

## ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA INDUCCION DE VARIACION SOMACLONAL EN CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*), Y SELECCION 'IN VITRO' DE CALLOS Y PLANTULAS TOLERANTES A *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*<sup>1</sup>

ANA L. ALZATE M.<sup>2</sup>, ANTONIO ANGARITA Z.<sup>3</sup> Y VIRGINIA MONTES DE GOMEZ<sup>4</sup>

**Resumen.** Con el objeto de definir las técnicas de un posible método de selección de callos y plántulas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) tolerantes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, se realizaron en primera instancia experimentos en los cuales se determinaron concentraciones hormonales ideales para lograr la regeneración de callos y plántulas a partir de pétalos. El medio ideal obtenido, quedó constituido por el medio de Murashige y Skoog, BAP: 0.5 ppm, NAA: 2 ppm y 2,4 D: 0.1 ppm. Se determinó el pétalo completo como el mejor explante en el logro de la regeneración de plántulas. Para ejercer presión de selección se utilizaron concentraciones de material tóxico líquido autoclavado de *F. oxysporum* entre 0 - 40% combinado con el medio de regeneración de callos y plántulas. De este último experimento se obtuvieron posibles variantes somaclonales tolerantes hasta niveles del 10% de material tóxico producido por el patógeno.

### PRELIMINAR STUDIES ON SOMACLONAL VARIATION OF CARNATION (*Dianthus caryophyllus*), AND "IN VITRO" SELECTION OF CALLUSES AND PLANTLETS RESISTANTS TO FUSARIAL WILT

**Summary.** Five experiments were carried out in the laboratory to obtain callus and

plantlets from young petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) using different concentrations of BAP, NAA, 2,4D and light/dark treatments. The best results were obtained with Murashige and Skoog medium containing 0,5 ppm of BAP, 2 ppm of NAA and 0,1 ppm of 2,4D on light conditions. It was determined that the whole petal as explant was better to obtain plantlets regenerated. For the selection pressure it was used autoclaved toxic material of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (between 0 and 40%) mixed with the plantlets and callus regenerated medium. From this experiment it was obtained possible tolerant somaclonal variants of carnation to 10% level of toxic materials.

### 1. INTRODUCCION

Desde los años 1965 Colombia se inició favorablemente en la producción de clavel para exportación. El éxito radicó en la ventajosa situación geográfica de las zonas productoras (4 grados al norte del Ecuador, 2,600 mt de altitud, temperatura entre 18 y 5 grados centígrados, fotoperíodos de 12 horas) y a la economía en las estructuras de los invernaderos que no requieren sistemas reguladores de temperatura como en los países de estaciones. Además la red de comunicación aérea permite un transporte rápido después de la cosecha.

En el presente, Colombia es uno de los principales exportadores de clavel, compitiendo en el mercado internacional al mismo nivel de otros importantes productores. Una de las evidencias de este hecho fue la obtención del primer lugar en la exposición floral para el mercado de Gran Bretaña "Chelsea

<sup>1</sup> Resumen basado en la tesis de grado de A.L. A. para optar al título de Magister en Fitotecnia área Genética y Fitomejoramiento.

<sup>2</sup> Licenciada en Biología y Química, estudiante Postgrado Fitotecnia.

<sup>3</sup> Profesor asistente, I.A., Ph.D., Facultad de Agronomía, U. Nal. de Colombia, Bogotá.

<sup>4</sup> Profesora asociada, Química, Ph.D., Facultad de Química, U. Nal. de Colombia, Bogotá.

Flower Show".

Muchas son las enfermedades que atacan este cultivo, pero se considera como la más grave a nivel mundial el Marchitamiento Vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

La lucha contra esta enfermedad es extremadamente difícil debido a la facilidad de introducción del patógeno al terreno por medio de materiales de propagación infectados, por el elevado costo de los métodos de erradicación (como la desinfección con vapor y la utilización de fumigantes) o preventivos (cultivo sobre bancos elevados, siembras a bajas temperaturas retardando la actividad fungal pero con la inevitable reducción en rendimiento y calidad).

Estos métodos de control de la enfermedad no son muy efectivos y algunos que necesitan de detallada atención no son muy adecuados o suficientes para solucionar el problema si además se tiene en cuenta que la dificultad de la erradicación se basa principalmente en la profundidad que el hongo alcanza a invadir evadiendo la esterilización o la acción de fumigantes.

