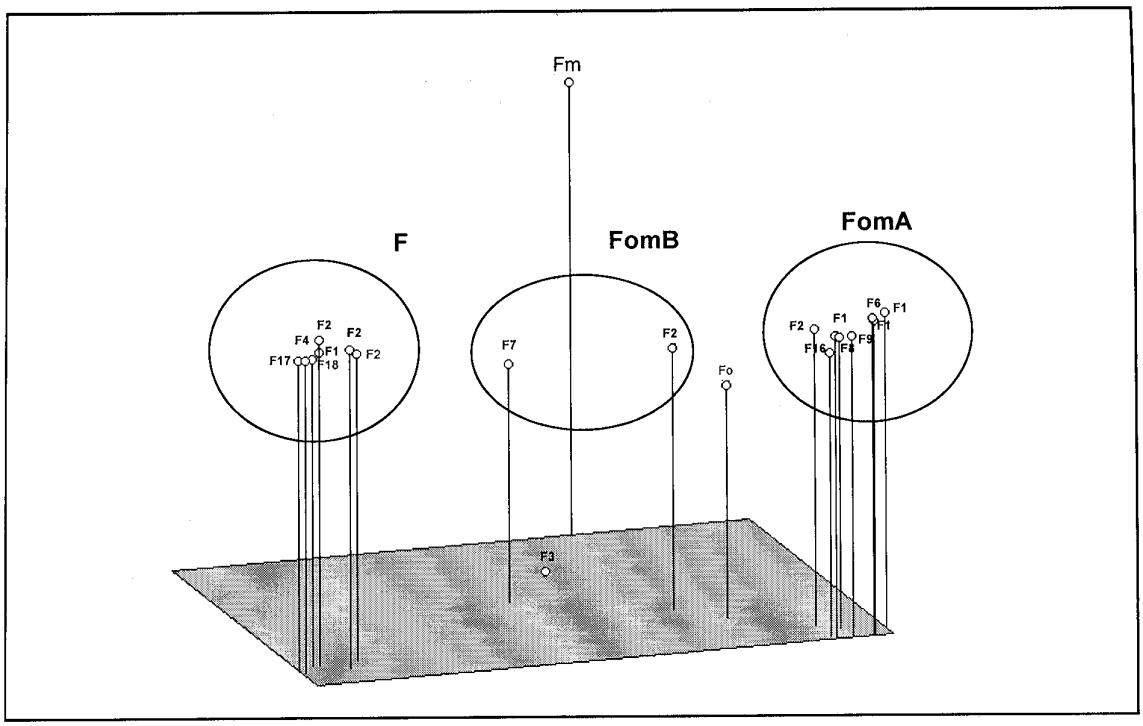

Figura 3. Representación tridimensional del agrupamiento de los aislamientos de *Fusarium* estudiados mediante análisis de componentes principales de los polimorfismos de RAPD. Se indican los principales grupos genéticos observados.

Figure 3. Three-dimensional representation of the grouping of the studied *Fusarium* isolates based on an analysis of the principal components of the polymorphic RAPD bands. The main genetic groups observed are indicated.

especial. Nuestros resultados claramente describen una inconsistencia entre la identificación taxonómica, basada en morfología, y la genética, basada en análisis de ADN. Este tipo de discrepancias ha sido reportado para otros géneros fungosos y especialmente para especies del género *Fusarium.* Gran parte de este fenómeno se ha atribuido a la variabilidad fenotípica que presenta *Fusarium* en medios de cultivos (Nelson, 1991; Kistler, 1997; Gordon y Martyn, 1997). Se ha intentado superar este problema mediante la estandarización de las metodologías de laboratorio, incorporando estructuras y criterios comunes en claves para la identificación de las especies de este hongo. Sin embargo, existe consenso acerca de la necesidad de disponer de sistemas de identificación más objetivos, rápidos y aplicables a un gran número de muestras, como el análisis de ADN. Este tipo de metodologías se encuentra bastante simplificado en la actualidad, en cuanto a procesamiento e infraestructura, lo que permitiría su uso en forma rutinaria (MacLean *et al*, 1993; McDonald, 1997).

El grupo de *F. oxysporum* resultó ser genéticamente bastante heterogéneo. Un grupo (FomA) presentó una alta homogeneidad genética, mientras que otro (FomB) fue notoriamente divergente del primero y similar a aquellos aislamientos de *F. oxysporum* no patogénicos a melón utilizados como control. Las fuentes de variabilidad para esta especie, que no desarrolla cruzamientos sexuales en la naturaleza, podrían estar asociadas con acumulación de mutaciones. Este fenómeno podría estar facilitado por la presencia de transposones y la transferencia genética vía anastomosis de hifas (Gordon y Martyn, 1997). En la actualidad, y sobre la base de análisis fenotípicos

