

Patogenicidad, identificación morfo-molecular del agente causal de la pudrición de frutos de calabaza pipiana y marchitez del chile

GARCIA-VILLANI, Vianney[`], AYVAR-SERNA, Sergio[†], DÍAZ-NÁJERA, José Francisco^{*`}, MENA-BAHENA, Antonio[`].

apigro1988@hotmail.com

[`]Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Avenida Vicente Guerrero Núm. 81. Iguala, Guerrero, C.P. 40000.

[†]Universidad Autónoma Chapingo, Dpto. de Fitotecnia, Posgrado en Horticultura, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México C.P. 56230.

Recibido Julio 14, 2015; Aceptado Enero 20, 2016

Resumen

Patogenicidad e identificación morfológica y molecular de *P. capsici* Leonian aislado de calabaza pipiana. Se realizó un muestreo de frutos de calabaza pipiana (*C. angyrosperma* Huber) con síntomas de pudrición, en el Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Las muestras colectadas se analizaron en laboratorio, se aisló y purificó el hongo; se identificó en base a las características morfológicas, culturales y la formación de las clamidosporas. Asimismo, se realizó análisis del ADN micelial del hongo mediante PCR. La patogenicidad se corroboró trasplantando plantas sanas de chile de 30 días de edad, en arena esteril (460 g), dejando un tratamiento con tres repeticiones sin inocular y tres tratamiento con sus respectivas repeticiones, inoculadas de diferente manera. Las plantas control permanecieron sanas, las inoculadas desarrollaron síntomas a los seis días después de la inoculación, demostrando que hubo mayor severidad en las plantas inoculadas con discos de V8-Agar + el patógeno, directamente al cuello de la planta de chile. La identificación morfológica, molecular y la prueba de patogenicidad, confirmaron que *P. capsici* es el agente causal de la marchitez del chile.

Palabras clave: inoculación, marchitez, patogenicidad

Abstract

Pathogenicity and morphological and molecular identification of *P. capsici* Leonian pumpkin isolated pipiana sampling pipiana fruits of pumpkin (*C. angyrosperma* Huber) with symptoms of rot in the Agricultural College of the State of Guerrero was performed. The collected samples were analyzed in the laboratory, he was isolated and purified fungus; It was identified based on morphological, cultural and chlamydo spores formation characteristics. Furthermore, DNA analysis mycelial fungus was performed by PCR. Pathogenicity was confirmed by transplanting healthy pepper plants 30 days old, in sterile sand (460 g), leaving a treatment with three repetitions and three treatment inoculate their repetitions, inoculated differently. Control plants remained healthy, developed symptoms inoculated six days after inoculation, showing that there were more severe in plants inoculated with discs of V8-Agar + pathogen directly to the neck of chili plant. The morphological, molecular identification and pathogenicity test, confirmed that *P. capsici* is the causative agent of chile wilt.

Key words: inoculation wilt pathogenicity

Citación: GARCIA-VILLANI, Vianney, AYVAR-SERNA, Sergio, DÍAZ-NÁJERA, José Francisco, MENA-BAHENA, Antonio. Patogenicidad e identificación morfo-molecular del agente causal de la pudrición de frutos de calabza pipiana y marchitez del chile, Foro de Estudios sobre Guerrero, Noviembre de 2015. Mayo 2015 – Abril 2016, 2-3:37-42

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: *apigro1988@hotmail.com*)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

