

CARACTERIZACIÓN CULTURAL-MORFOMÉTRICA COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium* SPP., ASOCIADO A *Nicotiana tabacum* L.

Oandis Sosa-Sánchez¹, Mirella Romero-Bastidas², Juan José Silva-Pupo³, Ramiro Remigio Gaibor-Fernández⁴, Sergio Florentino Rodríguez-Rodríguez⁵, Wilson Geobel Ceiro-Catasú⁶*

Palabras clave: Especies fúngicas; pudrición basal del tallo; tabaco; taxonomía.

Keywords: Fungal species; basal stem rot; tobacco; taxonomy.

Recibido: 14/12/2020

Aceptado: 25/03/2021

RESUMEN

Introducción. *Nicotiana tabacum* L., es un cultivo de importancia económica como producto exportable en Cuba y sus plantaciones pueden ser afectadas significativamente por el fitopatógeno *Fusarium* spp. **Objetivo.** El objetivo fue caracterizar cultural y morfométricamente las especies de *Fusarium* asociadas a *N. tabacum*. **Materiales y métodos.** Se colectaron muestras de plantas con afectaciones vasculares, marchitamiento, clorosis y necrosis en tallos y hojas en áreas especializadas en la producción tabacalera en la provincia cubana de Granma. A partir de los tejidos vegetales analizados se obtuvieron 9 aislados en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), que se purificaron con cultivos monosporicos. Se utilizaron los medios PDA, Carnation Leafpiece Agar (CLA), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) y Agar Nutriente (AN) para la

ABSTRACT

Cultural-morphometric characterization as a tool for the identification of *Fusarium* spp., associated with *Nicotiana tabacum* L. **Introduction.** *Nicotiana tabacum* L., is a crop of economic importance as an exportable product in Cuba and its plantations can be significantly affected by the phytopathogen *Fusarium* spp. **Objective.** The objective was to characterize culturally and morphometrically the *Fusarium* species associated with *N. tabacum*. **Materials and methods.** Samples of plants with vascular affectations, wilting, chlorosis and necrosis in stems and leaves were collected in areas specialized in tobacco production in the Cuban province of Granma. From the analyzed plant tissues, 9 isolates were obtained in Potato Dextrose Agar (PDA) medium, which were purified by monosporic cultures. PDA,

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: wceiroc@udg.co.cu

1 Universidad de Granma, Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.

 0000-0002-8231-3822.

2 Universidad Autónoma de Baja California Sur, Departamento Académico de Agronomía, La Paz, B.C.S., México.

 0000-0002-1579-0194.

3 Universidad de Granma, Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.

 0000-0003-1049-5740.

4 Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Agronomía, Los Ríos, Ecuador.

 0000-0002-0981-2000.

5 Universidad de Granma, Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.

 0000-0003-2923-5092.

6 Universidad de Granma, Departamento Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.

 0000-0003-2065-2279.

caracterización cultural-morfométrica sobre la base de caracteres cualitativos y cuantitativos. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y el procesamiento estadístico se realizó mediante un ANOVA factorial y la prueba de Tukey, procesado con InfoStat 2008. **Resultados.** Los resultados confirmaron la existencia de 9 aislados de *Fusarium*, de ellos, 5 de *F. oxysporum* y 4 de *F. phyllophylum*. La caracterización combinada cultural-morfométrica demostró una mayor variabilidad de la pigmentación en medio PDA en ambas especies de *Fusarium* y evidenció diferenciación inter e intraespecífica en la formación de estructuras microscópicas, constatándose macroconidios con una talla de 8,17-33,35 x 1,45-6,30 μm en *F. oxysporum* y de 6,68-20,10 x 1,42-4,67 μm en *F. phyllophylum*. **Conclusiones.** Se caracterizan eficazmente por el método combinado cultural-morfométrico 9 aislados de *Fusarium* spp., (5 de *F. oxysporum* y 4 de *F. phyllophylum*) y se pone de manifiesto la selectividad de estas 2 especies por *N. tabacum*.

Carnation Leafpiece Agar (CLA), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) and Nutrient Agar (AN) media were used for cultural-morphometric characterization on the basis of qualitative and quantitative traits. A completely randomized design was used and statistical processing was performed using factorial ANOVA and Tukey's test, processed with InfoStat 2008. **Results.** The results confirmed the existence of 9 isolates of *Fusarium*, of them, 5 of *F. oxysporum* and 4 of *F. phyllophylum*. The combined cultural-morphometric characterization demonstrated greater variability of pigmentation in PDA medium in both *Fusarium* species and evidenced inter and intraspecific differentiation in the formation of microscopic structures, verifying macroconidia with a size of 8.17-33.35 x 1.45-6.30 μm in *F. oxysporum* and 6.68-20.10 x 1.42-4.67 μm in *F. phyllophylum*. **Conclusions.** Nine *Fusarium* spp. Isolates (5 from *F. oxysporum* and 4 from *F. phyllophylum*) are efficiently characterized by the combined cultural-morphometric method and the selectivity of these 2 species for *N. tabacum* is demonstrated.

INTRODUCCIÓN

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es una de las plantas comerciales no comestibles que ocupa mayor área de siembra en la agricultura mundial y es uno de los pocos cultivos agroindustriales que se comercializa completamente en forma de hojas (Calero-Hurtado *et al.* 2019). En Cuba la producción de *N. tabacum* se realiza principalmente al sol y empalado, del cual se obtiene el puro cubano que posee una excelente calidad y un alto costo en el mercado internacional (Toledo *et al.* 2016).

En Cuba se plantan anualmente aproximadamente 15 868 ha, con un rendimiento promedio de 3,89 t.ha⁻¹, mientras que, en la provincia Granma solamente se obtienen 1,0 t.ha⁻¹. Este

bajo rendimiento puede ser atribuido a las afectaciones del fitopatógeno *Fusarium* spp. (Barceló y Mustelier 2019). Esta especie fúngica se conoce mundialmente por causar la enfermedad denominada marchitez vascular y es capaz de ocasionar la pudrición basal del tallo en tabaco. Tanto en semilleros como en campo abierto, causa daños en el sistema radical, que afecta directamente los procesos de absorción de agua y nutrientes e influye negativamente sobre el rendimiento y calidad del cultivo (Retana *et al.* 2018).

