

Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán

Fusarium wilt caused by *Fusarium solani* in chili chilaca (*Capsicum annuum*) in Michoacán

Alfredo Reyes-Tena, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Ricardo Santillán-Mendoza, Marlene Díaz-Celaya, Sylvia P. Fernández-Pavía*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), 58880, km 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, México. *Autor para correspondencia: fpavia@umich.mx.

Recibido: 04 de Abril, 2019.

Aceptado: 15 de Julio, 2019.

Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Santillán-Mendoza R, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP. 2019. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 43-47.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-1

Resumen. En Queréndaro, Michoacán, México, el cultivo de chile chilaca (*Capsicum annuum*) es de importancia económica, social y cultural; sin embargo, los problemas fitosanitarios limitan su producción. En junio de 2017, se observaron plantas enfermas con síntomas de marchitez y necrosis. Con el objetivo de identificar el agente causal de la enfermedad se recolectaron secciones de 10-15 cm de tallo y raíz, se obtuvo consistentemente (30%) un aislado fúngico del género *Fusarium*. El aislado mostró abundantes clamidosporas terminales de pared lisa, macroconidios con tres a cinco septos y célula apical ligeramente curva, microconidios septados y aseptados, ovales, elipsoides y reniformes. Se realizaron pruebas de patogenicidad bajo condiciones de invernadero, se inocularon $1.2 \times$

10^6 conidios/mL⁻¹ de *Fusarium* en plantas de chile chilaca de 45 días de edad. Veinte días posteriores a la inoculación, se observaron síntomas de marchitez, defoliación, clorosis, y necrosis en el tallo y la raíz. Se re-aisló al patógeno a partir de tejido vegetal enfermo y se amplificó el gen del factor de elongación 1- α . La secuencia obtenida se sometió a un análisis BLAST contra secuencias de las bases de datos de GenBank. De acuerdo con las características morfológicas y moleculares, el agente causal de la marchitez en chile chilaca de Queréndaro, Michoacán es *Fusarium solani*.

Palabras clave: necrosis del tallo, clorosis, filogenia, postulados de Koch.

Abstract. In Queréndaro, Michoacán, Mexico the chili chilaca crop (*Capsicum annuum*) has a great economic, social and culture importance, however, phytosanitary problems limit the production. In July 2017, diseased plants with wilt and necrosis symptoms were observed. With the aim to identify the causal agent of the disease, sections of 10-15

cm from stem and root were collected, and one fungal isolate from the *Fusarium* genre was consistent obtained (30%). The isolate showed abundant terminal chlamydospores with smooth wall, macroconidia with three to five septa and slightly bend apical cell, microconidia oval ellipsoids and reniform with and without septa. Pathogenicity tests carried out in a greenhouse conditions, 1.2×10^6 *Fusarium* conidia were inoculated on 45 day-old chili chilaca plants. Twenty days after the inoculation, chlorosis, wilt, necrosis on the stem and roots, were observed on the inoculated plants. The pathogen was re-isolated and the elongation factor 1- α gene was amplified. The sequence obtained was analyzed by BLAST against sequences from the GenBank. According to the morphologic and molecular characteristics, the causal agent of wilting in chili chilaca plants in Queréndaro, Mexico is *Fusarium solani*.

Key words: stem necrosis, chlorosis, phylogeny, Koch's postulates.

México produce anualmente un volumen mayor a tres millones de t de chile verde (*Capsicum annum*) lo que le permite ser el principal exportador a nivel mundial (SADER, 2019). En el estado de Michoacán, en el año 2018, se produjeron más de 116 000 t de chile, cifra que lo ubicó en el séptimo lugar de producción nacional. Queréndaro destaca entre los municipios productores de chile chilaca debido a su importancia cultural al ser la sede de la "Feria del chile" que se celebra anualmente. Sin embargo, las enfermedades que se presentan en el cultivo de esta hortaliza son una limitante para la producción. Dentro de estas, la marchitez del chile chilaca ocasiona mayores pérdidas en producción, al reducir hasta en 50% el rendimiento del cultivo, y está asociada con patógenos de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Velarde-

Félix *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce con exactitud la identidad del patógeno.

