

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Phytophthora capsici* EN *Cucurbita argyrosperma* Hort. ex L.H.Bailey, Y MANEJO EN INVERNADERO

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Phytophthora capsici* IN *Cucurbita argyrosperma* Hort. ex L.H.Bailey, AND GREENHOUSE HANDLING

Díaz-Nájera, J.F.¹; Vargas-Hernández, M.¹; Leyva-Mir, S.G.¹; Ayvar-Serna, S.²; Michel-Aceves, A.C.²; Alvarado-Gómez, O.G.,^{3*}; Ariza-Flores, Rafael⁴

¹Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Edo. de México C.P. 56230. ²Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Avenida Vicente Guerrero Núm. 81. Iguala, Guerrero. ³Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Av. Universidad s/n, Cd. Universitaria San Nicolás de los Garza, Nuevo León C.P. 66451. ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Iguala, Gro.

***Autor responsable:** omar-alvarado@prodigy.net.mx

RESUMEN

La calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*), es importante en la alimentación, sus semillas se consumen tostadas y aderezadas con sal, además son el ingrediente principal para elaborar platillos típicos de México y diferentes dulces tradicionales, sin embargo, algunos hongos causan severos problemas en sus frutos reduciendo rendimientos. Se realizó la identificación morfológica y molecular del oomicete involucrado en la pudrición de frutos de calabaza pipiana y se evaluaron alternativas de control químico y biológico en condiciones de invernadero. Se recolectaron frutos de calabaza pipiana (agosto-septiembre, 2011), con diferentes síntomas y niveles de pudrición, en la zona norte del estado de Guerrero, México, y después de su identificación morfológica, se extrajo el ADN del hongo para su análisis mediante PCR, utilizando oligonucleótidos que amplifican el espaciador intergénico interno (ITS). Ambas técnicas identificaron a *Phytophthora capsici* en frutos de pipiana, y los productos de amplificación por PCR se compararon con las disponibles en el GenBank. Las secuencias evidenciaron 99% de similitud con secuencias de sandía y calabaza. Los ingredientes activos para su control (propamocarb+fosetil y metalaxil+clorotalonil), ejercieron el mejor control al retrasar la presencia del patógeno en frutos de calabaza pipiana.

Palabras clave: Pudrición pipiana, ITS, secuenciación, control de enfermedades.

ABSTRACT

Cushaw pumpkin (*Cucurbita argyrosperma*) is important in the diet, its seeds are consumed toasted and salted, and they are the main ingredient to make typical Mexican dishes and various traditional sweets; however, some fungi cause severe problems in its fruits, thus reducing its yields. The morphological and molecular identification of the oomycete involved in cushaw pumpkin fruit rotting was performed, and alternatives for chemical and biological control under greenhouse conditions were evaluated. Cushaw pumpkin fruits with different symptoms and levels of rotting were collected (August-September, 2011), in the northern zone of the state of Guerrero, México, and after their morphological identification, DNA from the fungus was extracted for its PCR analysis, using oligonucleotides that amplify the internal intergenic spacer (ITS). Both techniques identified *Phytophthora capsici* in cushaw fruits, and the PCR amplification products were compared with those available at the GenBank. The sequences showed 99% of similarity with sequences from watermelon and squash. The active ingredients for its control (propamocarb+fosetyl and metalaxyl+chlorothalonil), exerted the best control by delaying the presence of the pathogen in cushaw pumpkin fruits.

Keywords: cushaw rotting, ITS, sequencing, disease control.

INTRODUCCIÓN

La familia Cucurbitaceae incluye 118 géneros y 825 especies, y México es uno de los más importantes centros de diversidad, teniendo un importante papel cultural y económico dentro de la sociedad (Lira *et al.*, 2002). La calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*) es un cultivo importante en el estado de Guerrero, y es de principales estados productores de semilla (SIAP, 2012). Recientemente el precio de venta por tonelada de semilla ha aumentado de \$15,500 en el año 2005 a \$35,000 en 2011, lo que ha propiciado que se incremente la superficie sembrada en la entidad de 4,228 ha, a 5,742 ha (SIAP, 2012). Sin embargo, condiciones cálidas y alta humedad relativa durante el verano favorecen la presencia de enfermedades, generando problemas sanitarios durante su cultivo (Zitter *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2007). Se ha observado en algunas áreas geográficas de Guerrero, donde se cultiva calabaza pipiana en suelos sin pendiente, de textura pesada y mal drenaje, incidencia de ataque de hongos tales como, *Phytophthora* spp., causando pérdidas importantes en el rendimiento e ingresos económicos. Los patógenos se controlan normalmente con fungicidas sistémicos que son compuestos capaces de penetrar la cutícula de las hojas y dispersarse en la planta; se caracterizan por sus propiedades protectoras y curativas, muy efectivos a bajas concentraciones para el control de la enfermedad durante largos periodos de tiempo (Gisi y Sierotzki, 2008), sin embargo, su uso excesivo ha provocado además de contaminación ambiental, que su eficacia disminuya y estimule la resistencia en los patógenos (Bartlett *et al.*, 2002).

