

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Identificación de aislados de *Fusarium* spp. asociados a *Solanum quitoense* Lam en Pastaza, Ecuador

Identification of isolates of *Fusarium* spp. associated with *Solanum quitoense* Lam in Pastaza, Ecuador

William Castro López^{1*}, Karina Carrera Sanchez¹, Felipe Lidcay Herrera Isla², Rene Cupull Santana²

¹Facultad de Ciencias de la Tierra, Universidad Estatal Amazónica, Campus principal km 1 ½ vía Puyo - Tena, Ecuador, CP 160150

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 6, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

E-mail: alexanderk.castro@gmail.com

RESUMEN

La marchitez vascular es la enfermedad más destructiva de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) en la Amazonia ecuatoriana donde causa cerca de un 80 % de pérdidas. En este estudio fueron identificados y caracterizados varios aislados de hongos pertenecientes al género *Fusarium* asociados a esta enfermedad. Ocho aislados de *Fusarium* spp. fueron obtenidos de plantas con síntomas de marchitez en diversas áreas representativas cultivadas con naranjilla, provincia de Pastaza. Cada aislado fue cultivado en placas de Petri (90 mm Ø) con los medios PDA y CLA. Los parámetros evaluados fueron: color de la colonia (anverso y el reverso), textura del micelio, crecimiento micelial y otras características morfológicas como: tamaño de los conidios (largo y ancho), y de las clamidosporas. Varias claves taxonómicas se emplearon para la identificación de los aislados. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado aplicando la versión 23 *Statistics IBM-SPSS* de *Windows*. Los ocho aislados estudiados pertenecen al género *Fusarium* spp., siendo este hongo reportado por varios autores asociados a la marchitez de la naranjilla.

Palabras clave: caracterización cultural y morfológica, *Fusarium* spp., lulo, marchitez vascular, naranjilla

ABSTRACT

The vascular wilt is the most destructive disease of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) in the ecuadorian Amazon causing field losses near 80%. In this study was identified and characterized some isolates at a fungus belonging to the genus *Fusarium* associated with this disease. Eight isolates of *Fusarium* spp. were obtained from plants with symptoms of wilt from representative areas cultivated with naranjilla, Pastaza province. Each isolates were cultivated in Petri dishes (90 mm Ø) contained PDA and CLA media. The cultural parameters evaluated were: colour of the colony (reverse and obverse); mycelia texture; mycelial grown and others morphological characters like: size of conidia (length and width) and chlamyospore size. Several taxonomical keys were used to identify the fungi isolated. A randomized design was utilized and the data were processed statistically

by means IBM-SPSS Statistics version 23 on Window. The eight isolates belonging to the genus *Fusarium* spp. a fungus reported for several authors as the causal agent of the wilt in this plant.

Keywords: cultural and morphological characterization, *Fusarium* spp., lulo, vascular wilt, naranjilla

INTRODUCCIÓN

La naranjilla es una fruta nativa de la cordillera de los Andes, principalmente consumida y cultivada en Ecuador, Colombia y Perú entre los 800 a 1700 msnm. En Ecuador esta solanácea es cultivada a gran escala en la región Amazónica (provincias de Napo, Pastaza y Morona Santiago, y en menor escala Sucumbíos, Zamora Chinchipe y Orellana). El fruto de este árbol tiene gran aceptación en los mercados por su sabor agradable y aroma exquisito. A nivel mundial tiene demanda por considerarla una fruta exótica. Se le puede dar diferentes usos como son: pulpas, conservas y extractos aromáticos (Viera *et al.*, 2015).