La identificación de *Fusarium* spp., es compleja y requiere de mucho tiempo, recursos humanos y materiales. La caracterización cultural posibilita el desarrollo de microorganismos en un medio de cultivo in vitro y con ello, los aspectos cualitativos relacionados con la forma,

tamaño, textura, coloración, esporulación, entre otros, mientras que la morfométrica permite dilucidar las estructuras de interés taxonómico para determinar elementos relacionados con su talla. Por tanto, la combinación de estas formas de caracterización propone una efectiva identificación de especies fúngicas con claves ilustradas, sin recurrir a las técnicas moleculares que requieren mayor cantidad de recursos materiales y financieros, inaccesibles para muchos países pobres y en vías de desarrollo (Leslie y Sumrell 2008, Castro López *et al.* 2018).

Conocer las principales características de las especies de *Fusarium* que afectan a *N. tabacum* en agroecosistemas tabacaleros de la provincia Granma, resultará de gran interés científico para los programas de mejora de esta planta y para el establecimiento de alternativas de manejo del fitopatógeno en etapa de semillero y en campo. Según lo anterior, el objetivo de esta investigación fue caracterizar

cultural-morfométricamente las especies de *Fusarium* asociadas a *N. tabacum* cultivado en la provincia Granma, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo. Se muestrearon áreas especializadas en la producción de *N. tabacum* a campo abierto en la provincia Granma (Tabla 1). Las plantaciones tenían edades entre 20-40 días después del trasplante. Los campos se muestrearon en forma diagonal, se colectaron plantas enteras con daños evidentes de pudrición basal del tallo, con síntomas de clorosis y marchitez del follaje (González *et al.* 2005). Las muestras obtenidas se introdujeron en bolsas de nylon y se trasladaron inmediatamente al Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Cuba, para su procesamiento y caracterización.

Tabla 1. Lugar de procedencia de las muestras. Cuba.

Municipio	Localidad	Coordenadas	
		Norte	Oeste
Buey Arriba	Bueycito	20°14'20.5	76°46'28.8
	Corojito	20°11'05.2	76°43'21.7
Guisa	Monjará	20°17'51.9	76°36'08.7
Bayamo	El Dorado	20°15'52.3	76°44'43.8
Jiguaní	Santa Rita	20°20'11.9	76°29'24.1
Yara	Los Cayos	20°18'20.2	76°50'00.6

Procesamiento en laboratorio. Cada muestra se cortó en fragmentos de 1 cm y se desinfectó con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,0% durante 3 minutos; luego se lavaron con detergente comercial y finalmente se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada.

Seguidamente se establecieron cámaras húmedas en placas Petri ($\varnothing = 90$ mm) con papel de filtro esterilizado y humedecido. Se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y se observaron diariamente hasta la aparición de estructuras fúngicas durante 168 h. Luego se verificó la presencia de *Fusarium* spp.,

al microscopio óptico (Novel, modelo N200M, China) y con ayuda de un asa de siembra se recogieron fragmentos de micelio que fueron sembrados en placas Petri ($\varnothing = 90$ mm) en medio PDA: 39 g.L⁻¹ BioCen, esterilizado a 121°C durante 15 min y pH = 6) más cloranfenicol (0,01 g.L⁻¹), incubándose a 28±2°C en oscuridad hasta lograr el crecimiento de las colonias.

Las colonias crecidas en las placas se cubrieron con 10 mL de agua destilada estéril y se homogenizaron en un agitador Vortex por 30 s. Con un asa bacteriológica desinfectada, se tomó una asada de la suspensión y se depositó en el centro de las placas ($\varnothing = 90$ mm) que contenía 5 mL de medio de cultivo Agar agua (2%) para dispersarla con una varilla L de vidrio. Todas las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28±2°C y oscuridad durante 24 h. Luego, bajo microscopio óptico (20x) se detectaron y señalaron conidios solitarios germinados. Seguidamente con una aguja de siembra flameada se transfirió el fragmento de agar que contenía el conidio germinado a una placa Petri con medio de cultivo PDA más cloranfenicol. Las placas se sellaron con parafilm e incubaron a 28±2°C durante 7 días. Una vez que se lograron los cultivos puros monospóricos se conservaron a 4°C. Posteriormente, se comprobaron los postulados de Koch (Duarte *et al.* 2016).

Caracterización cultural-morfométrica de aislados de *Fusarium spp.* Se realizó sobre la base de caracteres cualitativos y cuantitativos, expresados por los aislados sobre los medios de cultivo PDA, Carnation Leafpiece Agar (CLA se elaboró al verter en cada placa 15 ml de Agar agua estéril; seguidamente se depositaron 7 fragmentos de hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) de 3-5 mm² previamente esterilizadas y pH ajustado a 6), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA: 1g de KH₂PO₄, 1g de KNO₃, 0,5 de MgSO₄·7H₂O, 0,5 de KCl, 0,2 de glucosa, 0,2 de sacarosa, 20g de Agar, esterilizado a 121°C durante 15 min y pH ajustado a 6) y agar nutriente (AN: 28 g.L⁻¹ BioCen, esterilizado a 121°C durante 15 min y pH ajustado a 6). Se emplearon placas Petri ($\varnothing = 90$ mm) que contenían 20 mL

de cada medio de cultivo independientemente. Las mismas se inocularon, central e individualmente, con un disco de micelio ($\varnothing = 5$ mm) de cada aislado, proveniente de la periferia de colonias crecidas sobre PDA durante 7 días. Las placas, 4 por aislado (réplicas), se sellaron con parafilm e incubaron (28±2°C y oscuridad). Las evaluaciones se realizaron cada 24 h hasta las 168 h. La coloración de la colonia en el anverso y reverso se determinó por observación visual y se documentó mediante fotografías con una cámara digital. También se describió la textura superficial, forma de los bordes, presencia de anillos en el anverso, formación de sectores y concentración de esporas. Se midió el diámetro de la colonia con una métrica graduada. A partir del diámetro de la colonia se calculó la velocidad media de crecimiento al séptimo día de incubación, mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$V \text{ crec} = DC/T$$

