

Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum indicum*)

Sporulation evaluation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* in two culture media and two inoculation methods on sesame (*Sesamum indicum* L.)

Ingrid HERRERA y Hernán LAURENTIN ✉

Departamento de Ciencias Biológicas. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Vía Agua Viva. Cabudare C.P. 3023. Estado Lara. Venezuela. E-mail: hlaurentin@ucla.edu.ve
✉ Autor para correspondencia

Recibido: 13/03/2012 Fin de primer arbitraje: 08/06/2012 Primera revisión recibida: 27/06/2012
Fin de segundo arbitraje: 30/07/2012 Segunda revisión recibida: 10/08/2012 Aceptado: 10/08/2012

RESUMEN

Una de las estrategias más efectivas en el control de hongos fitopatógenos es la obtención de cultivares resistentes, lo cual requiere de un protocolo de inoculación eficaz para la identificación de germoplasma que tenga este atributo. En todo procedimiento de inoculación se requiere contar con suficiente material que actúe como propágulo inicial. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la producción de esporas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* sobre dos medios de cultivo, así como evaluar dos metodologías de inoculación de este hongo sobre ajonjolí. Las metodologías de inoculación consistieron en: i. enfrentar a las plántulas a una suspensión de esporas, ii. enfrentar a las plántulas a micelio y esporas mezclados con un sustrato en bandejas plásticas. El medio papa dextrosa agar permitió una producción 4 veces mayor de clamidosporas, 5 veces mayor de macroconidios y 2 veces mayor de microconidios que el medio SNA (agar bajo en nutrientes). En relación a las metodologías de inoculación, la primera resultó en un 100% de incidencia y una severidad de 0,91, considerándose esta como el promedio sobre 10 plántulas de la relación longitud de la lesión entre longitud de la plántula. La segunda metodología resultó en un 50% de incidencia y una severidad de 0,68. Siendo ambas metodologías efectivas en lograr la enfermedad en plantas de ajonjolí, se podría considerar la segunda como más adecuada debido a que sus condiciones son más parecidas a las que se dan en campo, estableciéndose interacciones entre el sustrato, el hongo y la planta.

Palabras clave: protocolo inoculación, macroconidios, microconidios, clamidosporas, marchitez, sésamo, selección, mejoramiento genético

ABSTRACT

One of the most effective strategies for fungi control is to obtain resistant cultivars, but for that, it is necessary an efficient inoculation protocol to identify resistant germplasm and also to get initial propagule enough. The objectives of this research were to evaluate spores production of *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* on two culture media, and two inoculation methods of the fungus on sesame. Inoculation methods were: i. confronting plantlets to fungus spores, and ii. confronting plantlets to fungus (mycelia and spores) mixed with soil. Spores production was 4, 5 and 2 times larger on potato dextrose agar than on SNA (low nutrients agar) for chlamydo spores, macroconidia and microconidia respectively. First inoculation method resulted in 100% incidence and 91% of severity, which was measured as the relation lesion length/plantlet length expressed as percentage. Second method resulted in 50% incidence and 68% severity. The second method was considered the most suitable for screening sesame germplasm to the fungus.

Key words: inoculation protocol, macroconidia, microconidia, chlamydo spore, wilt, sesame, selection, plant breeding

INTRODUCCIÓN

El ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) es un cultivo que posee una tradición en Venezuela de más de 60 años. El principal indicador de su importancia en la agricultura del país es la superficie que se dedica a su cultivo, la cual en los últimos 10 años ha estado en un promedio de 45.000 has anuales (FEDEAGRO,

2012). Como cualquier otro cultivo, el ajonjolí tiene limitaciones dadas por factores bióticos y abióticos. Entre los factores bióticos, los hongos fitopatógenos del suelo *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* han sido reportados como los que tienen mayores efectos negativos sobre la producción de ajonjolí en Venezuela (Pineda, 2002). La enfermedad del marchitamiento causada por

Fusarium es asociada a la infecci3n previa dada por *Macrophomina phaseolina* (Dhingra y Sinclair, 1978; Pineda y Avila, 1988), sin embargo algunos estudios señalan que *Fusarium* no requiere de infecciones previas por otros hongos para causar la enfermedad (Ammar *et al.*, 2004). *F. oxysporum* f.sp. *sesami* sobrevive como un hongo saprófito en el suelo; al entrar en contacto con la planta de ajonjolí sus hifas penetran las raíces creciendo intercelularmente hasta alcanzar el xilema, por donde continúa su crecimiento afectando el suministro de agua a la planta.

