

Etiología de la Marchitez de Plantas de Chayote (*Sechium edule*) en el Estado de Veracruz

Etiology of Chayote (*Sechium edule*) Wilting Plants in the State of Veracruz

Gildardo Olguín Hernández, Guadalupe Valdovinos Ponce, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco Edo. de México. CP 56230, México; **Jorge Cadena Íñiguez**, Campus San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados. Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. CP 78600, México; **Ma. de Lourdes Arévalo Galarza**, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad- Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco Edo. de México. CP 56230, México. Correspondencia: gvapon@colpos.mx

(Recibido: Junio 05, 2013 Aceptado: Enero 08, 2014)

Olguín Hernández G, Valdovinos Ponce G, Cadena Íñiguez J y Arévalo Galarza ML. 2013. Etiología de la Marchitez de Plantas de Chayote (*Sechium edule*) en el estado de Veracruz. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 161-169.

Resumen. México es el principal productor y exportador de chayote (*Sechium edule*) verde liso a nivel mundial. En Veracruz, en donde se produce más del 70 % del volumen nacional, la marchitez de plantas se presentó desde 1990 como uno de los problemas fitosanitarios principales del cultivo. El objetivo de este trabajo fue determinar la etiología de la marchitez de plantas de chayote en la región Centro del estado de Veracruz. En el ciclo de producción 2011-2012, se muestrearon 14 plantas con marchitez y se obtuvieron las raíces cercanas a la zona de origen de brotes nuevos. Se cortaron 30 segmentos de la zona de avance del tejido necrosado, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 3 %, se lavaron con agua estéril y se sembraron en los medios de cultivo PARPNH, PDA y V8-agar. En condiciones de invernadero, se inocularon las guías basales de 60 plantas mediante la colocación de esporangios. Los síntomas aparecieron 22 d después de la inoculación como marchitamiento y amarillamiento foliar. De las plantas inoculadas se re-aisló e identificó molecular y morfológicamente a *Phytophthora capsici*, reportándolo por primera vez en México como el agente causal de la marchitez de plantas de *S. edule* en Veracruz.

Palabras clave adicionales: *Phytophthora capsici*, marchitamiento, diagnóstico, identificación molecular.

El fruto de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) se cosecha en madurez hortícola a los 18 ± 2 días después de anthesis (Aung *et al.*, 1996; Cadena *et al.*, 2007) y se consume principalmente como verdura. El cultivo evolucionó comercialmente de hortaliza de traspatio a producto de

Abstract. Mexico is the main producer and exporter of smooth green chayote (*Sechium edule*) worldwide. In the state of Veracruz, where it is produced more than 70 % of the national volume, wilting of chayote plants has been there since 1990 as an important phytosanitary problem. The objective of this work was to determine the etiology of wilting plants of chayote in the Central region of state of Veracruz. During the 2011-2012 production cycle, 14 plants with wilting symptoms were sampled, and roots were harvested at the shoot emerging zone. Thirty segments were dissected at the advancing zone of necrotic tissue, disinfested with 3 % sodium hypochlorite, washed with sterile distilled water and cultured onto PARPNH, PDA and V8-agar media. The basal guides of 60 plants were inoculated by sporangium deposition and kept under greenhouse conditions. Symptoms appeared 22 d after inoculation as wilting and yellowing of leaves. *Phytophthora capsici* was reisolated from the inoculated plants, and identified molecular and morphologically for first time in Mexico as the causal agent of the *S. edule* wilting plants in Veracruz.

Additional keywords: *Phytophthora capsici*, wilting, diagnosis, molecular identification.

The fruit of chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw) is harvested at horticultural maturity of 18 ± 2 d after anthesis (Aung *et al.*, 1996; Cadena *et al.*, 2007) and is mainly consumed as a vegetable. This crop evolved commercially from backyard vegetable to exportation product with high demand in United States and Canada, ranking within the non-traditional vegetables of highest importance in national exports (Cadena *et al.*, 2001). It has social importance because of the manpower required, for example, in a 4 ha commercial orchard, 30 to 35 people (80 % women) are employed for a period of 6-9 months; in addition, because

exportación con amplia demanda en Estados Unidos y Canadá, ubicándose dentro de las hortalizas no tradicionales de mayor importancia en la exportación nacional (Cadena *et al.*, 2001). Tiene importancia social por la mano de obra que demanda, ya que en una huerta comercial de 4 ha se emplean de 30 a 35 personas (80 % mujeres) por un periodo de 6 a 9 meses; además, debido a que el fruto se puede dañar fácilmente, su cosecha y empaque requieren mano de obra adicional (GISEM, 2008).

Como resultado del éxito comercial del chayote en los mercados de Norteamérica, la superficie de la producción nacional como monocultivo ha aumentado considerablemente, lo que generó la aparición de problemas fitosanitarios, principalmente la marchitez de plantas, que no solo limitan el volumen y la calidad de la producción, sino también ponen en riesgo las fuentes de empleo (GISEM, 2011).

En México, la zona de producción de chayote más importante se ubica en la región central de Veracruz, en los municipios de Coscomatepec, Huatusco, Ixhuatlán del Café, Chocamán, Tlilapan, Orizaba, Rafael Delgado, Amatlán de los Reyes, Cuichapa e Ixtaczoquitlan (Cadena *et al.*, 2010).

