

Ensayos

Viabilidad en la detección de *Phytophthora palmivora* en frutos de papaya (*Carica papaya*) en la zona Costa de Oaxaca

Resumen

Phytophthora palmivora es el agente causal de la pudrición frutal y radical de la papaya, es considerada una enfermedad de lento desarrollo en el hospedante, y de las más importantes en este cultivo a escala mundial. Por tal motivo se seleccionó a *P. palmivora* para su identificación en el presente trabajo. Para el aislamiento de este agente se procedió a identificar en campo los frutos que presentaran los síntomas característicos de dicha enfermedad del fruto, los cuales fueron procesados en laboratorio para extraer una parte del tejido infectado y colocarlo en medios de cultivo PDA suplementado con ácido láctico para limitar el crecimiento de bacterias. Al obtener los cultivos puros se realizaron estudios morfológicos para identificar estructuras reproductivas típicas de *P. palmivora*. Los resultados obtenidos en este estudio preliminar nos indicaron la ausencia de *P. palmivora*, por otro lado se identificó la presencia del agente patógeno *Colletotrichum* spp que causa la enfermedad conocida como antracnosis. El presente trabajo nos da una visión preliminar de la problemática de agentes patógenos de tipo fungoso, por lo que en estudios posteriores se centrará a determinar la distribución de *Colletotrichum* spp en la región Costa.

Abstract

Phytophthora palmivora is the causal agent of fruit and root rot in papaya. It is considered a slow-developing disease, and is among the most important for this crop worldwide. For this reason, we chose *P. palmivora* for identification in our research. To isolate this agent, we proceeded by identifying on-site those fruits which showed symptoms characteristic of this disease. These were processed in the laboratory to extract part of the infected tissue, which were placed in PDA culture media supplemented by lactic acid to limit bacteria growth. Upon obtaining pure cultures, morphological studies were carried out to identify reproductive structures typical of *P. palmivora*. The results of the preliminary study showed the absence of *P. palmivora*. On the other hand, it showed the presence of the pathogenic agent *Colletotrichum* spp, which causes the disease known as anthracnose. This paper provides a preliminary look at the problem of fungal pathogenic agents, from which later studies will focus on determining the distribution of *Colletotrichum* spp in the coastal region.

Résumé

Phytophthora palmivora est l'agent responsable de la putréfaction radicale de la papaye. Elle est considérée comme maladie au lent développement chez l'hôte et c'est l'une des plus importantes de cette culture à échelle mondiale. C'est pourquoi on a sélectionné *Phytophthora palmivora* pour son identification dans le travail présent. Afin d'isoler cet agent, on a procédé à l'identification sur le terrain des fruits présentant les symptômes caractéristiques de cette maladie du fruit. Ces fruits ont été utilisés en laboratoire pour extraire une partie du tissu infecté et le disposer en culture PDA agrémentée d'acide lactique pour limiter la croissance de bactéries. L'obtention de cultures pures a permis de réaliser des études morphologiques pour identifier les structures reproductives typiques de *Phytophthora palmivora*. Dans cette étude préliminaire, les résultats obtenus nous ont indiqué l'absence de *Phytophthora palmivora* et d'un autre côté, on a identifié la présence de l'agent pathogène *Colletotrichum* spp qui cause la maladie connue sous le nom d'antracnose. Ce travail nous donne une vision préliminaire de la problématique des agents pathogènes de type fongiques. Dans des prochaines recherches nous nous concentrerons sur la distribution de *Colletotrichum* spp dans la région de Oaxaca.

Julieta Karina Cruz Vázquez¹,
Epifanio Santíz Rodríguez¹,
Edmundo Lozoya Gloria²,
Francisco Gumaro Ruiz Ruiz¹.

¹Universidad del Mar Campus Puerto Escondido. Oaxaca, México.

²CINVAESTAV-IPN Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

Palabras clave: fitopatógeno, zoosporas, esporangios, monospóricos, PDA.