Una de las estrategias a considerar en el manejo de un microorganismo fitopat3geno es recurrir a la resistencia mediante el mejoramiento genético como medida de control más efectiva (Oku, 1994). Poder determinar la existencia de resistencia de la planta al ataque de alg3n pat3geno requiere de la existencia de un protocolo de inoculaci3n que asegure el contacto entre estructuras vegetativas y/o reproductivas del agente causal con la planta en la cual quiera ser evaluada la resistencia (Niks *et al.*, 1993); así mismo es requerida la disponibilidad de suficiente material que actúe como propágulo inicial. Estudios anteriores sobre resistencia de ajonjolí a *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* han sido realizados en evaluaciones en campo utilizando suelos naturalmente infectados (e.g. El-Shazly *et al.*, 1999; Ammar *et al.*, 2004) o promoviendo la infecci3n artificial mediante la aplicaci3n de una mezcla de suelo y esporas del hongo en el sitio de siembra (El-Bramawy y Wahid, 2007; El-Bramawy y Al-Wahid, 2009), situaci3n que deja muchas variables sin control, lo cual afecta la repetibilidad que pueda tener esta metodología. Las observaciones empíricas que se hacen en siembras comerciales en Venezuela no aclaran la situaci3n, puesto que se ven plantas enfermas y plantas sanas en un mismo lote, sin haberse cuantificado los daños o haber relacionado la incidencia y/o severidad con alguna condici3n climática particular. Por tal raz3n, el presente trabajo tuvo como objetivos evaluar la producci3n de esporas de *F. oxysporum* f.sp. *sesami* sobre dos medios de cultivo, así como evaluar dos metodologías de inoculaci3n de este hongo sobre ajonjolí.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del hongo

El hongo se aisló partiendo de material enfermo con síntomas de marchitez presuntivamente causados por *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* colectado en siembras comerciales de ajonjolí con el

cultivar UCLA1 (Montilla y Terán, 1996) en el Municipio Esteller del estado Portuguesa, Venezuela. Secciones de tejido enfermo del cuello de la planta se sumergieron en etanol (80% v/v) durante 1 min y luego en agua destilada también por 1 min, para luego colocarlas en cajas Petri conteniendo medio agar agua. Sobre este medio se identificó el micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* de color blanco y tupido, corroborándose su identidad mediante la observaci3n al microscopio de los macroconidios (fusiformes, ligeramente curvadas y mayoritariamente de tres septos), microconidios (sin septos, elipsoidales a cilíndrica, curvadas), clamidosporas (tanto terminales como intercalares, de doble pared y circulares) y fiálides (cortas y no septadas), tal como lo establecen Nelson *et al.* (1983) para *F. oxysporum*. Luego se procedió a tomar una muestra de dicho micelio y se colocó en medio agar papa dextrosa (PDA, Merck, Darmstadt, Alemania), repitiendo esta operaci3n tantas veces como fuese necesario para obtener cultivos puros. A partir de este cultivo se obtuvo un cultivo monospórico para garantizar la identidad del aislamiento, siendo éste el cultivo de partida para la obtenci3n del inóculo requerido para el desarrollo de las metodologías a probar. De esta manera se obtuvieron dos aislamientos del hongo, llamados C3 (obtenido cerca de la localidad de Chorrerones, en las coordenadas 9°07'43,18"N y 69°01'45" O) y 13-2009 (obtenido cerca de la localidad de El Gateo, en las coordenadas 9°12'16" N y 68°46'38" O).

