

***Fusarium oxysporum*, agente causal de la marchitez de estevia en Veracruz, México**

Santos Gerardo Leyva-Mir¹
Jennifer Dulce Gutiérrez-Salazar¹
Moisés Camacho-Tapia²
Luis Alfonso Aguilar-Pérez²
Elvis García-López²
Juan Manuel Tovar-Pedraza^{1§}

¹Departamento de Parasitología Agrícola-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. CP. 56230, Tel. 01(595) 9521500, ext. 6304. (lsantos@correo.chapingo.mx; dulce_gutierrez2012@hotmail.com). ²Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México CP, 56230 (camacho.moises@colpos.mx; aguilar.luis@colpos.mx; garcia.elvis@colpos.mx).

§Autor para correspondencia: jmtovarp91@gmail.com.

Resumen

La marchitez de plantas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es uno de los problemas fitosanitarios de mayor importancia en la zona productora de Veracruz. El objetivo de este estudio fue identificar al agente causal de los síntomas de marchitez en plantas de estevia en una plantación localizada en Martínez de la Torre, en el estado de Veracruz, México. En 2015, se observaron y recolectaron plantas de estevia con síntomas de pudrición de raíz, necrosis basal del tallo y marchitez. A partir de las muestras, se obtuvieron continuamente colonias fúngicas de *Fusarium*. Para la identificación del hongo, se realizó una caracterización morfológica y análisis de secuencias de la región del espaciador interno transcrito (ITS) y de la secuencia parcial del gen factor de elongación 1- α (EF1- α). Además, se verificó la patogenicidad de un aislado representativo de *Fusarium* en plantas de estevia. Los resultados de la caracterización morfológica, análisis de secuencias ITS y EF1- α , así como las pruebas de patogenicidad, determinaron que *Fusarium oxysporum* es el agente causal de los síntomas de marchitez de plantas de estevia en Martínez de la Torre, Veracruz.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, *Stevia rebaudiana*, etiología, hongos.

Recibido: diciembre de 2017

Aceptado: enero de 2018

La estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es originaria del noroeste semi-árido paraguayo, de sus hojas se extraen compuestos glucósidos, aproximadamente 300 veces más dulces que el azúcar de caña. A la estevia también se le atribuyen propiedades antibióticas y anti fúngicas (Arturo *et al.*, 2009). Algunos de los efectos que produce la ingestión estevia en los humanos son: efecto hipotensivo e hipoglucémico, además de presentar acción antiinflamatoria y antimicrobiana (Marcavillaca, 2016).

Entre los principales países productores de estevia se encuentran Japón, China, Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Laos, Malasia y Filipinas; dichos países representan 95% de la producción mundial (Herrera-Cedano *et al.*, 2012). En América, es cultivada principalmente en Paraguay, Brasil, Argentina, Colombia, Perú y México. La superficie cultivada total en México es de 58 ha, distribuidas en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (SIAP, 2015).

Existen diversos hongos fitopatógenos que se han reportado induciendo enfermedades en plantas de estevia, en donde la susceptibilidad a estos, se incrementa ante niveles excesivos de agua (Álvarez, 2005), tal es el caso de hongos como *Alternaria alternata*, *Alternaria steviae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Septoria steviae*, *Uromyces* sp., *Verticillium dahliae* (Farr y Rossman, 2017), *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Ascochyta* sp., *Phomopsis* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Cercospora* sp., *Thielaviopsis* sp. (Arturo *et al.*, 2009), *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium semitectum* (Hilal y Baiuomy, 2000). Con respecto a enfermedades bacterianas, únicamente se ha registrado a *Pseudomonas cichorii* causando mancha foliar (Strayer *et al.*, 2012). Mientras que, *Tomato spotted wilt virus* (Chatzivassiliou *et al.*, 2007) y *Cucumber mosaic virus* (Chatzivassiliou *et al.*, 2016) son los virus registrados induciendo enfermedades en estevia.

La marchitez de la estevia se ha reportado previamente en Brasil (Mendes *et al.*, 1998), Egipto (Hilal y Baiuomy, 2000), Venezuela (Arturo *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2015) e India (Hegde y Chavan, 2009). Esta enfermedad se ha asociado principalmente a *Fusarium oxysporum*, aunque, otras especies como *F. solani* (Hegde y Chavan, 2009) y *F. semitectum* (Hilal y Baiuomy, 2000) también pueden estar asociadas.