Durante los meses de mayor precipitación (junio-noviembre), incrementa la incidencia de plantas de chayote con síntomas de marchitez por pudrición de raíces. Los productores asocian estos síntomas con *Phytophthora* sp. y aplican para su control fungicidas a base de metalaxyl, lo cual reduce la incidencia; sin embargo, no existen reportes que indiquen que *Phytophthora* sp. sea el agente causal. Olguín (2010), reportó la asociación de *Fusarium oxysporum* y *F. sambucinum* con los mismos síntomas, pero el estudio no comprobó que estos hongos fueran los agentes causales primarios de la enfermedad. La falta de conocimiento sobre la etiología de este problema fitosanitario ha mermado la productividad del cultivo y debido a la aplicación indiscriminada de fungicidas, se han incrementado los costos de producción y el riesgo de seleccionar organismos resistentes al metalaxyl y mfenoxam, sin que exista un control eficiente (FRAC, 2012; Jackson *et al.*, 2010; Café y Ristiano, 2008; Lamour y Hausbeck, 2000). Con base en estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue determinar la etiología de la marchitez de plantas de chayote en huertas comerciales de dos localidades de la región central de Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zonas de muestreo. Las zonas de muestreo se localizaron en Tlaltengo (1480 msnm, 97° 00' de longitud oeste y 19° 05' de latitud norte) y Huatusco (1300 msnm, 95° 58' de longitud oeste y 19° 09' de latitud norte) en los municipios de Coscomatepec y Huatusco, respectivamente en Veracruz, México (Soto y Gómez, 1994; Cadena *et al.*, 2005). Dichas localidades forman parte de la principal región productora de chayote, en donde prevalece vegetación de bosque pino-encino y mesófilo de montaña (Vázquez *et al.*, 1992). Las plantaciones se manejan en condiciones de temporal y con densidades de plantación que varían de 100-128 plantas por hectárea.

the fruit can be easily damaged, its harvesting and packaging require additional labor (GISEM, 2008).

As a result of the commercial success of chayote in North American markets, the area of national production as monoculture has increased considerably, which led to the emergence of phytosanitary problems, mainly the wilting plants, which not only limit the amount and quality of production, but also threaten the employment opportunities (GISEM, 2011).

In Mexico, the most important chayote production area is located in the central region of Veracruz, in the municipalities of Coscomatepec, Huatusco, Ixhuatlán del Café, Chocamán, Tlilapan, Orizaba, Rafael Delgado, Amatlán de los Reyes, Cuichapa and Ixtaczoquitlan (Cadena *et al.*, 2010).

During the months of highest precipitation (June-November), the incidence of chayote wilting plants with root rots increases. Producers associate these symptoms with *Phytophthora* sp. and they apply metalaxyl based fungicides for its control, which reduces the incidence; however, there are no scientific reports indicating that *Phytophthora* sp. is the causal agent. Olguín (2010), reported the association of *Fusarium oxysporum* and *F. sambucinum* with the same symptoms, but the study did not show that these fungi were the primary causal agents of the disease. The lack of knowledge about the etiology of this phytosanitary problem has reduced the crop productivity and due to the indiscriminate application of fungicides, production costs and the risk of selecting metalaxyl and mfenoxam resistant organisms, have increased without existing an efficient control (FRAC, 2012; Jackson *et al.*, 2010; Café y Ristiano, 2008; Lamour y Hausbeck, 2000). Based on this background, the aim of this study was to determine the etiology of chayote wilting plants in commercial orchards of two locations in the central region of Veracruz.

MATERIALS AND METHODS

Sampling areas. The sampling areas were located in Tlaltengo (1480 masl, 97° 00' west longitude and 19° 05' north latitude) and Huatusco (1300 masl, 95° 58' west longitude and 19° 09' north latitude) in Coscomatepec and Huatusco municipalities respectively in Veracruz, Mexico (Soto y Gómez, 1994; Cadena *et al.*, 2005). These locations are part of the main chayote producing region, where the prevailing vegetation are the pine-oak and cloud forests (Vázquez *et al.*, 1992). The plantations are managed under rainfall conditions with and plant densities ranging from 100-128 plants per hectare.

Symptoms characterization and isolation of microorganisms. Commercial orchards of smooth green chayote were surveyed during June, August and October 2011. The wilting plants were identified visually because of their sagging and dark coloration of the leaves (Figure 1A) and the soft consistency of watery appearance of the basal guides (guías basales). For the isolation of microorganisms, it was cut the transition zone between stem and root (this is the origin area of new shoots where the cortex and vascular tissue showed lesions of necrotic appearance and exudates)

Caracterización de síntomas y aislamiento de microorganismos. Se recorrieron parcelas comerciales de chayote verde liso en los meses de junio, agosto y octubre del 2011. Las plantas con síntomas de marchitez se localizaron de forma visual por la flacidez y coloración oscura de las hojas (Figura 1 A) y por la consistencia blanda de apariencia acuosa de las guías basales. Se cortó la zona de transición entre el tallo y la raíz (zona de origen de brotes nuevos en donde la corteza y el tejido vascular presentaron lesiones de apariencia necrótica y exudados) (Figura 1 B) de 11 y 3 plantas recolectadas en Coscomatepec y Huatusco respectivamente, para hacer el aislamiento de microorganismos.

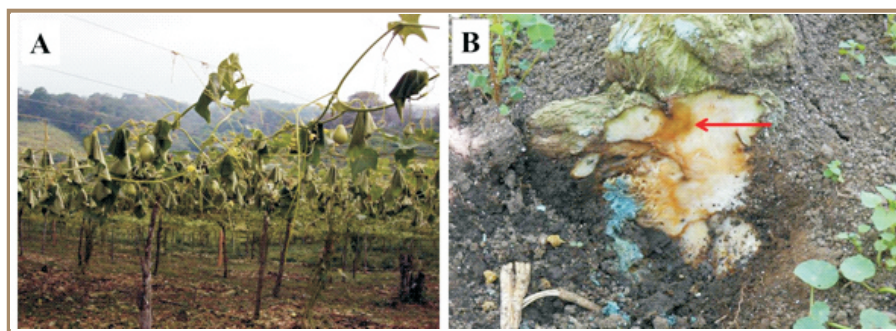


Figura 1. Plantas de chayote (*Sechium edule*) verde liso con síntomas de marchitez (A) en huerta comercial en la región central de Veracruz, México 2011. Zona de infección y avance de la necrosis (tejido de transición entre tallo y raíz) (B).