©COCYTIEG

www.fesgro.mx

Introducción

Entre los cultivos de mayor importancia económica en México se encuentra el chile (*Capsicum annum* L.). En diversas zonas donde se produce esta solanácea, la marchitez del chile, inducida por el oomycete *P. capsici* es una de las enfermedades más importantes que puede causar, de pérdidas 70% en la producción de esta hortaliza en México (Cardona, 2013). En la agricultura convencional se prefiere la aplicación de fungicidas sintéticos porque se busca la posibilidad de encontrar una solución más rápida a este problema; además estos productos están disponibles en una amplia gama, surten efecto a corto plazo y son de fácil acceso y uso. Sin embargo, tienen las principales desventajas de crear poblaciones resistentes de fitopatógenos, son tóxicos para los humanos y contaminan el medio ambiente. Entre las alternativas alentadoras para sustituir o disminuir la aplicación del control químico, está la utilización de los fitoextractos vegetales; que se han empleado desde tiempos remotos en el control de microorganismos fitopatógenos; son una alternativa económica y eficiente para el control de enfermedades, y permiten una producción agrícola más sostenible y menos contaminante. De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se propone identificar morfológica y molecularmente al patógeno, agente causal de la marchitez del chile; comprobar su patogenicidad y, en una fase preliminar, evaluar *in vitro* el efecto de fungicidas químicos, cepas de *Trichoderma spp.*, y extractos vegetales, sobre el crecimiento del hongo asociado a esta enfermedad de la raíz, con el propósito de aportar información que pueda contribuir a hacer más eficiente el manejo integrado de este hongo fitopatógeno.

Metodología

Muestreo y material vegetal

ISSN 2007-882X

COCYTIEG ® Todos los derechos reservados

Durante agosto del 2011 se colectaron frutos con síntomas de pudrición de *C. angyrosperma*, en un lote experimental del Centro de estudios profesionales del Colegio superior Agropecuario del Estado de Guerrero, en el municipio de Cocula, Gro., en la zona norte del estado. (Figura 1) y se realizó el diagnóstico fitosanitario en el laboratorio de Fitopatología del CEP-CSAEGro.

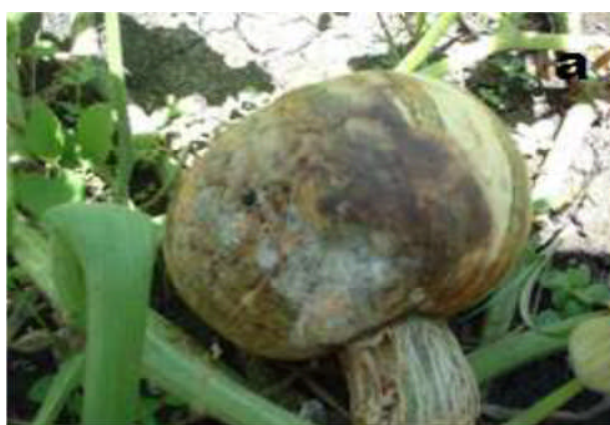


Figura 1. Pudrición de fruto en calabaza pipiana.

Aislamiento y purificación del patógeno

De los frutos de calabaza, se cortaron trocitos de 1 cm², abarcando partes de tejido enfermo en la zona de avance de la infección, se lavaron los trocitos con agua destilada y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5%; se enjuagaron con agua destilada estéril durante 3 minutos; se colocaron en cajas Petri conteniendo medio de cultivo jugo de verduras V8-agar (Singleton *et al.* 1992); se sellaron las cajas con parafilm, se incubaron a temperatura ambiente (26 ± 28 °C) por cinco días, y se purificó el hongo transfiriendo puntas de hifas en nuevas cajas Petri con V8-agar, se incubaron a temperatura ambiente, hasta que se formaran estructuras reproductivas típicas del hongo para su identificación morfológica (Fernández *et al.*,

GARCIA-VILLANI, Vianney, AYVAR-SERNA, Sergio, DÍAZ-NÁJERA, José Francisco, MENA-BAHENA, Antonio. Patogenicidad e identificación morfo-molecular del agente causal de la pudrición de frutos de calabaza pipiana y marchitez del chile, Foro de Estudios sobre Guerrero

2013). La cepa fungosa se transfirió a un tubo de ensayo con V8-agar para conservar el aislamiento y utilizarlo en los ensayos experimentales subsecuentes (Tuite, 1996).