Donde

V crec = velocidad de crecimiento del aislado (mm.h⁻¹)

DC = diámetro de las colonias (mm)

T = tiempo transcurrido (h)

El conteo de las esporas se realizó a los 7 días del crecimiento de las colonias de cada aislado y en cada medio. A las placas con los aislados crecidos se le adicionó 10 mL de agua destilada estéril y se homogeneizaron con una varilla L de vidrio. La suspensión de esporas se colectó en un tubo de ensayo con una capacidad de 20 mL. A partir de estas, se prepararon diluciones hasta 10⁻². Se usó un tubo capilar para extraer pequeñas porciones de la dilución y se depositó una gota en una cámara de Neubauer para determinar la concentración de los macroconidios con ayuda de un microscopio Novel a 40x.

Aspectos taxonómicos evaluados. Se preparó un microcultivo en porta objeto cavado con medio CLA, donde se depositó un fragmento

de 3-5 mm² de hoja de clavel esterilizado y sobre este se añadió una gota de medio agar agua (AA: 20 g.L⁻¹ BioCen, esterilizado a 121°C durante 15 min y pH ajustado a 6). Una vez solidificado el medio se inoculó cada aislado con ayuda de una aguja de siembra. Seguidamente se estableció el microcultivo en una cámara húmeda. Posteriormente, a las 24 h se visualizaron al microscopio óptico (40x) los macroconidios, células conidiógenas y microconidios (presencia y disposición). Se hicieron preparaciones microscópicas permanentes para observar la forma, el tamaño de los macroconidios y los septos, y se determinó la presencia y disposición de las clamidosporas. Se observó la pigmentación en todos los medios. En PDA se determinó la forma y la velocidad de crecimiento de las colonias, la formación de esporodoquios y el número de septos en los macroconidios; mientras que, en SNA se observó la presencia de clamidosporas y la forma de los micro y macroconidios. La caracterización hasta nivel de especie se efectuó con la clave taxonómica ilustrada (Leslie y Summerell 2008).

Diseño y procesamiento estadístico. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado

con arreglo bifactorial: Factor A (4 medios de cultivos) y factor B (9 aislados de *Fusarium* spp.) para un total de 36 interacciones o tratamientos y 4 réplicas. Se usó un ANOVA bifactorial y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0,05$). Previamente al ANOVA los valores de concentración de macroconidios fueron transformados por LOG (x+1), procesado con el programa estadístico InfoStat 2008.

RESULTADOS

Caracterización cultural de los aislados de *Fusarium* spp. Al analizar la pigmentación de los aislados de *Fusarium* spp., en el anverso de las placas en medio PDA se observó que variaron entre blanco y blanco cremoso, excepto el aislado F que presentó tonalidad violeta. En el reverso la coloración observada fue color crema y blanco. Todos los aislados presentaron colonias con bordes redondeados y regulares, con una textura afelpada y algodonosa. La formación de anillos se evidenció en los aislados C y G, mientras, que en el aislado H además de estos caracteres se notaron sectores (Figura 1).

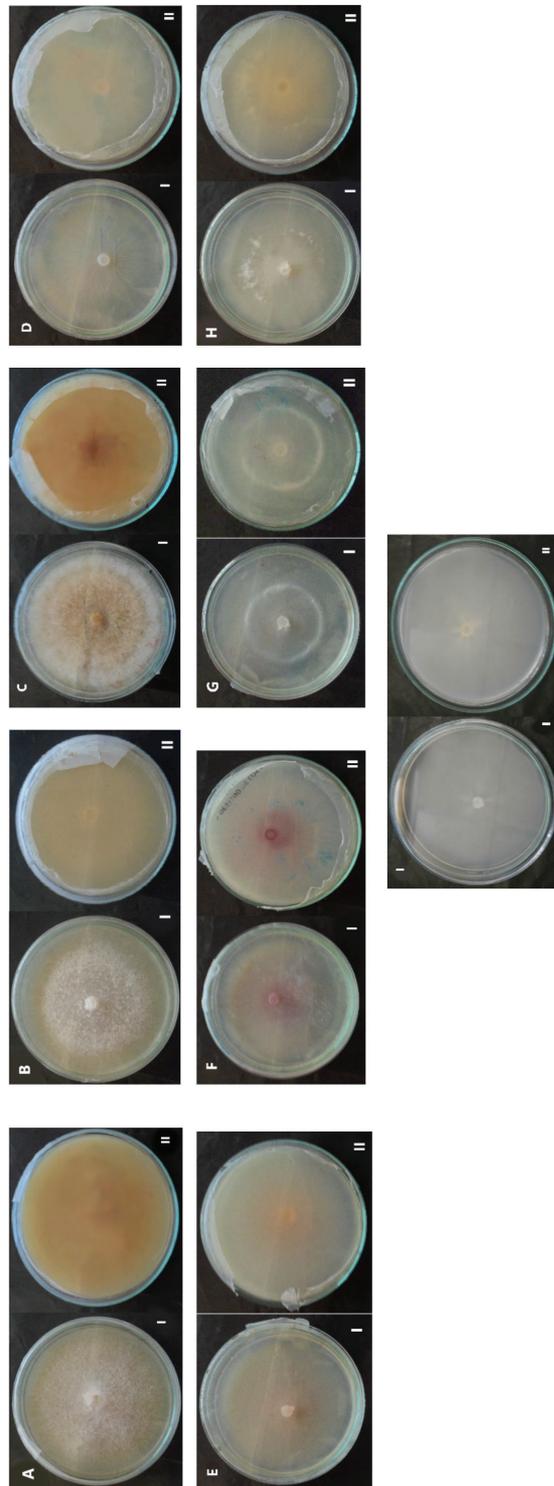


Figura 1. Características culturales de las colonias de 9 aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *N. tabacum* en medio PDA (I: anverso, II: reverso).