En Ecuador alrededor de 10 000 ha están destinadas a la siembra de naranjilla en las estribaciones externas de la cordillera y llanura Amazónica, el 17 % de la Amazonía se dedica a la producción de este fruto, por lo cual ha alcanzado alta demanda en los mercados nacionales e internacionales. La provincia de Napo es el sector de la Amazonía Ecuatoriana donde se produce la naranjilla en mayor escala (Torres *et al.*, 2017). Sin embargo, los principales problemas fitosanitarios que afronta este cultivo son: la marchitez vascular (*Fusarium oxysporum* Schelcht), el tizón (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz y Sacc), el nematodo de la raíz (*Meloidogyne incognita* Kofoid y White) y el gusano perforador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis* Guenée), debido mayormente a infecciones generadas por hongos, siendo la marchitez vascular la enfermedad más devastadora de la naranjilla en la Amazonia con pérdidas que alcanzan hasta el 100 % (Ochoa y Ellis, 2010).

La marchitez en naranjilla infecta a la planta a través de las raíces y se propaga por el sistema vascular. El síntoma principal se evidencia en las hojas inferiores las cuales presentan un amarilleo o clorosis para luego caer. Al realizar cortes transversales y longitudinales de la raíz, tallo y peciolo se observa el floema con una coloración café negruzca, en forma de anillo (Bermeo, 2015).

En la amazonia ecuatoriana, la incidencia por marchitez vascular de naranjilla (MVN)

constituye una de las causas principales de las pérdidas de rendimiento en este cultivo, debido a que los métodos tradicionales para su control no han sido efectivos y no se disponen de aislados debidamente caracterizados del o los agentes causales, es menester encontrar una metodología eficaz para combatir dicha enfermedad (Holguin, 2016; Viera *et al.*, 2015). No obstante, la información acerca de la especie de *Fusarium* en este cultivo en el país es aún escasa. Por la importancia económica que tiene este cultivo, este trabajo tuvo como objetivo la identificación de aislados de *Fusarium* spp. asociados a (*Solanum quitoense* Lam), con vistas a desarrollar alternativas de manejos más eficaces que favorezcan la obtención de productos de calidad sostenible y así reducir el daño ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización: Las investigaciones se desarrollaron en los Laboratorios de Biología y Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica ubicada en el Km 1 ½ vía Puyo-Tena y se muestrearon ocho fincas, donde se localizaron las zonas más representativas del cultivo de naranjilla pertenecientes a la provincia de Pastaza.

Aislamiento de organismos asociados a la marchitez vascular de la naranjilla

Se realizó un muestreo aleatorio simple en los meses de octubre a diciembre de 2017 en zonas comerciales de mayor producción de naranjilla. Las muestras colectadas provinieron de plantas con sintomatologías de clorosis en las hojas inferiores, decoloración de los haces vasculares, pudrición en cuello y base del tallo y defoliación. El análisis de las muestras se realizó mediante cortes transversales y longitudinales de los diferentes órganos afectados; además de observaciones a simple vista, con ayuda de un microscopio estereoscópico binocular modelo Krüss MSL4000®, aumento de 10x.

Para el procesamiento de las muestras, se hicieron cortes de secciones de tejido a

nivel de raíz y tallo, de lesiones en estadios iniciales e intermedios de la enfermedad, de aproximadamente 4 a 6 mm. Las muestras fueron lavadas con agua corriente durante 3 min hasta eliminar las partículas de suelo y se desinfectaron durante 2 min en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5 %, y 1 min en alcohol etílico al 70 %, asimismo fueron lavadas tres veces en agua destilada, durante 1 min. Se transfirieron asépticamente a una cámara húmeda (placa de Petri con un papel filtro humedecido con agua estéril) por 48 h, con el propósito de observar el desarrollo del hongo sobre la superficie de la muestra (Leslie y Summerell, 2006).