Con el objetivo de identificar al agente causal de la enfermedad, se recolectaron muestras de raíz primaria, raíces secundarias, corona y tallo de plantas sintomáticas de chile chilaca en parcelas del municipio de Queréndaro, Michoacán durante junio de 2017. Las muestras se lavaron con agua y detergente marca Roma[®], se cortaron segmentos de 0.5 cm de longitud en la zona intermedia entre el tejido sano y enfermo; éstos se desinfestaron en una solución de Cloralex[®] al 10% (0.6% de hipoclorito de sodio); se enjuagaron en agua destilada estéril y se secaron con papel estéril. Cinco segmentos de tejido de raíz y cinco de tallo se sembraron en cajas Petri con medio selectivo (NARPH) que contenía natamicina (0.02 g L⁻¹), ampicilina (0.27 g L⁻¹), rifampicina (0.01 g L⁻¹), pentacloronitrobenzeno (0.10 g L⁻¹) e himexazol (0.075 g L⁻¹) y se almacenaron a 24 °C (Soto-Plancarte *et al.*, 2017). El aislado fúngico obtenido se purificó por punta de hifa y se empleó para la caracterización morfológica y molecular. Se cultivó en medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), se cortaron discos de agar con micelio de 6 mm de diámetro y se almacenaron en microtubos con agua destilada estéril a 15 °C en la Colección de Hongos del Laboratorio de Patología Vegetal de la UMSNH con el código MXMIC-798. Para la caracterización molecular, se extrajo ADN genómico utilizando un protocolo con base en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB; Sigma-Aldrich) descrito por Leslie y Summerell (2016) con modificaciones. El micelio se incubó en buffer de lisis a 65 °C durante 1 h y se usó etanol absoluto en lugar de isopropanol (2-propanol). La concentración del ADN genómico fue calculada en un espectrofotómetro (Nanodrop; Thermo Scientific, Waltham, MA). Se amplificaron porciones parciales del gen factor de elongación de la traducción 1- α (EF).

La verificación de la patogenicidad se realizó en el invernadero del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el cual registró una temperatura de 30 ± 8 °C. El cultivar de chile chilaca CHL1 se empleó como material vegetal. Se obtuvieron plántulas en celdas de 100 cm² de volumen empleando el sustrato Mezcla 3 (Sunshine®). Se aplicaron 20 mL del fertilizante universal Miracle-Gro® (24N-8P-16K) a cada planta cada siete días hasta la inoculación del patógeno. Las plantas se colocaron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar. El aislado de *F. solani* se cultivó en medio SNA a 24 °C durante 10 días; luego se preparó una suspensión de conidios a una concentración de 1.2×10^6 conidios mL⁻¹. Doce

plantas sanas de chile chilaca de 45 días de edad fueron inoculadas con 1.0 mL de la suspensión de conidios aplicando directamente en la rizósfera. Seis plantas inoculadas con agua destilada estéril se emplearon como controles negativos. El patógeno se re-aisló a partir de tejido sintomático y se corroboró la identidad mediante la amplificación de EF. Para inferir las relaciones filogenéticas se realizó un análisis de máxima parsimonia utilizando secuencias de *F. solani* y de especies de *Fusarium* depositadas en la base de datos del GenBank.

Se registró una incidencia de la enfermedad del 10% en campo, los síntomas consistieron en pérdida de turgencia foliar, clorosis, necrosis de tejido de raíz, tallo y corona (Figuras 1 A y B). En las cajas de aislamiento, después de 48 h se observó