Debido al poco éxito en el empleo de métodos artificiales, los mejoradores han recurrido a la búsqueda de materiales resistentes o tolerantes al patógeno; dentro de estos métodos, la utilización práctica de la Variación Somaclonal en la obtención de clones resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, es una buena alternativa basada en la posible evidencia del aumento de la variabilidad genética a través de cultivos de callos y regeneración de plántulas en medios de cultivo que contengan toxinas o extractos del hongo involucrados con la enfermedad, es decir, por medio de una presión de selección.

Los objetivos de esta investigación fueron en primer término, la evaluación de factores hormonales y condiciones de cultivo óptimos para la formación de callos y regeneración de plántulas y en segundo término la selección de calliclones a partir de explantes (pétalos) de la variedad Nohra Barlo a través de técnicas de cultivo de tejidos y selección de callos y plántulas tolerantes "in vitro" a extractos de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

## 2. MATERIALES

Para la realización de los experimentos se

utilizaron todos los reactivos, equipos y otros materiales con los que cuentan los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional y de la Empresa "Floramérica S.A." Las condiciones de sus cámaras de crecimiento son:  $27 \pm 2$  grados centígrados de temperatura y 16 horas luz, 8 oscuridad de fotoperíodo (en la Facultad de Agronomía) y  $22 \pm 1$  grados centígrados de temperatura, 246 footcandles de intensidad lumínica y 18 horas luz, 6 oscuridad de fotoperíodo (en el laboratorio de Floramérica).

El aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, se realizó en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional, la temperatura de la incubadora es 24 grados centígrados.

**Material Vegetal.** El material vegetal constó de botones cerrados de la variedad Nohra Barlo de aproximadamente 1 1/2 cm de longitud. Los explantes utilizados de estos botones fueron los pétalos localizados en la parte media de una longitud de 10-15 mm aproximadamente.

Para el aislamiento e identificación de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* se utilizaron tallos de Nohra Barlo infectados con el hongo.

*Fuentes de hormonas, vitaminas y agar.*

### HORMONAS:

2,4 D: Compañía Grand Island (2,4-D) 99 + % Pure.

ANA # N-0375: Compañía Sigma Ap. 97% O

BAP No. 13-6750: Compañía Sigma.

### VITAMINAS:

Tiamina: Compañía Sigma

Inositol: Compañía Sigma

### AGAR:

Difco Bacto Agar 0140-01 (Detroit Michigan USA).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSION

**Efecto de la luz, del NAA y el BAP en la inducción de callos y plántulas a partir de pétalos de clavel.** Con el objeto de lograr regeneración de plántulas a partir de pétalos, se probaron 24 tratamientos que consistieron en interacciones hormonales de Auxinas (NAA) - Citoquininas (BAP) combinadas con luz y oscuridad sobre el medio básico de Murashige y Skoog. Los resultados de estos tratamientos se presentan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Efecto de la adición de NAA y BAP en las diferentes etapas de desarrollo de pétalos, iniciación de callos y regeneración de plántulas.

TRATAMIENTO	No. de replic. *4	No. de pétalos desarroll.	No. de raíces	No. de callos	No. de plántulas
1 BAP 0*1 NAA 0*2 Luz *3	10	10	0	0	0
2 BAP 0 NAA 0 oscuridad	10	10	0	0	0
3 BAP 0 NAA 1 Luz	10	5	5	5	0
4 BAP 0 NAA 1 oscuridad	10	4	3	3	0
5 BAP 0 NAA 2 oscuridad	10	5	5	5	0
6 BAP 0 NAA 2 oscuridad	8	1	1	1	0
7 BAP 0 NAA 3 Luz	10	5	2	2	0
8 BAP 0 NAA 3 oscuridad	7	2	2	2	0
9 BAP 0.5 NAA 0 Luz	10	10	0	4	4
10 BAP 0.5 NAA 0 oscuridad	8	7	0	3	0
11 BAP 0.5 NAA 1 Luz	10	6	0	1	1
12 BAP 0.5 NAA 1 oscuridad	10	8	1	1	0
13 BAP 0.5 NAA 2 Luz	9	6	1	4	4
14 BAP 0.5 NAA 2 oscuridad	7	3	3	3	0
15 BAP 0.5 NAA 3 Luz	10	6	2	3	3
16 BAP 0.5 NAA 3 oscuridad	10	1	1	1	0
17 BAP 1 NAA 0 luz	10	10	0	0	0
18 BAP 1 NAA 0 oscuridad	8	7	0	0	0
19 BAP 1 NAA 1 Luz	10	8	0	0	0

Cuadro 1. (continuación)

TRATAMIENTO	No. de replic.*4	No. de pétalos desarroll.	No. de raíces	No. de callos	No. de plántulas
20 BAP 1 NAA 1 oscuridad	10	5	3	3	0
21 BAP 2 NAA 2 Luz	10	7	0	1	1
22 BAP 1 NAA 2 oscuridad	10	4	2	2	0
23 BAP 1 NAA 3 LUz	8	5	1	1	1
24 BAP 1 NAA 3 oscuridad	9	5	5	5	0

\*1: en ppm

\*2: en ppm

\*3: condiciones lumínicas

\*4: El número original de replicaciones fue 10; las diferencias se deben a contaminaciones en las unidades experimentales.

