

Aislamiento e Identificación de Especies de *Fusarium* spp Asociadas al Declinamiento del Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Cinco Municipios de Guanajuato, México

Miguel A. Quilambaqui J.
Instituto de Fitosanidad - Fitopatología
Colegio de Postgraduados
Km. 35.5 Carretera México-Texcoco, 56230, Edo. De México, México
mquilamb@espol.edu.ec

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar las especies de *Fusarium* asociadas con plantas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) con síntomas de declinamiento. Un total de 88 muestras fueron seleccionadas mediante un muestreo ponderado se seleccionaron en septiembre y en diciembre en un área de 2,983 ha, el 88 % de la superficie cultivada, correspondiente a los municipios de Dolores Hidalgo (10 muestras), Irapuato (40 muestras), San Luis de la Paz (6 muestras), San Miguel de Allende (12 muestras) y Silao (10 muestras). A partir de raíces, parte basal del tallo y rizoma de plantas se identificaron tres especies: *Fusarium oxysporum* (58.4 %), *Fusarium moniliforme* (24.7 %), y *Fusarium solani* (16.9 %), se aislaron indistintamente de tejido del rizoma, parte basal del tallo y de raíces carnosas. La detección de estas especies fue mayor en dos municipios: *F. oxysporum*, en Irapuato (21.9 %) y Silao (15.5 %), seguida de *F. moniliforme*, Irapuato (11.0 %), y Silao, (5.5 %) y finalmente *F. solani*, Irapuato (5.9 %) y Silao (4.1 %). Estas especies de *Fusarium* se asociaron a plantas con síntomas de amarillamiento de ramas basales, reducción de crecimiento, marchitez y necrosis parcial o total del tejido aéreo. Las raíces presentaron algunas veces manchas rojizas en los haces vasculares y necrosis.

Palabras Claves: Identificación, *Fusarium*, incidencia, síntomas, marchitez, necrosis.

Abstract

The purpose of this research was to detect and identify *Fusarium* species associated to asparagus plants (*Asparagus officinalis* L.) with declining symptoms. 88 samples were collected using a balanced sampling process on September and December over an area of 2,983Ha, on Dolores Hidalgo, Irapuato, San Luis La Paz, San Miguel Allende and Silao municipalities at Guanajuato, Mexico. Three *Fusarium* species were identified from roots, basal stems and rhizomes, indistinctively: *Fusarium oxysporum* (58.4%), *Fusarium moniliforme* (24.7%) and *Fusarium solani* (16.9%). The major detection of these species was observed at Irapuato and Silao municipalities, with 21.9%, 11%, and 5.9% at Irapuato for *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, and *F. solani*, respectively; and 15.5%, 5.5% and 4.1% at Silao for the same species respectively. These species were associated with plants showing basal leaves yellowing, growing rate decrease, and partial or total aerial organs wilt and necrosis. Roots showed in some cases reddish spots on vascular faces and necrosis.

1. Introducción

El cultivo de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) se cultiva en 16 municipios de Guanajuato, en una superficie de 3376 ha, (SDAIR, 2000), siendo uno de los cultivos más importantes, ya que es fuente de trabajo y captación de divisas por concepto de las exportaciones. En 1990 la captación total de divisas del país ascendió a 39,139 millones de dólares por un volumen exportado de 21,165 toneladas (5, 22). El

88% de la superficie cultivada en Guanajuato se concentran en: San Miguel Allende (603 has), Dolores Hidalgo (406 has), Irapuato (713 has), San Luis de la Paz (938 has) y Silao (323 has).

En la actualidad se reporta un notable descenso en el rendimiento del espárrago en Guanajuato pasando de 7 - 8 ton/ha, en los 80's a 1.5 - 2 ton/ha, lo que ha ocasionado el cambio a otros cultivos (5). Este descenso en el rendimiento se ha atribuido a la presencia de

enfermedades, sin que hasta el momento existan trabajos que proporcionen evidencias claras.

Una de las enfermedades más importantes asociada a este cultivo a nivel mundial es el declinamiento del espárrago, la cual es atribuida a especies del género *Fusarium*, siendo las más frecuente reportadas: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium solani* (4, 6, 12, 24).

