

First record of *Fusarium solani* and *F. equiseti* in plantations of *Jatropha curcas* in Mexico

Primer registro de *Fusarium solani* y *F. equiseti* en plantaciones de *Jatropha curcas* en México

Elizabeth Herrera-Parra, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Mocochoá. Mérida, Yucatán, C.P. 97454, México; **Jairo Cristóbal-Alejo**, Instituto Tecnológico de Conkal. Avenida Tecnológico S/N Conkal, Yucatán. C.P. 97345, México; **Misael Martínez-Bolaños**, INIFAP, Campo Experimental Rosario Izapa. km. 18 de la carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas, C.P. 30870, México; **Marianguadalupe Hernández-Arenas**, INIFAP, Campo Experimental Zacatepec, Zacatepec, Morelos, C.P. 62780, México; **Guillermo López-Guillén**^{3*}, INIFAP, Campo Experimental Rosario Izapa. km. 18 de la carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas, C.P. 30870, México. *Autor para Correspondencia: lopez.guillermo@inifap.gob.mx.

Recibido: 04 de septiembre de 2016.

Aceptado: 21 de diciembre de 2016.

Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Martínez-Bolaños M, Hernández-Arenas M, López-Guillén G. 2017. First record of *Fusarium solani* and *F. equiseti* in plantations of *Jatropha curcas* in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 150-161.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1608-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1608-1)

Primera publicación DOI: 16 de Enero, 2017.

First DOI publication: January 16, 2017.

Resumen. El piñón (*Jatropha curcas*) es una planta multipropósitos que ha adquirido importancia debido a que el aceite que se extrae de sus semillas, se puede transformar en biodiesel. Desde el año 2012, en plantaciones de *J. curcas* ubicadas en Yucatán, México, se observaron síntomas de marchitez, necrosamiento de tejido vascular y

Abstract. Physic nut (*Jatropha curcas*) is a multipurpose plant that has acquired importance as biofuel; due to the oil extracted, its seed can be used to produce biodiesel. Vascular tissue necrosis, vascular wilting, root rot, dieback and shortening symptoms were observed in *J. curcas* plantations in Yucatan, Mexico. The objective this work was to identify the causal agent of symptoms using conventional and molecular techniques. Pathogenicity tests in the greenhouse, morphological characterization and sequence analysis showed that the causal agents of the disease were *Fusarium solani* and *Fusarium equiseti*. This is the first report of *F. solani* as causal agent of vascular tissue necrosis, vascular wilting and root rot, and also the first report of *F. equiseti* to cause dieback and shortening in *J. curcas* in Mexico.

acortamiento de entrenudos. El objetivo del trabajo fue identificar el agente causal de los síntomas descritos por medio de métodos convencionales y moleculares. Las pruebas de patogenicidad en invernadero, caracterización morfológica, así como el análisis de secuencias mostraron que los agentes causales de los síntomas de la enfermedad fueron *Fusarium solani* y *Fusarium equiseti*. Este es el primer reporte de *F. solani* como agente causal de necrosamiento de tejido vascular, marchitez y pudrición de raíz, y también es el primer reporte de *F. equiseti* como responsable de muerte descendente y acortamiento de entrenudos en plantas de *J. curcas* en México.

Palabras clave: *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, fitopatógenos, piñón.

El piñón (*Jatropha curcas*) es un arbusto perenne multipropósitos que pertenece a la familia Euphorbiaceae; se considera nativo de Centroamérica, particularmente de México (Openshaw, 2000; Pecina-Quintero *et al.*, 2014). Esta planta, se distribuye en regiones tropicales y subtropicales de Asia, África y América, en donde se cultiva con la finalidad de extraer aceite de sus semillas y producir biodiesel (Heller, 1996; Wang *et al.*, 2008). *Jatropha curcas* es resistente a la sequía y por su toxicidad se considera resistente y/o tolerante al ataque de plagas y enfermedades (Heller, 1996; Zamarripa-Colmenero *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2010).

La expansión global de *J. curcas* como cultivo, ha contribuido a la aparición de enfermedades de etiología desconocida, a pesar de la supuesta resistencia y/o tolerancia que se le atribuye (Machado y Pereira, 2012; Machado *et al.*, 2014). De acuerdo con la literatura, *J. curcas* es atacada por 42 hongos, cuatro bacterias y dos virus (Alonso y Lezcano, 2014). Entre las enfermedades más comunes en plantaciones de *J. curcas*, están las causadas por

Key words: *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, phytopathogens, *physic nut*.

Physic nut (*Jatropha curcas*) is a perennial multipurpose flowering plant that belongs to the family Euphorbiaceae. It is native to Central America but most likely to Mexico (Openshaw, 2000; Pecina-Quintero *et al.*, 2014). Physic nut is distributed across tropical and subtropical regions of Asia, Africa and America, where it is grown for seed oil extraction and biodiesel production (Heller, 1996; Wang *et al.*, 2008). *Jatropha curcas* is resistant to drought and, because of its toxicity, it is considered to be resistant and/or tolerant to plant pests and diseases (Heller, 1996; Zamarripa-Colmenero *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2010).

The global expansion of *J. curcas* as a crop has contributed to disease outbreaks of unknown etiology in spite of the supposed resistance and/or tolerance attributed to this species (Machado and Pereira, 2012; Machado *et al.*, 2014). According to literature, *J. curcas* is infested by 42 fungi, four bacteria and two viruses (Alonso and Lezcano, 2014). Among the most common diseases found in *J. curcas* plantations are those caused by fungi, including *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici* (anthracnose); *Passalora jatrophi*, *Cercospora jatrophi*, *Pseudocercospora jatrophae* (leaf spot); *Pseudoidium jatrophae* (powdery mildew); *Phakopsora arthuriana* (rust); *Lasiodiplodia theobromae* (dieback); *Fusarium solani* (root rot); *Macrophomina phaseolina* (crown and root rot); *Rhizoctonia bataticola* (root rot); *Botryosphaeria dothidea* (canker) and other fungi (Kumar *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2011; Machado and Pereira, 2012; Ellison, 2015).