Seguidamente, con la ayuda de un asa previamente esterilizada se tomaron muestras con crecimiento micelial y se colocaron en placas de Petri (90 mm Ø) que contenían medio de cultivo Agar de Papa Dextrosa (PDA, Difco®). Las placas de Petri se sellaron con parafilm e incubaron durante 48 h a 28 °C. Cada colonia desarrollada se aisló y purificó en medio de cultivo PDA. A partir de los cultivos fúngicos puros en medio de cultivo PDA se realizaron cultivos monospóricos y se sembraron por cada aislamiento 5 placas de Petri (90 mm Ø), con medio de cultivo PDA e incubaron las mismas a 28 °C durante 48 h (Leslie y Summerell, 2006).

Caracterización cultural

La caracterización cultural de los aislados se realizó mediante el uso de claves taxonómicas propuestas por Barnett y Hunter (1998), Watanabe (2002) y Leslie y Summerell (2006), la cual consistió en realizar el análisis de diversos caracteres cualitativos y cuantitativos, para lo que se tuvo en cuenta el color de la colonia (anverso y reverso) de acuerdo con la tabla de colores propuesta por Rayner (1970), textura del micelio, así como el cálculo de la Tasa de Crecimiento Radial (TCR). Además, para el cálculo de la TCR se sembraron diez placas de Petri (90 mm Ø), con medio de cultivo PDA por cada aislado, y se transfirió asépticamente un disco micelial. Las placas se sellaron con parafilm a 28 °C, en incubadora digital (marca: memmert).

Además, para el conteo de conidios se realizaron 5 réplicas por aislado y se adicionó 10 mL de agua estéril, inmediatamente después de depositar el agua estéril en el medio de cultivo, las placas se agitaron en forma circular, hasta que la suspensión se dispersó completamente en el medio, se tomaron 10 µL con una pipeta y se colocaron en la cámara de Neubauer, para

determinar la concentración total de conidios por mL con un aumento de 40x.

Caracterización morfológica

Asimismo, se realizó la caracterización de los aislados fúngicos, para lo cual se preparó con medio de cultivo hojas de clavel-agar (CLA) para promover la esporulación en lugar del crecimiento micelial, por lo que se colocaron fragmentos de hojas de clavel estériles, antes que el medio Agar-Agua al 2 % gelificara, los que se incubaron a 28 °C por 72 h (Rivas, 2015). Para la evaluación de las características morfológicas en los aislados fúngicos, se consideró la forma y tamaño de los macroconidios y microconidios, así como el número de septos. A cada una de estas estructuras presentes en las preparaciones microscópicas, se les hicieron 50 mediciones, y se midió el diámetro y forma de las clamidosporas. La escala micrométrica usada fue de 1 µm con el aumento de 100x. Las especies de hongos fueron identificadas según las características morfológicas y culturales.

Se utilizaron las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998), Watanabe (2002), Leslie y Summerell (2006), para la determinación de las especies del género *Fusarium*.

Parámetros evaluados y análisis de datos

El análisis estadístico se realizó con la utilización del paquete estadístico IBM-SPSS *Statistics* versión 23 sobre *Windows*®. Para las variables: Tasa de crecimiento radial (TCR), cuantificación y mediciones de las estructuras reproductivas, se realizaron diseños experimentales, totalmente aleatorizados. En todos los casos se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas, en los experimentos que estos no se cumplieron se aplicaron pruebas no paramétricas: H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de aislados de *Fusarium* spp. asociados a la marchitez vascular de la naranjilla

Un total de ocho aislados de *Fusarium* spp. fueron obtenidos en las fincas muestreadas en la provincia de Pastaza, a partir de secciones de tejido de raíces y tallos con síntomas de pudriciones radicales asociadas a la MVN. Todos los aislados mostraron características macroscópicas y culturales altamente diferenciadas,

principalmente en la pigmentación en medio de cultivo PDA, a los mismos que se les asignaron sus respectivos códigos para proseguir con su caracterización.