El objetivo de este estudio fue identificar al agente causal de los síntomas de pudrición de raíz, necrosis basal en tallo, y marchitez de plantas de estevia en Martínez de la Torre, Veracruz, mediante la combinación de caracterización morfológica, análisis de secuencias de la región ribosomal de ADN del espaciador interno transcrito (ITS) y de la secuencia parcial del gen factor de elongación 1- α (EF1- α), además de pruebas de patogenicidad.

Durante 2015, se realizaron muestreos dirigidos en una plantación de estevia localizada en Martínez de la Torre, Veracruz, México. Se recolectaron 20 plantas con síntomas de pudrición de raíces, necrosis basal en tallo, clorosis foliar y marchitez. La incidencia de la enfermedad en campo se estimó en 25%.

Para el aislamiento, las raíces de las muestras vegetales se lavaron con agua para retirar residuos de suelo y se cortaron en segmentos de 5 mm a partir de la zona de avance de la pudrición de raíz y de la necrosis basal del tallo. Posteriormente, los segmentos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron en papel

absorbente estéril. De cada planta recolectada se sembraron cinco segmentos desinfectados en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Las cajas se incubaron a temperatura de 25 °C y en oscuridad continua. Las colonias fúngicas desarrolladas se transfirieron a cajas con medio PDA fresco. Los aislados fúngicos se purificaron a través de la técnica de cultivos monospóricos y se almacenaron a -80 °C en tubos criogénicos conteniendo glicerol al 15%.

A partir de los aislados de hongos obtenidos se realizaron preparaciones temporales en lactofenol y en glicerina, con la finalidad de observar y caracterizar las principales estructuras reproductivas en microscopía de luz. La identificación a nivel de género se realizó con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (2006), mientras que la identificación a nivel de especie se llevó a cabo usando las descripciones reportadas por Leslie y Summerell (2006).

Se realizaron pruebas de patogenicidad en 10 plantas de estevia, utilizando un aislado representativo del hongo. El aislado fúngico se incrementó en cajas Petri conteniendo medio de cultivo PDA. A partir de los conidios desarrollados en medio de cultivo, se obtuvo una suspensión de conidios ajustada a una concentración de 1×10^6 esporas ml^{-1} . Las raíces de 10 plantas se sumergieron en la suspensión de esporas durante 30 min, posteriormente las plantas se sembraron en vasos de unisel conteniendo suelo estéril y se colocaron en un invernadero a 25 °C. Diez plantas cuyas raíces se sumergieron únicamente en agua destilada estéril, sirvieron como control. Las plantas se observaron cada 24 h y se registró el avance de los síntomas. La prueba de patogenicidad completa se realizó dos veces.

La extracción de ADN genómico de un aislado representativo del hongo identificado morfológicamente, se realizó mediante la maceración de 100 mg de micelio obtenido a partir de una colonia con 7 días de crecimiento. Posteriormente, se siguió el protocolo indicado en el kit de extracción Plant DNeasy Mini Kit (Qiagen®, EE. UU). La calidad del DNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer de corrida TBE 0.5 X con el uso de 5 μl del DNA y llevada a 90 volts. El gel se analizó en un transiluminador Gel-Doc mod 2000 (Biorad®, EE. UU).

Para la amplificación por PCR se utilizaron los iniciadores ITS5/ITS4 (White *et al.*, 1990) y EF2/EF1 (O'Donnell *et al.*, 1998). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 μl , buffer de PCR 1x, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP, 0.4 μM de cada primer, 1U DNA polimerasa (Promega®, EE. UU) y 100 ng de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 (Biorad®, EE. UU), con una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min. La temperatura de alineamiento fue 55 y 54 °C para ITS5/ITS4 y EF1/EF2, respectivamente. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer de corrida TBE 0.5 X con el uso de 5 μl del producto de PCR, para llevar a electroforesis a 80 volts. El gel se analizó en un transiluminador Gel-Doc mod 2000 (Biorad®, EE. UU).