**Formación de callos (con respecto al desarrollo de pétalos).** Aunque el NAA inhibe el desarrollo de pétalos, aquellos que logran desarrollo en concentraciones hasta de 3 ppm, son favorecidos para la formación de callos; mientras que el BAP individualmente es efectivo en la formación de callos solo a bajas concentraciones (0.5 ppm).

En general para la formación de callos es necesaria la presencia de al menos una de las hormonas señaladas, o también la presencia de la interacción hormonal auxina-citoquinina.

**Organogénesis (con respecto a la formación de callos).** Las hormonas son fundamentales para el desarrollo de plántulas. Por lo tanto donde se presentó organogénesis hubo necesariamente desarrollo de callo.

El NAA individualmente no produce desarrollo de plántulas, aun cuando puede inducir desarrollo de callos y el BAP en concentraciones de 0.5 - 1 ppm en presencia o ausencia de NAA produce organogénesis siempre en luz. Vale la pena resaltar que en ausencia de BAP no se presentó regeneración de plántulas; esto es debido probablemente a la acción del BAP como citoquinina que favorece la regeneración de brotes adventicios.

Los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos 9 (BAP: 0.5 NAA: 0 en ppm y luz) y 13 (BAP: 0.5 NAA: 2 en ppm

y luz) en los cuales hubo un 40% y un 44.4% de regeneración respectivamente. Estos resultados se observaron a los 35 días de siembra en condiciones del laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de Bogotá.

El tratamiento 9 mostró proliferación de brotes, respuesta explicada por la presencia única de citoquininas (BAP: 0.5 ppm) en el medio de cultivo y que está de acuerdo con resultados de Gimelli et al (1983). Las plántulas obtenidas a partir de ese tratamiento mostraron arrosetamiento, vitrificación, color verde-amarillizo y pequeño tamaño.

Con respecto a la vitrificación, Leshem en 1986 la define como el desarrollo de plántulas anormales, translúcidas, vidriosas, succulentas, de tallos cortos y gruesos y hojas frágiles. Estas plantas se caracterizan por la ausencia relativa de organización celular y diferenciación vascular y no presentan transporte polar de auxinas (Leshem, 1985).

Kevers y Gaspar en 1985 reportan la deficiencia de lignina en tejidos vitrificados y el posible papel del etileno en el control de la formación de lignina.

Como lo muestran estos reportes, las plantas vitrificadas son una evidencia de desorden celular, negativas en la micropropagación pero de interés en trabajos de tipo variación somaclonal.

En el tratamiento 13, el incremento de

NAA tuvo un efecto positivo en el fenotipo de las plántulas regeneradas, las cuales fueron más similares a plántulas normales de clavel, presentaron menor vitrificación y eran un poco más elongadas que las del tratamiento 9. Debido a las anteriores características, se eligió este tratamiento como el mejor.

**Evaluación de la interacción hormonal BAP: 0.5 NAA: 2 (en ppm), a diferentes concentraciones de 2,4 D y su acción en la inducción de callos y organogenesis.** Con el objeto de aumentar la producción de callos y lograr la obtención de plántulas que presentaran mayor elongación o dominancia apical, se realizaron tratamientos con la presencia de diversas concentraciones de otra auxina (2,4 D) como lo muestra el cuadro 2.

Concentraciones de 2,4 D superiores a 0.625 ppm, si bien favorecen la inducción de callos, como en el tratamiento 4 (1 ppm de 2,4 D) inhibe el desarrollo de plántulas. Estos resultados están de acuerdo con el efecto conocido del 2,4 D como inductor de callos en concentraciones inferiores a 1 ppm, reportado por Dodds y Roberts en 1982. Igualmente, con respecto a su papel en la formación de plántulas, se reporta al 2,4 D como promotor de embriogénesis y organogénesis en muchas especies tanto sólo como en combinaciones. (Kikrorian et al, 1987).

De acuerdo a los resultados, concentraciones superiores a 6,25 ppm disminuyen el beneficio de la formación de callos. Con respecto a la formación de raíces, el 2,4 D no tiene una respuesta importante.

