

CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *FUSARIUM* EN EL CULTIVO DEL GARBANZO (*CICER ARIETINUM*) EN LAS PROVINCIAS CIUDAD HABANA Y LA HABANA”.

Characterization of *Fusarium* genus in chick-pea crops in Havana city and Havana.

J. Miguel Dueñas García; Tomas Shagarodsky; José A. Fresneda; Yakein Hernández Fundora y Jesús González.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
EMail: duenasm@inifat.co.cu

RESUMEN

La Fusariosis del Garbazo (*Cicer arietinum*) constituye una de las limitantes productiva a nivel mundial. Las especies del género *Fusarium* desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible. En Cuba la identidad de dichas especies no estaba establecida, por tal motivo nos propusimos identificar los agentes causales para las provincias Ciudad Habana y La Habana. Para lograr tal objetivo se realizaron inspecciones fitosanitaria a varias localidades cultivadas de estas provincias. Después de cumplimentados disímiles procedimientos, técnicas y metodologías fitosanitarias se estableció a *Fusarium oxysporun* y *Fusarium solani* como responsables sintomáticos. Correspondió el 71.43% de las cepas analizadas a *Fusarium oxysporun* y 28.57% a *Fusarium solani*. Además se demostró que dichos agentes causales se encuentran ampliamente distribuidos, al encontrarse cepas de ambas especies entre los diez aislados analizados por localidad.

Palabras claves: *Fusarium*; *Fusarium oxysporun*; *Fusarium solani*

ABSTRACT

Chick-pea's Fusariosis (*Cicer arietinum*) is one of the limited productions in the world. Species of *Fusarium* genus develop in the host some affection and those affections are generally irreversible. Here in Cuba, the identity of these species were not established, that's why finding the causal agent of those damages here in Havana city and Havana province it's our main purpose. To achieve this goal, we made a lot of **fitosanitarias** visits to different cultivated places in those provinces. After finding the different procedures, techniques and **fitosanitarias** methodology, we established a *Fusarium oxysporun* and *Fusarium solani* as an symptomatic responsible. A 71.43 % of the analysed stumps are in correspondence with *Fusarium oxysporun* and a 28.57 % with *Fusarium solani*. Beside, it has been demonstrated that those causal agents are widely spread when stumps of both species were located among ten isolated species per places.

Key words: *Fusarium*; *Fusarium oxysporun*; *Fusarium solani*

INTRODUCCIÓN

El garbanza (*Cicer arietinum*) es una de las principales leguminosas de granos alimenticios cultivadas en el mundo. Su producción abarca típicamente áreas de los subtropicos áridos (Ustimenko, 1982), aunque en los últimos años el área cultivada se

a extendido hasta zonas tropicales, gracias a la obtención de nuevas variedades con mayor plasticidad ecológica.

En los últimos 10 años Cuba ha realizado esfuerzos por introducir el cultivo del garbanzo (Shagarodsky **et al.**, 2001). La superficie cultivada en nuestro país sólo comprende hasta el momento áreas experimentales y pequeñas áreas de campesinos privados. Aunque en las Tunas hubo record de producción estatal en la campaña 2001-2002, (Puig y Mastrapa, 2003).

La producción mundial del garbanzo encuentra restricción no sólo en los factores abióticos, sino también en los factores bióticos. En este sentido uno de los principales agentes limitante lo constituyen las especies del género **Fusarium**; sus daños desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas considerables.

Las especies causantes de la *Fusariosis* en el cultivo del garbanzo en Cuba no han sido identificadas; por tal motivo en el presente trabajo nos propusimos establecer la identidad de dichos agentes causales para las provincias Ciudad Habana y La Habana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las inspecciones fitosanitarias se realizaron a áreas agrícolas y experimentales de las provincias Ciudad Habana y La Habana, durante la campaña 2001-2002

En C. Habana se reconocieron áreas experimentales del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humbolt" (INIFAT), con una superficie de 1ha., suelo ferralítico rojo y riego por aspersión: También se visitaron extensiones agrícolas del IIMA (Instituto de Investigación en Mecanización Agrícola), Campos 2, Campo 4, Campo 8, Campo 11 y Campo 13, con una superficie total de 6.32 ha., suelo ferralítico rojo y bajo régimen de riego por aspersión.