Recientemente ha aumentado la tendencia del control de enfermedades de las plantas sin utilizar productos químicos de origen sintético. En los últimos 30 años, se han utilizado alternativas, tales como, el uso de microorganismos para el control biológico, partiendo de la premisa de usar enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar los efectos dañinos en las plantas o sus productos (Lim y Kim, 2010; Yang *et al.*, 2012). No obstante que los éxitos comerciales, hasta el momento, son todavía limitados y se basan principalmente en hongos de los géneros *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., *Streptomyces* sp., *Coniothyrium* sp. y *Candida* sp., así como bacterias de los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., y *Agrobacterium* sp. (Harman *et al.*, 2010; Pliego *et al.*, 2011; Antonopoulos *et al.*, 2010; Bi *et al.*, 2012). Con base en lo anterior, se identificó morfológicamente y molecularmente al oomicete involucrado en

la pudrición de frutos de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*) y evaluar alternativas de control químico y biológico en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y METODOS

Identificación morfológica del hongo presente en frutos de calabaza pipiana

Durante los meses de agosto y septiembre del 2011 se recolectaron frutos de calabaza pipiana (*C. argyrosperma*), con diferentes síntomas y niveles de pudrición en Campo Experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (18° 19' N, 99° 39' O), a una altitud de 640 m (Martínez-Rojero *et al.*, 2011). El tamaño de muestra y tipo de muestreo se realizó bajo la metodología propuesta por Pedroza-Sandoval (2009), se utilizó un muestreo sistemático de transecto en W. Los síntomas considerados fueron manchas acuosas hundidas con un crecimiento de micelio blanco en la parte inferior y superior del fruto (Zitter *et al.*, 2004). De los frutos de calabaza con síntomas y signos de pudrición, se tomaron cinco trozos de tejido de 0.5 cm² cada uno directamente de la zona de avance de la enfermedad; se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por dos minutos; se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril; y se sembraron 100 muestras de tejido en cajas Petri con medio de cultivo jugo de verduras Agar (V8-Agar), elaborado según Singlenton *et al.* (1992). Cada colonia desarrollada se separó y purificó por cultivo monozoospórico. De las cepas puras del último aislamiento, se hicieron preparaciones permanentes para observar al microscopio compuesto las características morfológicas del agente causal. Se midió el largo y ancho de 30 estructuras sexuales y asexuales representativas del aislamiento. La identificación morfológica se realizó siguiendo las claves de Singlenton *et al.* (1992), Wantanabe, (2002) y Gallegly y Hong (2008).

Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron 20 frutos en etapa de cosecha del genotipo criollo Apipilulco de *C. argyrosperma*, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por dos minutos y se lavaron con agua destilada estéril, se utilizó un fruto como unidad experimental con cuatro repeticiones en un arreglo completamente al azar. El aislamiento mencionado se transfirió a medio de cultivo V8-Agar para el incremento de inóculo. Después de 15 días de crecimiento, se prepararon suspensiones de inóculo en agua destilada estéril; se ajustó a una concentración a 4×10^6 zoosporas mL⁻¹, cada fruto se inoculó mediante aspersión

de 2.5 mL de la suspensión; como testigo se utilizaron cinco frutos, los cuales se inocularon con agua destilada estéril con el mismo procedimiento. Los 25 frutos inoculados se colocaron en charolas de poliestireno de 60×40 cm, desinfectadas con etanol al 70%. Se incubaron a 26 °C y 80% de humedad relativa; y los síntomas se registraron diariamente por ocho días. De las zonas de avance del hongo en los tejidos dañados, se tomaron 10 muestras de cada uno (0.5 cm²) y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 min, posteriormente se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril y se sembraron en el medio de cultivo V8-Agar. Las características morfológicas de la colonia y hongo re aislado se compararon con las originalmente inoculadas, para comprobar los postulados de Koch, y de éste, purificar e incubar durante 15 días en medio de cultivo V8-Agar para la extracción de ADN.