Introducción Producción e importancia económica

El fruto de la papaya (*Carica papaya*) es uno de los frutos tropicales con mayor demanda nacional e internacional. En México los principales estados productores son Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Michoacán, Guerre-

ro y Colima. En el 2011 Oaxaca ocupó el tercer lugar (cuadro 1) en cuanto a producción de papaya a nivel nacional. (SIAP, 2011).

Cuadro 1. Principales Estados productores de papaya. Fuente SIAP 2011

Ubicación	Producción (Toneladas)
Chiapas	140,721.50
Veracruz	115,056.50
Oaxaca	113,705.25
Colima	59,134.31
Guerrero	45,180.30

Siendo el distrito Costa el lugar que produce mayor cantidad de papaya en todo el estado de Oaxaca (cuadro 2). En donde Villa de Tututepec de Melchor Ocampo es el municipio responsable en la producción de papaya (cuadro 3) en el distrito Costa (SIAP, 2011).

Cuadro 2. Producción de papaya por distritos en Oaxaca. Fuente SIAP 2011

Distrito	Producción (Toneladas)
Costa	101,491.50
Istmo	9,081.10
Valles Centrales	1,860.80
Huajuapán de León	666.00
Cañada	605.85

Cuadro 3. Distribución de la producción de papaya en el distrito Costa Fuente SIAP 2011

Municipio	Producción (Toneladas)
Villa de Tututepec de Melchor Ocampo	39,045.00
Santiago Jamiltepec	17,875.00
Santa María Huatulco	10,927.50
Santa María Huazolotitlán	10,880.00

La disminución de los rendimientos obtenidos en este cultivo a nivel nacional son ocasionados entre otros factores por enfermedades y plagas causadas por bacterias (*Enterobacterium cloacae*), hongos (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Collectotrichum*, *Alternaria solani*, entre otros), virus (Meleira, virus de la mancha anular), oomicetos (*Phytophthora sp*), (Loayza, 2001 y Tapia et al., 2015).

Phytophthora

El género *Phytophthora* (del griego *Phyton*: planta; *phthora*: destructor) pertenece al reino *Straminipila*, Orden *Peronosporales*. Familia *Pythiaceae*. Es un organismo patógeno de plantas dicotiledóneas en donde

la especie de *Phytophthora capsici* fue la primera que se describió (Leonian, 1922) en Nuevo México el cual es patógeno del chile (Hernández, 2007).

Actualmente se han descrito varias cepas de *P. palmivora* debido a la variación morfológica y de infección (Nelson, 2008). Se caracteriza por tener un micelio alargado y bien desarrollado. Contiene esporangios en simpodios que se encuentran bien desarrollados, crecen de forma abundante, son prominentes y terminales. Se reproducen de manera asexual y sexual mediante zoosporas biflageladas que se desarrollan dentro de clamidosporas en forma papilada (Agrios, 2005).

Los zoosporangios producen zoosporas, clamidosporas y oosporas. Las zoosporas son los componentes más importantes para el desarrollo de la infección, ya que son móviles e infecciosas, después de liberarse del zoosporangio. Las clamidosporas son estructuras de resistencia que se mantienen latentes en el suelo hasta encontrar al hospedero, éstas pueden germinar a zoosporangios al contacto con el agua. Los zoosporangios penetran a la planta a través de heridas en sus tejidos. Los propágulos de este patógeno se dispersan por el viento, agua, suelo, animales, etc. Una vez que aparece la enfermedad se propaga rápidamente (Nelson, 2008).

Algunos autores mencionan que tanto *Phytophthora palmivora* y *P. parasitica* pueden infectar el fruto de papaya en cualquier estadio de su desarrollo, conforme la enfermedad progresa, el fruto cambia de color y textura hasta terminar en el suelo el cual constituye un reservorio de inóculo para posteriores infecciones (Hine, et al., 1965); también puede afectar el tronco, fruto y raíz (Álvarez y Nelson 1982); se menciona que la infección de la fruta es la enfermedad más evidente e importante económicamente, la característica principal es el apareamiento de manchas de agua y posteriormente la fruta se cubre de una masa algodonosa blanquecina, se marchitan y caen al suelo (Pernezny y Litz 2003).