Las áreas recorridas en la provincia La Habana fueron a los Municipios de Güira de Melena y Quivican. En Güira de Melena las prospecciones fitosanitarias fueron a la CPA "Niceto Pérez" con un área agrícola cultivada de 22 ha. Se visitó la finca "San Rafael" con una superficie sembrada de 8.05 hectáreas, riego por surco y suelo ferralítico rojo. Además de visitó en la UBPC "Etiopía 5" la extensión sembrada en suelo ferralítico rojo y bajo riego por aspersión fue de 1,2 caballerías (16 hectáreas).

Correspondiente al Municipio Quivican se reconocieron la CPA "Pedro Rodríguez Santana" con un área cultivada de 49,5 ha total, riego por aspersión y suelo ferralítico rojo y la finca "Caparosa" con una superficie de 7 ha aproximadamente, suelo ferralítico rojo y riego por aniego.

Las prospecciones fitosanitarias se realizaron cada 15- 20 días después de germinada la semilla

El método de muestreo consistió en cruzar el campo diagonalmente; seleccionando unidades (plantas) al azar a intervalos. Los elementos de selección fueron:

- 1.-Plantas con amarillamiento
- 2.-Plantas marchitas.
- 3.-Plantas cloróticas.

En todos los casos se tuvo el cuidado de seleccionar la planta completa, para no afectar el sistema radical, la tierra adyacente fue removida con un cuchillo.

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de fitopatología de la Dirección de Protección de Planta del INIFAT. Procediendo con ellas del siguiente modo.

- Caracterización de los síntomas.

Las muestras se clasificaron según su sintomatología en:

1. Marchitez
2. Marchitez descendente
3. Marchitez ascendente

En el criterio clasificado como Marchitez se incluyeron aquellos estados avanzados de Marchitez descendente y ascendente que como tales no podían estar circunscritos en ellos.

- Procesamiento de las muestras.

Las raíces de las plantas fueron lavadas con agua corriente por unos minutos hasta que éstas quedaron limpias de tierra. Posteriormente se sumergieron en una solución al 2% de hipoclorito de sodio durante un minuto y se secaron con papel absorbente estéril, sin llegar a frotar (Martínez **et al.**, 1992 y Castaño **et al.**, 1997). Las muestras se colocaron en cámara húmeda, utilizando para ello bolsas de polietileno transparente. El período de incubación fue hasta observarse abundante desarrollo del hongo sobre la superficie de la muestra. La incubación estuvo condicionada a temperatura ambiente y luminosidad fluorescente blanca alternada (12h /día).

De las partes vegetativas del hongo que se encontraban en los tejidos de las plantas sintomáticas puestas en cámara humedad se hicieron preparaciones para su observación al microscopio y conformar una valoración preliminar genérica del agente causal, más afirmativamente.

Al tejido vegetal se le hicieron cortes transversales y longitudinales con el objetivo de delimitar hasta que punto los tejidos vasculares estaban afectados.

- Aislamiento del agente causal.

Los aislados primarios (10 por localidad, total 70) se obtuvieron sembrando en placa petri de 9cm. y sobre medio de cultivo PDA (agar de papa dextrosa) a pH= 5.5, pequeño fragmento de la estructura somáticas del hongo que creció sobre su hospedante durante el período de incubación. Las placas fueron colocadas a temperatura ambiente, con alternancia de luz (12 h/día), proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca suspendidos a 50 cm. sobre las placas.

El medio de cultivo fue preparado con los componentes y siguiendo los requerimientos señalado por Martínez **et al.** (1992) y Castaño (1994). Las placas petri utilizadas habían sido esterilizadas con anterioridad a 150°C, durante 2 horas.

Después de obtenidos los cultivos puros como resultados de la sucesiva transferencia de estructuras somáticas a placa petri con medio PDA se pasaron a tubos con igual medio para su conservación. Los tubos fueron colocados en refrigeración $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

- Identificación.