Identificación morfológica

De los frutos de calabaza con síntomas y signos de pudrición, se tomaron 5 trozos de tejido de 1 cm² de la zona de avance de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por tres minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron. Posteriormente se colocaron en cajas Petri conteniendo medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y jugo de verduras Agar (V8-Agar) (Singleton et al., 1992). Cada colonia desarrollada se aisló y purificó por punta de hifa. Se hicieron preparaciones y se observaron al microscopio compuesto las características morfológicas de los conidios. La identificación se realizó con las claves reportadas por Barnnett y Hunter (1998), Leslie y Summerell (2006), Sneh *et al.* (1991) y Wantanabe (2002).

Prueba de patogenicidad

Se utilizó una suspensión de inóculo con 4×10⁶ UFC (unidades formadoras de colonias; esporangios) mL⁻¹ del oomycete y 15 plántulas de chile criollo ancho liso (apaxtleco) de 30 días de edad, cultivadas previamente en vasos de unisel n° 9 (9x13.5 cm) con arena esterilizada; la inoculación se efectuó en cuatro tratamientos con tres repeticiones, de la siguiente manera: 1) Testigo: las plantas sanas se regaron con agua purificada de garrafón tres veces diario, 2) Se cortaron (cinco) discos de 0.5 cm de diámetro de V8-agar + colonia del hongo se utilizaron como inóculo colocandolos; en la arena cerca del cuello de la planta sana. 3) Se cortaron cinco discos (0.5 cm de diámetro) de V8-agar + colonia del hongo; se depositaron en 20 mL de agua destilada para obtener una

suspensión de inóculo con 4×10⁶ UFC mL⁻¹, con un atomizador se aplicó 3 veces al día al cuello de la planta. 4) Se cortaron cinco discos de 0.5 cm de diámetro de V8-agar + el hongo; se hizo una suspensión con agua destilada esterilizada en un tubo de ensayo, se vació en una caja Petri (sin tapa); al vaso desechable se le hizo varias perforaciones en la base para que por osmosis se propagara el patógeno. Se incubaron a 26°C y 60% de humedad relativa. Los síntomas de avance de pudrición se registraron diariamente por seis días. De las zonas de avance de pudrición en el tejido se obtuvieron 10 muestras (± 0.5 cm²) y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 min, lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril, secaron en papel toalla estéril y sembraron en medio de cultivo V8-Agar. Las características morfológicas de la colonia re-aislada fueron determinadas para completar los postulados de Koch.

Identificación molecular

La extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) se realizó a partir de 50 a 100 mg de micelio utilizando el kit DNeasyMR (Qiagen, 2012); se efectuaron 4 repeticiones. Se realizaron reacciones en cadena de polimerasa (PCR) universal para hongos (White *et al.*, 1990). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa a 1.5 %, las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP. Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron y se compararon los resultados con la información disponible en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de EE.UU.

Resultados

Aislamiento y purificación del patógeno

De las muestras de fruto con pudrición, se aisló y purificó al patógeno asociado con los síntomas de marchitez del chile. Las colonias del hongo crecieron, en promedio, 0.85 cm día^{-1} , en V8-Agar a $\pm 28 \text{ °C}$; produce una colonia con micelio liso, forma círculos concéntricos por la luminosidad (Figura 2A), y cuando tiene condiciones de humedad favorables forma un crecimiento algodonoso de color blanco, (Figura 2B). Las características culturales observadas correspondieron a las descripciones de Singleton et al. (1992); Mendoza (1993) y Wantanabe (2002). Para la especie *Phytophthora capsici*.

Identificación morfológica

Después de 6 días en medio de cultivo V8-agar, el oomiceto reaislado de frutos inoculados que manifestaron síntomas; produjo esporangios en simpodio simple, ovoides, elongados, elípticos, limoniformes, con una o dos papilas bien desarrolladas, así como oogonios esféricos, terminales anteridios claviformes, terminales anfiginos (Figura 2.5). Estas características morfológicas son similares a las descritas para *P. capsici*, por Singleton et al. (1992); Mendoza (1993) y Wantanabe (2002).