Debido a lo anterior, es importante realizar un estudio preliminar de la incidencia de este patógeno en las zonas de mayor producción de papaya en la región Costa de Oaxaca. Con su aislamiento se procederá a realizar investigaciones futuras para proponer posibles estrategias de control empleando metabolitos naturales extraídos de plantas endémicas.

Metodologías y materiales

Colecta

a) Establecimiento de las zonas de colectas

El presente trabajo se realizó en el año de 2011 en diversos puntos de la localidad de Río Grande perteneciente al municipio de Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca. (figura 1). El clima de Río Grande es cálido-húmedo con lluvias en verano por lo que se genera temperaturas entre 25 y 39°C oscilando en una media anual de 27°C y una precipitación pluvial de 800 a 2000 mm distribuyéndose en un 96 % de mayo a octubre (INEGI, 2010).

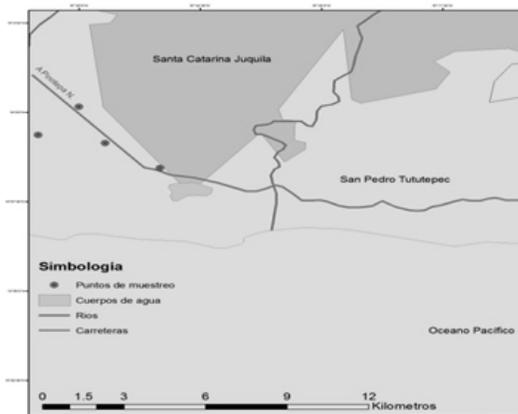


Figura 1. Localización de las zonas de colecta. Muestra los diferentes lugares de colecta comprendidos en el municipio de Villa de Tututepec de Melchor Ocampo (marcas en forma de círculo de color verde).

El estudio se realizó en cuatro huertas de papaya, de 9 a 13 meses de edad con un sistema de riego de microaspersión, las cuales están ubicados cerca de la carretera federal 200 entre el kilómetro 94 al 81, dichos sitios de muestreo fueron debidamente geotiquetados (Cuadro 4).

Cuadro 4. Coordenadas geográficas generadas por las colectas, obtenidas por un GPS Garmin Etrex vista hcx

Colecta	Latitud N	Longitud W	Altitud (msnm)	Sitio
1	15°59'44.86"	97°24'57.22"	20	Río Grande
2	15°58'51.17"	97°25'44.59"	14	Río Grande
3	15°58'38.29"	97°24'22.02"	15	Río Grande
4	15°57'52.31"	97°23'13.4"	15	Río Grande

b) Colecta de muestras

Una vez identificadas las zonas de colecta, se procedió a realizar las colectas de tejido vegetal en diferentes puntos de la localidad antes mencionada. Se identificaron los frutos con síntomas característicos de *Phytophthora* sp o alguna enfermedad producida por hongos o agentes patógenos (Mansilla *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 2003) (Figura 2). En el sitio de muestreo

se colectaron frutos y se colocaron en recipientes de plástico cerrados (Rodríguez *et al.*, 2004).

Aislamiento de hongos

a) Tratamiento

El análisis de las colectas realizadas se llevó a cabo en el laboratorio de química de la Universidad del Mar; se extrajo tejido que contenía partes sanas y enfermas