Caracterización cultural

Las colonias crecidas en el medio de cultivo PDA fueron muy variables, así como los pigmentos difundidos en el medio de cultivo (púrpura blanquecino, violeta, crema blanquecina, crema y rosa magenta). Las colonias presentaron bordes regulares, hubo presencia de líquido de transpiración, tipo de micelio principalmente lanoso o húmedo (47,5 %) y en algunos casos afelpado (23,8 %); el color del anverso fue variable, aunque prevalecieron los colores: púrpura blanquecino (52,5 %) y rosa blanquecino (42,5 %) y por el reverso la pigmentación de las colonias fue violeta blanquecino (40 %) y rosa magenta (20 %) respectivamente (Fig. 1). De acuerdo con Leslie y Summerell (2006), *F. oxysporum* produce pigmentos que varían en color desde blanco, violeta pálido, púrpura-oscuro hasta rosa-magenta. De igual manera, la concentración de conidios basados en los análisis estadísticos, los mejores aislados en el número de conidios/mL fueron As-N1 y As-N4 procedentes de los barrios Murialdo1 y Bellandía (Tabla 1).

Las características culturales observadas en los aislados de *Fusarium* spp, fueron similares a las referidas por Agrios (2010). Asimismo, coincidieron con las características informadas por Leslie y Summerell (2006). En nuestro estudio, diferentes aislados obtenidos produjeron pigmentaciones de diferentes colores púrpura blanquecino, violeta blanquecino, crema blanquecina, blanco y rosa magenta. Este resultado demuestra la gran variabilidad entre los diferentes aislados estudiados asociados a la MVN. Irzykowska *et al.* (2012) asevera que *F. oxysporum* posee un abundante micelio (algodonoso o flocoso).

Basados en la tasa de crecimiento radial y según los resultados de análisis estadístico, se logró identificar dos aislados As-N7 y As-N8 que a su vez presentaron un mayor crecimiento micelial diario, al final del período de evaluación y antes, llenando la placa de Petri a los 12 días. Seguidas de los demás aislados, quienes mostraron un crecimiento similar entre sí, difiriendo significativamente con el resto de los aislados. La velocidad de crecimiento micelial promedio de los aislados estudiados fue de 6,59 mm por día.

Caracterización morfológica

El género *Fusarium* tiene gran variabilidad, esto hace difícil su identificación (Nelson *et al.*,