Figure 1. Smooth green chayote (*Sechium edule*) plants with wilting symptoms (A) in a commercial orchard in central Veracruz, Mexico 2011. Infection area and necrosis progression (tissue transition between stem and root) (B).

Pruebas de patogenicidad

Aislamiento de microorganismos. La zona de transición entre el tallo y las raíces de cada una de las 14 plantas se disectó en 30 fragmentos de 5 mm de longitud. Las 420 muestras obtenidas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % por 4 min, se lavaron por 3 min con agua destilada estéril y se secaron completamente con sanitas esterilizadas. Las muestras se cultivaron equitativamente en PARPNH (jugo V8 con pimaricina 0.01 g, ampicilina 0.25 g, rifampicina 0.01 g, pentacloronitrobenzeno 0.05 g e himexazol 0.05 g) (Erwin y Ribeiro, 1996), PDA y V8 (jugo V8 300 mL, CaCO₃ 4.5 g, agar 20 g) acidificado con ácido láctico al 25 % durante 48 h a 30 ± 2 °C en oscuridad continua.

Los hongos y oomicetes que crecieron se transfirieron y purificaron en PDA y V8-agar frescos mediante las técnicas de cultivos monoconidiales y monozoospóricos, respectivamente. Los oomicetes purificados se utilizaron para realizar las pruebas de patogenicidad e identificación (Erwin y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008; Barnett y Hunter, 2006; Leslie y Summerell, 2006).

Preparación del inóculo. El inóculo se preparó a partir del microorganismo que tuvo el valor más alto en la frecuencia de aislamientos, y se obtuvo de cultivos de 6 días de crecimiento en medio V8-agar. Cinco rodajas de medio de cultivo con crecimiento micelial de 1.0 cm de diámetro se transfirieron a 100 mL de medio V8-líquido con dos gotas de

(Figure 1 B) of 11 and 3 plants collected in Coscomatepec and Huatusco respectively.

Pathogenicity tests

Isolation of microorganisms. The transition zone between the stem and roots of each of the 14 plants were dissected into 30 pieces of 5 mm length. The 420 samples obtained were disinfested with 3 % sodium hypochlorite for 4 min, washed for 3 min with sterile distilled water and thoroughly dried with sterile paper towels. The samples were cultured equitably in PARPNH (V8 juice with 0.01g pimaricin, 0.25g ampicillin, 0.01g rifampicin, 0.05g pentachloronitrobenzene and 0.05 g hymexazol) (Erwin and Ribeiro, 1996), PDA and V8 (300 mL of V8 juice, 4.5 g

CaCO₃, 20 g agar) acidified with 25 % lactic acid for 48 h at 30 ± 2 °C in continuous darkness.

Grown fungi and oomycetes were transferred and purified on fresh PDA and V8-agar using monoconidial and mono zoosporic culture techniques, respectively. Purified Oomycetes were used for pathogenicity tests and identification (Erwin y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008; Barnett y Hunter, 2006; Leslie y Summerell, 2006).

Inoculum preparation. The inoculum was prepared with the most frequently isolated microorganism; it was obtained from 6 d old cultures growth on V8-agar medium. Five slices of culture medium with 1.0 cm in diameter mycelial growth were transferred to 100 ml of V8-liquid medium with two drops of 25 % lactic acid. The oomycete was cultured at 25 ± 2 °C without agitation and after 5 d of growth, it was transferred on to 90 mm in diameter Petri dishes with 6 mL of sterile distilled water. Cultures were maintained under white light at 25 ± 2 °C for 24 h to induce the sporangia formation. The inoculum concentration was adjusted to 11,500 sporangia mL⁻¹.

Inoculation and reisolation. Sixty plants were inoculated at 28 d after they were sown. Ten mL of the sporangial suspension were placed on the base of the first shoot emitted by the fruit. As a control experiment, sterile distilled water was placed at the base of the first shoot of 20 plants at the same development stage than those inoculated with sporangia. All plants were kept under a 50/50 shade cloth in a greenhouse at 28 ± 3 °C, and 70 % relative

ácido láctico al 25 %. El oomicete se cultivó a 25 ± 2 °C sin agitación y después de 5 d se transfirió a cajas Petri de 90 mm de diámetro con 6 mL de agua destilada estéril. Los cultivos se mantuvieron bajo luz blanca a 25 ± 2 °C durante 24 h para inducir la formación de esporangios. La concentración del inóculo se ajustó a 11,500 esporangios mL⁻¹.

Inoculación y reaislamiento. Se inocularon 60 plantas a los 28 días después de la siembra. Se colocaron 10 mL de la suspensión de esporangios en la base del primer brote emitido por el fruto. Como tratamiento testigo se depositó agua destilada estéril en la base del primer brote de 20 plantas en la misma etapa de desarrollo que las inoculadas con los esporangios. Todas las plantas se mantuvieron bajo malla sombra (50/50) en invernadero a 28 ± 3 °C, humedad relativa del 70 % y riego a saturación por 30 días. Una vez que las plantas mostraron los síntomas de marchitamiento, se reaislaron los microorganismos en medio de cultivo V8-agar y PDA. Las colonias obtenidas se compararon morfológicamente con los aislamientos originales que se obtuvieron de las huertas comerciales.

Caracterización morfológica. Se describieron las características cualitativas y cuantitativas de 50 estructuras reproductivas sexuales (oogonio y anteridio) y 100 estructuras asexuales (esporangióforo y esporangios) crecidas en medio V8-agar. Se hicieron preparaciones semi-permanentes teñidas con azul de algodón y se observaron en un microscopio compuesto (VE-B6, Velab). El registro fotográfico se hizo con un microscopio Nikon Eclipse E400 con cámara integrada.