Esta enfermedad se presenta en cualquiera de las etapas de desarrollo de la planta (10), y entre los síntomas que produce son: amarillamientos, clorosis, marchitez, retardo en el crecimiento y decoloración de la corona, rizoma y raíces; llegando muchas veces a un colapso y a una completa pudrición radical. Se puede presentar además una reducción en el número de tallos y ramas, con presencia de lesiones hundidas y necróticas. Cuando afecta a los turiones (brotes de espárrago directos del rizoma), en cualquiera de las etapas de su crecimiento, estos muestran flacidez y marchitamiento (15).

En Caborca, México, varias especies del género *Fusarium*, fueron responsables del declinamiento del espárrago, caracterizados por una reducción en el número de tallos y turiones, amarillamiento, reducción en el vigor y pudrición radical (14). La falta de información acerca de esta enfermedad en México y específicamente en el estado de Guanajuato, ha tenido repercusiones económicas y ambientales por la ineficacia de las medidas de control implementadas, por lo que el presente trabajo tuvo como objetivos: a) detectar e identificar a la especie (s) de *Fusarium* asociada al declinamiento del espárrago en Guanajuato, y b) determinar su prevalencia y distribución en el mismo.

2. Materiales y métodos

Muestreo para la detección de *Fusarium* spp.

De los 16 municipios productores de espárrago en este estado, se seleccionaron los más representativos de acuerdo a las estadísticas de producción, siendo estos: San Miguel Allende; Dolores Hidalgo; Irapuato; San Luís de la Paz y Silao con 323 ha (Cuadro 1).

El número de muestras de tejido vegetal de espárrago en cada municipio se determinó en forma ponderada tomando en cuenta los siguientes parámetros (Mora, 2000): hectáreas sembradas (ha), precipitación pluvial anual (pp) y altura sobre el nivel del mar (asnm), datos que fueron obtenidos del Centro de Entomología del INIFAP-Celaya, Gto. y de la SDAIR-Celaya Gto. A los factores (ha, asnm y pp) se le asignaron valores ponderativos; así al

municipio con menor superficie se le asignó el valor de 1 y de 3 al de mayor superficie; para los otros dos factores (asnm y pp), el procedimiento fue inverso, así al municipio, con menor asnm y precipitación pluvial, se le asignó el valor de 1. Esto considerando que la mayor inductividad del suelo podría estar dada por una mayor humedad y temperatura moderadas del suelo (<25 °C)

La disponibilidad de recursos humanos y económicos permitieron estimar que un total de 45 sitios de muestreo podrían ser seleccionados en los cinco municipios. Con los datos definidos del factor de ponderación total y el número total de sitios por muestrear, se realizaron los siguientes cálculos para estimar muestras por municipio (Cuadro 1) con la ecuación siguiente:

$$ni = n \frac{(Swi)(Awi)(Pwi)}{\sum_{i=1}^5 (SwiAwiPwi)}$$

Donde:

ni= Número de muestras por municipio *i*

n= Número total de muestras a procesar

Swi= ponderación de la superficie del municipio *i*, *i*= 1,.....5

Awi= ponderación de la altura sobre el nivel del mar del municipio *i*, *i*= 1,.....5

Pwi= ponderación de la precipitación pluvial del municipio *i*, *i*= 1,.....5

Cuadro 1: Criterios de ponderación, factor de ponderación total y número de muestras a seleccionar en cinco municipios del estado de Guanajuato. Otoño 2000.

Municipios a muestrear	Clima	Suelo	Sup. (ha)	FP ² de sup.	asnm (m)	FP ³ de asnm	pp (mm)	FP ⁴ de precipitación	F. Total de ponderación	N° total de muestras ⁵
San Miguel	BShw	Franco arenoso, Arcillo limoso	603	2	1910	1	350	2	4	12
Dolores Hidalgo	BShw	Franco arenoso	406	1	1920	1	450	3	3	10
Irapuato	(A)C(W-)	Franco arenoso, Arcillo arenoso	713	2	1730	2	650	3	12	40
Silao	(A)C(W-)	Franco arenoso, Arcillo arenoso	908	3	1780	2	150	1	6	20
San Luís de la Paz	BShw	Franco arenoso, Limo arcilloso	323	1	2100	1	350	2	2	6
TOTAL									27	88

¹Bs, tipo clima seco semicálido, con lluvias en verano; BSK w= clima seco templado con lluvias en verano; (A)C(W-)= clima húmedo semicálido con lluvias en verano.