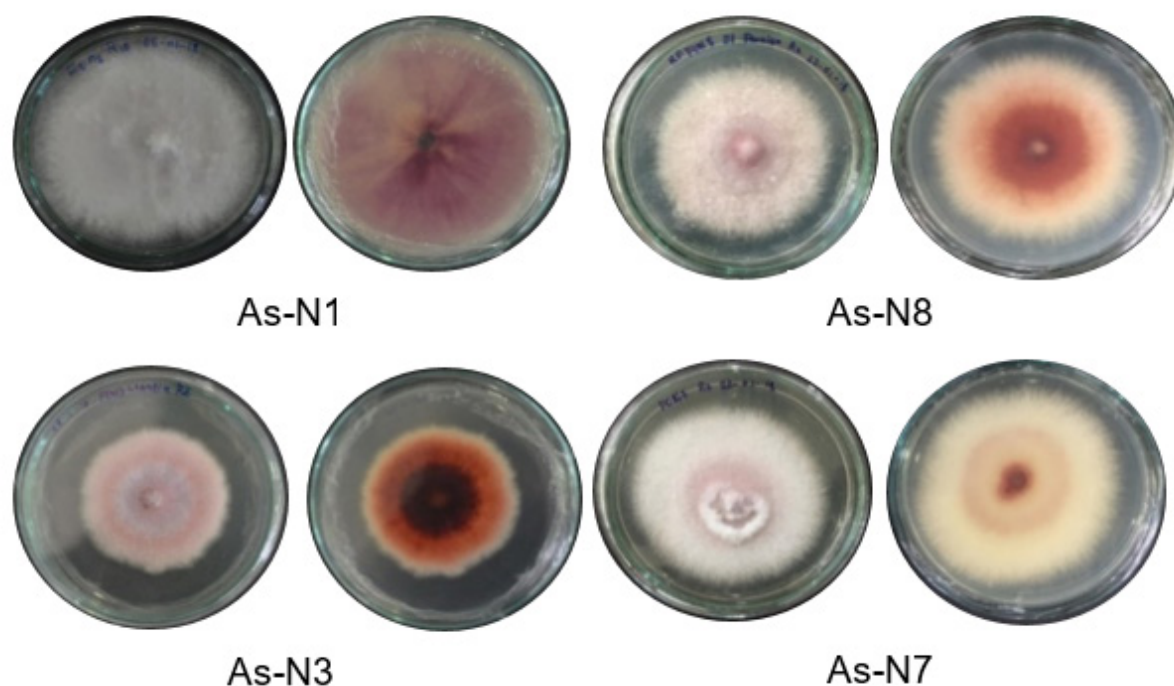


Fig. 1- Pigmentación del anverso y reverso de los aislados en medio de cultivo PDA

Tabla 1 - Concentración total de conidios de los aislados colectados en zonas productivas de naranjilla en la provincia de Pastaza, Ecuador

Código	Origen del aislado	Concentración de macro y micro conidios/mL
As-N1	Murialdo 1	5,82x10 ⁷ ± 0,408 a
As-N2	Murialdo 2	9,30x10 ⁶ ± 0,888 c
As-N3	Llandia	1,22x10 ⁷ ± 0,287 c
As-N4	Bellandia	3,13x10 ⁷ ± 0,195 b
As-N5	El Paraíso	8,30x10 ⁶ ± 0,183 c
As-N6	El Telegrafista	1,02x10 ⁷ ± 0,158 c
As-N7	Mera	1,37x10 ⁷ ± 0,366 c
As-N8	Pueblo Unido	2,93x10 ⁷ ± 0,433 b

a b c Rangos medios con letras desiguales en una misma columna difieren por ($p \leq 0,05$) según prueba de Dunnett C (n=5)

1983). Los miembros de este género producen dos tipos de conidios típicos los cuales se llaman macroconidios y microconidios. Ambos tipos son producidos a partir de fialides (fialósporas). Los macroconidios son largos, multiseptados en forma de media luna o canoa, los cuales nacen casi siempre en esporodoquio (Agris, 2010).

Tomando en cuenta las características culturales y morfológicas de la textura, el color del anverso y reverso y la TCR se concluyó que todos los aislados obtenidos de tejidos enfermos de *S. quitoense* pertenecen al género *Fusarium* (Tabla 2, 3 y 4). Desde el punto de vista morfológico, se observaron microconidios hialinos con diámetro (11,84 a 5,96 μm de largo x 3,06 a 1,5 μm de ancho) de forma globosa,

oval y elíptica, usualmente no septados, aunque se presentaron algunos con un solo septo. Se observaron falsas cabezas en la formación de los microconidios. Por otra parte, los aislados mostraron macroconidios de longitud corta a media (21,44 a 28,3 μm de largo x 2,86 a 3,34 μm de ancho) en forma de bote, ligeramente curvados a casi rectos que se van estrechando gradualmente hacia ambos extremos. La célula apical de los macroconidios es en forma de gancho o ligeramente puntiaguda. Usualmente los macroconidios presentaron tres septos. Además, se observaron abundantes clamidosporas (entre 8,00 y 9,50 μm de diámetro) en cultivos de 2-3 semanas en el medio CLA, las cuales usualmente aparecieron solas o en parejas (Fig. 2).