Analizando cuantitativamente los resultados, el 2,4 D en concentraciones superiores a 0,625 ppm no favorece la organogénesis; por el contrario, inhibe la acción organogénica de la interacción NAA - BAP. Pero cuando se presentó organogénesis a bajas concentraciones de 2,4 D (inferiores a 0.625 ppm), las plántulas obtenidas tenían una mayor elongación, excelente apariencia, poco vitrificadas, muy semejantes a plántulas normales, especialmente en presencia de 0.1 ppm de 2,4 D. Las plántulas del tratamiento testigo tenían características similares a las obtenidas en el tratamiento 13 del numeral anterior pero que comparadas fenotípicamente con las plántulas obtenidas en 0.1 ppm de 2,4 D eran muy inferiores.

Por estas razones, se escogió al tratamiento 0.1 ppm de 2,4 D como el mejor y por lo tanto la combinación hormonal para regeneración de plántulas a partir de callos de pétalos de clavel quedó constituido por BAP: 0.5; NAA: 2 y 2,4 D: 0.1 (en ppm).

**Evaluación de distintas secciones del explante en la formación de callos y plántulas.** Este experimento estuvo basado en tres tratamientos: en el primero se sembraron en cada frasco, dos pétalos completos, uno pequeño (más o menos 8 mm) y uno más grande (más o menos 15 mm), en el segundo se tomó la parte basal del pétalo y en el tercero se tomaron partes medias y superiores.

Para esta evaluación se utilizó el medio de cultivo de callos seleccionado en el numeral anterior (BAP: 0.5, NAA: 2 y 2,4 D: 0.1 en ppm).

**Cuadro 2.** Evaluación de la interacción hormonal BAP: 0.5 - NAA: 2 (ppm) a diferentes concentraciones de 2,4 D y su acción en la inducción de callos y organogénesis.

TRATAMIENTO concentraciones de 2,4D ppm	No. de replic. *1	No. de pétalos desarroll.	No. de raíces	No. de callos	No. de plántulas
1 0	10	9	0	3	3
2 0.1	10	10	2	7	4
3 0.5	9	6	0	6	0
4 0.625	9	7	0	7	2
5 1	9	6	0	6	0
6 2	9	7	0	7	0
7 3	10	6	0	6	0
8 3.125	9	5	0	5	0
9 6.25	10	8	0	8	0
10 12.5	10	8	0	3	0
11 21.25	10	8	0	2	0

\*1: El número de replicaciones de los tratamientos fue 10, la diferencia en el número de replicaciones se debe a contaminación de unidades experimentales.

En el primer tratamiento los pétalos de mayor tamaño presentaron rápido crecimiento y completo desarrollo tomando el color rosado característico de la variedad Nohra Barlo, se produjo formación de callo en la base del pétalo y posteriormente (más o menos a los 30 días) se observó la presencia de plántulas de muy buena apariencia y exuberantes; dos de las cinco presentaron vitrificación.

De los cinco pétalos pequeños sólo tres se desarrollaron; el crecimiento del pétalo fue menor que en el caso anterior, hubo formación de callos en los tres y formación de plántulas en uno de ellos. La plántula que se formó fue muy pequeña y presentó vitrificación (la formación de callos y plántulas fue en la base del pétalo).

En el segundo tratamiento, la pequeña parte que se tomó del pétalo, se desarrolló y tomó el color característico de la variedad. Se produjo también formación de callos en la parte basal y formación de plántulas a partir de éstos, en las cinco réplicas. Las plántulas formadas en ese tratamiento, fueron plantas vitrificadas, una de hojas anchas y otras de hojas enrolladas en forma de tubo, su altura no excedía un cm, su coloración fue entre amarillo claro y verdoso. La apariencia general no fue muy deseable.

En el tercer tratamiento, los segmentos de la parte media y superior del pétalo, crecieron y tomaron el color característico de Nohra Barlo pero no presentaron formación de callos ni de plántulas.

Por lo tanto el explante ideal lo constituye el pétalo completo de longitud aproximada 10-15 mm.

**Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.** De las muestras obtenidas a partir de tallos infectados de clavel, se aisló e identificó el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causante del marchitamiento vascular del clavel.

A los tres días de siembra de los explantes sobre PDA, se pudo observar el comienzo de su crecimiento, de coloración blanca y apariencia algodonosa. En la parte inferior de la caja de petri se observaron coloraciones que se tornaron de rosa pálido en los primeros días de cultivo a púrpura oscuro aproximadamente a los 15 días. La identificación se basó en la clave "FUSARIUM SPECIES" de Nelson y Tousson, página 142.