Los fragmentos amplificados con los iniciadores ITS5/ITS4 y EF1/EF2 se purificaron mediante el protocolo de DNA clean & concentrator (Zymo Research®, EE. UU). En un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml se agregaron 5 volúmenes del buffer DNA Binding y se mezcló por inversión. La mezcla se transfirió en una columna Zymo-Spin en un tubo de colección de 2 ml. Se centrifugó durante 30 s a 8 000 rpm, y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 μl de

buffer DNA Wash dentro de la columna y centrifugó 30 s durante 8 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se cambió a un tubo nuevo de 2 ml. Se agregó 60 μ l buffer de DNA Elution directamente en la columna y se incubó durante 1 min. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml y se diluyó el DNA. Los fragmentos de DNA purificados se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (dna.macrogen.com). Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos en NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) con la herramienta BLASTn.

A partir de las muestras de tejido vegetal infectado que se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo PDA, se obtuvo 92% de colonias pertenecientes al género *Fusarium*.

El hongo obtenido se desarrolló bien en medio de cultivo PDA formando macroconidios, microconidios y clamidosporas. La colonia desarrollada en medio PDA fue de color crema con ligera pigmentación violeta y con crecimiento algodonoso. Los microconidios fueron hialinos, de forma oval a elipsoidal, de $5.1-9.8 \times 2.3-2.9 \mu\text{m}$. Los macroconidios fueron hialinos, de $20.2-30.2 \times 2.5-4.7 \mu\text{m}$, de forma alargada y curvada, con la célula apical ligeramente aguda, la célula basal con forma de pie y presentando de 3 a 5 septos. Se observaron clamidosporas individuales y en par, distribuidas de manera terminal e intercalar en las hifas. Todas las características coincidieron con las reportadas por Leslie y Summerell (2006) para la especie *Fusarium oxysporum*.

Ocho días después de la inoculación (ddi), se observó que el aislado inoculado de *Fusarium oxysporum* causó pudrición de raíz, necrosis basal del tallo y marchitez en todas las plantas inoculadas con la suspensión de esporas. Doce ddi, las plantas inoculadas murieron debido a la completa obstrucción de los haces vasculares. Mientras que, las plantas de estevia que se usaron como control, permanecieron asintomáticas y libres de la enfermedad. A partir de los tejidos infectados de las plantas sintomáticas, se re-aislaron colonias de *Fusarium* que presentaron las mismas características morfológicas de los aislados obtenidos de las plantas de estevia en campos de cultivo.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad de este estudio coinciden con los síntomas registrados en plantas de estevia por Salazar *et al.* (2015): sin embargo, los tiempos de desarrollo de síntomas y muerte de plantas fueron diferentes, aun cuando la concentración de esporas usadas para la inoculación fue la misma. Lo anterior pudo deberse a diversos factores como condiciones de invernadero o virulencia del aislado.

El análisis con la herramienta BLASTn de la secuencia ITS obtenida en este estudio, mostró 99 % de identidad con la secuencia de *F. oxysporum* depositada en el GenBank con número de acceso KJ439169. Mientras que, la secuencia EF1- α presentó 100% de identidad con diversas secuencias de EF1- α de *F. oxysporum* (números de acceso del GenBank KY508354, KU507197, KU507192, KU507184 y KU507180). Lo anterior confirmó los resultados de la identificación morfológica llevados a cabo en este estudio.

En general, los resultados de esta investigación coincidieron con los reportados por Arturo *et al.* (2009) y Salazar *et al.* (2015), quienes determinaron mediante identificación morfológica y pruebas de patogenicidad, que *Fusarium* sp. y *F. oxysporum* son los causantes del síntoma de marchitez en plantas de estevia producidas en Maracay y en Aragua, Venezuela, respectivamente.

Por otra parte, Hilal y Baiuomy (2000) registraron a *F. oxysporum* causando marchitez de plantas de estevia en Egipto; sin embargo, su estudio carece de pruebas de patogenicidad y análisis molecular. Otras especies de *Fusarium* que se han reportado causando pudrición de raíces de estevia son *F. solani* en Egipto (Hilal y Baiuomy, 2000) e India (Hegde y Chavan, 2009), además de *F. semitectum* en Egipto (Hilal y Baiuomy, 2000).