In Mexico, as a result of research conducted by different institutions, there have been reports of damage caused by plant pathogens to *J. curcas*. Valdez-Rodríguez *et al.* (2011) reported the presence

hongos, tales como *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici* (antracnosis); *Passalora jatrophi-gena*, *Cercospora jatrophiicola*, *Pseudocercospora jatrophae* (mancha foliar); *Pseudoidium jatrophae* (cenicilla); *Phakopsora arthuriana* (roya); *Lasiodiplodia theobromae* (muerte descendente); *Fusarium solani* (pudrición de la raíz); *Macrophomina phaseolina* (pudrición de corona y raíz); *Rhizoctonia bataticola* (pudrición de raíz); *Botryosphaeria dothidea* (cancro) y otros hongos (Kumar *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2011; Machado y Pereira, 2012; Ellison, 2015).

En México, como resultado de investigaciones desarrolladas por diferentes instituciones se han reportado problemas ocasionados por fitopatógenos en *J. curcas*. Valdéz-Rodríguez *et al.* (2011) reportaron la presencia de *Pythium aphanidermatum* en plántulas y semillas cultivadas en Veracruz, mientras que Espinoza *et al.* (2012) encontraron a *Alternaria alternata* en inflorescencias con síntomas de necrosamiento en Sinaloa. Otras enfermedades de *J. curcas* que se han reportado en México son causadas por *C. gloeosporioides*, *C. circinans*, *P. arthuriana*, *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Pleurotus ostreatus*, *Ralstonia solanacearum* (Valdez-Rodríguez *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2012; Nolasco-Guzmán *et al.*, 2013; Quiroga-Madrugal *et al.*, 2013; Salazar-Pinacho *et al.*, 2016).

En Yucatán, México, se observaron en algunas plantaciones de *J. curcas* desde el año 2012, síntomas de marchitez, necrosis, acortamiento de entrenudos y muerte de plantas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar el (los) agente (s) causal (es) de los síntomas en plantaciones de *J. curcas*.

Los muestreos se realizaron en dos plantaciones experimentales de *J. curcas* del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicadas en el Campo Experimental

of *Pythium aphanidermatum* in seedlings and seed cultivated in Veracruz, while Espinoza *et al.* (2012) found *Alternaria alternata* in inflorescences showing symptoms of necrosis in Sinaloa. Other *J. curcas* diseases reported in Mexico are caused by *C. gloeosporioides*, *C. circinans*, *P. arthuriana*, *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Pleurotus ostreatus*, *Ralstonia solanacearum* (Valdez-Rodríguez *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2012; Nolasco-Guzmán *et al.*, 2013; Quiroga-Madrugal *et al.*, 2013; Salazar-Pinacho *et al.*, 2016)

In Yucatán, Mexico, symptoms of wilting, necrosis, shortened internodes and dead plants have been observed since 2012 in some plantations. For this reason, this research was aimed at identifying the agent or agents causing symptoms of diseases in *J. curcas* plantations.

Samplings were conducted in two *J. curcas* experiment plantations of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) in the Campo Experimental Mocochoá (21° 06' N and 89° 26' O at 13 masl) and Sitio Experimental Uxmal, in Yucatán (20° 25' N and 89° 46' O, at 50 masl), respectively. The two plantations accounted for 3,000 plants; directed samplings of plants with symptoms of necrotic vascular tissue, wilting, root rot, dieback and shortened internodes were conducted at both sites. At least 2 % of plants were sampled in each plantation.

Samples with infected tissue were placed in brown paper bags and taken to the Laboratory of Plant Pathology of the Instituto Tecnológico de Conkal for testing purposes.

In the laboratory, to isolate fungi associated with root and internodes rot, 0.5 cm² cuttings of diseased tissue were made, which then were disinfected with 2 % sodium hypochlorite for 1 min, washed twice with distilled water and placed on sterile absorbent paper to remove excess of moisture. Later, separately, each sample was sown in 90 mm

Mocochá (21° 06' N y 89° 26' O, a 13 msnm) y Sitio Experimental Uxmal, en Yucatán (20° 25' N y 89° 46' O, a 50 msnm), respectivamente. Las dos plantaciones cuentan con 3,000 plantas, en las cuales se realizaron muestreos dirigidos en plantas con síntomas de necrosamiento de tejido vascular, marchitez, pudrición de raíz, muerte descendente y acortamiento de entrenudos. En cada plantación se muestreó al menos el 2 % de las plantas.

Las muestras con tejido infectado, se introdujeron en bolsas de papel estraza y se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Conkal para su estudio.

En laboratorio para el aislamiento de los hongos asociados a la pudrición de raíz y entrenudos, se realizaron cortes de 0.5 cm² del tejido enfermo, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 1 min, se lavaron con dos cambios de agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente por separado, cada muestra se sembró en cajas Petri de 90 mm conteniendo medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), colocando cinco cortes por caja Petri. Éstas se incubaron a 28±1 °C hasta observar crecimiento de micelio. Finalmente, con una aguja estéril, porciones de micelio fueron transferidos individualmente a nuevas cajas Petri con PDA.