Las estructuras reproductivas sexuales se indujeron a partir del apareamiento entre uno de los aislamientos obtenidos de la zona de transición entre el tallo y la raíz de las plantas recolectadas en Huatusco, y un aislamiento obtenido de frutos de la misma especie recolectada en Cuautlapan, Veracruz.

La identificación del género se hizo con las claves de Erwin y Ribeiro (1996), y para especie con las descritas por Gallegly y Hong (2008). La determinación de género y especie de los aislamientos fungosos se hicieron con las claves de Barnett y Hunter (2006), y con las descritas por Leslie y Summerell (2006), respectivamente.

Identificación molecular. La extracción del ADN (Silva *et al.*, 2009; Bowers *et al.*, 2006) se hizo a partir de un cultivo de 4 d de crecimiento en medio líquido V8 a 20-25 °C. Se tomó una porción de aproximadamente 5 mm de micelio y se colocó en tubos Eppendorf de 200 µL con 30 µL de la solución de lisis (Lyse N Go, Pierce®, EE.UU.). Las muestras se incubaron a 95 °C durante 5 min y se centrifugaron (EBA21, Hettich® Zentrifuge) por 10 min a 3000 g. La amplificación del ADN de la región ITS se hizo con los iniciadores universales ITS6 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo la enzima 1 x Taq DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleosidotrifosfatos (0.2mM cada uno), 100 ng de ADN, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de GoTaq DNA (Promega®, EE.UU.). Las amplificaciones se

hicieron en un volumen final de 25 µL. Después de la amplificación, las plantas se regaron hasta el punto de saturación por 30 d. Once plantas mostraron síntomas de marchitamiento, los microorganismos fueron reaislados en V8-agar y PDA como medios de cultivo. Las colonias obtenidas fueron morfológicamente comparadas con los aislamientos originales obtenidos de huertas comerciales.

Morphological characterization. Qualitative and quantitative characteristics of 50 sexual reproductive structures (oogonium and antheridium) and 100 asexual structures (sporangiophore and sporangia) grown on V8-agar medium were described. Semi-permanent preparations stained with cotton blue were made and observed under a compound microscope (VE-B6, Velab). The photographic record was made with a Nikon Eclipse E400 microscope with an integrated camera.

Sexual reproductive structures were induced by pairing one of the isolates obtained from the transition zone between the stem and root of plants collected in Huatusco, and one fruit isolate obtained from the same species collected in Cuautlapan, Veracruz.

Gender identification was done by using the Erwin and Ribeiro keys (1996), and the species with those described by Gallegly and Hong (2008). Genus and species designation of the fungal isolates were done following the Hunter (2006) and, Leslie and Summerell (2006), keys respectively.

Molecular identification. DNA extraction (Silva *et al.*, 2009; Bowers *et al.*, 2006) was done from a 4 d old culture growth in V8 liquid medium at 20-25 °C. Approximately 5mm mycelium were placed in 200 µL Eppendorf tubes with 30 µL of the lysis solution (Lyse N Go, Pierce®, USA). The samples were incubated at 95 °C for 5 min and centrifuged (EBA21, Hettich® Zentrifuge) for 10 min at 3000 g. DNA amplification of the ITS region was done with the ITS6 (5'-G G A A G T A A A A G T C G T A C A A G G -3') universal primers and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). The PCR reaction mixture was prepared in a final volume of 25 µL containing 1x Taq DNA polymerase enzyme, 0.8 mM deoxy nucleoside triphosphates (0.2mM each), 100 ng of DNA, 20 pmol of each primer and 2 units of DNA GoTaq (Promega®, USA). Amplifications were carried out in a thermal cycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200; BIORAD®, Mexico) with an initial denaturation cycle at 95°C for 2 min; 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, alignment at 57 °C for 1 min, a final extension at 72 °C for 2 min, and a final amplification cycle at 72 °C for 10 min.

Amplification products were verified by gel electrophoresis on 1.2 % agarose gel in 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) at 87 V for 1 h. The gel was stained with ethidium bromide (3 mg L⁻¹) and DNA was visualized with a transilluminator (Gel Doc 2000 UV; BIORAD®, USA). The amplicons were purified with the QIAquick PCR kit (Qiagen®, USA) following the manufacturer's instructions, and sequenced in both directions with an automated Model 3730XL DNA sequencer (Applied Biosystems®, USA) to ensure correct nucleotides readings. The obtained sequences were aligned with those deposited in the gene bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI,

hicieron en un termociclador (Peltier Thermal Cycler PTC-200; BIORAD®, México) con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, el alineamiento a 57 °C por 1 min, una extensión final a 72 °C por 2 min y un último ciclo de amplificación a 72 °C por 10 min.

Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % en amortiguador TAE 1X (Tris Acetate- EDTA) a 87 V durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L⁻¹) y el ADN se visualizó en un transiluminador (Gel Doc 2000 UV; BIORAD®, EE.UU.). Los amplicones se purificaron con el kit QIAquick PCR (Qiagen®, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de secuenciación de ADN modelo 3730XL (Applied BioSystems®, EE.UU.) para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas. Las secuencias obtenidas se alinearon con las depositadas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012).

RESULTADOS

Reaislamiento de microorganismos. De los tejidos obtenidos de plantas con síntomas de marchitez se aislaron oomicetes, hongos y bacterias. *Phytophthora* sp. se presentó con mayor frecuencia en 129 (92 %) de los 140 fragmentos de tejido sembrados en PARPNH. En los 11 fragmentos restantes crecieron bacterias y hongos saprófitos que no se identificaron. En el medio V8-ácido láctico, *Phytophthora* sp. se aisló de 39 fragmentos de tejido (28 %), *Fusarium* sp. de cuatro y bacterias de 97. En PDA solamente se aisló a *Fusarium* sp. en 11 de los 140 fragmentos de los tejidos que se cultivaron. En seis y en dos de los 60 fragmentos de las guías basales de las plantas asintomáticas que se cultivaron en PDA crecieron bacterias y *Alternaria* sp., respectivamente. Solamente en tres de los 60 fragmentos mantenidos en V8-agar crecieron bacterias.