Con respecto al control de la marchitez de estevia, Hilal y Baiuomy (2000) indicaron que el tratamiento químico a base de metil tiofanato y el tratamiento biológico a base de *Trichoderma harzianum*, presentan un control efectivo de la enfermedad. Sin embargo, es poca la información específica sobre las estrategias de manejo de la marchitez de plantas de estevia, por lo que se sugiere realizar estudios dirigidos a evaluar diversas estrategias de control, con la finalidad de obtener herramientas de manejo integrado para minimizar los daños ocasionados por esta enfermedad en áreas de cultivo de estevia en México.

Conclusiones

La combinación de resultados de la caracterización morfológica, análisis de secuencias ITS y EF1- α , así como pruebas de patogenicidad, confirmaron que *Fusarium oxysporum* es el agente causal de los síntomas de pudrición de raíz, necrosis basal del tallo, clorosis foliar y marchitez de plantas de estevia en la localidad de Martínez de la Torre, en el estado de Veracruz, México.

Literatura citada

- Álvarez, J. E. 2005. Inteligencia de mercados de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Escuela de Administración, Finanzas y Tecnología. Antioquía. Colombia. 122 p.
- Arturo, M. C.; González, T. C.; Peña, E. J. y Díaz, J. E. 2009. Microorganismos patógenos de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Bioagro. 21(3):173-178.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St Paul, MN, USA. 218 p.
- Chatzivassiliou, E. K.; Giakountis, A.; Testa, A.; Kienle, U. and Jungbluth, T. 2016. Natural infection of *Stevia rebaudiana* by *Cucumber mosaic virus* in Spain and by *Sclerotium rolfsii* in Greece. Plant Dis. 100(5):1029-1035.
- Chatzivassiliou, E. K.; Peters, D. and Lolas, P. 2007. Occurrence of *tomato spotted wilt virus* in *stevia rebaudiana* and *Solanum tuberosum* in Northern Greece. Plant Dis. 91(9):1205-1211.
- Farr, D. F. and Rossman, A. Y. 2017. Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory. USDA-ARS. Retrieved September 01, 2017. <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>.
- Hegde, Y. R. and Chavan, S. S. 2009. *Fusarium* wilt- a new disease of *Stevia rebaudiana*. J. Mycol. Plant Pathol. 39:344-345.
- Herrera, C. F.; Gómez, J. R. y González, R. C. 2012. El cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México, D. F. 43 p.
- Hilal, A. A. and Baiuomy, M. A. 2000. First record of fungal diseases of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in Egypt. Egyptian Journal of Agricultural Research. 78(4):1435-1448.

- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium*. Laboratory manual. Ed. Blackwell Publishing, State Iowa, USA. 740 p.
- Marcavillaca, M. C. 1984. Micropropagación *in vitro* de *stevia rebaudiana* Bertoni por medio de segmentos nodales y meristemas. Sociedad Argentina para la Investigación de Productos Aromáticos. Argentina. 241-243 p.
- Mendes, M. A. S.; Da Silva, V. L.; Dianese, J. C.; Ferreira, M. A. S. V.; Santos, C. E. N. dos.; Gomes Neto, E.; Urben, A. F. e Castro, C. 1998. Fungos em plants no Brasil. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasilia, Brasil. 555 p.
- O'Donnell, K.; Kistler, H. C.; Cigelnik, E. and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:2044-2049.
- SIAP. 2015. Servicio de Información Agrícola y Pecuaria. www.siap.gob.mx.
- Salazar, L.; Diamont, D. y Aponte, G. 2015. Identificación del agente causal de la marchitez de *Stevia rebaudiana* Bertoni en muestras provenientes del Estado de Aragua, Venezuela. Bioagro. 27(1):57-61.
- Strayer, A.; Garcia, M. A.; Sun, X.; Schubert, T. and Sutton, B. 2012. First report of *Pseudomonas cichorii* causing leaf spot of Stevia detected in Florida. Plant Dis. 96(11):1690-1696.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee S. and Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Eds.). Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J. and White, T. J. Academic Press, Inc., New York. 315-322 pp.