Producci3n de esporas

La producci3n de esporas se evaluó en los dos aislamientos obtenidos del hongo, y en dos medios de cultivo. Para esto se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con tres repeticiones. El diseño de tratamiento fue factorial, donde los factores principales fueron los medios de cultivo, los aislamientos del hongo y su interacci3n. La unidad experimental en este diseño fue una caja Petri conteniendo tanto el medio como el aislamiento. Los medios de cultivo evaluados fueron agar papa dextrosa (PDA) y SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar por sus siglas en alemán, 0,1% de K₂HPO₄, 0,1% NaNO₃, 0,05% MgSO₄ · 7H₂O, 0,05% KCl, 0,02% glucosa, 0,2% sacarosa y 2% de agar). En el centro de las cajas Petri, sobre el medio de cultivo ya solidificado, se colocaron dos piezas cuadradas de papel filtro (1cm x 1cm) previamente esterilizadas tal como sugiere Nirenberg (1990) para incrementar la esporulaci3n. Entre los trozos de papel se colocó 1 cm² de medio PDA conteniendo micelio proveniente

del borde en crecimiento activo de un cultivo anterior. A los quince días se agregaron 10 ml de agua destilada (esterilizada) en cada caja Petri, y se frotó la superficie con una varilla curvada de vidrio para que quedaran en suspensión las esporas. Se filtró la suspensión y se cuantificaron los macroconidios, microconidios y clamidosporas. Para registrar los valores observados de las esporas mencionadas, se promediaron dos observaciones independientes hechas en un hematocitómetro, específicamente una cámara de Neubauer, para cada unidad experimental. Cada observación en el hematocitómetro consistió en la cuantificación de las esporas en 48 cuadrados terciarios (0,25mm x 0,25mm) de la cámara. La evaluación de los resultados para la forma más eficiente de obtener esporas se logró mediante un análisis de varianza que consideró el medio de cultivo, el aislamiento y su interacción: esto se hizo para número de macroconidios, número de microconidios y número de clamidosporas

Metodologías de infección *in vitro*

El cultivar de ajonjolí utilizado para evaluar las metodologías de inoculación artificial fue UCLA295 (Laurentin *et al.*, 2004), línea experimental que ha sido probada en campo desde hace más de 5 años y que ha mostrado sintomatología de fusariosis en distintos grados, dependiendo de la localidad y el año de siembra. Las semillas utilizadas fueron previamente tratadas con un fungicida de contacto (Captan). La primera metodología consistió en colocar plántulas de ajonjolí en contacto con esporas de *F. oxysporum* f.sp. *sesami* en cajas Petri, y en la segunda las plántulas se pusieron en contacto con micelio y conidios del hongo mezcladas con un sustrato esterilizado en bandejas plásticas.

Evaluación de la infección *in vitro* mediante la aplicación de una suspensión de esporas

Se prepararon 4 cajas Petri esterilizadas en autoclave, se le colocó a cada una de ellas un disco de papel absorbente (también esterilizado) del mismo diámetro de la caja. Sobre él se colocaron diez semillas del genotipo de ajonjolí UCLA295 y se agregó agua destilada estéril para lograr su germinación. A los 11 días de colocadas las semillas (a los 7 días de haber germinado), se agregaron 5 ml de una suspensión de 1000 esporas ml⁻¹ en cada caja Petri. Como control se utilizaron 4 cajas Petri con las semillas de ajonjolí dispuestas de la misma forma como ya fue explicado, a las cuales no se agregaron

esporas, sólo 5 ml de agua destilada. Al cumplirse siete días de la inoculación, se determinó la incidencia de la enfermedad expresada en porcentaje, mediante la relación (Número de plantas enfermas / Número de plantas totales) x 100. Como indicadores de la severidad se usaron la longitud de las lesiones visibles y la altura de la plántula, así como el porcentaje en la longitud de la plántula ocupada por la lesión [(longitud de la lesión/longitud de la plántula) x 100] y los valores obtenidos se promediaron dentro de cada unidad experimental. La confiabilidad y/o reproducibilidad de la metodología fue determinada al comparar los valores de incidencia y severidad de los tratamientos con esporas, con los obtenidos en el tratamiento control.