La identificación del agente causal del necrosamiento de tejido vascular, marchitez, pudrición de raíz, muerte descendente y acortamiento de entrenudos de *J. curcas*, se realizó por medio de la observación de preparaciones temporales y permanentes de hongos de acuerdo con la metodología de Cristóbal-Alejo *et al.* (2013). La identificación a nivel de género y especie se hizo usando claves de Barnett y Hunter (2006) y Leslie y Summerell (2006), respectivamente. Las preparaciones observadas con microscopio compuesto, se fotografiaron con una cámara Sony Cbershot.

Petri dishes (five cuts per Petri dish) containing Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium. The samples were incubated at 28±1 °C until mycelium growth was observed. Finally, using a sterile needle, portions of mycelium were individually transferred to new Petri dishes with PDA.

The identification of the causal agent of *J. curcas* necrotic vascular tissue, wilting, root rot, dieback and internodes shortening was made through observation of temporary and permanent preparations of fungi using the methodology by Cristóbal-Alejo *et al.* (2013); the identification at the genus and species levels was made following the keys of Barnett and Hunter (2006) and Leslie and Summerell (2006), respectively. Pictures of the preparations observed under a compound microscope were taken with a Sony Cybershot digital camera.

The molecular identification of fungi was based on a sequence analysis of specific DNA regions (Seifert *et al.*, 2007). The DNA extraction was carried out with a Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™, and the DNA integration was verified through 1.2 % agarose gel electrophoresis. The conventional polymerase chain reaction (PCR) technique was used to amplify the internal regions ITS1 and ITS2 between the ribosomal genes (rADN) 18S-5.8S and 28S with the primers ITS1 and ITS4 (Manter and Vivanco, 2007). The reaction mixture included the primers ITS1 and ITS4 (1 mM), MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA Polymerase (2.5 units) and DNA (100 ng) for a final volume of 50 µL. The amplification was performed in a Thermocycler (TECHNE®-312, Minnesota, USA) under the following conditions: initial denaturation of 2 min at 95 °C, followed by 30 cycles (denaturation at 94 °C for 1 min, alignment at 54 °C for 30 s and an extension of 1 min at 72 °C) with a final extension of 5 min at 72 °C (White *et al.*, 1990).

La identificación molecular de los hongos se basó en un análisis de la secuencia de regiones del ADN específicas (Seifert *et al.*, 2007). Para la extracción de ADN se utilizó el Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ y la integración del ADN se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. Se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, para la amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales (rADN) 18S-5.8S y 28S con los iniciadores ITS1 e ITS4 (Manter y Vivanco, 2007). La mezcla de reacción consistió en iniciadores ITS1 e ITS4 (1 mM), MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimerasa (2.5 unidades), y ADN (100 ng) para un volumen final de 50 µL. La amplificación se realizó en un Termociclador (TECHNE®-312, Minnesota, EE.UU.), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 30 s y una extensión de 1 min a 72 °C) con una extensión final de 5 min a 72 °C (White *et al.*, 1990).

Los productos finales de la amplificación, se visualizaron en gel de agarosa al 2 % (Ultra Pure™). Los fragmentos amplificados se enviaron a la empresa MacroGen (EE.UU.) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con las depositadas en el banco de genes de NCBI (National Center for Biotechnology Information) con ayuda del programa BLASTn. Las secuencias se depositaron en la base de datos del GenBank para obtener su número de acceso.

Se implementaron los postulados de Koch para confirmar la patogenicidad de los aislados fúngicos que se obtuvieron consistentemente a partir de los tejidos sintomáticos de plantas de *J. curcas*. Para el hongo aislado de plantas con síntomas de necrosamiento de tejido vascular, marchitez y pudrición de raíz, se desinfectaron semillas de *J. curcas* con hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 min, se

The final products of the amplification were visualized in 2% agarose gel (Ultra Pure™). The amplified fragments were delivered to the company MacroGen (USA) to be sequenced. The sequences obtained were analyzed and compared with the sequences stored at the gene bank of NCBI (National Center for Biotechnology Information) using BLASTn. The sequences were submitted to the GenBank database to obtain their access number.

The Koch's postulates were used to confirm the pathogenicity of fungi isolates obtained consistently from asymptomatic tissue of plants of *J. curcas*. For the isolate fungus of plants with necrotic vascular tissue, wilting and root rot, seeds of *J. curcas* were disinfected with 1 % sodium hypochlorite for 2 min, washed twice with sterile distilled water and sown in 1L polystyrene cups containing sterile soil. After seed germination, twenty 40-day-old plants were selected; 2mm-deep cuts in the plant neck or bottom were made and inoculated by spraying a 1 x 10⁶ mL⁻¹ spore concentration. Twenty plants sprayed with sterile distilled water were used as control. The cuts of all the plants were covered with Parafilm® paper and left in the greenhouse until symptoms appeared. For the fungus isolate of plants showing dieback and shortened internodes, the same methodology was used, but the fungus inoculation was performed 15 cm above the plant's neck or base.

From plants of *J. curcas* with necrotic roots, wilting and necrotic vascular tissue, *Fusarium solani* was isolated and identified (Figure 1A, B y C). These symptoms were also observed by Sharma *et al.* (2001), Wu and Yu (2011), Machado and Pereira (2012), and Machado *et al.* (2012). *Fusarium solani* is the causal agent of root rot symptoms in *J. curcas* plantations in China (Wuet *et al.*, 2011), whose teleomorph was identified as *Nectria haematococca*. According to

lavarón con dos cambios de agua destilada estéril y se sembraron en vasos de poliestireno de 1 L de capacidad que contenían suelo estéril. Después de la germinación de las semillas, se seleccionaron 20 plantas de 40 días de edad, a las que se le realizaron incisiones de 2 mm de profundidad en la base del cuello o base de las plantas, y posteriormente, se inocularon por aspersión de esporas a concentración de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. La misma cantidad de plantas se consideraron como testigos en las cuales solo se realizaron incisiones y se asperjó agua destilada estéril. Las incisiones en todas las plantas se cubrieron con papel Parafilm® y se mantuvieron en invernadero hasta la aparición de síntomas. Para el hongo aislado de plantas con muerte descendente y acortamiento de entrenudos se siguió la misma metodología que el caso anterior, con la diferencia que la inoculación del hongo se realizó a 15 cm sobre el cuello o base de la planta.