De las colonias aisladas e identificadas, se

tomaron pequeñas muestras con un sacabocado de 3 mm de diámetro, que se llevaron al medio de cultivo de caseína hidrolizada a 7 días de agitación continua, con lo que se logró el incremento rápido del inóculo. El conteo de esporas dio como resultado 5.000.000 de esporas/ml de medio de caseína.

**Prueba de Kjeldhal.** Una manera de medir el crecimiento del hongo en un cultivo es determinando el aumento de nitrógeno que también puede expresarse como aumento de proteína bruta. Con este fin se realizó la determinación de nitrógeno por microkjeldhal. Este resultado permite que para una posible repetición de los experimentos de inducción de resistencia, se pueda tener un dato preciso que caracterice el material tóxico utilizado. Los resultados se presentan en el cuadro 3.

**Estudio de la regeneración de callos y plántulas en presencia de diferentes concentraciones de *F. oxysporum* inactivado como posible método de selección.** Teniendo en cuenta que los trabajos de Buiatti, Gimelli et al en 1986 demuestran un incremento en la variación natural heredable mediante la utilización de pétalos como explantes y que la obtención de plantas a partir de sus callos fue más alta que con otros explantes, en este trabajo se diseñó un sistema que combina la utilización del cultivo "in vitro" de estos explantes para la regeneración de plántulas con el empleo de concentraciones crecientes de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* autoclavado como medio para ejercer una presión de selección que condujera a la obtención de plántulas resistentes a este hongo.

Analizando los resultados consignados en el cuadro 4, los resultados que se observan

**Cuadro 3.** Resultados de la prueba de Kjeldahl.

Porcentaje de N producido por el testigo (medio de caseína)*	7,7 x 10 <sup>-4</sup> mg/100 ml
Porcentaje de N producido por caseína+el hongo*	7,49 x 10 <sup>-3</sup> mg/100 ml
Porcentaje de N producido por el hongo	6,72 x 10 <sup>-3</sup> mg/100 ml
Porcentaje de proteína producida por el hongo	0,042 mg/100 ml.

\* La cantidad de muestra utilizada fue de 20 ml.

**Cuadro 4.** Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de material tóxico de *F. oxysporum* en la regeneración de callos y plántulas.

TRATAMIENTO porcentaje de ma- terial tóxico	Número de replic.*1	Número de pétalos desarrollad.	Número de callos	Número de plántulas
1 0	18	18	15	8
2 0,078	20	18	14	5
3 0,156	19	17	14	5
4 0,3125	20	20	10	7
5 0,625	20	20	14	5
6 1,25	20	20	10	9
7 2,5	19	19	3	3
8 5	19	19	5	1
9 10	19	19	6	1
10 20	20	20	0	0
11 40	20	20	0	0

\*1: El número de replicaciones del experimento fue 20. La diferencia de replicaciones en los tratamientos se debe a contaminaciones en las unidades experimentales.

en el testigo con respecto a desarrollo del pétalo, formación de callo y de plántulas, son similares a los obtenidos en los dos primeros experimentos (en los tratamientos 5 y 13 del primer experimento y el tratamiento 2 del segundo experimento) en medio sin material tóxico.

Con respecto a la organogénesis, a concentraciones hasta de un 10% de material líquido autoclavado, se logró la obtención de plántulas que potencialmente pueden representar aquellas que han expresado sus mecanismos de defensa o posibles variantes somaclonales tolerantes hasta estos niveles de material tóxico de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Las posibles plántulas variantes, se obtuvieron a los 50 días de siembra de los explantes en condiciones del laboratorio de la empresa "Floramérica S.A.". Esta diferencia de 15 días en la obtención de regeneración de plántulas fue posiblemente debida a la menor temperatura de la cámara de crecimiento de la empresa "Floramérica S.A." (22 grados centígrados).

Las plántulas resultantes en todos los tratamientos presentaron una gran diversidad fenotípica no relacionada con los niveles altos o bajos del material tóxico. En todos los tratamientos se observaron algunas plantas vitrificadas y dentro de ellos su tamaño fue ampliamente variable.

A los 70 días, se observó la formación de plántulas muy pequeñas en los tratamientos 8 (5% de material tóxico) y 9 (10%) que

sobrevivieron poco tiempo y definitivamente no se logró regeneración en los tratamientos 10 y 11. En general en los tratamientos 8, 9, 10 y 11 (a excepción de los casos anteriormente señalados) sólo se observó desarrollo de pétalo.