² Factores de ponderación (FP) de sup: 1=300-400 ha, 2=400-750 ha, 3=> 750 ha.

³ Factores de ponderación de asnm: 1=300-650 asnm, 2= 700-950 asnm.

⁴ Factores de ponderación de precipitación: 1=100-450 mm, 2= 150-350 mm, 3=> 350 mm.

⁵ Unidad de muestreo= Un campo en el cual se tomó una muestra compuesta de 5 plantas completa con síntomas de marchitez, amarillamiento y reducción de crecimiento.

Aislamiento de *Fusarium*

Trozos de tejido vegetal del rizoma, raíces, parte basal del tallo, se seleccionaron de plantas con síntomas de marchitez, amarillamiento y reducción de crecimiento y fueron examinadas en el estereoscopio y posteriormente procesadas. Con el fin de detectar la infección de *Fusarium*. Cada muestra se cortó en pequeños trozos, los cuales se

desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 1.0 a 3.0 minutos, se lavaron con agua destilada y se transfirieron asépticamente a una cámara húmeda (caja Petri con un papel filtro humedecido en agua esterilizada). Adicionalmente, trozos desinfectados de raíz se transfirieron a cajas Petri, conteniendo PDA (papa dextrosa agar) y selladas con kleenpack.

Con el propósito de conocer en que sección del sistema radical se tenía la mayor infección de *Fusarium*, el 50% (44 muestras) de muestras se sembraron separando los fragmentos de rizoma, parte basal del tallo y raíces carnosas. Estas se realizaron en un medio selectivo para *Fusarium* consistente en: 39g de papa dextrosa agar (PDA; Laboratorios Bioxon, México) con 750 mg de pentacloronitrobenzeno (PCNB, nombre comercial Terraclor 75 WP) y 300 mg de sulfato de estreptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en un litro de agua destilada (25).

En todos los casos, las cajas Petri sembradas se incubaron durante 7 días a 24°C y un fotoperíodo de 12:12. A los 7 días los aislamientos se transfirieron a otras cajas Petri para su purificación. Esta fase se realizó en el laboratorio de Fitopatología del INIFAP Celaya, Gto.

Identificación

La identificación de los aislamientos de *Fusarium* se realizó considerando las estructuras encontradas en los cultivos: macroconidios, microconidios, fiálides, conidióforo y clamidosporas (1, 2, 3, 7, 21). Para la confirmación de la especie se tuvo la colaboración de Victoria Ayala, IFIT, Colegio de Postgraduados (Montecillo, México).

3. Resultados

Muestreo y aislamiento de hongos

Los síntomas de amarillamiento en ramas basales, marchitez, necrosis parcial o total de la planta y finalmente retardo en el crecimiento (Fig. 1A) fueron frecuentemente observados en plantas tipificadas con declinamiento. Las raíces carnosas presentaron estrías rojizas típicas pero sin presentar una pudrición completa. En algunos campos de espárrago, en estado de reposo vegetativo las plantas mostraron un amarillamiento generalizado en toda la planta producto de la actividad fisiológica en esta etapa pero no se asociaron con una infección radical (Fig. 1B).

Un total de 219 aislamientos de *Fusarium* spp. fueron obtenidos de plantas con síntomas de declinamiento encontrándose la mayor prevalencia

en Irapuato (38. 81 %) y en Silao (25.11 %) (Cuadro 2). Del total de los aislamientos de *Fusarium* spp. el 58. 4 %, correspondió a *F. oxysporum*, 24. 7 % a *F. moniliforme* y el 16.9 % a *F. solani*. En cuanto a la distribución de estas especies en los municipios *F. oxysporum* fue la más prevalente en Irapuato (21.9 %) y Silao (15.5 %), seguida de *F. moniliforme* (11.0 % y de 5.5 %, respectivamente) y de *F. solani* (con un 5.9 % en Irapuato y 4.1 % en Silao) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia total (%) y por especie de *Fusarium* aisladas de plantas exhibiendo síntomas de declinamiento en campos esparragueros de cinco municipios de Guanajuato, México 2000.