De plantas de *J. curcas* con raíces necrosadas, marchitez y necrosamiento de tejido vascular, se aisló e identificó a *Fusarium solani* (Figura 1A, B y C). Estos síntomas, también fueron observados por Sharma *et al.* (2001), Wu y Yu (2011), Machado y Pereira (2012), y Machado *et al.* (2012). *Fusarium solani* es el agente causal de los síntomas de pudrición de la raíz en plantaciones de *J. curcas* en China (Wu *et al.*, 2011), cuyo teleomorfo fue identificado como *Nectria haematococca* y de acuerdo con la revisión de literatura, este es el primer reporte en plantaciones de *J. curcas* localizadas en México. *Fusarium solani* presentó micelio algodonoso, septado de color crema con cambios de coloración de azul-verde; microconidios unicelulares, ovoides-arriñonados con 2.7-8.9 μm de largo por 2-4 μm de ancho, producidos en conidióforos individuales o en pares y largos; macroconidios en forma de canoa o media luna, con un diámetro 9.1-38.9 μm por 2.2-4.4 μm con 1-4 septos, paredes gruesas, cilíndricas, superficie dorsal y ventral paralela en

literature reviews, this is the first report in *J. curcas* plantations in Mexico.

Fusarium solani presented cottony mycelium, cream colored septate that changed from blue to green; unicellular and egg-kidney-shaped micronidia 2.7-8.9 μm long x 2-4 μm wide produced in large conidiophores, single and in twos; canoe- or crescent-shaped 9.1-38.9 μm x 2.2-4.4 μm in diameter with 1-4 septates, thick cylindrical walls, back and ventral surface parallel along its entire length, blunt and rounded apical cell with a slot at the base, globose chlamydospores, single and in twos, 6.2-11.1 μm in diameter (Figure 1D and E). These morphological characteristics agree with those described by Barnett and Hunter (2006) and Leslie and Summerell (2006) for *F. solani*.

Results of search for homology using BLASTn with nucleotide sequences reported by NCBI were 99 % similar to the sequence of the *F. solani* fungus (Access Number U733636). The nucleotides sequence was submitted to the GenBank database with Access Number KY013237.

In plants of *J. curcas* inoculated with *F. solani*, wilting symptoms were observed seven days after inoculation (dpi), followed by a loss of turgidity in plants and chlorosis in leaves, which gradually turned brown (Figure 1C). Root extraction of *J. curcas* at 13 dpi showed necrosis in the vascular system; from the symptoms observed, *F. solani* was isolated. The control plants did not show any symptom. The symptoms observed correspond to those reported by Wu *et al.* (2011) in *J. curcas* plantations in China; the authors found that 2 months after inoculating seedlings of *J. curcas*, they showed symptoms of root rot, leaf chlorosis, leaves falling and necrotic and rotten roots. Similar symptoms were also reported by Herrera-Parra *et al.* (2011) in wilted plants of *Thevetia peruviana*, as well as by Hasan *et al.* (2014) in plants of *Hibiscus abdariffa* with symptoms of root rot and wilting.