Reproducción de síntomas en invernadero. Veintidós días después de la inoculación (ddi), 54 de las 60 plantas inoculadas presentaron síntomas de flacidez de brotes tiernos y amarillamiento de las hojas (Figura 2A). La base de la guía se necrosó en el área inoculada (Figura 2B). Asimismo, a los 30 ddi, las guías basales se secaron

2012).

RESULTS

Reisolation of microorganisms. Oomycetes, fungi and bacteria were isolated from tissues obtained of plants with wilting symptoms. *Phytophthora* sp. was present more frequently in 129 (92 %) out of 140 tissue fragments planted on PARPNH. In the remaining 11 fragments, some bacteria and saprophytic fungi were not identified. *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., and bacteria were isolated from 39 (28 %), 4, and 97 tissue fragments cultivated on V8-lactic acid medium, respectively. Only *Fusarium* sp. was isolated from 11 out of 140 tissue fragments cultured on PDA. Six and two out of 60 basal guide fragments of asymptomatic plants cultured on PDA showed bacteria and *Alternaria* sp., respectively. Bacteria grew in only three out of the 60 fragments maintained on V8-agar.

Symptoms reproduction under greenhouse conditions. Twenty two days after inoculation (dai), 54 out of 60 inoculated plants showed flaccid young shoots and leaf yellowing (Figure 2A). The base of the guide (base de la guía) got necrotic at the inoculated area (Figure 2B). Likewise, at 30 dai, basal guides dried out causing a premature leaf wilting (Figure 2C).

Morphological characterization. The oomycete grown on V-8 agar showed a white and a star like coenocytic mycelial growth. The sporangia formation was observed after 13 d of growth under natural light. In distilled water sporangia developed at 19 h of exposure in white light.

Sporangia developed in umbellate and simple sympodia (Figures 3A and 3B), showing ellipsoidal to lemon-like shapes of 58.71 x 29.28 µm (average of 100 sporangia), conspicuous papillae and a long pedicel (Figures 3C and 3D). They germinated directly as hyphae or with the formation of new sporangia (Figures 3E and 3F). Fifteen d after pairing, the oomycete developed oogonia with amphigynous antheridia and plerotic oospores (Figures 3G and 3H). These characteristics correspond to those described by Erwin and Ribeiro (1996) and Gallegly and Hong (2008) for *Phytophthora capsici*.

Molecular identification. The amplification product obtained with ITS4 and ITS6 primers, was a 650 bp band, corresponding to the size of the expected one. The



Figura 2. Reproducción de síntomas en plantas de chayote (*Sechium edule*) verde liso inoculadas en invernadero. Amarillamiento foliar (A) y necrosis de la guía basal en la zona de inoculación (B) (22 d después de la inoculación). Senescencia de hojas basales (C) (30 d después de la inoculación).

Figure 2. Reproduction of symptoms on smooth green chayote (*Sechium edule*) plants, inoculated under greenhouse conditions. Foliar yellowing (A) and necrosis of the basal guide at the inoculated area (B) (22 d after inoculation). Senescence of basal leaves (C) (30 d after inoculation).

provocando el marchitamiento prematuro de las hojas (Figura 2C).

Caracterización morfológica. El oomicete presentó crecimiento micelial cenocítico de tipo estrellado y color blanquecino en V8-agar. La formación de esporangios se observó a partir de los 13 d de crecimiento bajo condiciones de luz natural. En agua destilada los esporangios se desarrollaron a las 19 h de exposición en luz blanca.

Los esporangios se desarrollaron en cabezuelas y en simpodio simple (Figuras 3A y 3B), presentando forma

sequence analysis showed a 100 % similarity to the *P. capsici* JQ610200.1 sequence present in the NCBI genomic database (2012). The sequence was registered in the database with the accession number Jx871893 instead of access.

DISCUSSION

The results obtained in this research, showed that chayote wilting plants is not induced by *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* or *F. sambucinum*, as reported by Rivera *et al.* (1992) and Olguin (2010) in Costa Rica and Mexico, respectively. The symptoms described by these