Por otra parte, en el medio SNA los aislados desarrollaron tonalidades de color blanco, excepto los aislados C y F que presentaron color blanco-amarillento. Los bordes fueron redondeados y regulares con una textura algodonosa. La formación de anillos se evidenció en los aislados

B, D y G. En AN y CLA no se observaron variaciones culturales significativas, debido a un crecimiento micelial escaso y poco pigmentado, excepto los aislados B y F que desarrollaron una textura algodonosa abundante con tonalidad blanca en AN (Figuras 2, 3, 4).

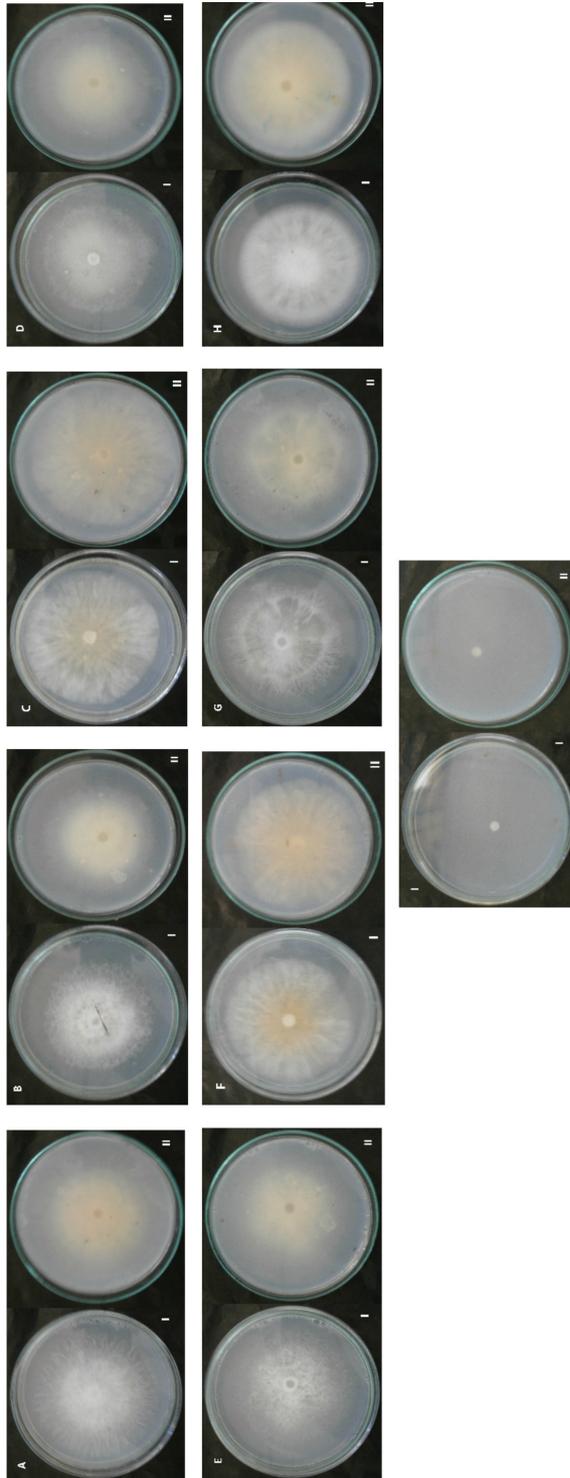


Figura 2. Características culturales de las colonias de 9 aislados de *Fusarium* spp., procedentes de *N. tabacum* en medio SNA (I: anverso, II: reverso).

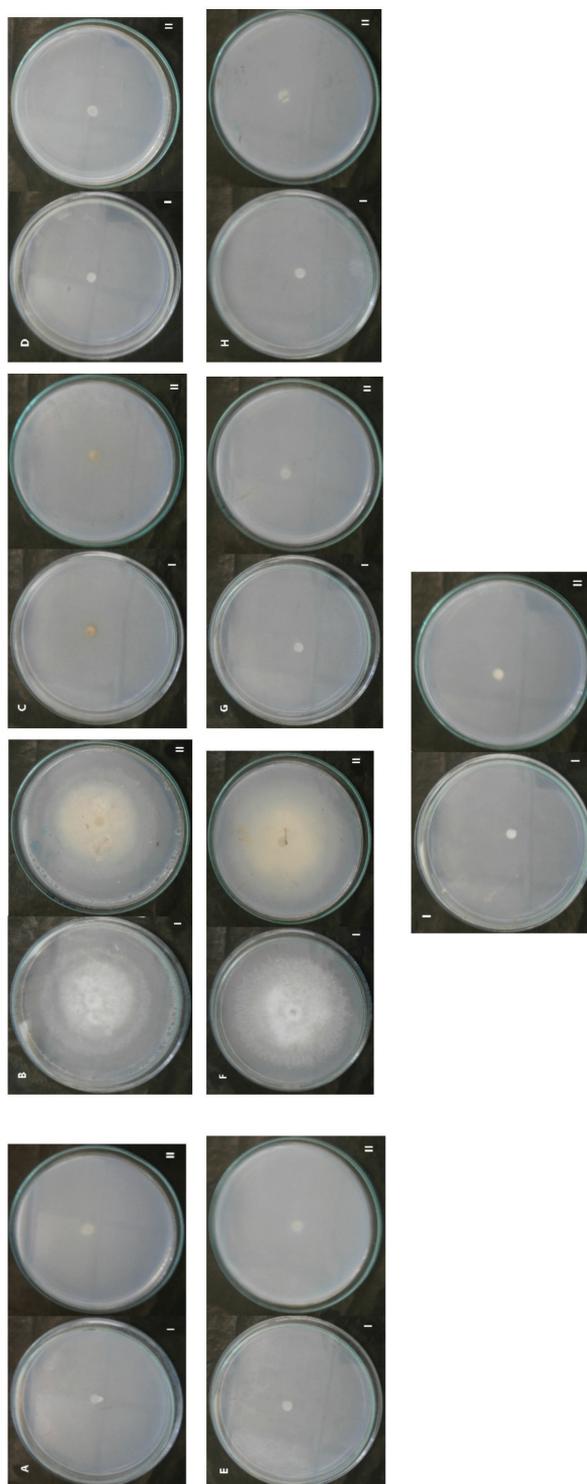


Figura 3. Características culturales de las colonias de 9 aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *N. tabacum* en medio AN (I: anverso, II: reverso).