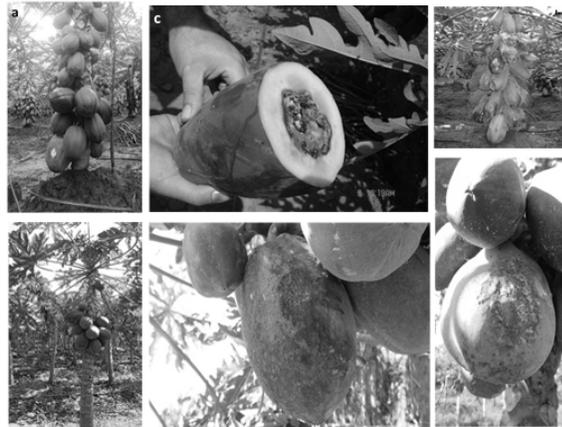


Figura 2. Identificación de frutos infectados en campo. (a,b,d,e y f) Se pudo constatar que los frutos se encontraban infectados por un agente fitopatógeno, provocando lesiones evidentes por su presencia, (c) algunos frutos no presentan síntomas característicos en su exterior pero en el interior del fruto puede ser blanco para la invasión de diferentes patógenos.

de la superficie de los frutos (figura 3). Se cortaron en secciones de 5 mm aproximadamente y se desinfectaron con una solución clorada al 6% (v/v) durante dos minutos; después se lavaron tres veces con agua destilada estéril, y posteriormente se secaron en papel filtro Whatman.

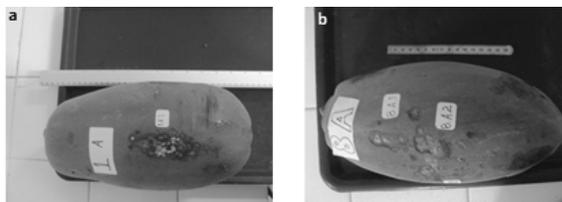


Figura 3. Identificación de frutos colectados. (a) y (b) Las lesiones fueron etiquetadas y medidas de acuerdo a la severidad de la enfermedad.

b) Siembra

Los tejidos desinfectados fueron sembrados en cajas petri (figura 4) con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) acidificado con ácido láctico al 2% v/v e incubados a temperatura ambiente (27°C) durante 24 a 38 horas (Graham *et al.*, 1998).

c) Purificación

El cultivo primario, considerado como el producto de la primera siembra no diferencial de las muestras,

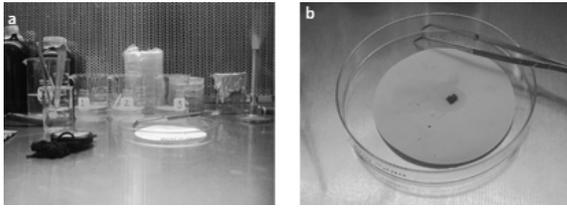


Figura 4. Material y equipo del laboratorio para los análisis. (a) Se utilizó una campana de flujo laminar para el procesamiento de las muestras; (b) el tejido antes de ser inoculado en el medio de cultivo (PDA) se desinfectó y secó con papel filtro previamente esterilizado.

es considerado multiespóricico, ya que en este cultivo germinan varias esporas generando diversas cepas. Se aislaron microorganismos que macroscópicamente presentaron morfotipos diferenciales, los cuales se procesaron como cultivos nuevos. En condiciones asépticas, con un sacabocado de 5 mm de diámetro se extrajeron discos de agar que contenían micelio periférico de la colonia, se sembraron en medio de cultivo PDA adicionado con ácido láctico al 2% v/v. y se dejaron incubar a 27°C (Mansilla *et al.*, 1993, Agrios, 2005).

d) Cultivos monospóricos

Para realizar este cultivo se tomó en cuenta el protocolo reportado en el trabajo de (Echeverría, 2006). A partir del cultivo multiespóricico se cortaron discos de 5 mm de diámetro, los discos se pasaron a tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril y una gota de Tween 20. Se removieron los conidios agitando en vortex por 5 minutos, se tomó 1 ml de suspensión de conidios y se colocó en tubos de ensayo estériles, posteriormente se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} con agua destilada estéril.

Para determinar la concentración del inóculo de los conidios se usó una Cámara de Neubauer, con el cual se hicieron conteos de esporas en campos de dimensiones conocidas, que dieron el número de esporas por mililitro de la suspensión inicial (Gilchrist *et al.*, 2005).