Identificación molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de 100 mg⁻¹ de micelio utilizando el kit DNeasy^{MR}, siguiendo el procedimiento del fabricante (Anónimo, 2012). El procedimiento fue repetido a partir de cuatro cajas Petri con el hongo. Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos con los oligos ITS-1fu 5'-tccgtagtgtaacctgcgg-3', y ITS-4 5'-tctctccgcttattgatatgc-3' (White *et al.*, 1990); los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y generan un producto de talla variable entre 500 y 900 pares de bases (pb) aproximadamente. Esta práctica se realizó con una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL, cuyos componentes finales fueron: amortiguador de reacción 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 200 µM de cada uno, 20 pmoles de cada oligonucleótido y una unidad de *Taq* DNA polimerasa (Promega). El programa térmico consistió en mantener una temperatura a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 seg y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.5%, y los fragmentos obtenidos se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y se tomaron fotografías. Los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciados directamente y se compararon los resultados con las secuencias disponibles en el banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de EE.UU.

Manejo en invernadero

Con la finalidad de comparar el efecto de diferentes ingredientes activos sobre el patógeno aislado, la presente investigación se realizó en el invernadero de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo México. El material vegetal utilizado fue el genotipo AP de calabaza pipiana, utilizando solo frutos inmaduros de aproximadamente 150 g de peso.

Obtención, aplicación del inóculo y tratamientos

Del muestreo previamente realizado sobre frutos con diferentes síntomas y niveles de daño; se obtuvo un aislamiento monozoospórico, mismo que fue sembrado en medio de cultivo V8-Agar para su incremento masivo (Singleton *et al.*, 1992). De igual forma que para la prueba de patogenicidad,

después de 15 días de crecimiento, se obtuvo el inóculo a partir de cajas Petri con 20 ml de agua destilada estéril se colocaron 10 discos de medio de cultivo que contenían micelio de *P. capsici*. El material se incubó a 25 °C por tres días para la formación de esporangios y la posterior liberación de sus zoosporas, lo cual se logró después de poner las cajas Petri a 12 °C por media hora. Posteriormente, se ajustó una suspensión de zoosporas a una concentración de 4×10⁶ ml⁻¹. Se hizo primeramente la aplicación de los tratamientos (Cuadro 1), con un aspersor manual marca RL FLO MASTER con capacidad de dos litros, asperjando sobre la superficie de los frutos con un gasto de agua de 300 litro ha⁻¹ previa calibración, se dejó transcurrir cinco horas para permitir la reentrada de los productos, transcurrido ese tiempo se asperjó 2.5 ml⁻¹ de la concentración ajustada del patógeno previa calibración.

La variable evaluada fue días a la presencia del patógeno, la cual se consideró determinando en cuantos días después de aplicar los tratamientos e inoculación del patógeno, iniciaban la aparición de colonias sobre los frutos de calabaza. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por cuatro frutos, por las características del experimento se consideró a toda la unidad experimental como parcela útil. Se les realizó un análisis de varianza, prueba de comparación

Cuadro 1. Productos químicos y biológicos evaluados contra diferentes aislamientos de *P. capsici* en tres genotipos de calabaza pipiana (*C. argyrosperma*).

Tratamiento	Ingrediente activo	Dosis Litro ⁻¹
<i>Trichoderma</i> cepa CSAEGro	<i>Trichoderma asperellum</i>	1×10 ⁸ UFC ml ⁻¹
PHC [®] Biopak-F [®]	<i>Bacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.	3 g
PHC [®] Root Mate [®]	<i>Trichoderma virens</i> cepa G-41	3 g
Q 2000	yodo libre	5 ml
Previcur [®] Energy	propamocarb + fosetil	6 ml
Ridomil Gold [®] Bravo SC	metalaxil + clorotalonil	6 ml
Testigo	Sin aplicación	--

múltiple de medias utilizando el método Tukey con nivel de significancia al 5% y contrastes ortogonales para comparar el grupo de tratamientos químicos contra tratamientos biológicos, mediante el software Statistical Analysis System (SAS, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

Las colonias de las cepas aisladas de los frutos inoculados mostraron un crecimiento micelial blanco algodonoso; similar al aislamiento original, este mostró espo-

rangios de 20-50×15-42.5 μm, papila 06.02 a 07.05 μm de ancho, 1.2-6 μm de profundidad. Las clamidosporas 35 μm de diámetro. Por las características de este hongo se demostró que se trató de *P. capsici* (Singlenton *et al.*, 1992; Wantanabe, 2002, Gallegly y Hong, 2008). (Figura 1).