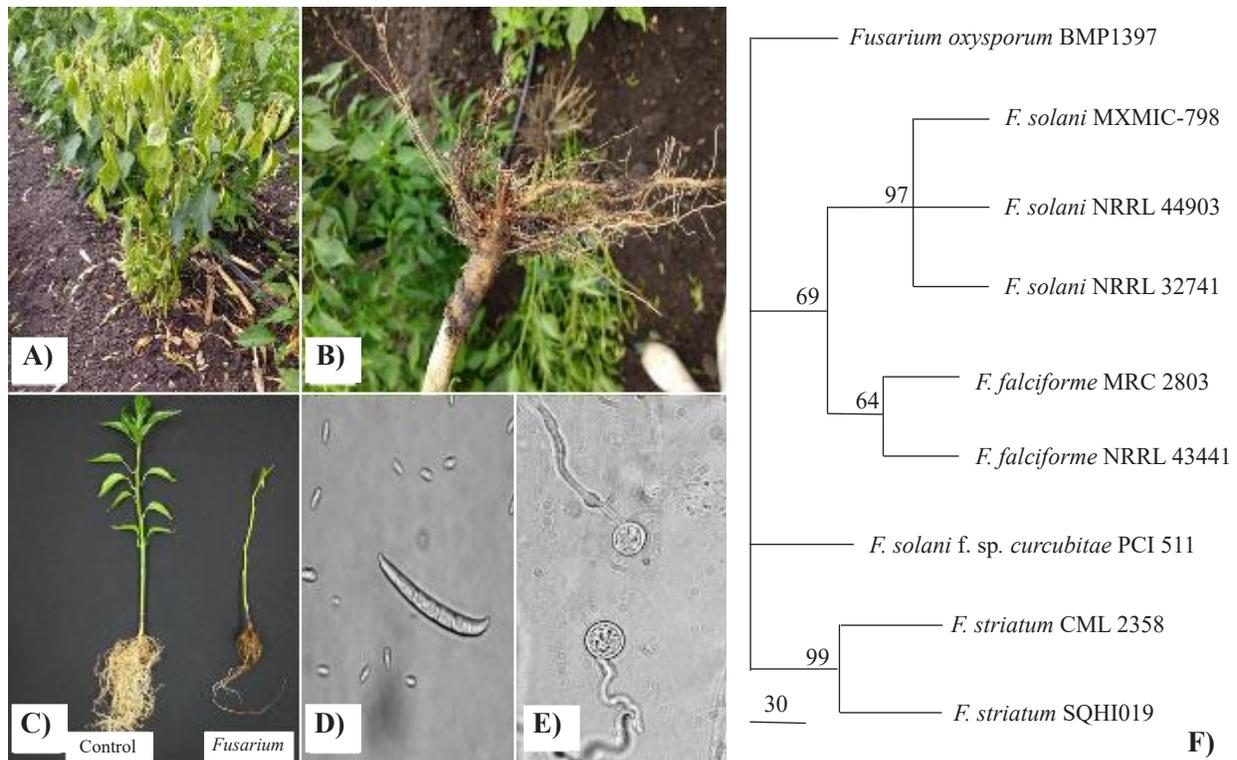


Figura 1. A) Planta de chile chilaca (*Capsicum annuum*) de tres meses de edad con síntomas de marchitez y clorosis en campo. B) Raíz y corona mostrando necrosis. C) Derecha: Planta de chile de 45 días edad inoculada con 1.2×10^6 conidios de *Fusarium solani*; izquierda: planta control. D) Macro y microconidios. E) Clamidosporas terminales. F) Relaciones filogenéticas del aislado MXMIC-798 de *Fusarium solani* y especies cercanas; *Fusarium oxysporum* se usó como grupo externo.

crecimiento micelial en tres de los segmentos de tallo y se seleccionó un aislado fúngico. En SNA el aislado mostró características morfológicas del género *Fusarium* tales como macroconidios de entre 22 y 33 μm de largo y 2.5 a 5.0 μm de ancho, con tres a cinco septos y célula apical ligeramente curva; microconidios de entre 6.0 y 9.5 μm de largo y 1.5 a 4.0 μm de ancho, ovales, reniformes, elipsoides, aseptados o con uno o dos septos (Figura 1D); abundantes clamidosporas de pared lisa de 6.0 a 8.0 μm de diámetro, terminales, solas o dispuestas en pares o en cadenas de tres (Figura 1E). Las características anteriores y las medidas de macro y microconidios coincidieron con la descripción de *Fusarium solani* (Leslie y Summerell, 2006; Ramdial y Rampersad, 2010; Wang *et al.*, 2014; Hans-Josef *et al.*, 2016).