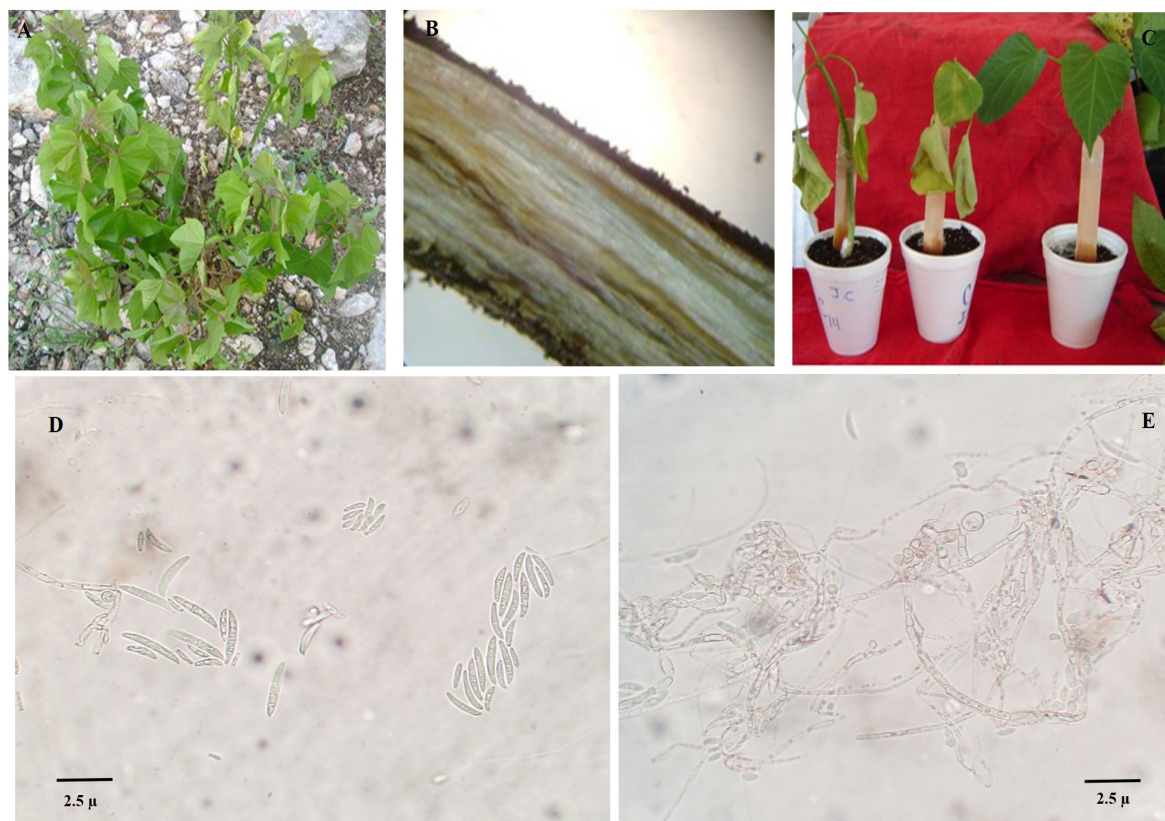


Figura 1. Síntomas inducidos en *Jatropha curcas* por *Fusarium solani* y características microscópicas de *Fusarium solani*. (A) Plantas con síntomas de marchitez. (B) Necrosamiento del sistema radical. (C) Reproducción de síntomas de marchitez en plántulas. (D) Microconidios y macroconidios. (E) Formación de clamidosporas.

Figure 1. Symptoms caused by *Fusarium solani* in *Jatropha curcas*, and microscopic characteristics of *Fusarium solani*. (A) Plants with wilting symptoms. (B) Root system necrosis. (C) Dissemination of wilting symptoms in seedlings. (D) Microconidia and macroconidia. (E) Chlamydoconidia formation.

toda su longitud, célula apical roma y redondeada con una muesca en la base; clamidosporas globosas, solas y en pares, con diámetros de 6.2-11.1 µm (Figura 1D y E). Estas características morfológicas coinciden con las descritas por Barnett y Hunter (2006) y Leslie y Summerell (2006) para el caso de *F. solani*.

Los resultados de la búsqueda de homología por BLASTn con secuencias de nucleótidos reportadas en NCBI, mostró un 99 % de similitud con la secuencia del hongo *F. solani* (No. de acceso U733636). La secuencia de nucleótidos, se depositó

In plants of *J. curcas* with symptoms of dieback and stems with shortened internodes, *Fusarium equiseti* was isolated and identified (Figure 2A, B, D and E). There are other reports of *F. equiseti* but as causal agent of damping-off, root rot and wilting in *Pinus halepensis*, *H. sabdariffa* and *Panax quiquefolius* (Punja *et al.*, 2007; Hasan *et al.*, 2014; Lazreg *et al.*, 2014), as well as inducer of floral necrosis and young fruit falling in *Carica papaya* (Vásquez *et al.*, 2012). However, this is the first report of dieback and internodes shortening in stems of *J. curcas*.

en la base de datos del GenBank con número de acceso KY013237.

En plantas de *J. curcas* inoculadas con *F. solani*, se observaron síntomas de marchitez a los siete días posteriores a la inoculación (dpi). Posteriormente se observó una pérdida de turgencia de las plantas y clorosis en hojas, las cuales gradualmente se tornaron café (Figura 1C). A los 13 dpi, se extrajeron las raíces y se observó necrosis en el sistema vascular, de los síntomas observados se aisló a *F. solani*. Las plantas testigo no mostraron ningún síntoma. Los síntomas observados coincidieron con los reportados por Wu *et al.* (2011) en plantaciones de *J. curcas* en China, quienes encontraron que después de 2 meses de inocular plántulas de *J. curcas*, éstas mostraron síntomas de pudrición de raíz, clorosis en hojas, caída de hojas, raíces necrosadas y podridas. Síntomas similares, también fueron reportados por Herrera-Parra *et al.* (2011) en plantas de *Thevetia peruviana* con marchitez; por Hasan *et al.* (2014) en plantas de *Hibiscus sabdariffa* con síntomas de pudrición de raíz y marchitamiento.

En plantas de *J. curcas* con síntomas de muerte descendente y tallos con acortamiento de entrenudos, se aisló e identificó a *Fusarium equiseti* (Figura 2A, B, D y E). Existen otros reportes de *F. equiseti* pero como agente causal de “damping-off”, pudrición de raíz y marchitez en *Pinus halepensis*, *H. sabdariffa* y *Panax quiquefolius* (Punja *et al.*, 2007; Hasan *et al.*, 2014; Lazreg *et al.*, 2014), así como inductor de necrosis floral y caída de frutos jóvenes en *Carica papaya* (Vásquez *et al.*, 2012). Sin embargo, este es el primer reporte de muerte descendente y acortamiento de entrenudos en tallos de *J. curcas*.

Este hongo en medio de cultivo PDA se caracterizó por presentar crecimiento micelial abundante, inicialmente de color blanco a amarillo pálido hasta cambiar a café; microconidios ovales de 53-80 x 4.0-4.5 µm, con una célula pie pedicelada, y

This fungus in a PDA culture medium was characterized by abundant mycelia growth, which was initially white to pale yellow and then turned brown; 53-80 x 4.0-4.5 µm oval micronidia with a pedicellate foot cell and chlamydospores in chains and aggregates (Figure 2F); and the development of sporodochia which were initially orange and then turned dark. Sporodochia showed plenty of macronidia developed in monophialides or in dorsoventral curved branched conidiophores, usually with five to seven 25-120µm long marked septates, a thick wall slightly arched at the ventral part and abruptly arched at the dorsal part, with a foot-like basal cell and a stranded apical part (Figure 2G). The morphological characteristics previously mentioned are in accordance with those described by Barnett and Hunter (2006) and Leslie and Summerell (2006) for *F. equiseti*.