Municipios a muestrear	Clima	Suelo	Sup. (ha)	FP ² de sup.	asm (m)	FP ³ de asm	pp (mm)	FP ⁴ de precipitación	F.Total de ponderación	N° total de muestras ⁵
San Miguel Dolores Hidalgo	BS/hw	Franco arenoso, Arrollo limoso	603	2	1910	1	350	2	4	12
Irapuato	(A) C(W)	Franco arenoso, Arrollo arenoso	406	1	1920	1	450	3	3	10
		Franco arenoso, Arrollo arenoso	713	2	1730	2	650	3	12	40
Silao	(A) C(W)	Franco arenoso, Arrollo arenoso	938	3	1780	2	150	1	6	20
San Luis de la Paz	BS/hw	Franco arenoso, Limo arcilloso	323	1	2100	1	350	2	2	6
TOTAL									27	88

¹BS/hw=Clima seco semicálido, con lluvias en verano; BS/W=Clima seco templado con lluvias en verano; (A)C(W)=Clima húmedo semicálido con lluvias en verano.
² Factores de ponderación (FP) de sup: 1=300-400 ha, 2=400-750 ha, 3=> 750 ha.
³ Factores de ponderación de asm: 1=300-650 asm, 2=700-950 asm.
⁴ Factores de ponderación de precipitación: 1=100-450 mm, 2= 150-350 mm, 3=> 350 mm.
⁵ Unidad de muestreo=Un campo en el cual se tomó una muestra compuesta de 5 plantas completa con síntomas de marchitez, amarillamiento y reducción de crecimiento.

Las colonias identificadas como *F. oxysporum* desarrollaron micelio de color violeta a púrpura con macroconidios, clamidosporas esféricas y microconidios producidos en fiálides cortas y ramificadas (Fig.1C). Colonias identificadas como *F. moniliforme* desarrollaron un micelio aéreo blanco, que a menudo se tornó púrpura; presentaron microconidios en cadenas en fiálides simples y ausencia de clamidosporas (Fig.1D y E). Otro grupo de aislamientos desarrolló micelio blanco que en ocasiones tomó tonalidades amarillas, presentó macroconidios en fiálides alargadas y clamidosporas simples y en pares correspondiendo a *Fusarium solani* (Fig. 1F).

Las tres especies de *Fusarium* se aislaron de tejido del rizoma, parte basal del tallo y de raíces carnosas. Sin embargo, *F. oxysporum*, fue ligeramente más comúnmente de raíces carnosas (34, 0 %), en cambio *F. moniliforme* fue más frecuentemente aislado (35 %) en la parte basal del tallo, mientras que *F. solani* se aisló más frecuentemente del rizoma (40.7 %).

4. Discusión

Con la detección de tres especies de *Fusarium* a partir de plantas de espárrago con síntomas de declinamiento, consistente en amarillamiento, marchitez y necrosis parcial o total de la planta, se

comprobó la asociación de este hongo con la enfermedad en el cultivo de espárrago en Guanajuato. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Guerrero (1997), quien concluye que el género *Fusarium* está asociado con el declinamiento del espárrago en el norte de México, así como los obtenidos en otros países (4,6,15).

En esta investigación se identificaron las especies *F. oxysporum*, *F. moniliforme* y *F. solani* lo cual también coincide con reportes de varios investigadores (4, 6, 12, 24). De los 219 aislamientos obtenidos de Guanajuato, la especie *F. oxysporum*, fue la más prevalente seguido de *F. moniliforme* y *F. solani*. Esto resultados coinciden en general con los obtenidos por (24), quienes de un total de 778 aislamientos de *Fusarium* spp. encontraron a *F. oxysporum* en un 35.6 %, seguida de *F. proliferatum* con 32.7 % y *F. solani* con 8.6 %. Los resultados anteriores difieren del reportado por Guerrero (1997), en Sonora, México ya que señala a *F. proliferatum*, como la especie más prevalente seguida de *F. oxysporum*. Aunque previamente Nigh (1978) y Endo (1978) (citados por 14) habían reportado en esta región a *F. oxysporum* y *F. moniliforme*. Guerrero (1997) sugiere que la especie *F. moniliforme*, podría en realidad corresponder a *F. proliferatum*.

Al revisar la problemática actual del declinamiento del espárrago en el mundo (17), menciona que *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, son las dos especies más comúnmente asociadas al declinamiento del espárrago en congruencia con lo reportado por (8, 11, 12, 15, 16).