De acuerdo a Gilchrist *et al.* (2005) y Echeverría (2006), una vez contabilizadas las esporas se determinó la concentración y volumen necesario de tal manera que al tomar 2 μ l y vaciarlos en una caja petri con medio de cultivo; se inocularon 20 esporas y se distribuyó de manera homogénea con una varilla de vidrio con punta de triángulo para su posterior incubación a 27°C, por 24 horas. Este procedimiento se repitió para cada aislamiento.

Transcurridas las 24 horas, se buscaron mediante el microscopio estereoscópico esporas germinadas al anverso de la caja de petri, de las cuales se seleccionaron las originadas por una sola espóra (monospóricico) y se marcaron con un círculo. Posteriormente, en condiciones estériles dentro de la campana de flujo laminar y con un bisturí estéril se cortó el área señalada. El fragmento se extrajo y se colocó en una caja petri conteniendo medio PDA. Para cada espóra seleccionada se realizó el mismo procedimiento, un fragmento por cada caja petri, se incubaron por 96 horas a 27°C. Una vez pasado el tiempo sugerido se seleccionaron los cultivos con mayor crecimiento y de apariencia uniforme, para subcultivar en PDA.

La identificación se llevó a cabo utilizando las claves de identificación de Barnett y Hunter (1998) y Watanabe (2000) tomando en cuenta, características del cultivo: color superficial y reverso de la colonia, cantidad de hifa aérea, textura de la superficie, forma del margen, patrón de crecimiento y estructuras formadas. **Morfología del hongo:** forma de la hifa, estructuras asexuales como esporangios, esporas, conidios, entre otras. Para ello, se realizaron preparaciones y se tiñeron con azul de lactofenol de los cultivos monospóricicos en crecimiento (Watanabe, 2000; Reyes y Morales, 2007; Villanueva *et al.*, 2008).

Resultados

Se obtuvieron un total de 74 cepas de las cuatro colectas realizadas, no se encontraron estructuras que indicaran la presencia de *Phytophthora sp.*, en cambio se logró aislar e identificar a *Colletotrichum spp.*, *Rhizopus spp* y *Fusarium spp* (Cuadro 5).

La morfología de la colonia de *Colletotrichum sp.* (figura 5C) es de color café-grisácea con crecimiento radial y bordes irregulares, con hifas septadas con apresorios café oscuros e hifas hialinas, el cuerpo acervular posee setas oscuras estériles (Figura 5A, y 5B).

En cuanto a *Fusarium sp.* la colonia presenta en la parte central una coloración café oscura y blanquecina-amarillenta en los bordes. Presenta micelio aéreo escaso con textura algodonosa. Bordes discontinuos y hundidos, con crecimiento amorfo. Las hifas del micelio son septadas con clamidoconidios. Presenta macroconidios con 2 a 4 células, con forma de canoa, con células apicales elongadas y microconidios pre-

Cuadro 5. Distribución geográfica del número de cepas aisladas

Colecta	Latitud N	Longitud W	Sitio	Cepas de <i>Colletotrichum</i> spp	Cepas de <i>Fusarium</i> spp	Cepas de <i>Rhizopus</i> spp
1	15°59'44.86"	97°24'57.22"	Río Grande	21	3	1
2	15°58'51.17"	97°25'44.59"	Río Grande	15	5	0
3	15°58'38.29"	97°24'22.02"	Río Grande	12	2	1
4	15°57'52.31"	97°23'13.4"	Río Grande	10	4	0
Total				58	14	2

sentes, usualmente de 1 a 2 células con forma cilíndrica y redondeada en los extremos, ver figura 5D y 5E. De acuerdo a Barnett y Hunter (1998) los aislados de éste género son muy difíciles de identificar debido a las condiciones físico-químicas de cultivo que ocasiona la malformación del esporodoquio; sin embargo, es posible su identificación debido a la producción de macro y microconidios en forma de canoa, como se puede observar en la figura 5E.