Los tratamientos 4 y 6 con 0.312% y 1.25% de material tóxico respectivamente, mostraron el mayor número de posibles variantes regeneradas. Estos resultados no presentaron una relación directa en cantidad de plántulas regeneradas con el porcentaje del material tóxico presente en el medio. Con respecto a este resultado se toma como una explicación viable la que deduce Reisch en 1983 quien manifiesta que las variaciones somaclonales inducidas a nivel de callos, dependen primordialmente de las anomalías genéticas celulares (aneuploidia y niveles variables de ploidia) y no del stress impuesto al callo. Estas anomalías pueden ser variaciones tanto mutacionales como epigenéticas como lo señaló Buiatti y Roselli en 1979. Algunas mutaciones son debidas a reversiones o deleciones como lo reportaron Barbier y Dullieu en 1980.

Con respecto a los resultados se puede considerar que si la causa del marchitamiento vascular es fundamentalmente la presencia de toxinas secretadas por el hongo, debería esperarse una relación más directa entre concentración del extracto de *Fusarium* y la disminución del número de plántulas obtenidas.

Y si el efecto fundamental es el taponamiento

miento de los haces vasculares por las estructuras del hongo o por la posibilidad de formación de polímeros que taponen y en este caso por estar el hongo inerte, no tiene la capacidad de penetración al tejido en crecimiento, no debería ocurrir ningún efecto inhibitorio en la formación de plántulas.

Por lo tanto en los resultados se observa una selección en los callos que generan plántulas en presencia del hongo pero no tienen una relación directa con la concentración. Esto podría también interpretarse como la inhibición del efecto de las toxinas en las plántulas regeneradas, reacción posiblemente explicada por la activación o inducción de formación de enzimas, como respuesta al stress producido por el hongo, capaces de bloquear las estructuras presentes en las paredes del patógeno.

En términos generales, se puede considerar que el extracto estéril de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* es un potente factor de selección ya que en concentraciones superiores al 20 por ciento se inhibe totalmente la regeneración de plántulas, como lo muestra la figura 9. Muy seguramente los somaclones obtenidos son variantes genéticas tolerantes a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, pero no necesariamente los regenerados en concentraciones altas son los más tolerantes ya que los que promueve la variación genética es la regeneración adventicia a partir de callos y no es stress al que fueron sometidos. Se hace sin embargo indispensable propagar clonalmente estos somaclones y evaluarlos en condiciones de campo, ya que las modificaciones probablemente obtenidas a través del paso por callos, podrán modificar características fenotípicas como color, forma, tamaño y número

de pétalos; longitud del tallo, precocidad y otros caracteres agronómicos con relación a la variedad de origen Nohra Barlo, además de la tolerancia a *F. oxysporum*.

Las plántulas regeneradas de este experimento se llevaron a subcultivo en el medio de Murashige y Skoog sin hormonas.

**Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de material tóxico de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* en la regeneración de callos y plántulas.** Con el objeto de afirmar los resultados exitosos obtenidos en el experimento anterior, se realizó un nuevo experimento cuyos tratamientos contenían las concentraciones de material tóxico en las cuales se tuvo regeneración de posibles variantes tolerantes en dicho experimento. Como lo muestra el cuadro 5.

Se obtuvo regeneración de plántulas a partir de callos de pétalos en medios tóxicos de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* en todos los tratamientos, siendo el 5 (1.75%) el de mayor cantidad de plántulas, que constituyen posibles variantes tolerantes.

Al igual que en el experimento anterior, no hubo relación directa en cantidad de plántulas regeneradas con el porcentaje de material tóxico presente en el medio, aunque en todas las concentraciones evaluadas hasta 2.5% de material tóxico hubo regeneración de plántulas.

**Evaluación de la efectividad de la técnica de la doble capa como método de selección de callos y plántulas tolerantes a *F. oxysporum*.** En este experimento los tratamientos constaron de diferentes grosores de la segunda capa colocados sobre una capa uniforme de PDA, las relaciones de grosor fueron 1: 1, 1: 1/2, 1: 16\$. El medio de la segunda capa

**Cuadro 5.** Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de material tóxico de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* en la regeneración de callos y plántulas.

TRATAMIENTO porcentaje de ma- terial tóxico	Número de pétalos	Número de callos desarrollad.	Número de raíces	Número de plántulas
1 0	12	12	1	6
2 1	11	11	1	3
3 1.25	13	12	1	4
4 1.5	12	9	1	3
5 1.75	11	9	0	7
6 2	10	5	0	4
7 2.25	12	7	0	4
8 2.50	12	7	2	2

\*: Cada tratamiento tuvo 13 replicaciones.

lo constituyó el medio de regeneración de callos y plántulas a partir de pétalos presentado en el numeral 4.2. El testigo contenía solamente medio para regeneración de callos y plántulas.