La baja frecuencia de aislamientos de *F. solani* de las zonas esparragueras de Guanajuato, sugiere que su importancia puede ser menor comparada con la de *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, como ha sido sugerido por (18, 24). *F. oxysporum*, típicamente se ubica en el tejido xilemático de las plantas y producen marchitamientos (13); en cambio *F. moniliforme* y *F. solani*, causan pudriciones radicales y ahogamientos de las plántulas (23). Varios investigadores señalan que en el cultivo de espárrago las especies de *Fusarium*, pueden ser aisladas de partes subterráneas (rizoma y raíces) o de toda la planta (9, 19, 24) y tanto de plantas asintomáticas como de las que presenten síntomas visibles (18), esto podría dificultar la estimación de la incidencia real de *Fusarium*, basándose solamente en la inspección y muestreo de plantas con síntomas como se efectuó en este estudio. Sin embargo en trabajos de patogenicidad la asociación de casualidad y efecto debe en principio demostrarse.

En una investigación realizada en zonas esparragueras de Connecticut, EUA (18) encontraron

que *F. moniliforme* fue más común aislarlo del segmento basal del tallo y del rizoma; mientras que *F. oxysporum* fue aislado del segmento basal del tallo, rizoma y raíces, pero solamente en una baja frecuencia; en cambio *F. solani*, fue aislado en baja frecuencia de tejidos del rizoma. En este trabajo también se encontraron diferencias en este aspecto pero las frecuencias de *F. oxysporum* y *F. solani* no fueron tan bajas con respecto a *F. moniliforme*.

Según (11), señala que *F. oxysporum* es común aislarlo de cultivos de espárrago entre 1 y 2 años de edad mientras que *F. moniliforme*, es común aislarlo de cultivos de 12 años de edad o más. Eso sugiere que *F. moniliforme*, es más hábil para colonizar tejidos senescentes que *F. oxysporum* (17) y podría explicar la menor frecuencia de aislamiento de los campos muestreados ya que en general se inspeccionaron cultivos menores a 8 años de edad.

Este trabajo demostró la asociación de tres especies de *Fusarium* con el declinamiento del espárrago y justificó estudios de patogenicidad en condiciones controladas los cuales se presentan en otro reporte (Quilambaqui *et al* 2002)

5. Referencias

- [1] Alexopoulos, C., y Mims, C. 1985. Introducción a la Micología. Omega. Segunda edición. España. 638 p.
- [2] Barnett., H. and Hunter, B. 1986. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth ed. Macmillan publishing Co. New York, USA. 128p.
- [3] Booth, C. 1977. Fusarium. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species.
- [4] Commonwealth Mycological Institute England. 58 p.
- [5] Cook, M. 1923. Dwarf asparagus. Phytopathology 13: 284.
- [6] De la Rosa-López, C. 1998. Análisis de Precios y de Cantidad del Espárrago Fresco de Explotación de Caborca, Sonora. Tesis. Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 110 p.