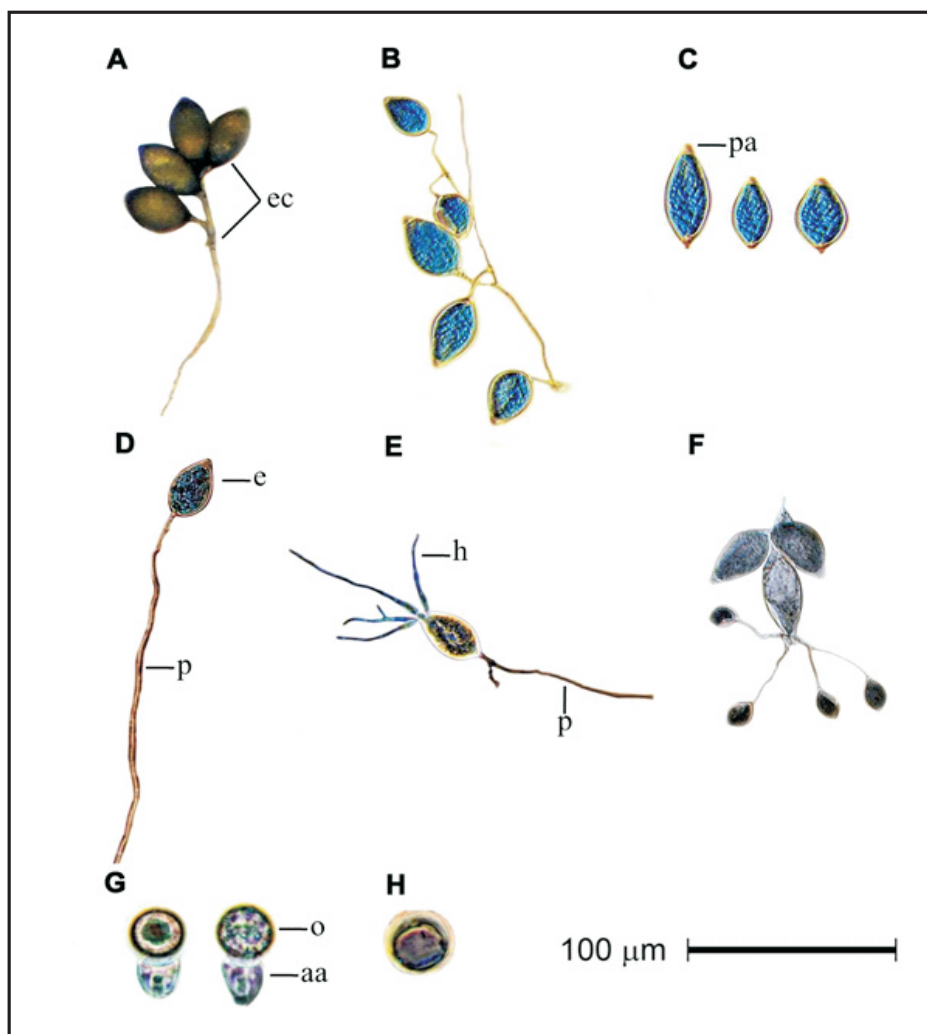


Figura 3. Estructuras diagnósticas de reproducción sexual y asexual de *Phytophthora capsici* aisladas de plantas de chayote (*Sechium edule*) verde liso con síntomas de marchitez crecidas en medio de cultivo V8-agar. (A) Esporangios en cabezuela. (B) Esporangios sobre simpodio simple. (C) Esporangios papilados. (D) Esporangio con pedicelo largo. (E) Germinación directa de esporangios emitiendo hifas y (F) Esporangios. (G) Oogonios con anteridios anfígenos. (H) Oospora. Anteridio anfígeno (aa), esporangio (e), esporangios en cabezuela (ec), hifa (h), oogonio (o), papila (pa), pedicelo (p).

Figure 3. Diagnostic structures of sexual and asexual reproduction of *Phytophthora capsici* isolated from smooth green chayote (*Sechium edule*) plants with wilting symptoms grown on V8-agar culture medium. (A) Sporangia in umbellate sympodium. (B) Sporangia in simple sympodia. (C) Papillate sporangia. (D) Sporangium with a long pedicel. (E) Direct germination of sporangia emitting hyphae and (F) sporangia. (G) Oogonia with an amphigynous antheridium (H) Oospore. Amphigynous antheridia (aa), sporangium (e), sporangia in umbellate sympodia (ec), hyphae (h), oogonium (o), papilla (pa), pedicel (p).

elipsoidal a limoniforme de 58.71 x 29.28 µm (promedio de 100 esporangios), papila conspicua y pedicelo largo (Figuras 3C y 3D). Germinaron directamente como hifas o con la formación de nuevos esporangios (Figuras 3E y 3F). El oomicete desarrolló oogonios con anteridios anfiginos y oosporas pleróticas a los 15 d después del apareamiento (Figuras 3G y 3H). Las características anteriores corresponden con las descritas en las claves de Erwin y Ribeiro (1996), Gallegly y Hong (2008) para *Phytophthora capsici*.

Identificación molecular. El producto de amplificación obtenido con los primers ITS4 e ITS6 fue de 650 pb, correspondiente al tamaño del amplicón esperado. El análisis de la secuencia mostró un 100 % de similitud con la secuencia JQ610200.1 de *P. capsici* depositada en la base de datos del NCBI (2012). La secuencia se registró en esta base con el número de acceso JX871893.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación, indican que la marchitez de las plantas de chayote no es inducida por *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* ni *F. sambucinum*, como lo reportaron Rivera *et al.* (1992) y Olguín (2010) en Costa Rica y México, respectivamente. Los síntomas descritos por estos investigadores fueron pudrición de raíz, hojas cloróticas y senescencia prematura en plantas aisladas o distribuidas en manchones, lo cual coincide con los síntomas observados en las huertas comerciales evaluadas en esta investigación; en donde además de estos síntomas, las plantas presentaron hojas sin turgencia y deshidratación en la zona de la corona (área de distribución plagiotrópica de las guías).

Rivera *et al.* (1992) y Olguín (2010), no realizaron las pruebas de patogenicidad para determinar si *Pythium* sp. y las dos especies de *Fusarium* fueron los agentes primarios de la marchitez de las plantas. Es importante resaltar que el aislamiento de *Phytophthora* sp. a partir de tejido sintomático es más difícil que el de algunos hongos, incluyendo *Fusarium* spp., ya que los síntomas en los órganos aéreos se presentan una vez que la infección de las raíces ha avanzado. Bajo tales condiciones, patógenos secundarios, o parásitos y saprófitos facultativos (hongos y bacterias) invaden el tejido radical enmascarando el crecimiento de *Phytophthora* sp. (Mircetich y Browne, 1987).

De acuerdo con las claves taxonómicas de Erwin y Ribeiro (1996), se aisló a *Phytophthora* en el 92 y 28 % de los fragmentos de tejido con síntomas de marchitez que se cultivaron en PARPNH y V8-agar, respectivamente, *Fusarium* spp. (Barnett y Hunter, 2006) creció en el 3 % del tejido sembrado en V8-agar. La identificación morfológica a nivel de especie (Gallegly y Hong, 2008) y el análisis molecular indicaron que la especie corresponde a *P. capsici*. Estos resultados, complementados con las pruebas de patogenicidad, indicaron que *P. capsici* es el agente causal primario del marchitamiento de las plantas de chayote.