Sequencing results show that the nucleotides sequence was 100 % similar to that of the *F. equiseti* fungal species (Access Number KJ412501) reported by NCBI. The nucleotides sequence was also submitted to the GenBank database with Access Number KY012795.

In plants of *J. curcas* inoculated with *F. equiseti*, symptoms of stem necrosis and dieback were observed at 20 dpi (Figure 2D and E); from these, *F. equiseti* was re-isolated. The control plants did not show any symptom (Figure 2C).

According to Machado and Pereira (2012), in areas with prolonged dry seasons, *J. curcas* shows a higher incidence of root and neck rot. For this reason, it is believed that water stress is the main environmental condition that favors the disease development; such condition was observed during samplings in *J. curcas* plantations in Yucatán.

In this research, *F. solani* is reported for the first time as the causal agent of wilting and vascular tissue necrosis, and *F. equiseti* as inducer of internodes shortening and dieback in *J. curcas*

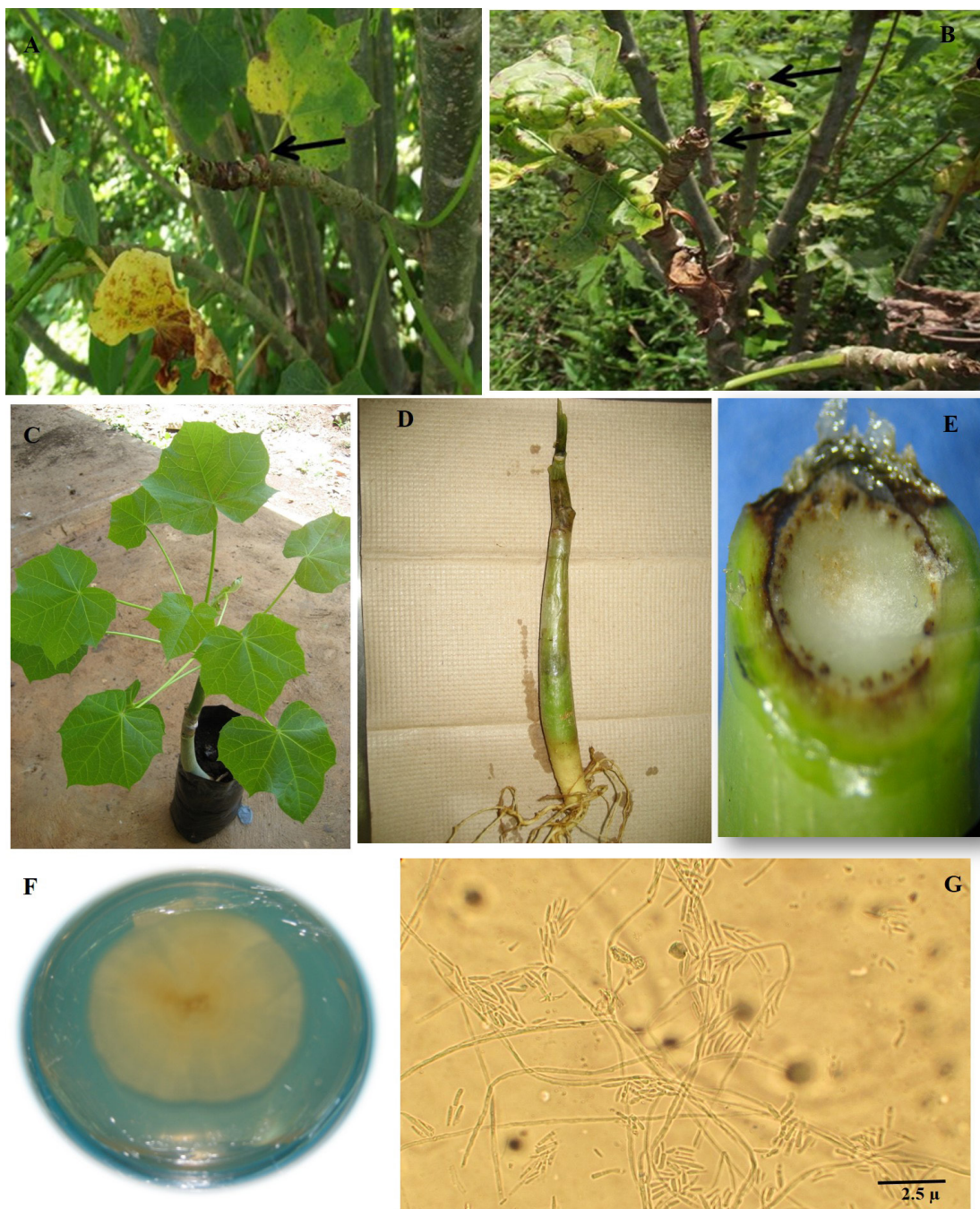


Figura 2. Síntomas inducidos en *Jatropha curcas* por *Fusarium equiseti* y características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium equiseti*. (A) Acortamiento de entrenudos en ramas. (B) Muerte descendente de ramas. (C) Planta testigo sin síntomas. (D) Planta inoculada con muerte descendente. (E) Corte de tallo necrosado. (F) Crecimiento en medio de cultivo PDA. (G) Macroconidios.