Teniendo en cuenta los criterios conclusivos de muchos autores (Gerlach y Nirenberg (1982); Singh **et al.** (1991); Nelson **et al.** (1993); López (2004) y López y López, (2004)) sobre las peculiaridades de las especies del género *Fusarium* sobre diferentes medios de cultivos, se seleccionaron los medio PDA, CLA (agar hojas de clavel) y Agar papa con papel de filtro, para la caracterización cultural y morfológica de las especies aisladas.

Los medios utilizados se prepararon según las descripciones señaladas por López (2004). Las hojas de Clavel para el medio CLA fueron desinfectadas con etileno.

Las placas de 9 cm. de diámetro con los medios de cultivo fueron sembradas transfiriendo asépticamente una pequeña fracción de la estructura vegetativa de los aislados. Se dispusieron 3 placas por aislado, las que fueron incubadas a temperatura ambiente en alternancia de luz blanca fluorescente 12h/ días.

La identidad de los aislados fue establecida teniendo en cuenta el tipo de pigmento que difundió en medio PDA, así como su hábito de crecimiento. Para la caracterización de los parámetros morfológicos (esporodoquios, clamidospora, forma y tamaño de los conidios) se tuvieron presente los rasgos propios del aislado en los medio CLA y Agar papa con papel de filtro.

Se utilizo la clave detallada por López (2004) para las especies fitopatógenas del género *Fusarium*. Asimismo se tuvieron en cuentas los rasgos somáticos y reproductivos distinguidos por los autores Gerlach y Nirenberg (1982); Nelson **et al.** (1983); Singh **et al.** (1991); Mathur y Kongsdal (2003).

RESULTADO Y DISCUSIÓN

De los aislados estudiados cincuenta de las cepas se clasificaron como *Fusarium oxysporum*. Los mismos se caracterizaron por una gran variabilidad morfológica en medio PDA. Las colonias presentan un crecimiento rápido 50-90 mm de diámetro a la semana, a temperatura ambiente 25-28°C (invierno) $\pm 2^{\circ}\text{C}$ y alternancia de luz blanca fluorescente (12h/días).

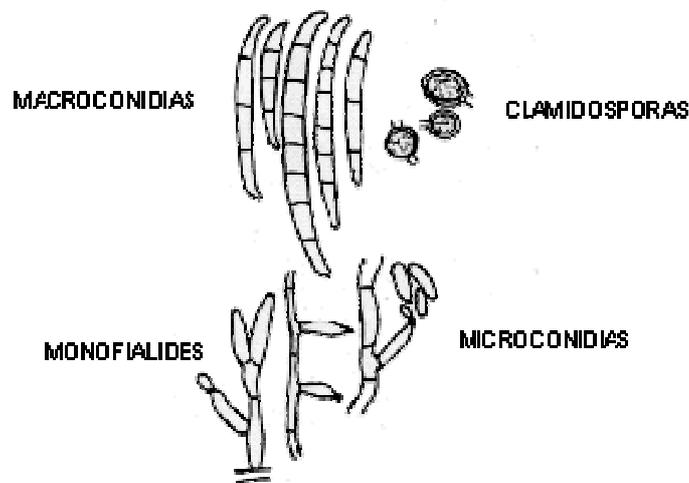
Al principio la colonia es lisa, algo algodonosa, tornándose posteriormente un poco lanosa. Al dorso de la placa petri la colonia es blanca o salmón pálido, con su centro de color púrpura, algunos aislados se mostraron azul oscuro. Su reverso es púrpura o azul grisáceo- verdoso.

Microscópicamente estos aislados presentaron microconidios abundantes, hialinos, ovalados, elípticos y ocasionalmente reniformes; con uno o dos septos, que midieron 4-5 x 2-4 μm . Los microconidios forman falsas cabezas.

Los macroconidios hialinos de pared delgada, son apenas curvos (falcada) o casi rectos, puntiagudos en ambos extremos, célula basal en forma de pie. Presentan de 3-5 septos y miden de 20-59.5 x 2-6 μm .

Se caracterizaron además por presentar abundantes clamidosporas esféricas, grandes, hialinas; con paredes lisas o rugosas. Pudiendo observarse individualmente o en pares, a intervalos, a lo largo de las hifas o en ramificaciones laterales cortas.