Por otro lado el patógeno *Rhizopus* spp. penetra en el fruto por medio de heridas que ocurren durante la cosecha, transporte o durante el manejo postcosecha. Se presenta como pudrición acuosa cubierta de masas

de esporas de micelio gris con esporangios macroscópicos negros; El micelio carece de septas y produce esporangióforos largos aéreos que en sus puntas forman esporangios esféricos pequeños (Agrios, 2005).

Conclusiones

Con el presente análisis preliminar realizado en las colectas de frutos de papaya en Villa de Tututepec municipio de Melchor Ocampo, se puede afirmar que los cultivos de papaya presentaron enfermedades causadas principalmente por agentes de carácter fúngico. Cabe destacar que las morfologías que presentaron los diversos aislados identificados no pertenecían a los

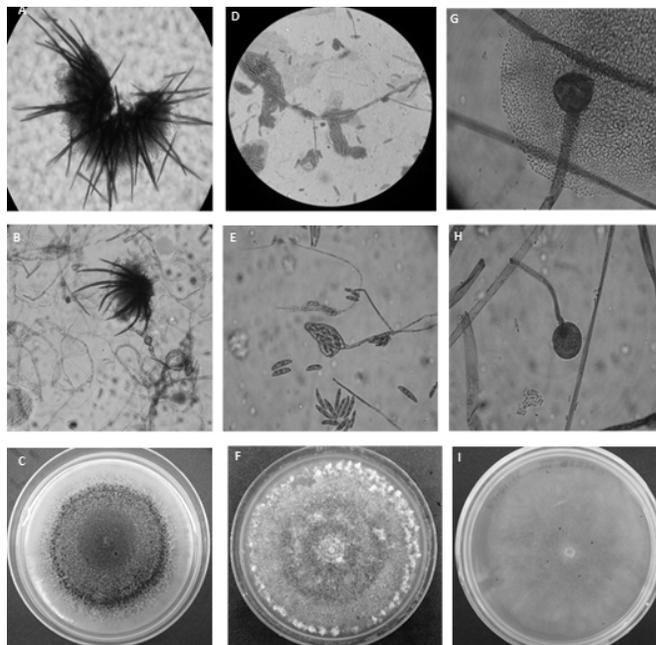


Figura 5. Características fenotípicas de *Colletotrichum* sp (C) Las características más pronunciadas de la colonia son la escasa presencia de micelio aéreo de color blanco, el crecimiento radial con bordes irregulares; B) El micelio es septado y A) la presencia del cuerpo acervular con setas café-oscuras y estériles, en el que existe gran cantidad de conidios, curvos y oblongos, en formación apical a los conidióforos. Aspectos morfológicos y microscópicos de *Fusarium* sp. (F) Crecimiento colonial de *Fusarium* sp. es amorfo, con una coloración café oscura en el centro y la bordea un micelio de color blanco-amarillento, presenta micelio aéreo escaso. (E y F) macroconidios de más de 2 células hasta 4 y microconidios de 1 a 2 células. Aspectos morfológicos y microscópicos de *Rhizopus* sp, (I) colonias algodonosas de color blanco, llega a cubrir completamente la caja Petri, se torna gris con puntos negros. (H) presencia de hifas gruesas y aseptadas, abundantes rizoides prominentes de color café, de los que salen los esporangióforos largos, no ramificados de color café, (G) cada uno con un esporangio café con esporangiosporas.

característicos reportados de *Phytophthora palmivora*, por lo tanto se puede concluir que la identificación de este patógeno no se pudo realizar directamente en fruto como lo estipulan algunos autores.

En los aislados obtenidos se identificó en mayor proporción a *Colletotrichum* spp seguido de *Fusarium* spp y en menor incidencia al género *Rhizopus* spp. *Colletotrichum* spp ha destacado ser el agente causal de la enfermedad conocida como antracnosis, el cual juega un papel muy importante en la economía de la agricultura a nivel mundial.