Figure 2. Symptoms caused by *Fusarium equiseti* in *Jatropha curcas*, and macroscopic and microscopic characteristics of *Fusarium equiseti*. (A) Shortening of internodes in branches. (B) Branch dieback. (C) Control plant without symptoms. (D) Plant inoculated with dieback. (E) Cutting of a necrotic stem. (F) Development in PDA culture medium. (G) Macroconidia.

clamidosporas de 7-9 μm en cadena y en conglomerados (Figura 2F). Se observó la formación de esporodoquios inicialmente de color naranja y posteriormente café oscuro. En los esporodoquios, se observaron abundantes macroconidios desarrollados en monofálides o en conidióforos ramificados dorsoventralmente curvos, usualmente con cinco a siete septos marcados, con una longitud de 25-120 μm , con pared gruesa que en su parte ventral se arquea ligeramente y en la parte dorsal se arquea abruptamente, con una célula basal en forma de pie y la parte apical filamentosa (Figura 2G). Las características morfológicas mencionadas anteriormente, coincidieron con las descritas por Barnett y Hunter (2006) y Leslie y Summerell (2006) para *F. equiseti*.

Los resultados de la secuenciación, muestra que la secuencia de nucleótidos tuvo 100 % de similitud con la especie de hongo *F. equiseti* (No. de acceso KJ412501) reportada en NCBI. La secuencia de nucleótidos, también se depositó en la base de datos del GenBank con número de acceso KY012795.

En plantas de *J. curcas* inoculadas con *F. equiseti* se observaron síntomas de necrosamiento y muerte descendente de tallos a los 20 dpi (Figura 2D y E), de los cuales se re-aisló a *F. equiseti*; mientras que en las plantas testigo no se observaron síntomas (Figura 2C).

De acuerdo con Machado y Pereira (2012), en áreas con estaciones secas prolongadas, se ha observado una mayor incidencia de la pudrición de raíz y cuello en *J. curcas*. Por lo que se cree que el estrés hídrico es la condición ambiental principal que predispone a las plantas a esta enfermedad, dicha condición se observó durante los muestreos que se hicieron en las plantaciones de *J. curcas* en Yucatán.

En este trabajo se reporta por primera vez a *F. solani* como agente causal de marchitez y necrosamiento de tejido vascular, y a *F. equiseti* como

in Yucatán, Mexico. This disease may become a serious problem for *J. curcas* cultivation in Mexico since there are no control and monitoring strategies in place. Therefore, further studies to know the environment conditions that favor the disease are needed, as well as strategies for its integrated management.