Identificación molecular

Las regiones intergénicas internas (ITS) y los genes ribosomales 18S, 5.8S y 28S amplificadas por PCR del aislamiento identificado morfológicamente como *P. capsici* tuvo 852 pb que concuerda con la talla esperada para

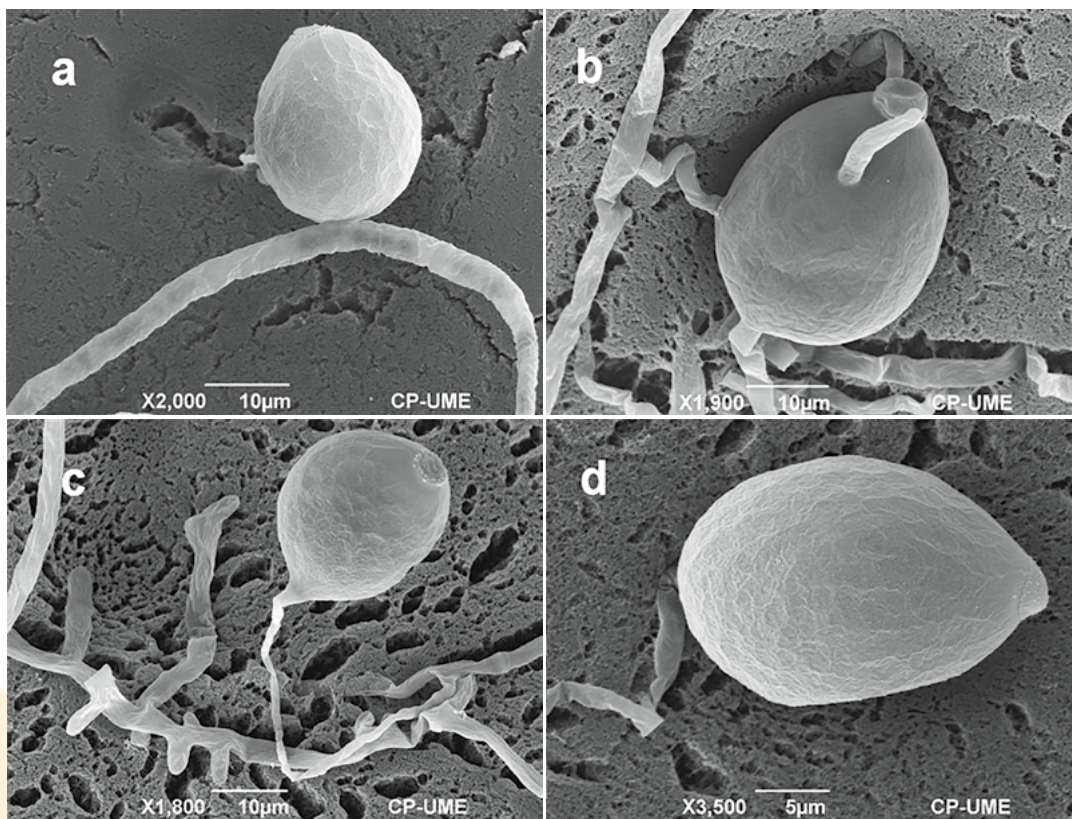


Figura 1. a: Esporangio y micelio liso, b: Esporangio papilado y micelio liso, c: Micelio toruloso y esporangio papilado y d: Esporangio papilado. Características típicas de *P. capsici*.

la especie. Las secuencias obtenida tuvieron un 99% de similitud con dos secuencias de las regiones 18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2 y 28S de *P. capsici* aislado a partir de calabaza en Italia (accesiones AJ75486 y AJ75487), así como con secuencias aisladas de sandía en E.U. (accesiones EU162757 y EU162758).