y genéticos, se entiende que *F. oxysporum* f. sp. *melonis* podría ser un grupo genéticamente heterogéneo y evolutivamente de origen polifilético (Jacobson y Gordon, 1991; Gordon y Martyn, 1997; Kistler, 1997). Por el modo de reproducción que presenta *F. oxysporum* sería esperable el establecimiento de líneas clonales (Gordon y Martyn, 1997). Se ha demostrado que la raza 1/VCG 0134 de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Análisis moleculares basados en perfiles de ADN mitocondrial y ribosomal nuclear indican que tales aislamientos podrían corresponder a una línea clonal (Gordon y Martyn, 1997). La gran variabilidad genética encontrada en los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* chilenos, colectados en una amplia región geográfica, sugiere una situación compleja. Probablemente existan varias líneas clonales en el país afectando cultivos de melón. La determinación de razas y de grupos de compatibilidad vegetativa (Puhalla, 1985; Correl, 1991) en nuestros aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* permitirían tener un cuadro más preciso.

El grupo Fs resultó ser genéticamente más uniforme, presentando varias bandas potencialmente útiles con fines de diagnóstico e identificación (Figura 1). En cambio, *F. oxysporum* presentó una gran variabilidad genética lo cual dificultó identificar bandas de ADN específicas que pudieran utilizarse como un marcador molecular con fines de identificación, tal como se ha propuesto para otras especies de *Fusarium* (Manulis *et al.*, 1994; Parry y Nicholson, 1996; Schilling *et al.*, 1996). Esta situación podría ser superada al evaluar un mayor número de partidores en los ensayos de RAPD, incrementando así las probabilidades de encontrar bandas susceptibles de utilizar en la identificación de dicha especie. Otra alternativa para identificar molecularmente *F. oxysporum*, sería realizar ensayos específicos analizando la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 como blanco (White *et al.*, 1990). Dicha región ha sido empleada con éxito para identificar *F. graminerum* (Schilling *et al.*, 1996).

Las inconsistencias encontradas en este estudio estarían confirmando las dificultades y limitaciones que ofrece la identificación taxonómica tradicional. Nuestros resultados presentan la disyuntiva si los aislamientos mal identificados corresponden a *F. semitectum* o bien a *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. Si se tratara del primer caso, los resultados podrían interpretarse en el sentido que dentro de la población nacional de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* existirían tres subpoblaciones altamente divergentes entre sí, que corresponderían a los grupos identificados como Fs, FomA y FomB (Figuras 2 y 3). Una segunda alternativa implicaría que aislamientos de *F. semitectum* podrían ser patogénicas a melón. *F. semitectum* suele ser aislado de ambientes tropicales y subtropicales (Nelson *et al.*, 1983; Windels, 1992), similares a algunas localidades muestreadas en este estudio. Si bien se ha informado la capacidad de *F. semitectum* de producir pudriciones en frutos de melón (Waraitch y Nandpuri, 1975; Prasad *et al*, 1988), afectar otras cucurbitáceas (Elarosi *et al.*, 1970; Sonoda *et al.*, 1993; McGovern, 1994) y otros cultivos (Knight *et al.*, 1977; Dhingra y Muchovej, 1979; Nalli y Balmas, 1997), no se ha descrito su capacidad patogénica sobre plantas de melón. Esto hace más evidente la necesidad de disponer de mejores sistemas de identificación para especies del género *Fusarium*, al mismo tiempo que sugiere realizar estudios para establecer la verdadera relación patogénica entre *F. semitectum* y melón.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar un especial agradecimiento a las Srtas. Cecilia Gamboa y Evelyn Silva, por su asistencia técnica en los ensayos de RAPD.

LITERATURA CITADA

Amstrong, G.M., and J.K. Amstrong. 1981. *Formae speciales* of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. p. 391-399. *In* P.E. Nelson, T.A. Mtaussoun and R.J. Cook (eds.). *Fusarium*: diseases, biology, and taxonomy. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.

Banihashemi, Z. 1968. The biology and ecology of *Fusarium oxysporum* f. *melonis* in soil and the root zones of host and non host plants. Diss. Abstr. 29:435B-436B.

Bainbridge, B.W., C.L. Spreadbury, F.G. Scalise, and J. Cohen. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. FEMS Microbiol. Lett. 66:113-118.

Burgess, L., B. Ummerell, S. Bullock, K. Gott, and P. Backhouse. 1994. Laboratory Manual for Fusarium Research. 191 p. University of Sydney and Botanic Gardens, Department of Crop Science, Fusarium Research Laboratory, Sydney, Australia.

Correl, J.C. 1991. The relationship between *formae speciales*, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 81:1061-1064.

Dhingra, O.D., and J.J. Muchovej. 1979. Pod rot, seed rot and root rot of snap bean and dry bean caused by *Fusarium semitectum*. Plant Dis. Rep. 63:84-87.