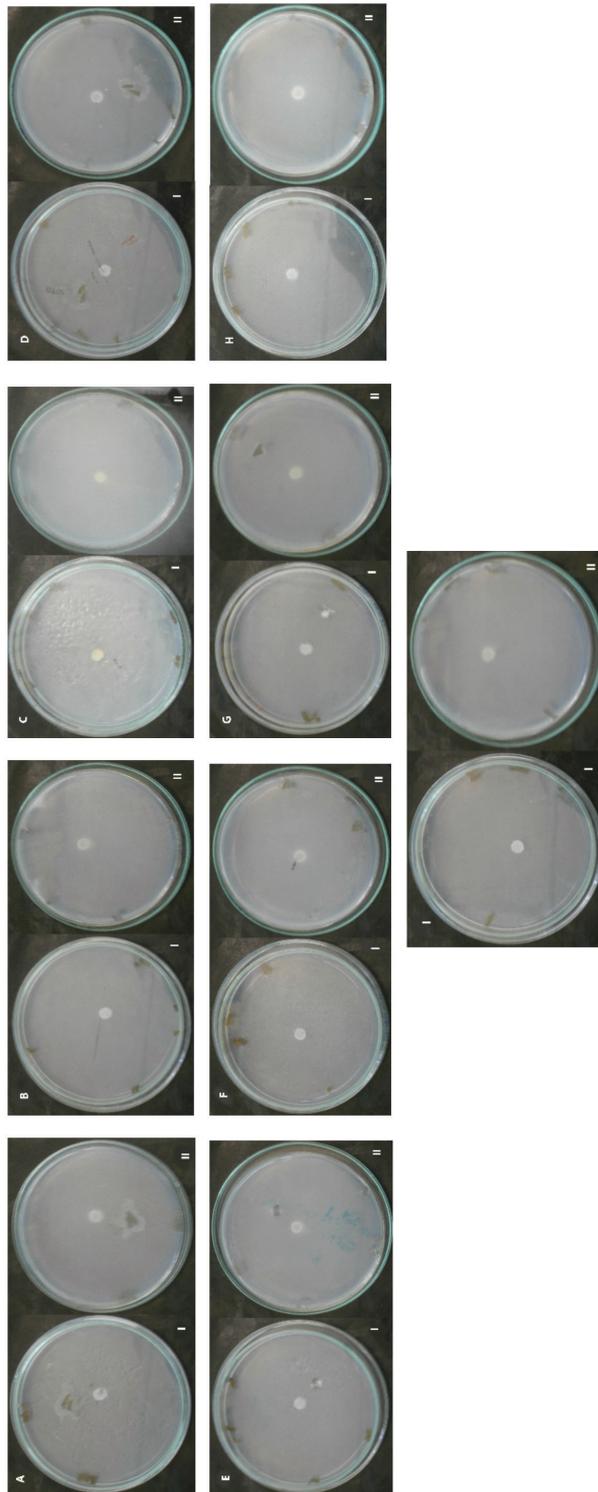


Figura 4. Características culturales de las colonias de 9 aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *N. tabacum* en medio CLA a los 7 días (I: anverso, II: reverso).

Finalmente, de esta parte, sobre la base de los resultados alcanzados se consideró al medio PDA como el más idóneo para la caracterización cultural de especies de *Fusarium* procedentes de *N. tabacum*, debido a una mayor variabilidad cultural y pigmentación.

Caracterización morfométrica de los aislados de *Fusarium* spp. Al analizar la velocidad media de crecimiento se constataron

diferencias (Tukey $p \leq 0,05$) entre aislados en los diferentes medios de cultivo evaluados. La mayor velocidad media se alcanzó en los medios CLA y PDA, mientras que la menor se obtuvo en los medios AN y SNA. Los aislados A, B, C y E mostraron una mayor velocidad media en PDA y CLA, respectivamente, así como el aislado F en CLA, mientras que registraron la menor velocidad media D, G y H en PDA y H e I en CLA (Tabla 2).

Tabla 2. Variabilidad de la velocidad media de crecimiento de los aislados de *Fusarium* spp. provenientes de *N. tabacum*.

Aislados	Velocidad media de crecimiento (mm.h ⁻¹)			
	PDA	SNA	CLA	AN
A	0,66 i	0,53 abcdefgh	0,60 fghi	0,52 abcdef
B	0,66 i	0,53 abcdefgh	0,60 fghi	0,52 abcdef
C	0,63 hi	0,53 abcdefgh	0,58 defghi	0,53 abcdefgh
D	0,53 abcdefgh	0,62 ghi	0,55 bcdefgh	0,51 abcdef
E	0,65 i	0,53 abcdefgh	0,62 ghi	0,50 abcde
F	0,55 bcdefgh	0,62 ghi	0,60 efghi	0,50 abcd
G	0,53 abcdefgh	0,58 cdefghi	0,55 bcdefgh	0,53 abcdefgh
H	0,45 a	0,53 abcdefgh	0,53 abcdefgh	0,44 a
I	0,53 abcdefgh	0,48 abc	0,53 abcdefg	0,47 ab
ES		0,01		

Medios de cultivos: PDA = Papa Dextrosa Agar, SNA = Spezieller Nährstoffarmer Agar, CLA = Agar Hojas de clavel, AN = Agar Nutriente, ES = Error Estándar. Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$).

Al analizar la concentración de macroconidios se observó diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$) entre aislados en los diferentes medios de cultivo evaluados. La mayor concentración de macroconidios por aislado

se cuantificó en los medios PDA y SNA, y la menor se obtuvo en CLA y AN. Los aislados A, B, C, D, E, F, G e I mostraron mayor esporulación en PDA, mientras que en SNA fueron B, C, D, E, F y H (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de macroconidios de los aislados de *Fusarium* spp. provenientes de *N. tabacum*.