Evaluación de la infección mediante el crecimiento de plántulas en sustrato mezclado con micelio y esporas del hongo

Se llenaron 4 bandejas de plástico transparente de 10 cm x 19 cm x 5 cm con un sustrato obtenido de la mezcla de tierra negra y arena (proporción 2:1) esterilizada durante una hora a 121°C y 15 libras de presión mediante autoclave (modelo H-Series, Systec, Alemania), mezclada con estructuras vegetativas y reproductivas de *F. oxysporum* f. sp. *sesami* desarrolladas durante 2 semanas de crecimiento. Como control se usaron 4 bandejas que se llenaron con el sustrato esterilizado, sin ser mezclado con el patógeno. En cada una de las bandejas se sembraron 10 semillas del cultivar UCLA295. A los 14 días de haberse efectuado la siembra, se registraron las mismas variables evaluadas en las metodologías anteriores.

Análisis estadístico de la evaluación de metodologías de inoculación

La comparación entre las dos metodologías se logró mediante un análisis de varianza de un diseño estadístico completamente al azar donde se consideraron cuatro tratamientos (las dos metodologías con sus respectivos controles) y cuatro repeticiones para cada una de las variables. Adicionalmente, se hicieron contrastes ortogonales para comparar los resultados obtenidos por cada metodología de inoculación con sus respectivos controles. Las fuentes de variación que resultaron con diferencias estadísticas (P<0,05) se sometieron a una prueba de medias de Tukey. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico Statistix for Windows v. 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSI3N

Los análisis de varianza identificaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) en la variable número de clamidosporas sólo para la fuente de variaci3n Medios de cultivo, en la cual el medio PDA permiti3 la formaci3n de $4,22 \text{ clamidosporas } (10 \mu\text{L})^{-1}$ mientras que SNA lo hizo solo para 1 clamidospora $(10 \mu\text{L})^{-1}$. En relaci3n al número de macroconidios hubo diferencias entre Aislamientos [$66 (10 \mu\text{L})^{-1}$ para 13-2009 y $26 (10 \mu\text{L})^{-1}$ para C-3] y Medio de cultivo [$77 (10 \mu\text{L})^{-1}$ para PDA y $15 (10 \mu\text{L})^{-1}$ para SNA]; y en la variable número de microconidios para la interacci3n Aislamiento x Medio de cultivo (Figura 1). Los resultados obtenidos permitieron visualizar que haya o no diferencias entre aislamientos, o que haya interacci3n, siempre el medio de cultivo PDA permiti3 una mayor producci3n de esporas que el medio SNA. Este resultado no concuerda con las consideraciones generales que existen sobre la producci3n de esporas en el género *Fusarium*. Nirenberg (1990) afirma que el medio para el cultivo, aislamiento y preservaci3n de *Fusarium* debe ser lo más bajo en nutrientes como sea posible, y que el papel filtro que se le añaede al medio SNA mejora la esporulaci3n y por lo tanto, puede ser utilizado para la producci3n masiva de conidios. Los resultados del presente trabajo indican que la esporulaci3n en *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* cuantificada luego de 15 días de crecimiento, no estaría relacionada con un bajo nivel inicial de nutrientes en el medio de cultivo. Esta hipótesis fue corroborada por Nirenberg (1990) al comparar medio SNA con medio agar hojas de clavel, pero no es cierta al comparar medio PDA con medio SNA.