Ninguno de los tratamientos de este experimento tuvo respuesta. Los pétalos sembrados sobre la segunda capa no se desarrollaron ni tomaron el color de la variedad. Solo el tratamiento testigo tuvo éxito en la regeneración de callos. No hubo regeneración de plántulas pues el experimento no contó con la presencia de luz, elemento indispensable para la organogénesis.

Se concluye que el medio para la regeneración de callos en la doble capa fue inefectivo debido a una aparente difusión hormonal hacia la primera capa.

#### LITERATURA CITADA

1. Arthur, A.E. 1984. Carnation Breeding: Scope for the future Scientific Horticulture, Vol. 35, p. 78-83.
2. Baker, K. and R. Cook. 1983. The Nature and Practice of Biological control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. Minnesota. p. 138, 139, 338, 339.
3. Barbier M., H.L. et Dulieu. 1980. IN: Colture in vitro e miglioramento genetico. Agric. Ital; p. 45.
4. Behnke, M. 1980. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. Theor. Appl. Genet. p. 56, 151, 152.
5. Booth, C. 1977. *Fusarium*. Common wealth mycological Institute. Kew, Surrey, England. p. 237.
6. Brosh S. 1975. The present status of flower crop protection in Israel. Ext. Service Dept. of plant protection. Tel Aviv. p. 30.
7. Buiatti, M. 1983. Colture in vitro e miglioramento genetico. Agric. Ital., Fasc. 3/4. p. 41-69.
8. ———, G. Roselli. 1979. Variabilità e selezione in piante a propagazione vegetativa. Riv. Ortoflorofrutt. It. p. 63-67.
9. Burgess, L.W. 1981. General Ecology of the Fusaria. pp. 225-235. In Nelson, Toussoun and Cook (Ed.). *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press.
10. Ceballos, F. y D. González. 1989. Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* del clavel en la Sabana de Bogotá. Tesis de Grado Fac. de Ciencias U. Nal. de Col. Bogotá.
11. Dodds, J. and L. Roberts. 1982. Nutritional components of tissue Culture Media. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press; p. 22, 23, 24, 36, 37, 38.
12. Evans, Sharp and Bravo. 1987. Plánt somaclonal variation and mutagenesis. Nestlé Research News. Switzerland; p. 63-65.
13. Fletcher, J.T. and J.A. Martin. 1972. Spread and Control of *Fusarium* Wilt in Carnations. Pl. Pathol; 21, 182-187.
14. Fontanel and Tabata. 1987. Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Nestlé Research News. Switzerland; p. 94.
15. Foroughi-Wehr, Friedt, Schuchmann and Wenzel. 1986. In vitro Selection for resistance. Somaclonal variations and crop improvement. Martinus Nijhoff Publishers. Belgium; p. 35, 45.
16. Garibaldi, A. 1979. Fungal and bacterial diseases of carnation and gerbera. Proc. Eucarpia meeting on carnation and gerbera. Alassio; p. 69-88.
17. ———, M. Lodovica. 1984. Integrater control of fusarium wilt of carnation in Italy. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent. 4912a: 357-362.
18. ———, 1977. Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and varietal susceptibility. Acta Horticulturae 71: 97-101.
19. ———, 1983. Resistenza di cultivar di garofano nei confronti di otto patotipi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill et Del.) Snyder et Hans. Riv. Ortoflorofrutt. It., 67: 261-270.
20. ———, 1978. Susceptibility of carnation to Italian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *F. oxysporum* var. *redolens*. Proceedings of the Eucarpia meeting on carnation and Gerbera, Alassio. p. 141-148.
21. Gegenbach, Green et Donovan. 1977. IN: Colture in vitro e miglioramento genetico. Agric. Ital., 1983, fasc. 3/4: p. 53.
22. Gimelli, Ginatta, Venturo, Positano and Buiatti. 1984. Plantlet regeneration from petals and floral induction "in vitro" in the mediterranean carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Riv. ortoflorofrutt. It. 68: 107-119.
23. Griffin, D. 1981. Fungal Attack Mechanisms. Fungal Physiology. John Wiley & sons. New York. p. 323-332.
24. Holley, W.D., and R. Baker. 1963. Carnation Production. W.C. Brown, Dubuque, Iowa. p. 1, 5, 9, 110, 111.
25. Kevers, C. and Gaspar. 1985. Soluble, Membrane and Wall Peroxidases, Phenylalanine Ammonia - lyase, and Lignin Changes in Relation to vitrification of carnation tissues cultured "in vitro". J. plant. Physiol. vol. 118. p. 41-48.
26. Krikorian, A. 1987. Plant hormones and their role in Plant Growth and Development. Martinus Nijhoff Publishers. New York. p. 593-600.
27. La Empresa. Boletín publicado sin autor ni año.
28. Larson, Roy A. 1980. Introduction to floriculture. Academic Press. North Caroline. p. 49-51, 70-72.
29. Lepoivre, Viseur, Duhem and Carels. 1986.