Estos resultados preliminares obligan a que en un futuro se debe de ubicar más sitios de muestreo en los diferentes municipios del distrito Costa como Jamiltepec y Pinotepa Nacional, además de una revisión de manera exhaustiva de las principales estrategias para el control de *Colletotrichum* spp como: antagonistas microbianos, control químico, extractos naturales además de considerar hacer uso de técnicas de biología molecular para poder identificar de manera más precisa y oportuna a los aislados obtenidos del presente trabajo **T**

Agradecimientos

El presente proyecto de investigación forma parte de los proyectos con financiamiento interno de la UMAR evaluados ante el consejo de investigación de dicha Institución.

Bibliografía

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Estados Unidos de America: Academic Press.

Álvarez A., Nelson M. (1982). Control of *Phytophthora palmivora* in Papaya Orchards with weekly sprays of Chlorothalonil. Plant disease. Vol. 66. 37-39.

Barnett, H. L., y Hunter B. B. (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Minnesota: The American Phytopathological Society Press.

Echeverría F. (2006). Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Tesis Bachiller. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica 92 p.

Graham, J., Timmer, L., Drouillard, D., Peever T. (1998). Characterization of *Phytophthora* spp. Causing Outbreaks of Citrus Brown Rot

in Florida. The American Phytopathological Society. Vol. 88(7). 724-729

Gilchrist L., Fuentes G, Martínez C., López R., Duveiller E., Singh R., Henry M., García I. (2005). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. México: CIMMYT.

Hernández, M. E. (2007). Variabilidad de aislados de *phytophthora capsici* en el estado de Guanajuato. Tesis Maestría, Celaya, Guanajuato. Instituto Tecnológico de Celaya. 140 p.

Hine R.B., Holtzmann O. B., Raabe R. D. (1965). Diseases of papaya (*Carica papaya* L.) in Hawaii. Hawaii agricultural experiment station university of Hawaii. 136

INEGI (2010). Instituto Nacional de Geografía y Estadística. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/topografia/compendio.aspx> Consultado 18 de agosto de 2015

Leonian, H.L. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Phytopathology 12. 401-408

Loayza, I. (2001). Capsicum y sus derivados en Iberoamérica aspectos agrícolas, científicos, tecnológicos y económicos. Bolivia CYTED.

Mansilla J.P., Pintos C., Salinero M. (1993). Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña. Bol. San. Veg. Plagas. Vol 19 (4). 541-549.

Nelson, S. (2008). *Phytophthora* blight of papaya. College of Tropical Agriculture and Human Resource University of Hawaii at Manoa. Vol(53).1-7

Pérez L., Durán L., Ramírez R., Sánchez J., Olalde V. (2003). Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de fitopatología. Vol 21(1). 19-25.

Pernezny, K., Litz R (2003). Some common diseases of Papaya in Florida. Plant Pathology Department, University of Florida. Vol (35). 1-4

Reyes C., Morales L. (2007). Determinación de la temperatura óptima de desarrollo in vitro

- de *Colletotrichum gloesporioides* Penz. En aguacate "Hass", en la zona aguacatera de Michoacán, México. Tesis de maestría. Morelia, Michoacan. Universidad de Morelia de San Nicolás de Hidalgo.
- Rodríguez V., Luna J., Valle P., Tiscareño M., Ruiz J. (2004). Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de su distribución espacial en el centro-norte de México mediante un sistema de información geográfica. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(1). 72-81.
- SIAP (2011). Servicio de información agroalimentaria y pesquera Disponible en http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=231&Itemid=108. Consultado 12 de Enero de 2015.
- Tapia R., Magaña A., Cortes A., Itza G., Nexticapan A., Quijano A., Martín R.,Perez D. (2015). Seed transmission of Papaya meleira virus in papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol. *Plant Pathology*, 64(8). 272–275
- Villanueva R., Yáñez M., Hernández A. (2008). Especies de *Colletotrichum* en Chirimoya (*Annona chiremola* Mill.). *Agrociencia*. 42(6). 689-701
- Watanabe, T. (2000). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. United States of America: CRC Press.