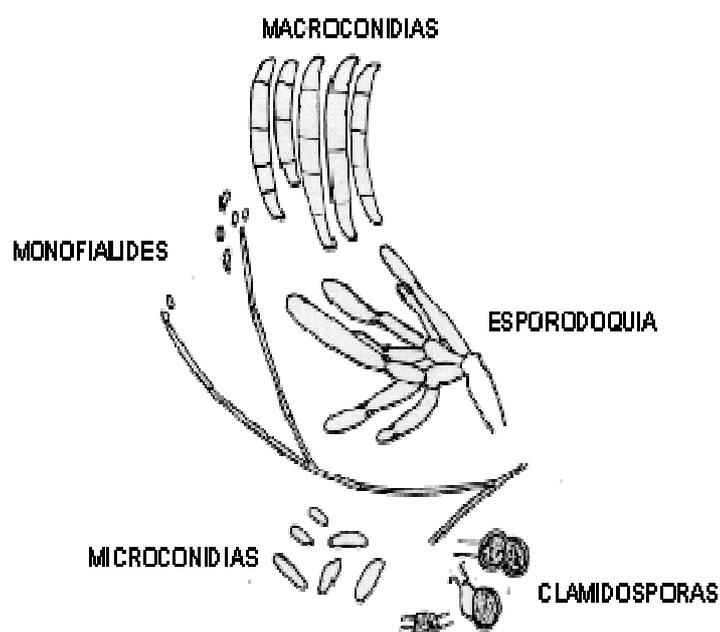
Figura. 1. Características microscópicas de *Fusarium oxysporum*



El resto de los aislados cultivados correspondieron a *Fusarium solani* (20 cepas). Sus colonias crecen rápido en PDA, 70-85mm de diámetro en una semana. Presentan un aspecto afelpado, algodonoso, de color blanco grisáceo a crema o acre. Produce pigmentos crema a tono café, ocasionalmente con manchas verdes o azuladas.

En estas cepas los microconidios se presentan abundantes, hialinos, ovoides, con 0-1 septo y ocasionalmente 2. Nacen en monofialides largas, con collar característico, forma falsa cabeza, miden 8-16 x 3-5 μm . Macroconidios ligeramente curvos, con el plano ventral y dorsal paralelos en la mayor parte de su longitud, con 5 -6 septos, pudiendo presentar eventualmente 7, miden 23-67 x 4-6 μm , célula apical ligeramente curva y célula basal pedicelada. Los esporodocios presentes de color crema al principio, tornándose más tarde azul o azul verdoso.

Figura 2. Características microscópicas de *Fusarium solani*



Los parámetros culturales y morfológicos que permitieron establecer a través de la clave de López (2004) la identidad de las especies causante de la *fusariosis* en el Garbanzo en las provincias C. Habana y La Habana coinciden con los descritos por los autores Gerlach y Nirenberg (1982); Nelson *et al.* (1983); Singh *et al.* (1991); Mathur y Kongsdal (2003).

Las especies *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* se encuentran presente en todas las localidades inspeccionadas, al encontrarse cepas de ambas especies en los diez aislados analizados por región. Los aislados de *Fusarium oxysporum* constituyeron el 71.43% del total de cepas aisladas; mientras que 28.57% restante fueron de *Fusarium solani*. (Tabla 1).

Tabla1.-“Cantidad de aislados de *F. oxysporum* y *F. solani* por localidad”

Localidad	Especie		Total
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	
INIFAT	9	4	
IIMA	6	1	
CPA “Niceto Pérez”	7	3	
Finca “San Rafael”	6	4	
UBPC Etiopia 5	6	4	
CPA “Pedro Rodríguez Santana	7	2	
Finca “Caparosa”	9	1	
	50	20	70
	71.43%	28.57%	

La sintomatología causada por *F. oxysporum* y *F. solani* corresponde con lo descrito por Gómez **et al.** (1998); quienes caracterizan una marchitez descendente para *F. solani* por la necrosis a los vasos conductores que conforman el floema y marchitez ascendente causada por *F. oxysporum*, debido al daño que produce al tejido xilemático.

Al realizar los cortes longitudinales a las muestras clasificadas como marchitez ascendente pudimos constatar que eventualmente tejidos afectados mostraban rasgos de coloración marrón.