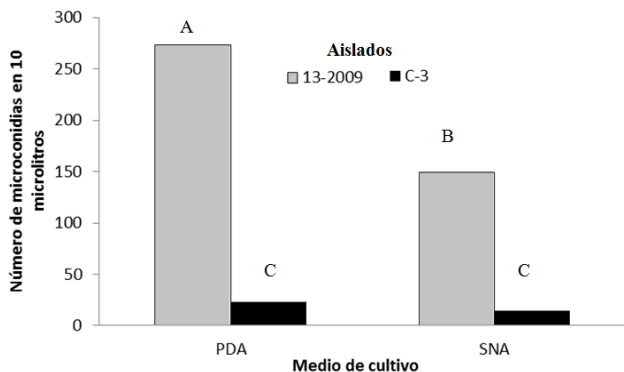


Figura 1. Influencia de dos medios de cultivos y diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *sesami*, en el número de microconidios. PDA: agar papa dextrosa y SNA: Spezieller Nährstoffarmer Agar. Las columnas identificadas con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de separaci3n de medias de Tukey ($P < 0,05$).

En cuanto a las metodologías de inoculaci3n, los contrastes ortogonales mostraron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre ambas metodologías y sus respectivos controles, para todas las variables a excepci3n de altura de planta, lo cual indica que la presencia de la enfermedad no afecta el crecimiento de la plántula en longitud en el caso del ajonjolí, resultado que contrast3 con el obtenido por Gabriel (1977) quien report3 disminuci3n de la longitud de plántulas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* de una forma muy similar a la primera metodología empleada en el presente trabajo. La Figura 2 muestra un 100% de incidencia de la enfermedad en las plantas inoculadas con la primera metodología, resultando sanas la totalidad de las plantas no inoculadas, lo cual evidencia la eficacia del método. En la misma figura se observa que la segunda metodología también permiti3 que se manifestara la enfermedad en la mitad de la poblaci3n evaluada. La Figura 3 muestra la severidad de la enfermedad, visualizándose una tendencia muy parecida a la de incidencia. Las plantas que mostraron los síntomas de la enfermedad en la primera metodología tuvieron un 91% de su longitud ocupada por la lesi3n causada por *F. oxysporum* f.sp. *sesami*, mientras que aquellas en la misma condici3n pero registradas en la segunda metodología tuvieron un 68% de su longitud ocupada por la lesi3n.

Las dos metodologías evaluadas fueron efectivas en causar la enfermedad, sin embargo, la diferencia que se da entre ambas, fundamentalmente en la incidencia, lleva a considerar que en la primera metodología evaluada la presi3n de inóculo fue muy grande, y por tal raz3n no hubo oportunidad para que

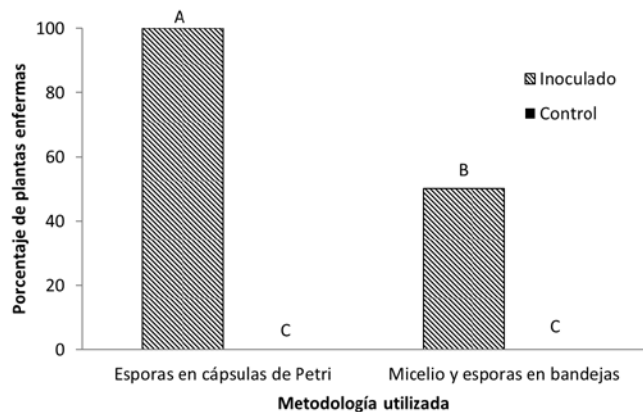


Figura 2. Porcentaje de plantas enfermas al inocular *F. oxysporum* f.sp. *sesami* sobre ajonjolí mediante dos metodologías. Las columnas identificadas con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de medias de Tukey ($P < 0,05$).

las plántulas activaran o utilizaran algún mecanismo de resistencia. La segunda metodología pareciera más apropiada para la evaluación de germoplasma de ajonjolí en relación a su respuesta frente a *F. oxysporum* f.sp. *sesami*, puesto que es más parecido a lo que sucede en el campo ya que se están dando las interacciones que puedan existir en el sistema planta-hongo-suelo.