La secuencia obtenida mostró 100% de identidad y cobertura con 20 cepas pertenecientes al complejo de especies de *F. solani*, y se almacenó en la base de datos del GenBank con el código de accesión MK532475. El análisis filogenético mostró que el aislado que se obtuvo en el presente estudio se agrupó con cepas de *F. solani* (Figura 1F). En la prueba de patogenicidad, las plantas inoculadas con *F. solani* mostraron clorosis, pérdida de turgencia foliar, defoliación y necrosis en raíces y tallo 20 días después de la inoculación (Figura 1C). A partir de tejido vegetal enfermo se re-aisló al patógeno. Las plantas control no mostraron síntomas y no se aisló a *Fusarium* a partir de éstas.

De acuerdo con las características morfológicas, la caracterización molecular, las pruebas de patogenicidad y el análisis filogenético, se estableció que *F. solani* es el agente causal de marchitez y necrosis en raíz y tallo de chile chilaca en Queréndaro, Michoacán, México. *Fusarium solani* se reportó como agente causal de pudrición de tallo y frutos de pimiento dulce (*C. annuum*) en Ontario, Canadá (Jarvis *et al.*, 1994) y pudrición de frutos en

Trinidad y Tobago (Ramdial y Rampersad, 2010). Recientemente se reportó a *F. solani* como agente causal de la marchitez en plantas maduras de chile poblano y damping-off en plántulas en Puebla, México (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018); y a *Fusarium oxysporum* como agente causal de marchitez en plantas de pimiento en invernaderos en Sinaloa (Velarde-Félix *et al.*, 2018). Los resultados del presente trabajo confirman que *F. solani* es un patógeno de importancia económica, ya que limita la producción de chile en México. Este es el primer reporte de este patógeno como agente causal de la marchitez del chile chilaca en Michoacán. La información del presente estudio será de utilidad para los productores locales de chile chilaca, ya que permitirá desarrollar estrategias de manejo de esta enfermedad, y disminuir la incidencia y severidad de la marchitez inducida por *Fusarium*.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado.

LITERATURA CITADA

- Jarvis WR, Khosla SK and Barrie SD. 1994. *Fusarium* stem and fruit rot of sweet pepper in Ontario greenhouses. Canadian Plant Diseases Survey 74: 131-134. http://phytopath.ca/wp-content/uploads/2014/10/cpds-archive/vol74/CPDS_Vol_74_No_2_1994_OCR.pdf#page=5.
- Hans-Josef S, Samuels GJ, Zhang N, Short DPG, Juba J and Geiser DM. 2016. Epitypification of *Fusisporium* (*Fusarium*) *solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. Mycologia 108: 806-819. <https://doi.org/10.3852/15-255>.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First Edition. Blackwell Publishing, Hoboken USA, 388 p. <https://www.wiley.com/en-ca/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>.
- Ramdial HA and Rampersad SN. 2010. First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of sweet pepper in Trinidad. Plant Disease 94: 1375. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0433>.
- Rivera-Jiménez MN, Zavaleta-Mancera HA, Rebollar-Alviter A, Aguilar-Rincón VH, García-de-los-Santos G, Vaquera-

- Huerta H and Silva-Rojas HV. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycological Progress* 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>.
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2019. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.gob.mx/siap (consulta, mayo 2019).
- Soto-Plancarte A, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, López-Pérez L, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 1867-1880. <https://dx.doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>.
- Velarde-Félix S, Garzón-Tiznado JA, Hernández-Verdugo S, López-Orona CA and Retes-Manjarrez JE. 2018. Occurrence of *Fusarium oxysporum* causing wilt on pepper in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 40: 238-247. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1420693>.
- Wang RY, Gao B, Li XH, Ma J and Chen SL. 2014. First report of *Fusarium solani* causing *Fusarium* root rot and stem canker on storage roots of sweet potato in China. *Plant Disease* 98: 160. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0651-PDN>.