Aislados	Concentración ($\times 10^6$ macroconidios.mm ⁻²)							
	PDA		SNA		CLA		AN	
	\bar{X}	Xt	\bar{X}	Xt	\bar{X}	Xt	\bar{X}	Xt
A	0,75	5,87 hijk	0,10	4,98 efghij	0,001	3,08 a	0,002	3,23 ab
B	1,03	6,01 ijk	1,60	6,20 jk	0,06	4,17 abcde	0,54	5,73 ghijk
C	0,91	5,96 hijk	2,38	6,38 k	0,01	3,96 abcde	0,01	3,79 abcde
D	1,19	6,08 ijk	0,78	5,89 hijk	0,01	4 abcde	0,01	4,00 abcde
E	0,34	5,51 fghijk	1,17	6,07 ijk	0,06	4,54 cdefg	0,004	3,60 abcd
F	1,19	6,08 ijk	0,89	5,55 fghijk	0,03	4,43 bcdef	1,10	6,04 ijk
G	0,89	5,95 hijk	0,06	4,76 defgh	0,16	4,14 abcde	0,003	3,28 abc
H	0,09	4,92 efghi	0,28	5,44 fghijk	0,28	4,08 abcde	0,01	4,11 abcde
I	0,31	5,49 fghijk	0,05	3,85 abcde	0,01	3,87 abcde	0,005	3,63 abcd
ES	0,04							

Medios de cultivos: PDA = Papa Dextrosa Agar, SNA = Spezieller Nährstoffarmer Agar, CLA = Agar Hojas de clavel, AN = Agar Nutriente, ES = Error Estándar.

\bar{X} valor promedio, Xt = valor transformado LOG(x+1). Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$).

El análisis cultural y morfométrico permitió la determinación de 5 especies de *F. oxysporum* (A, B, C, D, H) y 4 de *F. phyllophylum* (I, E, F, G) (Tabla 4). Todos los aislados de *F. oxysporum* presentaron esporodoquios, sin embargo, los aislados de *F. phyllophylum* no mostraron esta estructura, a excepción del aislado G. Los macroconidios *F. oxysporum* mostraron una longitud que osciló entre 8,17-33,35 μm , mientras que el ancho fluctuó entre 1,45-6,30 μm , con formas semicurva y recta a ligeramente semicurva. Se observaron células apicales con forma

curvada y ligeramente curvada, mientras que las células basales se mostraban ligeramente alargadas y alargadas en forma de pie, los macroconidios de esta especie presentaron 3 septos. Los macroconidios de *F. phyllophylum* registraron un largo que osciló entre 6,68-20,10 μm , mientras que, el ancho fluctuó entre 1,42-4,67 μm con formas semicurva y recta a ligeramente semicurva, se observaron células apicales redondeadas, las células basales mostraron forma ligeramente redondeada, los macroconidios presentaron de 1-3 septos (Figura 5).

Tabla 4. Especies de *Fusarium* asociadas a *N. tabacum* identificadas mediante caracteres culturales-morfométricos. Provincia Granma, Cuba.

Aislados	Especies	Macroconidios						
		Esporodoquio	Talla (µm)	Forma	Célula apical	Célula basal	Septo	
A		Presente	8,17-18,32 x 2,73-6,30	Semicurvo	Ligeramente curvada	Ligeramente alargada	3	
B	<i>Fusarium oxysporum</i>	Presente	19,64-33,35 x 2,20-4,63	Semicurvo	Curvada	Ligeramente alargada	3	
C	Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen	Presente	12,96-24,00 x 1,45-3,57	Semicurvo	Ligeramente curvada	Alargada en forma de pie	3	
D		Presente	18,29-28,26 x 2,08-5,51	Semicurvo	Ligeramente curvada	Ligeramente alargada	3	
H		Presente	8,87-22,15 x 1,82-4,53	Recto a ligeramente semicurvo	Ligeramente curvada	Ligeramente alargada	3	
I	<i>Fusarium phyllophilum</i>	Ausente	6,68-20,10 x 1,99-4,33	Recto a ligeramente semicurvo	Redondeada	Ligeramente redondeada	1	
E	Nirenberg & O'Donnell	Ausente	7,00-11,36 x 1,82-4,67	Semicurvo	Redondeada	Ligeramente redondeada	2	
F	(Sinónimo común <i>Fusarium proliferatum</i> var. minus)	Ausente	7,14-11,63 x 1,42-3,57	Semicurvo	Redondeada	Ligeramente redondeada	2	
G		Presente	6,91-15,49 x 2,82-4,67	Recto a ligeramente semicurvo	Redondeada	Ligeramente redondeada	1	

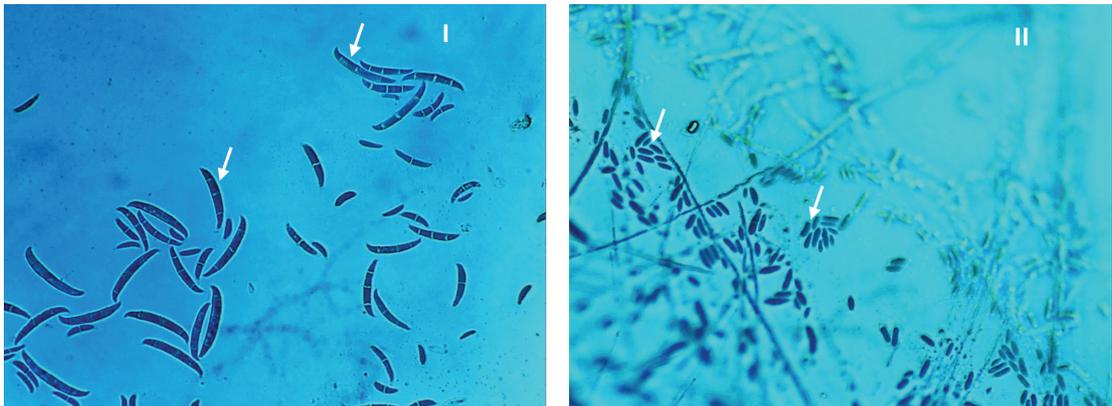


Figura 5. Forma de los macroconidios I (*F. oxysporum* aislado B) y II (*F. phyllophylum* aislado G) crecidos en medio CLA, observados a 40x.