Manejo en invernadero

Días a la presencia del patógeno

Esta característica es importante, puesto que una vez identificada la presencia del patógeno en frutos tiernos estos se dañan por completo y se pierden. Esta variable en estudio mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$); en las comparaciones de medias los ingredientes activos propamocarb+fosetil y metalaxil+clorotalonil, retardaron la aparición de *P. capsici* al día 6, el testigo se diferenció de todos los tratamientos, apareciendo el patógeno a los 2.82 días después de la inoculación (Figura 2). Al respecto Hu et al. (2007) señalan que el propamocarb y fosetylo tienen una buena acción protectora y curativa contra oomicetos, siendo esto respaldado con lo encontrado para este patógeno en la presente investigación. Por su parte Reiter et al. (1995) citan que el ingrediente activo propamocarb inhibe la formación de oosporas en *P. infestans*. Sin embargo, se reporta que el fosetilo tiene un alto grado de actividad sistémica y eficacia generalmente superior contra oomicetos, ejerciendo un buen control (Nelson et al., 2004; Gent et al., 2010). Se ha observado también que el metalaxil ha reducido el progreso de enfermedades ocasionadas por oomicetos (Aegerter et al., 2002).

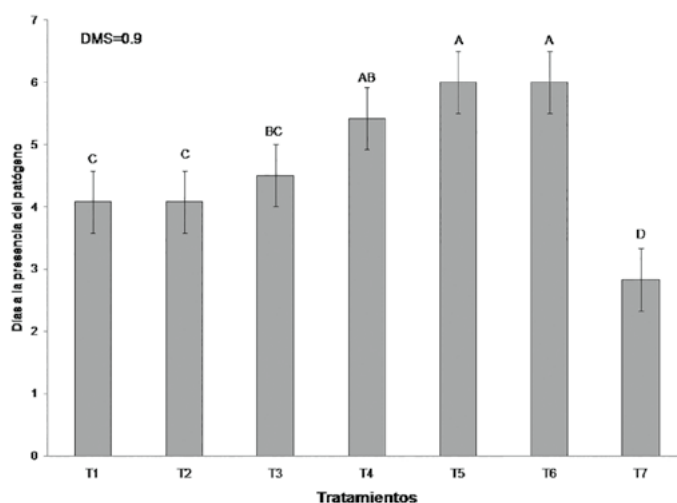


Figura 2. Días a la presencia de *P. capsici* por tratamiento. DMS: diferencia mínima significativa. T1: Trichoderma cepa CSAEGro; T2: PHC® Biopak-F®; T3: PHC®RootMate®; T4: Q 2000; T5: Previcur®Energy; T6: Ridomil Gold® Bravo SC; T7: Testigo.

La prueba de contrastes ortogonales indicó que la comparación entre productos biológicos contra los químicos resultó con diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$), el grupo de tratamientos biológicos en promedio retardó en 4.22 días la aparición de *P. capsici*, mientras que el grupo de tratamientos químicos la atrasó en promedio 5.80 días, resultando mejor estos últimos con una diferencia en la aparición del patógeno de 1.58 días (Figura 3, 4).

CONCLUSIONES

La identificación morfológica y molecular así como las pruebas de patogenicidad determinaron que el agente causal de la pudrición de frutos de calabaza pipiana fue *P. capsici*. Los ingredientes activos propamocarb+fosetil y metalaxil+clorotalonil, fueron los que registraron mejor control al retrasar la presencia del patógeno en los frutos.

LITERATURA CITADA

- Aegerter B., Davis R., Núñez J. 2002. Detection and management of downy mildew in rose rootstock. *Plant Disease* 86: 1363-1370.
- Anónimo. 2012. Qiagen: Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Versión 2. Alemania.
- Antonopoulos D.F., Melton T., Mila A.L. 2010. Effects of chemical control, cultivar resistance, and structure of cultivar root system on black shank incidence of tobacco. *Plant Disease* 94: 613-620.
- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58: 649-662.
- Bi Y., Jiang H., Hausbeck M.K., Hao J.J. 2012. Inhibitory effects of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. *Plant Disease* 96: 797-803.