- Double Layer Culture Technique as a Tool For the Selection of Calluses Resistant to Toxic Material From Plant Pathogenic Fungi. In Jean semal (Ed.). Somaclonal Variations and Crop Improvement. Martinus Nijhoff Publishers. p. 35-45.
30. Leshem, B. 1986. Carnation Plantlets from Vitrified plants as a Source of Somaclonal Variation. *Hortscience*:21 (2): 320-321.
  31. ———, B. and Sachs T. 1985. "Vitrified" *Dianthus-Teratoma* in vitro due to Growth Factor Imbalance. *Annals of Botany* 56, 613-617.
  32. Machardy, W. and Beckman. 1981. Vascular Wilt Fusaria: Infection and pathogenesis. pp. 365-369. In Nelson, Toussound and Cook (Ed.) *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. The Pennsylvania State Univ. Press.
  33. Mastalerz, J. s.f. *The Greenhouse Environment*. John Wiley & sons. Pennsylvania; p. 523-529.
  34. Messiaen, C. and R. Cassini. 1981. Taxonomy of *Fusarium*. pp. 424-433. In Nelson, Toussoun and Cook (Ed.) *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press.
  35. Muller, K.O., and H. Borger. 1940. IN: The nature and practice of Biological control of plant pathogens. The American Phytopathological society. Minnesota; p. 138.
  36. Nelson, P.; T. Toussound and W. Marasas. 1985. *Fusarium Species*. The Pennsylvania State University Press. p. 142-145.
  37. Ramírez, C. 1986. Estudio de la inducción de callos y de cultivos de células en suspensión *in vitro* de *Solanum Tuberosum* L. Variedad "Parda pastusa". Tesis de Grado Fac. de Biología. U. Javeriana. Bogotá.
  38. Reisch, B. 1983. Genetic Variability in Regenerated Plants. *Handbook of plant cell culture*. Vol: 1: Techniques for Propagation and Breeding. New York: McMillan Pub; p. 748-765.
  39. Scheffer, R.P. and Briggs, S.P. 1981. A perspective: of toxin studies in plant pathology. pp. 1-17. In R.D. Durbin (Ed.). *Toxins in plant disease*. Academic Press. Wisconsin.
  40. Schiva, Dalla, Aquila, Bianchini e Garibaldi. 1982. Garofano: Selezione per la resistenza a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Ann. 1st. Flor.* Vol. 13-1: 1-17.
  41. Shepard, J., 1987. In: *Plant somaclonal variation and mutagenesis*. Nestlé Research News. Switzerland; p. 64.
  42. Schertz, K.F., and Y.P. Tai, 1969. Assay. pp. 45-60. In: R.D. Durbin (Ed.) *Toxins in plant disease*. Academic Press. Wisconsin.
  43. Sparnaaij, L.D. 1978. *Current Research on Carnation with special Reference to Breeding*. Proceedings of the Eucarpia meeting on carnation and Gerbera, Alassio. p. 47-50.
  44. ———, L.D. and J.F. Demmink. 1977. Progress Towards *Fusarium* Resistance in Carnation. *Acta Horticulturae* Vol. 71: 107-113.
  45. Steiner, G.W. and R.S. Byther. 1971. In: *Toxins in plant disease*. Academic Press. Wisconsin; p. 55.
  46. Stoessl A. 1983. *The Dynamics of Host Defence*. Academic Press. Australia; p. 106-107.
  47. Sturgis. 1898. In: *Carnation Production*. W.C. Brown, Dubuque, Iowa. p. 110.
  48. Vesonder, R.F. and C.W. Hesseltine . 1981. *Metabolites of Fusarium*. *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press; p. 350-351.
  49. Wheeler and Luke. 1955. IN: *Toxins in plant disease*. Academic Press. Wisconsin. p. 54.
  50. Wickens, G.M. 1935. In: *Carnation Production*. W.C. Brown Dubuque, Iowa. P. 110.
  51. Yoder, O.C. 1981. Assay. *Toxins in plant disease*. Academic Press. Wisconsin. p. 45-55.