Tabla 2 - Dimensiones de (largo x ancho) de los microconidios de los aislados obtenidos

Código	Origen del aislado	Largo de microconidios		Ancho de microconidios	
		Medias (μm)	Rangos medios	Medias (μm)	Rangos medios
As-N1	Murialdo 1	7,22	178,95 bc	2,06	205,04 c
As-N2	Murialdo 2	10,7	294,84 a	2,22	225,17 bc
As-N3	Llandia	11,84	339,68 a	3,06	319,47 a
As-N4	Bellandia	6,72	167,44 bc	1,63	144,40 d
As-N5	El Paraíso	6,6	150,35 c	1,62	142,15 d
As-N6	El Telegrafista	5,96	115,81 d	1,5	124,75 d
As-N7	Mera	7,82	198,83 b	2,34	246,19 b
As-N8	Pueblo Unido	6,72	158,10 c	1,96	191,72 c

a b c d Rangos medios con letras distintas en cada columna difieren por ($p \leq 0,05$) según prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* (n = 50)

Tabla 3 - Dimensiones de (largo x ancho) de los macroconidios de los aislados obtenidos

Código	Origen del aislado	Largo de macroconidios		Ancho de macroconidios	
		Medias (µm)	Rangos medios	Medias (µm)	Rangos medios
As-N1	Murialdo 1	21,44	107,26 c	3,34	207,36 b
As-N2	Murialdo 2	22,58	127,89 c	3,7	258,72 a
As-N3	Llandia	23,74	156,09 c	3,26	198,56 b
As-N4	Bellandia	25,44	217,45 b	3,14	180,32 b
As-N5	El Paraíso	23,38	143,46 c	3,28	199,20 b
As-N6	El Telegrafista	27,28	257,18 a	3,38	214,88 b
As-N7	Mera	27,78	285,27 a	3,32	209,12 b
As-N8	Pueblo Unido	28,3	309,40 a	2,86	135,84 c

a b c Rangos medios con letras distintas en cada columna difieren por ($p \leq 0,05$) según prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* (n = 50).

Tabla 4 - Diámetro de las clamidosporas

Código	Origen del aislado	Diámetro de clamidosporas		Forma
		Medias (µm)	Rangos medios	
As-N1	Murialdo 1	8,06	157,88 dc	Simple
As-N2	Murialdo 2	9,28	242,30 abc	Parejas
As-N3	Llandia	8,00	142,21 c	Parejas
As-N4	Bellandia	8,80	205,93 bcd	Simple
As-N5	El Paraíso	8,64	193,36 cd	Cadenas
As-N6	El Telegrafista	8,82	214,75 abcd	Parejas
As-N7	Mera	8,60	190,05 d	Cadenas
As-N8	Pueblo Unido	9,50	257,51 a	Cadenas

a b c d Rangos medios con letras distintas en cada columna difieren por ($p \leq 0,05$) según prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* (n = 50)

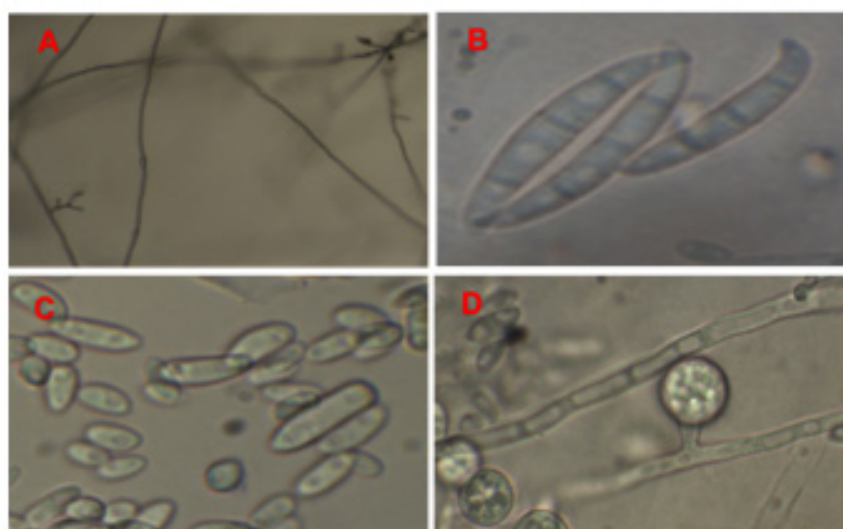


Fig. 2- Caracteres morfológicos utilizados en la identificación de aislados de *Fusarium* spp. crecidos en medio de cultivo CLA a 28 °C