- [7] Damicone, J., and Manning, W. 1987. Influence of management practices on severity of stem and crown rot, incidence of asparagus miner and yield of asparagus from transplants. *Plant Disease* 71: 81-84.
- [8] Domsch, K., Gams, W., and Anderson, T. 1980. *Compendium of Soil fungi*. Vol. II. Academic Press. London. 859 p.
- [9] Duran, R., Jiménez, R., y Melero, J, 1993. Importancia de las enfermedades del espárrago causadas por especies de *Fusarium* en Andalucía. *Actas del II Congreso Ibérico de ciencias hortícolas*. Zaragoza, España. pp. 1551-1556.
- [10] Elmer, W. 2000. Incidence of infection of asparagus spears marked in Connecticut by *Fusarium* spp. *Plant Disease* 84: 831-834.
- [11] Elmer, W., Johnson, D., Mink, G. 1996. Epidemiology and management of the diseases causal to asparagus decline. *Plant Disease* 80: 117-125.
- [12] Endo, R., and Burkholder, E. 1971. The association of *Fusarium moniliforme* with the crown rot complex of asparagus. *Phytopathology* 61: 891. (Abstract).
- [13] Fantino, M. 1990. Research on asparagus decline in Italy. *Acta Horticulturae* 271: 291-298
- [14] Garret, S.D. 1956. *Biology of Root Infecting Fungi*. Cambridge University Press. Cambridge. USA. 293 p.
- [15] Guerrero, J. 1997. Identification and etiology of *Fusarium* spp. associated with asparagus crown diseases in southern California and northern Mexico. PhD Dissertation. Thesis. University of Arizona. 68 p.
- [16] Grogan, R.G., and Kimble, K.A. 1959. The association of *Fusarium* wilts with the asparagus decline and replant problem in California. *Phytopathology* 49: 122-125.
- [17] Johnston, S., Springer, J., and Lewis, G. 1979. *Fusarium moniliforme* as a cause of stem and crown rot of asparagus and its association with asparagus decline. *Phytopathology* 69: 778-780.
- [18] Keulder, P. 1999. Asparagus decline and replant problem: A review of the current situation and approaches for future research. *Acta Horticulture* 479: 253-262.
- [19] La Mondia, J., and Elmer, W. 1989. Pathogenicity and vegetative compatibility among isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* colonizing asparagus tissues. *Canadian Journal Botany* 67: 2420-2424.
- [20] Mora-Aguilera, G. 2000. El Muestreo en la Sanidad: Principios y Aplicaciones. In *Principios de Salud Animal y Fitosanidad*. Cibrian, T. J.E., Anaya, R.S. (Compiladores). Colegio de Postgraduados. Montecillo. Edo. de México. pp. 103-124.
- [21] Nelson, P., Toussoun, T. and Marasas, W. 1983. *Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press. University Park. 190 p.
- [22] Nigh, Jr. E. 1996. Asparagus production in Mexico. Proc. 8th Int. Asparagus Symposium. *Acta Horticulturae* 415: 35-39.
- [23] Romero-Cova, S. 1993. *Hongos Fitopatógenos*. 1^{ra} reimpresión. Universidad Autónoma Chapingo. México. 347.
- [24] Schreuder, W. and Lamprecht, S. 1995. Pathogenicity of three *Fusarium* species with asparagus decline in South Africa. *Plant Disease* 79: 177- 181.
- [25] Wang, B. and Jeffers, S. 2000. *Fusarium* root and crown: A diseases of container grown hostas. *Plant Disease* 84: 980-988.

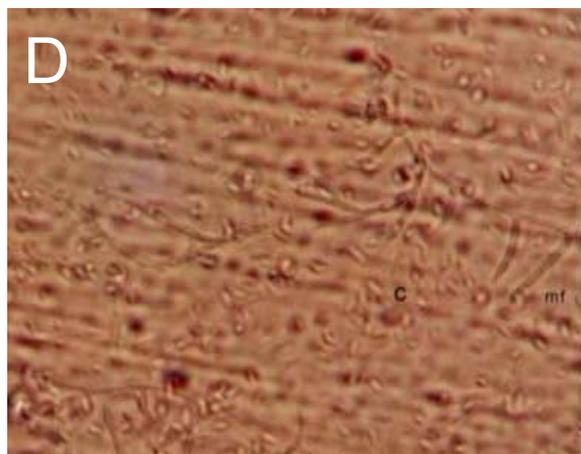
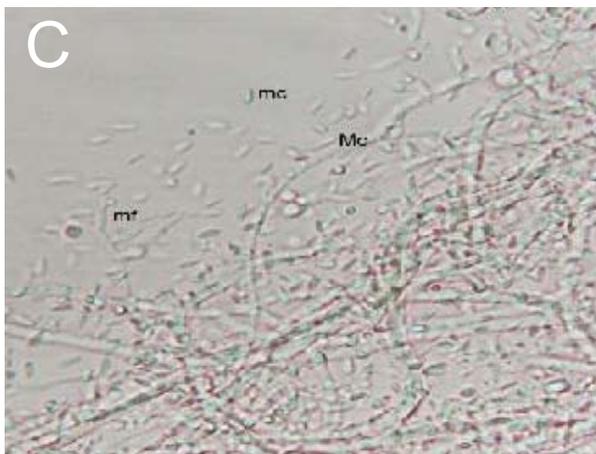


Fig. 1. (A) Planta de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) con síntomas de amarillamiento de ramas basales, marchitez y necrosis parcial del tejido aéreo asociados con el declinamiento. (B) Planta de espárrago en etapa de reposo vegetativo. Especies de *Fusarium* aisladas del sistema radical de plantas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) (C) *F. oxysporum*, (D y E) *F. moniliforme* y (F) *F. solani*: Macroconidios (Mc), microconidios (mc), conidios en cadena (cc), clamidosporas (cl) y monofiálides (mf).