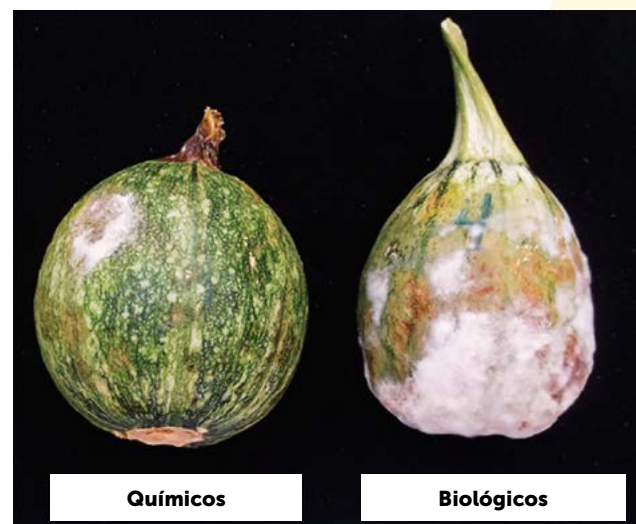


Figura 3. Comparación del efecto de fungicidas químicos y biológicos en la aparición de *P. capsici*.



Figura 4. A-B: Flor de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*). C: Frutos maduros sanos.

Cohen R., Burger Y., Horev C., Koren A., Edelstein M. 2007. Introducing grafted cucurbits to modern agriculture: The Israel experience. *Plant Disease* 91: 916-923.

Gallegly M., Hong, C (2008). *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. American Phytopathological Society (APS) Press, St. Paul, MN.

Gent D.H., Ocamb C.M., Farnsworth J.L. 2010. Forecasting and management of hop downy mildew. *Plant Disease* 94: 425-431.

Gisi U., Sierotzki H. 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology* 122: 157-167.

Harman G.E., Obregón M.A., Samuels G.J., Lorito, M. 2010. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. *Plant Disease* 94: 928-939.

Hu J., Hong C., Stromberg E.L., Moorman G.W. 2007. Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. *Plant Disease* 91:414-420.

Lim J.H., Kim S.D. 2010. Biocontrol of Phytophthora blight of red pepper caused by *Phytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 formulations. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53: 766-773.

Lira R., Villaseñor J.L., Ortiz E. 2002. A proposal for the conservation of the family Cucurbitaceae in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 11: 1699-1720.

Martínez-Rojero R.D., Reyna-Santamaria L., Torres-Hernández G.; Mastache-Lagunas A.A., Michel-Aceves A.C. 2011. Evaluación de la fertilidad y prolificidad en ciclos reproductivos de ocho meses durante tres estaciones en ovejas pelibuey en el trópico seco mexicano. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias* 21: 383-387.

Nelson M.E., Eastwell K.C., Grove G.G., Barbour J.D., Ocamb C.M., Alldredge J.R. 2004. Sensitivity of *Pseudoperonospora humuli* (the causal agent of hop downy mildew) from Washington, Idaho, and Oregon to fosetyl-Al (Aliette).

Pedroza-Sandoval A. 2009. Monitoreo y escalas visuales en la evaluación de las enfermedades. *In: Tópicos Selectos de Estadística Aplicados a la Fitosanidad*. Bautista M., N.; Soto R., L.; Pérez P., R. (eds.). Colegio de Postgraduados. IPN CIIDIR-Oaxaca. Montecillo, Texcoco Edo. de México. 256 p.

Pliego C., Ramos C., Vicente A., Cazorra F.M. 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and Soil* 340: 505-520.

Reiter B., Wenz M., Buschhaus H., Buchenauer H. 1995. Zűr Wirkung von propamocarb-hydrochlorid auf *Phytophthora infestans* in vitro und an kartoffeln und tomaten. *Gesunde Pflanzen* 47: 43-50.

SAS. 2009. SAS. Institute Inc. SASuser's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute incorporation, Cary, N.C. USA. 1028p.

SIAP. 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Singlenton L.L., Mihail J.D., Rush C.M. 1992. *Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi*. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 264 p.

Wantanabe T. 2002. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of cultures fungi and key to species*. Second ed. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. *In: M.A. Inns, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds). PCR Protocols*. Pp. 315-322. Academic Press. San Diego, CA.

Yang M.M., Xu L.P., Xue Q.Y., Yang J.H., Xu Q., Liu H.X., Guo J.H. 2012. Screening potential bacterial biocontrol agents towards *Phytophthora capsici* in pepper. *European Journal of Plant Pathology* 134: 811-820.

Zitter T.A., Hopkins D.L., Thomas C.E. 2004. *Plagas y Enfermedades de las Cucurbitaceas*. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi Prensa. 88 p.