Los microconidios de *F. oxysporum* y *F. phyllophylum* no presentaron septos. Estas estructuras en la especie *F. oxysporum* se mostraron de forma arrañonada, menos el aislado C que manifestó una apariencia oval, mientras que, en *F. phyllophylum* se exhibieron fusiformemente

(Tabla 5). Se observó la presencia de células conidiógenas monofiálides en todos los aislados de ambas especies. Las clamidosporas se observaron individualmente en los aislados de *F. oxysporum*. Ambas especies presentaron un micelio aéreo en falsas cabezas.

Tabla 5. Especies de *Fusarium* asociadas a *N. tabacum* identificadas por caracteres culturales-morfométricos. Provincia Granma, Cuba.

Aislado	Especie identificada	Microconidio				Otros caracteres morfológicos		
		Forma	Septo	Célula conidiógena	Clamidoporas	Micelio aéreo		
A		Arriñonada	0	Monofialídes	Individualmente	Falsas cabezas		
B		Arriñonada	0	Monofialídes	Individualmente	Falsas cabezas		
C	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen	Oval	0	Monofialídes	Individualmente	Falsas cabezas		
D		Arriñonada	0	Monofialídes	Individualmente	Falsas cabezas		
H		Arriñonada	0	Monofialídes	Individualmente	Falsas cabezas		
I		Fusiforme	0	Monofialídes	-	Falsas cabezas		
E	<i>Fusarium phyllophilum</i> Nirenberg & O'Donnell (Sinónimo común <i>Fusarium proliferatum</i> var. minus)	Fusiforme	0	Monofialídes	-	Falsas cabezas		
F		Fusiforme	0	Monofialídes	Individualmente	Falsas cabezas		
G		Fusiforme	0	Monofialídes	Individualmente	Falsas cabezas		

Los resultados obtenidos en esta investigación poseen importancia para el programa nacional de selección y mejoramiento de variedades de *N. tabacum* tolerantes a *Fusarium* spp., muestran una alta especificación de *F. oxysporum* y *F. phyllophylum* como especies fitopatógenas asociadas a *N. tabacum* y evidencian los riesgos potenciales de proliferación del fitopatógeno en agroecosistemas tabacaleros.

DISCUSIÓN

En el medio PDA no se observó gran variabilidad cultural, lo cual pudo ser atribuido a la poca biodiversidad de especies presentes. Al respecto Tapia y Amaro (2014) y Rentería-Martínez *et al.* (2019) expresaron que aislados de *Fusarium* spp., crecidos en PDA mostraron una amplia diversidad de coloraciones, entre ellas café, rojo, violeta, naranja, gris y blanco. Las personas autoras constatan que dicha variabilidad se debió a la alta biodiversidad de especies presentes y observadas durante la investigación. Se conoce que la pigmentación del micelio puede deberse a la disponibilidad de nutrientes y al pH del medio de cultivo. Por su parte, Quilambaqui (2005) y Duarte *et al.* (2016) informaron que especies de *Fusarium* mostraron coloraciones del micelio violeta, púrpura, violáceo, amarillento, blanquecino, rojo ladrillo y rosa salmón en medio PDA a un pH de 6, tal variabilidad no fue observada en el presente estudio.

Los medios SNA, CLA y AN poseen baja concentración de nutrientes y de péptidos, lo cual pudo incidir sobre la pigmentación y el desarrollo de los aislados. Al respecto, Hernández Amasifuen *et al.* (2019) y Almaraz-Sánchez *et al.* (2018) informaron que medios pobres en nutrientes influyeron sobre la coloración y la formación de estructuras fúngicas de *Fusarium* spp., lo expuesto coincidió con el resultado obtenido en la presente investigación, donde se puso de manifiesto una escasa coloración del micelio fúngico.

La máxima velocidad media de crecimiento observada, pone de manifiesto una asimilación diferencial de los nutrientes por los aislados en cada medio de cultivo y se relaciona con la capacidad de colonización de este hongo en suelos y sustratos. Los resultados coinciden con lo informado por Dueñas *et al.* (2007), quienes expresaron que los aislados de *Fusarium* spp., obtenidos de *Cicer arietinum* mostraron un rápido crecimiento en medio PDA. Más recientemente Duarte *et al.* (2016) expusieron que aislados de *Fusarium* spp. procedentes de *C. arietinum* alcanzaron la mayor velocidad de crecimiento $0,63 \text{ mm.h}^{-1}$ en medio Czapek Dox. En la presente investigación la mayor velocidad de crecimiento registrada por los aislados de *Fusarium* pudiera relacionarse con una rápida colonización de estos aislados en el suelo y sobre su hospedante vegetal.

La concentración de macroconidios constatada en esta investigación es mayor a los resultados obtenidos por Duarte *et al.* (2016) en especies de *F. oxysporum* aisladas de *C. arietinum*, los cuales registraron una esporulación entre $0,06-0,32 \times 10^6$ macroconidios. mm^{-2} , mientras que en *F. phyllophylum* obtuvieron $0,34 \times 10^6$ macroconidios. mm^{-2} en medio PDA. En otros estudios, Lazarotto *et al.* (2014) y Almaraz-Sánchez *et al.* (2018) evidenciaron que en aislados de *Fusarium* spp., se alcanzó un rango de esporulación entre $1,20-2,94 \times 10^6$ macroconidios. mL^{-1} , dichos resultados fueron similares a los obtenidos en el presente estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se consideró que la variabilidad de los macroconidios en cuanto a su morfología, características de las células apicales y basales, su tamaño y la formación de septos, los reafirma como la principal estructura para la identificación de especies de *Fusarium*. Al respecto, Leyva-Mir *et al.* (2017) informaron que en una caracterización de especies de *Fusarium* obtenidas del trigo se desarrollaron macroconidios con una talla de $24-33 \times 2-2,3 \mu\text{m}$ con 3 septos, célula apical curvada y basal ligeramente alargada, con micelio de coloración púrpura-violeta; mientras

que, en aislados que obtuvieron una coloración blanca-amarillenta registraron un tamaño de 22-48 x 2,5-4,2 μm . Por su parte, Duarte *et al.* (2016) registraron un tamaño de macroconidios de 11,04-39,22 μm de largo y 1,01-4,14 μm de ancho en *F. oxysporum*, lo cual coincidió con las características morfométricas de los aislados analizados en esta investigación.