Los síntomas que se observaron en plantas de chayote infectadas natural y artificialmente fueron reducción en el crecimiento de raíces absorbentes y el

researchers were root rot, chlorotic leaves and premature senescence on plants distributed isolated or aggregately, which is consistent with the symptoms observed in the commercial orchards evaluated in this research; additionally, leaf plants showed loss of turgidity and the crown area (area of plagiotropic distribution of the guides) got dehydrated.

Rivera *et al.* (1992) and Olguín (2010), did not perform pathogenic tests to determine whether *Pythium* sp. and two *Fusarium* species were the primary agents of the wilting plants. It is important to emphasize that it is more difficult to isolate *Phytophthora* sp. than some fungi, including *Fusarium* sp., due to some symptoms on aerial organs appear once the root infection has progressed. Under such conditions, secondary pathogens, or parasites and facultative saprophytes (fungi and bacteria) invade the root tissue masking *Phytophthora* sp. growth (Mircetich and Browne, 1987).

According to Erwin and Ribeiro (1996) keys, *Phytophthora* was isolated from 92 and 28 % of the tissue fragments with wilting symptoms cultured on PARPNH and V8-agar, respectively; *Fusarium* spp. (Barnett and Hunter, 2006) grew in 3 % of the tissue cultivated on V8-agar morphological. The morphological identification at the species level (Gallegly and Hong, 2008) and molecular analyses showed that the species correspond to *P. capsici*. These results, complemented with pathogenicity tests indicate that *P. capsici* is the primary causal agent of chayote wilting plants.

The symptoms observed in chayote plants naturally and artificially infected were growth reduction of root hairs, and watery brown lesions on primary roots and basal guides. It is possible that the brown lesions have been induced by pectolytic enzymes (PG and PME) that are produced by *P. capsici* during the infection process and that degrade the cell wall and the middle lamella of the vascular system parenchymal tissue (Li, *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2011). Such degradation results in maceration and cell death due to osmotic changes, which is associated with plant wilting as there is no an efficient system of water movement, minerals, nutrients, hormones and other solutes.

Another factor that might be involved with wilting plants, is the physical obstruction of tracheal xylem elements due to hyphal growth and to the possible invasion of other fungi (*Fusarium* spp.), as it increases the formation of gels and gums that are induced by accumulation and oxidation of cell degradation products (Agrios, 2005; Arevalo *et al.*, 2012).

Some conditions of the crop such as production in sloped areas and cultural practices (nitrogen fertilization, weed control and removal of soil in the drip area with hoe) facilitate *P. capsici* dispersion and the risk of infection of roots with young wounds (Jung and Blaschke, 2004; Erwin and Ribeiro, 1996, Elliott, 1989). According to Duniway (1983), the high relative humidity is one of the most important environmental conditions that induces the development of the diseases caused by *Phytophthora* spp. The incidence of chayote wilting plants in the geographical sampling area is approximately 13 to 15 % in the highest

desarrollo de lesiones pardas de apariencia acuosa en las raíces primarias y guías basales. Es posible que las lesiones pardas se deban a la acción de enzimas pectolíticas (PG y PME) que produce *P. capsici* durante el proceso de infección y que degradan la pared celular y lamela media del tejido parenquimatoso del sistema vascular (Li, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Tal degradación resulta en la maceración y muerte celular debido a cambios osmóticos, lo cual se asocia con el marchitamiento de la planta al no contar con un sistema eficiente en el movimiento de agua, sales minerales, nutrientes, hormonas y otros solutos.

Otro factor que pudiera estar involucrado con el marchitamiento de las plantas es la obstrucción física de los elementos traqueales del xilema debido al crecimiento de hifas y a la posible invasión de otros hongos (*Fusarium* spp.), ya que incrementa la formación de geles y gomas que se inducen por la acumulación y oxidación de los productos de degradación celular (Agrios, 2005; Arévalo *et al.*, 2012).

Algunas condiciones del cultivo tales como producción en áreas con pendiente y labores culturales (fertilización nitrogenada, control de malezas y remoción del suelo en la zona de goteo con azadón) facilitan la dispersión y el riesgo de infección por *P. capsici* en raíces con heridas recientes (Jung y Blaschke, 2004; Erwin y Ribeiro, 1996; Elliott, 1989). De acuerdo con Duniway (1983), la alta humedad relativa representa una de las condiciones ambientales de mayor importancia que induce el desarrollo de las enfermedades causadas por *Phytophthora* spp. La incidencia de plantas de chayote con síntomas de marchitez en el área geográfica de muestreo es aproximadamente del 13 al 15 % en la temporada de mayor precipitación pluvial y temperatura de 15 y 17 °C con humedad relativa del 100 %.

El decaimiento repentino de las plantas ocurre durante el patrón diurno de transpiración, y aun cuando algunas plantas se recuperan por la tarde, el marchitamiento vuelve a presentarse al día siguiente y las plantas mueren. La severidad del marchitamiento de las plantas varía de una huerta a otra, pero se considera proporcional al grado y velocidad de la infección de las raíces (Zitter *et al.*, 2004); sin embargo, debe considerarse que tanto la severidad como la incidencia de la enfermedad están en función de las condiciones ambientales y de la naturaleza genética del patógeno y la planta hospedante.

CONCLUSIÓN

Con base en las pruebas de patogenicidad y las identificaciones morfológica y molecular, se reporta por primera vez en México que *Phytophthora capsici* es el agente causal de la marchitez de plantas de chayote en la región centro del estado de Veracruz.

Agradecimientos. Agradecemos al Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México A.C. (GISeM); a la Línea Prioritaria de Investigación 13: Comunidades Rurales Agrarias, Ejidos y Conocimiento Local, del Colegio de Postgraduados; y al CONACYT por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

rainfall season, 15-17 °C temperature and 100 % relative humidity.