García **et al.** (1987) en su estudio sobre los agentes causantes de enfermedades en el cultivo del Garbanzo hace referencia genérica a *Fusarium*. Pupo y Herrera (1998) consideran a *F. oxysporum* como hongo asociado a la semilla. Jiménez **et al.** (1997) al estudiar el comportamiento de 3 variedades frente a hongos del suelo concluye que las mayores afectaciones corresponden a las causadas por *Fusarium* sin referir especies.

CONCLUSIONES

- Se establece a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* como responsables sintomáticos.
- Dichos agentes causales se encuentran ampliamente distribuidos, al encontrarse cepas de ambas especies entre los diez aislados analizados por localidad.
- Constituye el primer reporte para la agricultura Cubana

REFERENCIAS

- Booth, C.: 1971.** "The genus *Fusarium*". Commonwealth Mycological Institute. Ken, England 273pp.
- Booth, C.: 1977** " *Fusarium* Laboratory Guide to the Identification of the major species" Commonwealth Mycological Institute. Kew. England 58pp.
- Castañeda, R. 2000.**: "Hyphomycetes de hortalizas en Cuba". Tesis Presentada en opción al título de Doctor en Ciencias Agrícolas. Ministerio de la Agricultura. INIFAT. 103 pp.
- García, J. L.; L. González y T. Shagarodsky: 1987** "Principales enfermedades del cultivo del Garbanzo y posibles medidas de control": En Resultados de la Investigaciones para el desarrollo presente y futuro del Garbanzo en Cuba (T. Shagardsky y otro Ed.) pp42-52. VIII forum de Ciencia Y Técnica. INIFAT-MINAG. La Habana,.
- Gerlach, W.; H.; Nirenberg 1982.**: "The genus *Fusarium* Pictorial Atlas" Mitt. Biol. Bundesanst. Ld. Forstw. Berlin-Dahlem 209:1-406,
- Jiménes, E.; T., Shagarodsky; C., Campodel y J. González, 1997:** "Comportamiento de 3 variedades de Garbanzo (*Cicer arietinum*, L.) frente a hongos del suelo en condiciones de Cultivo" XI Forum Ciencia y Técnica INIFAT,.
- López, D. 2003.** "Contribución al diagnóstico del género *Fusarium* Link en Cuba". Tesis presentada en opción al título académico de Master en Ciencia Agrícolas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ministerio de la Agricultura,
- López D. y M. O., López: 2004.** "Influencia del pH y de los medios de cultivo en la Expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del Género *Fusarium* en Cuba" Rev. Fitosanidad 8(3):7-11.

- Martínez, B.; E., Fonet y N., Bravo, 1992 :** "Técnicas Generales de Micología Vegetal" Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CNSA) folleto 15pp..
- Mathur, S. B. y O.; Kongsdal, 2003.:** "Common Laboratory seed Health Testing Methods for Detecting Fungi" Ed Asociación Internacional de Semilla 1^{ra} Ed. 246-252pp.
- Nelson, P.; T., Toussoun; W., Marassas, 1983.:** "Fusarium Species an Illustrated Manual for Identification, the Pennsylvania State University Park and london,
- Puig, Y. y L., Mastrapa: 2003** "Santuario del garbanzo"<http://www.periodico26.cu/temas/temasotros.htm3-7->.
- Pupo, E. Y I. Herrera, 1998.:** "Lista de hongos asociados a semillas" Boletín técnico INISAV 1^{ra} Ed N^o1. Febrero 15pp.
- Shagarodsky, T.; M. L.; Chiang e Y., López: 2001.** "Evaluación de Cultivares de Garbanzo (*Cicer arietinum*) en Cuba" Rev. Agronomía Mesoamericana 12(1):95-98.
- Singh, K.; J., Frisvad; J. V., Traen y S. B., Mathur, 1991.:** "An Illustrated Manual en Identification of some Seed- borne Aspergilli; Fusarium; Penicillia and their Mycotoxins". Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Demark 1^{ra} Ed, 72-80pp,
- Ustimenko, G. V, 1982.:**"El Cultivo de Plantas Tropicales y Subtropicales" 1^{ra} Ed Mir Moscú, 135pp,