Prueba de patogenicidad

Los postulados de Koch permitieron comprobar que el aislamiento purificado es patogénico, porque provoca los síntomas de marchitez cuando se inocula en la planta sana de chile criollo ancho liso apaxtleco; seis días después de la inoculación con la suspensión de conidios de *P. capsici*, las plantas inoculadas mostraron síntomas de marchitez; se verificó que la mayor severidad de la enfermedad se desarrolló en plantas inoculadas con discos de V8-agar + colonia del hongo, colocadas directamente en el cuello de la planta (Figura 2A). Los frutos

control permanecieron libres de la enfermedad (Figura 2B). El re-aislamiento del hongo presentó las mismas características que el aislamiento originalmente inoculado, con lo que se cumplió el protocolo de los postulados mencionados (Bauer, 1984; Agrios, 2005).

Identificación molecular

Las regiones intergénicas internas ITS de los genes ribosomales (ARNr) amplificadas por PCR, del aislamiento identificado morfológicamente como *P. capsici*, concuerda con las secuencias obtenidas, tuvieron un 95 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con la secuencia de *P. capsici* gb|KC311834.1| (GenBank).

Discusión

Díaz (2013) evaluó la patogenicidad de *P. capsici* en calabaza pipiana y reportó que los primeros síntomas inducidos por *P. capsici* ocurrieron a los 6 a 8 ddi, con una incidencia de la enfermedad del 100 %, dichos resultados no difieren por los encontrados en el presente estudio dado que el 100% de incidencia de la enfermedad se presentó a los 6 ddi. Las plantas infectadas tuvieron reducción del crecimiento, amarillamiento del follaje y pudrición, de aspecto leñoso y agrietado del cuello de la planta. Dicha similitud de la presencia del patógeno a los días de inoculación coinciden con este trabajo.

Agradecimientos

Al Colegio Superior Agropecuario del estado de Guerrero, al área de fitopatología por la colaboración en la realización del presente estudio.