Edel, V., C. Steinberg, I. Avelange, G. Laguerre, and C. Alabouvette. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. Phytopathology 85:579-585.

Elarosi, H., S.H. Michali, M.A. Abd-El-Rehim, and H.M. Sheir. 1970. Damping-off of cucurbitaceous plants in U.A.R.I. Studies on damping-off on vegetables marrow. Phytopathology Medit. 9:1-7.

Gordon, T.R., and R.D. Martyn. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annu. Rev. Phytopathol. 35:111-128.

Jacobson, D.J., and T.R. Gordon. 1988. Vegetative compatibility and self incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Phytopathology 78:668-672.

Jacobson, D.J., and T.R. Gordon. 1991. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: a case study of diversity within a *formae specialis*. Phytopathology 81:1064-1067.

Kelly, A., A.R. Alcalá-Jiménez, B.W. Bainbridge, J.B. Heale, E. Pérez-Artés, and R.M. Jiménez-Díaz. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. Phytopathology 84:1293-1298.

Kistler, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 87:475-479.

Knight, C., D.F. Cutts, and J. Calhoum. 1977. The role of *F. semitectum* in causing crown rot of bananas. Phytopathol. Z. 89:170-176.

Leach, J.G., and T.M. Currence. 1938. *Fusarium* wilt of muskmelon in Minnesota. 128 p. Technical Bulletin. University of Minnesota Agricultural Experimental Station, Minnesotta, USA.

Leung, H., R.J. Nelson, and J.E. Leach. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. p. 157-205. *In* Advances in Plant Pathology, Vol. 10. Academic Press, New York, USA.

McDonald, B.A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. Phytopathology 87:448-453.

McGovern, R.J. 1994. First report of corky dry rot of cantaloupe caused by *Fusarium semitectum* in Florida. Plant Dis. 78:926.

McLean, D.J., K.S. Braithwaite, J.M. Manners, and J.A.G. Irwin. 1993. How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis? p. 207-244. *In*: Advances in Plant Pathology, Vol 10. Academic Press, New York, USA.

Manulis, S., N. Kogan, M. Reuven, and Y. Ben-Yephet. 1994. Use of RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. Phytopathology 84:98-101.

Muñoz, G., P. Hinrichsen, y M. Alvarez. 1999. Variabilidad genética de aislamientos de *Botrytis cinerea* provenientes de vid y tomate con resistencia a dicarboximidas. Agricultura Técnica (Chile) 59:1-12.

Nalli, R., and V. Balmas. 1997. *Fusarium semitectum* on pistachio nut. Pathogenic and morphological characteristics (*Pistacia vera* Latium). Informatore Fitopatologico 47:16-18.

Nelson, P.E. 1991. Hystory of *Fusarium* systematics. Phytopathology 81:1045-1048.

Nelson, P.E., T.A. Toussoun, and W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustration manual for identification. 193 p. University Park, Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, USA.

Onnions, A.H.S. 1971. Preservation of fungi. Chapter 4, p. 113-151. *In* Methods in Microbiology. C. Booth (ed.). Academic Press, New York, USA.

Parry, D.W., and P. Nicholson. 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathol. 45:383-391.

Prasad, M.M., A.K. Roy, K. Anjan, and A. Krishna. 1988. Biochemical changes in muskmelon fruits by fruit-rot fungi. Indian Phytopathol. 41:641-643.

Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Can. J. Bot. 63:179-183.

Risser, G., Z. Banihashemi, and D.W. Davis. 1976. A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. Phytopathology 66:1105-1106.

Rohlf, F.J. 1996. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0. 45 p. Exeter Software. Setauket, New York, USA.

Schilling, A.G., E.M. Moller, and H.G. Geiger. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. Phytopathology 86:515-522.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 550 p. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sneath, P., and R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. 573 p. Freeman, San Francisco, USA.

Snyder, W.C., and H.N. Hanssen. 1940. The species concept in *Fusarium*. Am. J. Bot. 27:64-67.

Sonoda, R.M., H.S. Paris, T.S. Shubert, and N.E. El-Gholl. 1993. Fruit rot squash cv. orangetti in Florida. Plant Dis. 77:847.

Vakalounoakis, D.L., and G.A. Fragkiadakis. 1999. Genetic differentiation of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. Phytopathology 89:161-168.

Waraitch, K.S., and K.S. Nandpuri. 1975. *Fusarium* fruit rot of muskmelon (*Cucumis melo* L.). Punjab Agricultural University. J. of Research 12:131-134.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalsky, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. *In* M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.). PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, London, England.

Windels, C.E. 1992. *Fusarium*. p. 115-128. *In* L.L. Singleton, J.D. Mihail and C.M. Rush (eds.). Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Woo, S.L., A. Zoina, G. Del Sorbo, M. Lorito, B. Nanni, F. Scala, and C. Noviello. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs. RFLPs and RAPD. Phytopathology 86:966-973.