The sudden plants decay occurs during the diurnal pattern of transpiration, and even though some plants recover in the afternoon, wilting recurs the next day and the plants die. The severity of the wilting plants disease varies from one planting to another, but is considered proportional to the extent and rate of root infection (Zitter *et al.*, 2004); however, it must be considered that both, the severity and incidence of the disease, depend on environmental conditions, and both the genetic nature of the pathogen and the host plant.

CONCLUSION

According to the pathogenicity test and the morphological, and molecular identification, it is reported for the first time in Mexico that *Phytophthora capsici* is the causal agent of chayote wilting plants in the central region of the state of Veracruz.

Acknowledgements. Thanks to the Interdisciplinary Research Group of *Sechium edule* in Mexico AC (GISeM); to the Priority Research Line 13: Agricultural Rural Communities, Communal lands and Local Knowledge, at Colegio de Postgraduados; and to CONACYT for the financial support to carry out this work.

LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. New York. USA. 922p.
- Arévalo GL, García OC y Rosas SGH. 2012. Factores que afectan la vida de florero en flores de corte. *Agroproductividad* 5: 28-35.
- Aung LH, Harris CM, Rij RE and Brown JW. 1996. Postharvest storage temperature and film wrap effects on quality of chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *J. Hort Science* 71: 297-304.
- Barnett LH and Hunter BB. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Bowers JH, Martin FN, Tooley PW and Luz EDMN. 2006. Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 97:492-503.
- Cadena IJ, Ruíz PLM, Trejo LC, Sánchez GP y Aguirre MJF. 2001. Intercambio de gases y relaciones hídricas del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 7: 21-35.
- Cadena IJ, Ruíz PLM, Aguirre MJF y Sánchez GP. 2005. Estudio de los síntomas asociados a la pérdida de color del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) en Veracruz, México. *Revista Chapingo serie Horticultura* 11:309-316.
- Cadena IJ, Arévalo GL, Avendaño ACH, Soto HM, Ruiz PLM, Santiago OE, Acosta RM, Cisneros SVM, Aguirre MJF and Ochoa MD. 2007. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh*

- Produce 1: 41-53.
- Cadena IJ, Avendaño ACH, Arévalo GL, Cisneros SVM y Campos RE. 2010. El chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw., importante recurso fitogenético mesoamericano. *Agroproductividad* 3: 26-34.
- Café FAC and Ristaino JB. 2008. Fitness of isolates of *Phytophthora capsici* resistant to mefenoxam from squash and pepper fields in North Carolina. *Plant Disease* 92: 1439-1443.
- Duniway JM. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. Pages 175-187 *In: Erwin DC, Bartnicki GS, and Tsao PH. (eds.). Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 392p.*
- Elliott CG. 1989. Some aspects of nitrogen nutrition and reproduction in *Phytophthora*. *Mycological Research* 92: 34-44.
- Erwin CD and Ribeiro KO. 1996. *Phytophthora*. Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 562p.
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. 2012. Listas de nombres comunes de fungicidas. www.frac.info (consulta, noviembre 2012).
- Gallely EM and Hong C. 2008. Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 158p.
- GISem. 2008. Rescatando los recursos fitogenéticos mesoamericanos. Volumen 1. Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. Primera edición. 17p.
- GISem. 2011. Rescatando y aprovechando los recursos fitogenéticos de Mesoamérica. Volumen 2: Chayote. Grupo Interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 24p.
- Jackson KL, Yin J, Csinos AS and Ji P. 2010. Fungicidal activity of fluopicolide for suppression of *Phytophthora capsici* on squash. *Crop Protection* 29: 1421-1427.
- Jung T and Blaschke M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology* 53: 197-208.
- Lamour KH and Hausbeck MK. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90: 396-400.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Kansas Agricultural Experiment Station, Manhattan. 369p.
- Li P, Feng B, Wang H, Tooley PW and Zhang, X. 2011. Isolation of nine *Phytophthora capsici* pectin methylesterase genes which are differentially expressed in various plant species. *Microbiology* 151: 61-70.
- Mircetich SM and Browne GT. 1987. *Phytophthora* root and crown rot of deciduous fruit trees: Progress and problems in etiology, epidemiology and control. Commemorative Symposium: Challenges and opportunities in fruit production, protection and utilization research. N.E. Looney, Ed. Summerland, B.C. Canada. 111p.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2012. Gen Bank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. (consulta, noviembre 2012).
- Olgún, H. G. 2010. Identificación y caracterización morfológica, cultural y molecular de hongos asociados a *Sechium edule* (Jacq.) Sw. en México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de México. 118p.
- Rivera G, Brenes F y Gamboa W. 1992. Hoja divulgativa sobre las principales enfermedades del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz). El Cocoro, COOPECHAYOTE R. L. 2p.
- Silva RHV, Fernández PSP, Canul GC, Macías LBC y Ávila, QGD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 134-147.
- Soto EM y Gómez CM. 1994. Uso del suelo y vegetación en los climas cálido-húmedos de Veracruz. *In: Castillo CG, Mejía SMT (eds). Los Recursos Vegetales. Problemática Ambiental en el Estado de Veracruz, Gobierno del Estado de Veracruz, México. 131-147p.*
- Vázquez TV, Zulueta RR and Lara MC. 1992. Análisis de la flora de malezas del campo experimental "La Bandera" municipio de Actopan, Veracruz. *La Ciencia y el Hombre* 11: 78-79.
- Wang H, Li F and Zhang X. 2011. Comparison of expression, purification and characterization of a new pectate lyase from *Phytophthora capsici* using two different methods. *BMC Biotechnology* 11: 32.
- White TJ, Lee BS and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis MA, Gelfand DA, Sninsky JJ, White TJ (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, CA, U.S.A. 315-322p.*
- Zitter AT, Hopkins LD and Thomas EC. 2004. Compendium of Cucurbit Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 88p.