Leyenda: **A:** Hifas. **B:** Macroconidios. **C:** Microconidios. **D:** Hifa y clamidosporas

CONCLUSIONES

1. Las características culturales y morfológicas de los ocho aislados obtenidos asociados a la marchitez vascular de *S. quitoense* correspondieron al género *Fusarium* spp.

2. Desde el punto de vista morfológico, se concluyó que las estructuras reproductivas (macroconidios, microconidios, clamidosporas) observadas y medidas se encuentran en el rango para la especie de *F. oxysporum*.

3. La presencia de *Fusarium* spp. asociada a la marchitez vascular de la naranjilla permite presumir a esta especie como el posible agente causal de dicha enfermedad, lo que procede realizar un diagnóstico molecular para su definitiva precisión taxonómica.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. 2010. *Fitopatología-Plant Pathology*. 2da Edition, Limusa, México, 856 p.
- BARNETT, H. and HUNTER, B. 1987. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4ta Edición. Editorial MacMillan Publishing Company, Estados Unidos de América, 234 p.
- BERMEO, N. 2015. Evaluación de la resistencia a *Fusarium oxysporum* y *Meloidogyne incognita* en segregantes de cruzamientos entre miembros de la sección lasiocarpa. Tesis de grado previa a la obtención de Título de Ingeniera Agrónoma, Carrera de Ingeniería Agronómica, UCE, Quito, Ecuador, 64 p.
- HOLGUIN, N. 2016. Evaluación in vitro de actividad inhibitoria de extractos de Moringa oleífera Lam. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, en plántulas de lulo (*Solanum quitoense* Lam). *Universidad Católica de Manizales*, Caldas, Colombia, pág. 79.
- IRZYKOWSKA, L., BOCIANOWSKI, J., WASKIEWICZ, A., WEBER, Z., KAROLEWSKI, Z., et al. 2012. Genetic variation of *Fusarium oxysporum* isolates forming fumonisin B1 and moniliformin. *Journal of Applied Genetics*, 53: 237-247.
- LESLIE, J. and SUMMERELL, B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Editorial Blackwell, Estados Unidos de América, 387 p.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A. and MARASAS, W. 1983. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. University Park, Texas, EE.UU. 193 p.
- OCHOA, L. y ELLIS, M. 2010. El manejo de la fusariosis como base para el cultivo ecológico de la naranjilla en el Ecuador. Boletín técnico INIAP, No. 138, Quito, Ecuador.
- RAYNER, R.W. 1970. *A mycological colour chart*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 619 p.
- RIVAS, F. 2015. Etiología y caracterización de la pudrición del cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en San Lorenzo, Esmeraldas, Ecuador. Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara, Cuba.
- TORRES, A., VARGAS, J., GARCÍA, Y., ARTEAGA, Y. y NAVARRETE, H. 2017. *Solanum quitoense* Lam, un rubro económico de alto valor en la Amazonía Ecuatoriana. En sitio web: https://www.researchgate.net/publication/318360455_Solanum_quitoense_Lam_un_rubro_economico_de_alto_valor_en_la_Amazonia_Ecuatoriana consultado el 18/07/2018.
- VIERA, W., MEJÍA, P., NOBOA, M., OBANDO, J., SOTOMAYOR, A., VÁSQUEZ, W. y VITERI, P. 2015. Arvenses Asociadas a los Cultivos de Naranjilla y Tomate de Árbol. *Revista Científica Ecuatoriana*, pág. 42-47.
- WATANABE, T. 2002. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU. 426 p. ISBN 9781439804193.