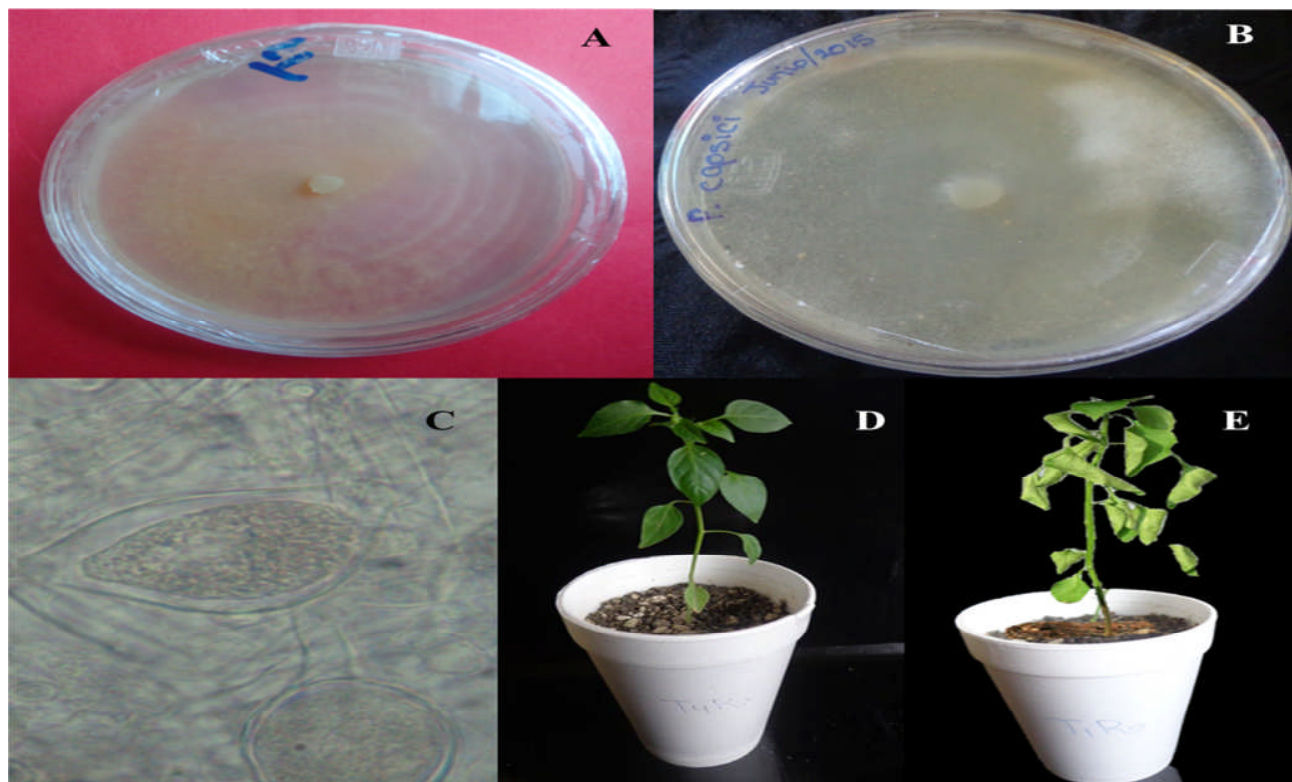
Conclusiones

Las características culturales del aislamiento y la morfología del mismo determinaron que *P. capsici*, es el agente causal de la marchitez del chile, la identidad morfológica fue corroborada por la identificación molecular.

La patogenicidad se corroboró con la incidencia de la enfermedad en las plantas de chile criollo ancho liso apaxtleco inoculadas con *P. capsici*,

Figura 2. A: Aislamiento con anillos concéntricos. B: Aislamiento joven algodonoso blanco C: Esporangios bipapilados D: planta de chile control sana. E: Prueba de patogenicidad, inoculación directamente al cuello de la planta con discos de V8-

mismas que mostraron reducción del crecimiento amarillamiento del follaje, pudrición de aspecto leñoso y agrietados, en el cuello de las plantas.



Agar + el patógen (*P. capsici*).

Referencias

Agrios, G. (2005). Plant Pathology. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. 922 p.
 Agrios, G. (2005). Plant Pathology. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. 922 p.

Barnett, H., and Hunter, B. (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological D. F. 726 p

Bauer, I.M.L. (1984). Fitopatología. Ed. Futura. México, D.F.

Cardona, A. J. (2013). Evaluación de genotipos de ajíes (*Capsicum* spp.) resistentes a pudriciones radicales causadas por

Fusarium sp y *Phytophthora capsici*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 11p

edition. CRC PRESS. New York Washington, D.C. 500 pp.

- Fernández, H.E., Guerrero, R.J.C., Rueda, P.E.O., y Acosta R. M. (2013). Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Biotecnia* 15(3): 46-50.
- Leslie, J. F. and Summerell B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Kansas Agricultural Experiment Station, Manhattan.
- Mendoza Z. C., (1993). Diagnóstico de enfermedades fungosas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo. 97 p.
- Quiagen. (2012). Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Versión 2. Alemania. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: M.A. Inns, D.H. Gelfland, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.). *PCR Protocols*. pp. 315-322. Academic Press. San Diego, CA.
- Singleton, L.L., Mihail, J.D. y Rush, Ch.M. (1992). *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. The American Phytopathological Society. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 265 p.
- Tuite, J. (1996). *Plant pathological methods; fungi and bacteria*. Burgess, Minneapolis USA. 239 pp.
- Wantanabe, T. (2002). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultures Fungi and Key to Species*. Second