CONCLUSIONS

Based on morphological characterization, rDNA ITS sequences analyses and pathogenicity tests, this is the first time *F. solani* is reported as the causal agent of vascular tissue necrosis, root rot and wilting in plants of *J. curcas* in Yucatán, Mexico. Also, for the first time, *F. equiseti* is reported as the causal agent of internodes shortening and dieback in *J. curcas*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their appreciation to Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) for its support to the Project "Potential pests and diseases of Physic Nut and Castor Bean that affect the biofuel production in the Mexican tropic".

~~~~~ End of the English version ~~~~~

inductor de acortamiento de entrenudos y muerte descendente de *J. curcas* en Yucatán, México. Esta enfermedad puede convertirse en un problema serio para el cultivo de *J. curcas* en México, debido a la falta de estrategias de control y monitoreo, por lo que se deben hacer más estudios encaminados a conocer las condiciones ambientales que favorecen la enfermedad, así como diseñar estrategias para el manejo integrado de ésta.

## CONCLUSIONES

Basados en caracterización morfológica, análisis de secuencias ITS del rDNA y pruebas de patogenicidad, se reporta por primera vez a *F. solani* como causante de síntomas de necrosamiento de tejido vascular, pudrición de raíz y marchitez en plantas de *J. curcas* en Yucatán, México. Asimismo, se reporta por primera vez a *F. equiseti* como el agente causal de acortamiento de entrenudos y muerte descendente de *J. curcas*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por el apoyo al proyecto: "Plagas y enfermedades potenciales del piñón e higuera que afectan la producción de biocombustibles en el trópico mexicano".

## LITERATURA CITADA

- Alonso O y Lezcano JC. 2014. Pathogen microorganisms in *Jatropha curcas* Linnaeus. Potential strategies for their management. *Pastos y Forrajes* 37:131-137. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=269131791001>.
- Barnett LH and Hunter BB. 2006. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 234 p.
- Biswas PK, Pohit S and Kumar R. 2010. Biodiesel from *Jatropha*: can India meet the 20% blending target. *Energy Policy* 38:1477-484. <http://doi:10.1016/j.enpol.2009.11.029>.
- Cristóbal-Alejo J, Navarrete-Mapen Z, Herrera-Parra E, Mis-Mut M, Tun-Suárez JM and Ruiz-Sánchez E. 2013. Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: Identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. *Revista de Protección Vegetal* 28:138-144. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n2/rpv07213.pdf>.
- Ellison CA. 2015. First Report of *Colletotrichum truncatum* causing stem cankers on *Jatropha curcas* in Burkina Faso. *Plant Disease* 99:14-20. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0181-RE>.
- Espinoza MA, Santos AE, Fernández E, Espinoza MG, Chávez JA, Bermúdez EM, Martínez AL, Martínez J and Leyva NE. 2012. First report of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing inflorescence blight in *Jatropha curcas* in Sinaloa, México. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34:455-458. <http://10.1080/07060661.2012.688770>.
- Hassan N, Shimizu M and Hyakumachi M. 2014. Occurrence of root rot and vascular wilt diseases in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in upper Egypt. *Mycobiology* 42:66-72. <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.66>.
- Heller J. 1996. *Physic nut. Jatropha curcas* L. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 66 p. [http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx\\_news/Physic\\_nut\\_Jatropha\\_curcas\\_L\\_161.pdf](http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Physic_nut_Jatropha_curcas_L_161.pdf).
- Herrera-Parra E, Bacab-Pérez I, Cristóbal-Alejo J, Tún-Suárez JMA and Ruiz-Sánchez E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*. *Fitosanidad* 15:231-236. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209123682005>.
- Kumar S, Sharma S, Pathak DV and Beniwal J. 2011. Integrated management of *Jatropha* root rot caused by *Rhizoctonia bataticola*. *Journal of Tropical Forest Science* 23:35-41. <http://www.jatropha.pro/PDF%20bestanden/Rootrot.%20Kumar.pdf>.
- Lazreg F, Belabid L, Sanchez J, Gallego E, Garrido-Cardenas JA and Elhaitoum A. 2014. First report of *Fusarium equiseti* causing damping-off disease on Aleppo pine in Algeria. *Plant Disease* 98:1268. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0194-PDN>.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Machado AR and Pereira OL. 2012. Major diseases of the biofuel plant, physic nut (*Jatropha curcas*). Pp:59-75. In: Fang Z (ed.). *Biodiesel: Feedstocks, Production and Applications*. Intech, Croatia. 75p. <http://dx.doi.org/10.5772/52336>.
- Machado AR, Pinho BD and Pereira LO. 2014. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity* 67:231-247. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13225-013-0274-1>.
- Machado AR, Pinho DB, Dutra DC and Pereira OL. 2012. Collar and root rot caused by *Neosectydidium dimidiatum* in the biofuel plant *Jatropha curcas*. *Plant Disease* 96:1697. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0504-PDN>.
- Manter KD, Vivanco MJ. 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed Template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 71: 7.14. <http://www.elsevier.com/located/jmicmeth>.
- Nolasco-Guzmán, V, Escobar VA, Tovar-Pedraza JM, Ríos-López EG, Calyecac-Cortero HG and Rangel AM. 2013. Primer reporte de *Phakopsora arthuriana* en *Jatropha curcas* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31:70-73. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61230974008>.
- Openshaw K. 2000. A review of *Jatropha curcas*: An oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy* 19:1-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00019-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00019-2).
- Pecina-Quintero V, Anaya-López JL, Zamarripa-Colmenero A, Núñez-Colí CA, Montes-García N, Solís-Bonilla JL



- and Jiménez-Becerril MF. 2014. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. *Biomass and Bioenergy* 60:147-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.005>.
- Punja ZK, Wan A, Goswami RS, Verma N, Rahman M, Barasubiye T, Seifert KA and Lévesque CA. 2007. Diversity of *Fusarium* species associated with discolored ginseng roots in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29:340-353. <http://dx.doi.org/10.1080/07060660709507480>.
- Quiroga-Madrigal RR, Rosales Esquinca MA, Rincón Espinosa MP, Garrido Ramírez E, Holguín Meléndez F, González Pinacho JA, Salazar Pinacho WM y Sol Hernández G. 2013. Enfermedades de *J. curcas*. Pp:83-102. In: Zamarripa CA y Solís Bonilla JL (eds.). *Jatropha curcas* L. Alternativa Bioenergética en México. Ave Dos Taller Creativo. Tapachula, Chiapas, México. 157p.
- Rao SC, Kumari PM, Wani SP and Marimuthu S. 2011. Occurrence of black rot in *Jatropha curcas* L. plantations in India caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Current Science* 100:1547-1549. <http://www.currentscience.ac.in/Volumes/100/10/1547.pdf>.
- Salazar-Pinacho WM, Quiroga-Madrigal RR, Rosales-Esquinca MA, Garrido-Ramírez ER y Holguín-Meléndez F. 2016. Etiología de la marchitez y pudrición basal de *Jatropha curcas* en Arriaga, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:110-115. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-5>.
- Seifert KA, Samson RA, DeWaard, JR, Houbraeken J, Levesque CA, Moncalvo JM, Seize GL and Hebert PDN. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *PNAS, The National Academy of Sciences of the USA*. 104: 3901-3906. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611691104>.
- Sharma S, Kaushik JC and Kaushik N. 2001. *Fusarium moniliforme* causing root rot of jatropha. *Indian Phytopathology* 54:275-277. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IPPJ/article/viewFile/18956/9311>.
- Valdéz-Rodríguez OA, García ER, Sánchez SO and Pérez VA. 2011. Isolation and pathogenicity of a possible *Pythium aphanidermatum* in *Jatropha curcas* L. non toxic. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14:649-660. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93918231028>.
- Vásquez A, Hernández CE, Mora AA, Nava DC. 2012. Sánchez GF. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. *Agrociencia* 46:757-767. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30225072001>.
- Wang ZY, Lin JM and Xu ZF. 2008. Oil contents and fatty acid composition in *Jatropha curcas* seeds collected from different regions. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 28:1045-1046. <http://www.j-smu.com/pdf2/200806/2008061045.pdf>.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-321. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, CA, USA. 345p.
- Wu YK and Yu GT. 2011. Study on the sexual stage of the root rot disease pathogen in *Jatropha curcas* L. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 27:297-301. [http://www.casb.org.cn/casb/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=2011-1795](http://www.casb.org.cn/casb/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=2011-1795).
- Wu YK, Ou GT and Yu JY. 2011. First report of *Nectria haematococca* causing root rot disease of physic nut (*Jatropha curcas*) in China. *Australasian Plant Disease. Notes* 6:39-42. <http://dx.doi.org/10.1007/s13314-011-0014-x>.
- Zamarripa-Colmenero A, Ruiz Cruz PA, Solís Bonilla JL, Martínez Herrera J, Olivera De los Santos A and Martínez Valencia B. 2009. Biocombustibles: perspectivas de producción de biodiesel a partir de *Jatropha curcas* L., en el trópico de México. *Campo Experimental Rosario Izapa, INIFAP. Folleto Técnico No. 12*. Tuxtla Chico, Chiapas, México. 46 p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx/portal/index.php/component/content/article/78colecciones-inifap/96-folleto-tecnico-busquedas>.