Con los resultados obtenidos se propone la segunda metodología utilizada para ser aplicada como rutina en los programas de mejoramiento genético de ajonjolí que busquen la obtención de cultivares con mecanismos de resistencia hacia el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami*

LITERATURA CITADA

Ammar, S., M. El-Shazly, M. El-Ashry, M. El-Bramawy. 2004. Inheritance of resistance to Fusarium wilt disease in some sesame hybrids. Egyptian Journal of Applied Science 19:36-55

Confederación Nacional de Asociaciones de Productores Agropecuarios (FEDEAGRO). 2012. Estadísticas agrícolas. Producción agropecuaria. Disponible en: <http://www.fedeagro.org>

Dhingra, O. y J.Sinclair. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Impresa Universitaria. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil.

El-Shazly, M., O. A. Wahid, M. A. El-Ashry, S. M. Ammar, M. A. El-Bramawy. 1999. Evaluation of

resistance to *Fusarium* wilt disease in sesame germplasm. International Journal of Pest Management 45:207-210

El-Bramawy y A. Wahid. 2007. Identification of genetic resources for resistance to Fusarium wilt, charcoal root rot and Rhizoctonia root rot among sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm. African Crop Science Conference Proceedings 8:1893-1900

El-Bramawy, M. y A. Al-Wahid. 2009. Evaluation of resistance of selected sesame (*Sesamum indicum*) genotypes to Fusarium wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami*. Tunisian Journal of Plant Protection 4:29-39

Gabriel M. 1977. Estimación de la agresividad de diferentes aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Schlecht) sn. et h. *Mycopathologia* 62 (1): 61-64

Laurentin H, D. Montilla y V. García. 2004. Relación entre el rendimiento de ocho genotipos de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) y sus componentes. Comparación de metodologías. Bioagro 16:153-162

Montilla, D. y H. Teran. 1996. UCLA1, una nueva variedad de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). Bioagro 8:26-29

Nelson, P., T. Toussoun y W. Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press. Estados Unidos. 226 pp.

Niks, R., P. Ellis y J. Parlevliet. 1993. Resistance to parasites. In: Hayward, M., N. Bosemark y I. Romagosa (eds.). Plant breeding: principles and prospects. Chapman & Hall. Londres.

Nirenberg, H. 1990. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. Stud. Mycol. 32:91-101

Oku, H. 1994. Plant pathogenesis and disease control. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, Estados Unidos.

Pineda, J. 2002. Enfermedades en el cultivo del ajonjolí. In: ASOPORTUGUESA, UCLA, INIA (eds.). II Curso de Producción de Ajonjolí y Soya. Araure, estado Portuguesa, Venezuela

Pineda, J. y J. Ávila. 1988. Alternativas para el control de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* patógenos del ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). Agronomía Tropical 38(4-6):79-84

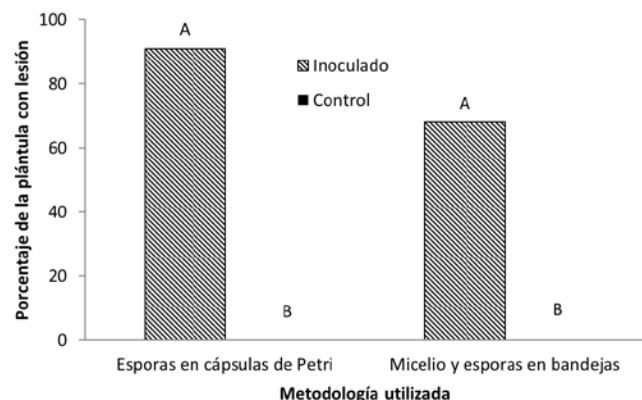


Figura 3. Porcentaje de la longitud de la plántula ocupado por la lesión causada por *F. oxysporum* f.sp. *sesami* al inocularlo sobre ajonjolí mediante dos metodologías. Las columnas identificadas con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de medias de Tukey ($P < 0,05$).