Se considera que la variabilidad de los microconidios en cuanto a su forma, tamaño y presencia de septos posee una relación con el medio de cultivo donde crece y con la especie en cuestión. Al respecto, Leslie y Summerell (2008), Cardona-Piedrahíta y Castaño-Zapata (2019) informaron que los aislados de *F. oxysporum* mostraron microconidios en forma oval y arriñonados, células conidiógenas monofílicas, microconidios en falsas cabezas y clamidosporas individualmente, lo cual coincidió con lo observado en el presente estudio. En este mismo sentido, Duarte *et al.* (2016) informaron que los microconidios de *F. phyllophylum* procedentes de *C. arietinum* mostraron de 0-1 septos y una apariencia fusiforme, similar a lo descrito en esta investigación.

CONCLUSIONES

Se caracterizan eficazmente por el método combinado cultural-morfométrico 9 aislados de *Fusarium* spp., (5 de *F. oxysporum* y 4 de *F. phyllophylum*). La caracterización cultural evidenció una mayor variabilidad de la pigmentación en el medio PDA en comparación con los restantes medios, mientras que, la morfométrica demostró una diferenciación inter e intraespecífica en la formación de estructuras microscópicas, lo que verificó una talla de macroconidios que oscila entre 8,17-33,35x1,45-6,30 μm en *F. oxysporum* y de 6,68-20,10x1,42-4,67 μm en *F. phyllophylum*. Lo expuesto, evidencia la selectividad de estas dos especies por *N. tabacum* y señala la necesidad de monitorear la fitopatogenicidad de este patógeno con el propósito de establecer su correspondiente manejo.

LITERATURA CITADA

- Almaraz-Sánchez, A; Ayala-Escobar, V; Tlatilpa-Santamaría, IF; Nieto-Ángel, D. 2018. *Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México. Rev. Mex. Fitopatol 37(1):159-169. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-2>.
- Barceló, AM; Mustelie, MR. 2019. Insectos nocivos asociados al cultivo del tabaco al sol (*Nicotiana tabacum*, L.) en una zona agroproductiva de la provincia de Las Tunas, Cuba. Rev. Dig. Med. Amb. "Ojeando la Agenda" 60(4):44-66.
- Calero-Hurtado, A; Quintero-Rodríguez, E; Olivera-Viciedo, D; Peña-Calzada, K; Pérez-Díaz, Y. 2019. Influencia de dos bioestimulantes en el comportamiento agrícola del cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Rev. Fac. Cienc. Méd 8(1):31-44.
- Cardona-Piedrahíta, LF; Castaño-Zapata, J. 2019. Comparison of inoculation methods of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. (Snyder & Hansen), the causal agent of the vascular wilt of tomato. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas Fis. Nat 43(167):227-233. DOI: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.854>.
- Castro López, W; Carrera Sánchez, K; Herrera Isla, FL; Cupull Santana, R. 2018. Identificación de aislados de *Fusarium* spp. asociados a *Solanum quitoense* Lam en Pastaza, Ecuador. Ctro. Agr 45(4):5-11.
- Duarte, Y; Echevarría Hernández, A; Martínez Coca, B. 2016. Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. Rev. Protección Veg 31(3):173-183.
- Dueñas, G; Shagardosky, T; Fresneda, J; Hernández, F; González, J. 2007. Caracterización del género de especies de *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. Rev. Protección Veg 11(32):63-66.
- González, LM; Flores, FG; García, BM; Rivera, SG; Vázquez, FPG; Gallegos, JAA; Guerra, RR; Williamson, JS; Enciso, MC; Elos, MM. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. Rev. Mex. Fitopatol 23(1):1-7.
- Hernández Amasifuen, AD; Pineda Lázaro, AJ; Noriega-Córdova, HW. 2019. Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de "ají paprika" *Capsicum annum* L. (*Solanaceae*) en el distrito de Barranca, Perú. Arnelo 26(2):689-698.
- Lazarotto, M; Milanesi, PM; Muniz, MFB; Reiniger, LRS; Beltrame, R; Harakava, R; Blume, E. 2014. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp pathogenic to pecan tree in Brazil.

- Genet. Mol. Res 13(4):9390-9402. DOI: <https://doi.org/10.4238/2014>.
- Leslie, JF; Summerell, BA. 2008. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa, USA, John Wiley & Sons. 280 p.
- Leyva-Mir, SG; Vega-Portillo, HE; Villaseñor-Mir, HE; Tlapal-Bolaños, B; Vargas-Hernández, M; Camacho-Tapia, M; Tovar-Pedraza, JM. 2017. Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el Bajío, México. Chil. J. Agric. Anim. Sci 33(2):142-151.
- Quilambaqui, MA. 2005. Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium* spp asociadas al declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco municipios de Guanajuato, México. ESPOL Ciencia 18(1):135-140.
- Rentería-Martínez, ME; Guerra-Camacho, M; Ochoa-Meza, A; Moreno-Salazar, F; Meza-Moller, AC; Guzmán-Ortíz, JM. 2019. Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. Rev. Mex. Fitopatol 37(1):16-34. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-1>.
- Retana, K; Ramírez-Coché, JA; Castro, O; Blanco-Meneses, M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía Costarricense 42(1):115-126.
- Tapia, C; Amaro, J. 2014. Género *Fusarium*. Revista chilena de infectología 31(1):85-86.
- Toledo, V; González, A; Martínez, J. 2016. Estabilidad de *Trichoderma harzianum* cepa A-53 en condiciones no controladas. Su influencia en la enfermedad pata prieta. CUBA TABACO 15(1):3-9.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr