



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Trabajo final de Pasantía

“Detección de hongos patógenos de la corona y raíz
de plantines de frutilla”

Pasante:

Ana Carla González

Directora:

Ing. Agr. (M. Sc) Verónica Obregón

Introducción y antecedentes.....	3
Objetivo general	5
Objetivos específicos.....	5
Plan de trabajo	6
• Cronograma de actividades.	6
Muestreo	6
Trabajo de laboratorio	7
➤ Procesamiento de muestras	7
➤ Aislamientos en medio de cultivo	8
➤ Identificación de patógenos	8
➤ Patogenicidad	8
Resultados.....	9
➤ Aislamiento e Identificación de patógenos.....	9
• <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> :.....	9
• <i>Phytophthora cactorum</i> :.....	11
• <i>Rhizoctonia sp</i> :.....	13
• <i>Pythium spp.</i>	15
➤ Evaluación de Patogenicidad:	17
Conclusiones:.....	21
Bibliografía	22



Introducción y antecedentes

La frutilla (*Fragaria x ananassa*) es una planta herbácea perenne, de la familia de las rosáceas, que crece en América del Norte y América del Sur en una gran variedad de climas y suelos. Es una planta originaria de la costa del Pacífico en América, principalmente en Estados Unidos, Hawaii y Chile. Los primeros en cultivarla fueron los mapuches, en el territorio que corresponde al centro y sur de Chile.

Los primeros híbridos documentados entre *F. virginiana* y *F. chiloensis*, fueron obtenidos a principios del siglo XVIII en Francia. Ambas especies son octoploides y la descendencia que se origina al cruzarlas presenta características intermedias. Finalmente, la frutilla moderna surgió en Brest, Francia, en 1766, tras el cruce de *Fragaria virginiana*, proveniente de Estados Unidos, y *Fragaria chiloensis*. Este primer híbrido, *Fragaria x ananassa*, ha sido el propulsor de las distintas formas de frutillas comerciales que conocemos en la actualidad.

Es una planta de crecimiento postrado, que coloniza el terreno extendiendo sus estolones. Las hojas son de un color verde brillante y poseen tres folíolos de bordes aserrados, la parte inferior es pubescente y están sostenidas por un pecíolo largo que las une a la corona y forma el tallo de la planta. Las raíces están compuestas por una cabellera de raicillas que se desarrollan principalmente en los primeros 25 centímetros de suelo.

Las flores son blancas con cinco pétalos, de unos 2 cm de diámetro, dispuestas en inflorescencias. El fruto es un poliaquenio de color blanco, rosado o rojo, la parte comestible es el receptáculo hipertrofiado que aloja los aquenios.

Con respecto a los requerimientos térmicos, es una especie de clima fresco, aunque existen variedades para zonas cálidas. Las temperaturas óptimas diurnas están entre 15 y 18°C (incluso, hasta 25°C) y nocturnas entre 8 y 10°C. La duración del día y la temperatura son factores que inciden directamente en la planta y la inducen a diferenciar la fase vegetativa de la reproductiva. El suelo de tipo franco arenoso es el adecuado para el óptimo crecimiento de la planta.

En Argentina se plantan de 1300 a 1500 ha. de frutilla, con un rendimiento de 45 a 52 mil toneladas. Las principales provincias productoras son: Santa Fe (Coronda), Tucumán (Lules), Buenos Aires, Jujuy (Perico), Corrientes (Bella Vista) y Patagonia (Kirschbaum et al., 2017).



La superficie de frutilla en Corrientes es aproximadamente 95 hectáreas, con una producción de 2.300 toneladas, siendo los principales departamentos productores Bella Vista, Lavalle y Goya que suman el 82% de la superficie provincial. La producción promedio en el departamento de Bella Vista representa el 0.95% del VPB. (Ministerio de la Producción de Corrientes; 2012 y 2016). La producción de frutillas en Corrientes se puede llevar a cabo bajo 3 sistemas, micro túnel, macro túnel y manta térmica. La plantación comienza los primeros días de abril y dependiendo de la variedad, culmina a fines de mayo, la cosecha se extiende hasta los meses de noviembre-diciembre. El ciclo de producción es muy largo, el cultivo se expone a diferentes condiciones climáticas, a veces extremas, que predisponen y comprometen a las plantas al ataque de enfermedades (Obregón, et al., 2020).

En los últimos años, los productores observan una pérdida importante de rendimiento, atribuyéndose, principalmente, a la mala calidad de plantines y problemas sanitarios de los mismos. Se estima una pérdida de plantas de alrededor del 15-30% y los rendimientos disminuyeron de 1,2 Kg/planta a 0,5 Kg (V. Obregón, comunicación personal, 4 de abril de 2019).

La sanidad de los platines de frutilla es uno de los puntos claves en la producción. Son varios los hongos que afectan severamente la corona y las raíces. *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Neopestalotiopsis*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, son diferentes agentes causales de enfermedades muy dañinas en el cultivo de frutilla, relacionadas con síntomas de marchitamientos, necrosis de tejidos e inclusive la muerte de la planta, comprometiendo no solo la producción sino, la calidad de la misma.

Neopestalotiopsis clavispora es una de las enfermedades más perjudiciales que se encuentra en la zona de producción de Corrientes y causa la enfermedad de la pudrición de la corona y raíz de la frutilla. El síntoma principal se observa en las hojas, con zonas internervales necróticas rojizas, con áreas de color óxido en las hojas más viejas, comenzando desde los márgenes y cubriendo toda la hoja a medida que se desarrollaba la enfermedad. (Obregón et al., 2018)

Pythium sp, *Phytophthora sp.* y *Rhizoctonia sp.* son cosmopolitas, habitan naturalmente en el suelo y producen podredumbre de raíces y generalmente aparecen asociados. Otras enfermedades como marchitamiento por *Verticillium* (*Verticillium dahliae*), pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), antracnosis (*Colletotrichum sp.*) y podredumbre negra de la raíz (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium spp.*) afectan la corona y raíz de la planta de frutilla (Agrios, 1996).



El diagnóstico de estas enfermedades que afectan la corona y raíz de la planta de frutilla es importante para plantear nuevas estrategias de control y manejo de la enfermedad.

Objetivo general

Identificar hongos patógenos que afectan la corona y raíz de los plantines de frutilla, provenientes de la zona de producción Bella Vista-Desmochado, con el fin de conocer la sanidad de los plantines.

Objetivos específicos

- Aprender las tareas que se realizan en el laboratorio (higiene, seguridad, trazabilidad de muestras).
- Aprender técnicas de manipuleo de muestras.
- Aprender el manejo y la utilización de los equipamientos del laboratorio (autoclave, estufas, destilador, balanza, microscopio y lupa estereoscópica, etc.)
- Aprender a preparar medios de cultivos a utilizar durante este trabajo.
- Aprender técnicas de aislamientos de hongos en distintos medios de cultivo.
- Aprender a diferenciar colonias de distintos patógenos que afecten los plantines de frutilla.



Plan de trabajo

El trabajo se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Bella Vista, en el Laboratorio de Fitopatología Hortícola a partir de abril de 2019. Se planteó un cronograma de actividades, que se detalla a continuación:

Cronograma de actividades.

Actividades/meses	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO
Revisión bibliográfica					
Muestreo					
Análisis de muestras					
Evaluación de resultados					
Informe Final					

Muestreo

Se realizaron muestreos de los plantines de frutillas, los cuales llegan de los distintos viveros en cajas cerradas. Las muestras se diferenciaron por variedad y viveros. Se tomaron 10 plantas al azar por caja, de un total de 20 cajas.

Las muestras, debidamente identificadas, se llevaron al laboratorio de fitopatología de la EEA para su procesamiento.

Trabajo de laboratorio

➤ Procesamiento de muestras

El procesamiento de muestras consiste en la eliminación de la tierra y materia orgánica y desinfección superficial de microorganismos contaminantes de la muestra a analizar, los cuales pueden interferir y/o causar contaminación, afectando los resultados del posterior análisis.

Los plantines se lavaron con agua de grifo para retirar la mayor cantidad de tierra posible, luego se descartó la parte foliar y nuevamente se lavaron las raíces sintomáticas y las coronas. Se realizó un corte longitudinal de la corona para observar su coloración, lo cual nos indica el estado sanitario de la misma. Se tomaron fotos de cada muestra y se le asignó un número (registros).

Luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% (NaClO) durante 1 minuto, etanol al 70% durante otro minuto, y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y finalmente se secaron en cabina de flujo laminar (Figura 1).



Figura 1: Procedimiento para el diagnóstico.



➤ Aislamientos en medio de cultivo

Para identificar a los distintos patógenos se realizaron aislamientos en medio de cultivo Agar Papa Glucosado (APG) y Agar agua (AA), dependiendo de la parte de la planta a sembrar.

1. Aislamiento de corona: se sembraron pequeños trozos de tejido de coronas necrosados en APG (1L agua destilada + 200 g de papa + 8 g glucosa + 17 g agar), en flujo laminar.
2. Aislamiento de raíces: se sembraron pequeños trocitos de raíces en medio AA (1L agua destilada + 17 g de agar).

Las cajas de Petri sembradas se incubaron en estufa de cultivo a 25-27°C, entre 2-3 días, con revisiones diarias.

➤ Identificación de patógenos

Luego de la incubación, se realizaron observaciones macro y microscópicas (microscopio óptico) para identificación de los patógenos. Las características observadas fueron: aspecto de la colonia, formas de las hifas presencia de tabiques, y formación de cuerpos de reproducción.

➤ Patogenicidad

Una vez identificados los patógenos más dañinos no solo por la frecuencia de aparición sino por el daño que causan (marchitamiento y muerte), se procedió a la inoculación para dar cumplimiento con los postulados de Koch.

Los hongos que se utilizaron para la inoculación fueron *N. clavispora* y *P. cactorum*. Para evaluar la patogenicidad de trasplantaron plantas de frutillas sanas (Variedades: Brillante, Early Brite, Sentation y Beauty) en macetas con sustrato estéril. Se conservaron en un invernadero plástico bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, con riego diario.



Se utilizaron 6 plantas por variedad, tres con inóculo y tres testigos. Para la inoculación se realizó un pequeño corte en la corona de las plantas, se colocaron 2 discos de agar de 7mm con colonias de los hongos, se cubrieron con algodón húmedo para favorecer la infección de dicho patógeno y las plantas se taparon con bolsas plásticas para crear un ambiente húmedo. Los testigos fueron inoculados con discos del medio de cultivo sin patógeno.

Resultados

➤ Aislamiento e Identificación de patógenos

De los aislamientos realizados, se formaron distintos tipos de colonias correspondientes a hongos patógenos de la corona y raíces.

- ***Neopestalotiopsis clavispora*:**

Después de 7-10 días, se observaron en el lado superior del medio, colonias de hongos circulares blancas y algodonosas (Figura 2) y en el reverso después de 7-10 días se observaron una coloración amarillo claro. Después de 7 días de incubación, colonias cubiertas con acérvulos oscuras. Los conidios eran fusiformes a elipsoides, con 5 células (que constan de dos células hialinas apicales y basales, y tres células medias centrales marrones) 8,6 x 24,6 u m (ancho x largo). En las basales se observaron de 2 a 4 apéndices apicales en conidios (Figura 3).



Figura 2: Colonias de *Neopestalotiopsis*, en medio de cultivo APG. Circulares, blancas y algodonosas, con acérvulas oscuras.



Figura 3: Conidios de *Neopestalotiopsis*. Tabicados, con células pigmentadas y apéndices (40x).

- ***Phytophthora cactorum*:**

Las colonias fueron de crecimiento lento, de color blanco algo radiadas y sin bordes definidos (Figura 4). En microscopio se observaron hifas poco ramificadas, formación de estructuras de reproducción asexuales (zoosporangios) y sexuales (oogonio y anteridio), (Figuras 5 y 6).



Figura 4: Colonias de *Phytophthora cactorum*, en medio de cultivo APG.

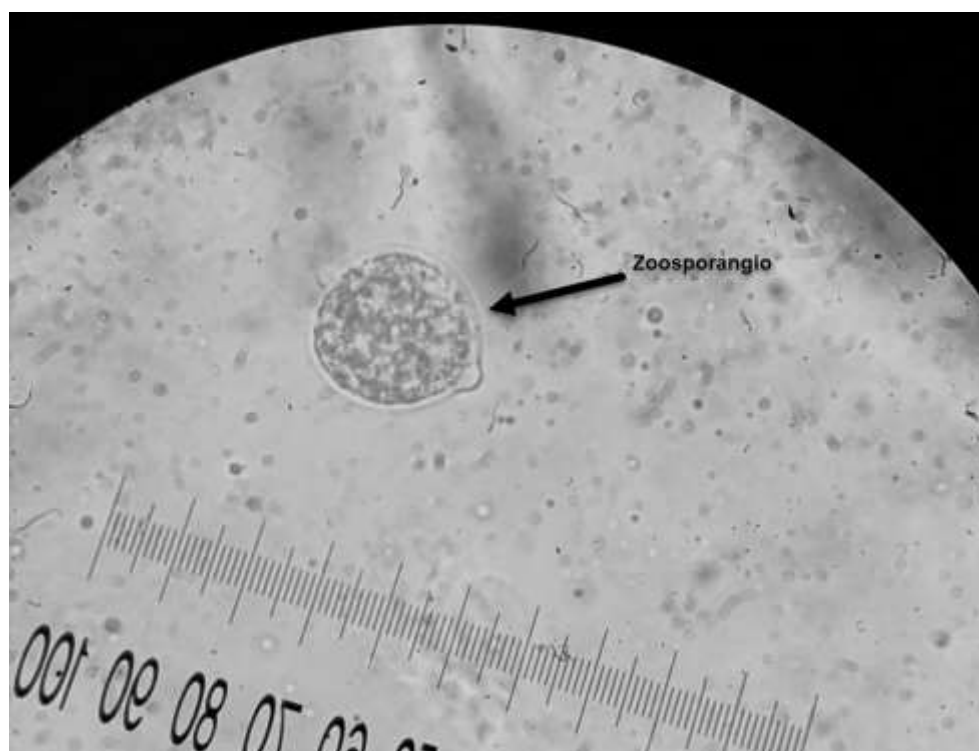


Figura 5: Estructuras de reproducción asexual de *Phytophthora cactorum*, vista en microscopio (100x).

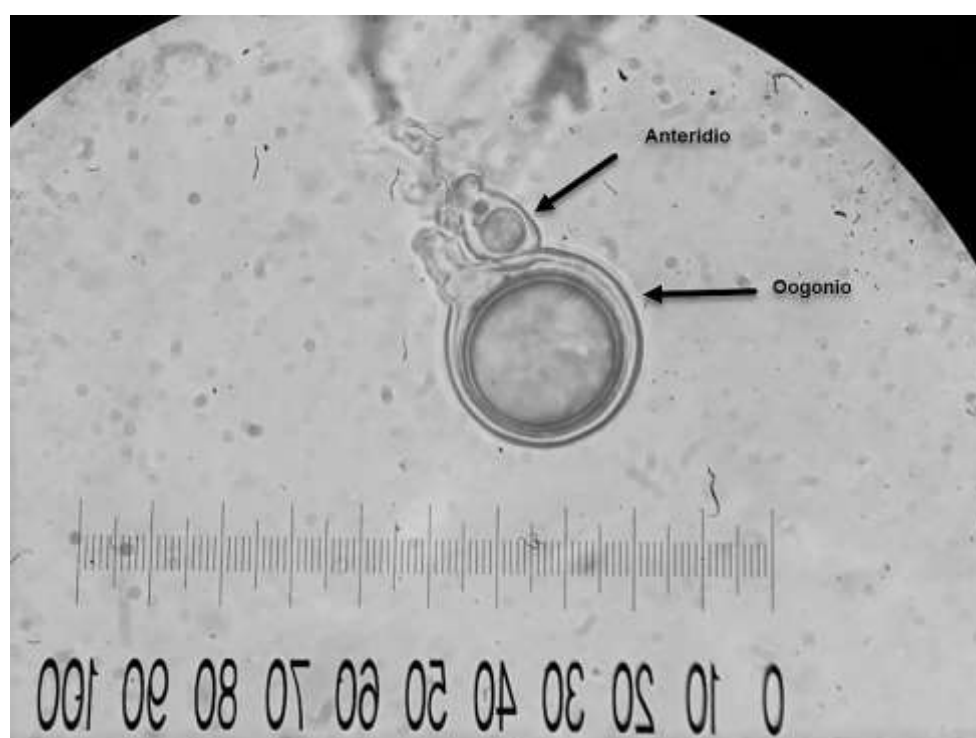


Figura 6: Estructuras de reproducción sexual de *Phytophthora cactorum*, vistas en microscopio (100x).

- ***Rhizoctonia sp.***

Las colonias en APG a los pocos días de crecimiento fue de color claro (Figura 7) y luego se torna color café claro algo amarillenta. Pasados unos días se formaron masas de hifas oscuras formando esclerocios.

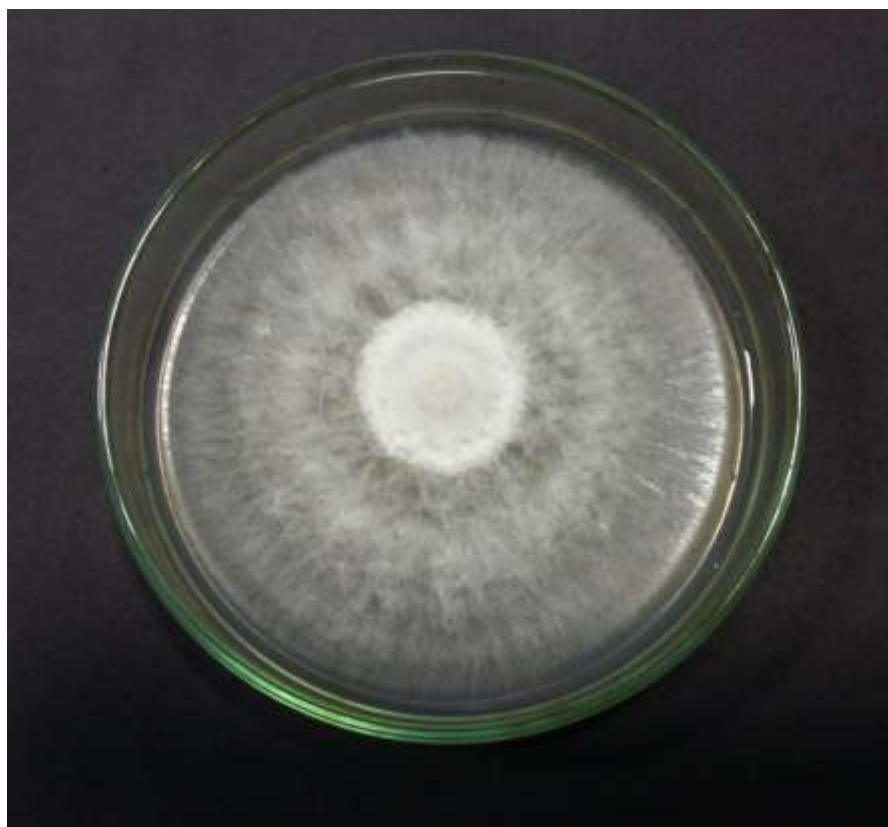


Figura 7: Colonias de *Rhizoctonia*, en medio de cultivo APG.



Figura 8 y 9: Colonias de *Rhizoctonia*, en medio de cultivo APG.

En el microscopio se observaron hifas gruesas largas con ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal, se estrechan ligeramente a nivel de la bifurcación y poseen un septo cerca de ella (Figura 10).



Figura 10: Hifas de *Rhizoctonia*, vistas en microscopio (40x).

- ***Pythium spp.***

Las colonias de *Pythium* son blancas, de rápido crecimiento (Figura 11), en el micelio se observaron estructuras asexuales del hongo (Zoosporangios).

Las hifas observadas en el microscopio fueron ramificadas con abundante formación de estructuras reproductivas (Figura 12).



Figura 11: Colonias de *Pythium sp.* en medio de cultivo APG.



Figura 12: Estructura de reproducción de *Pythium sp.*, vistas en microscopio (40x).

➤ Evaluación de Patogenicidad:

Se observaron síntomas en plantas inoculadas con *N. clavispora* y *P. cactorum*.

Todas las plantas inoculadas con patógenos presentaron síntomas, los cuales no se detectaron en plantas testigo.

Los síntomas de las plantas inoculadas con *Neopestalotiopsis*, en todas las variedades evaluadas, se observaron a los 7 días de la inoculación. El síntoma principal observado fue una necrosis internerval de color rojiza en las hojas más viejas, comenzando desde los márgenes y cubriendo toda la hoja a medida que se desarrollaba la enfermedad. En la corona se presentaron áreas de color marrón oscuro, sin patrón definido de forma y tamaño. Se confirmó la patogenicidad reaislando el patógeno en medios APG.



Figura 13: Var. Brillante, inoculada con cepa 1248 *Neopestalotiopsis*.



Figura 14: Var. Early Brite, inoculada con 1248 *Neopestalotiopsis*.



Figura 15: Var. Sensation, inoculada con cepa 1248 *Neopestalotiopsis*.



Figura 16, 17 y 18: Testigos de inoculación con *Neopestalotiopsis*.

Con respecto a los síntomas de las plantas inoculadas con *P. cactorum*, se observaron marchitamientos de las hojas con tonos verde azulado y márgenes de estas abarquillados hacia arriba. Dichos síntomas aparecieron a los 10 días luego de la inoculación.



Figura 19 y 20: Var. Brillante, inoculada con *Phytophthora cactorum*.



Figura 21 y 22: Testigos de inoculación con *Phytophthora cactorum*.

Conclusiones:

Se identificaron los siguientes hongos fitopatógenos en raíces y corona de los plantines de frutillas:

- *Rhizoctonia sp.*
- *Neopestalotiopsis clavispora*
- *Phytophthora cactorum*
- *Pythium sp.*

En referencia al desarrollo de las actividades llevadas a cabo en el curso de pasantía, puedo concluir que adquirí conocimientos básicos sobre el trabajo rutinario del laboratorio de fitopatología, aprendí a observar y diferenciar síntomas de enfermedades en plantas de frutilla, preparar medios de cultivo y técnicas de inoculación. Adquirí experiencia en el trabajo diario del servicio de diagnóstico de enfermedades que ofrece el laboratorio.



Bibliografía

- A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species Sajeewa S. N. Maharachchikumbura & Liang- Dong Guo & Lei Cai & Ekachai Chukeatirote & Wen Ping Wu & Xiang Sun & Pedro W. Crous & D. Jayarama Bhat & Eric H. C. McKenzie & Ali H. Bahkali & Kevin D. Hyde.
- Distribución de *Phytophthora cactorum* en el perfil de un suelo cultivado con frutilla (*Fragaria x ananassa*) María Josefina IribarrenI; Beatriz Angela GonzálezII; Susana Filippini III.
- Frutilla: Descripción de las principales enfermedades y plagas, y su control. Adlercreutz, E. 2009. EEA Balcarce.
- Guía para la identificación de las enfermedades de frutilla / Verónica Gabriela Obregón, Julia Magalí Ibañez, Tatiana Elisabet Lattar. – Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista, 2020.
- Identificación y control in vitro de *Pestalotiopsis hongo longisetula*, patógenos cultivos de fresa-Manoel Araújo Teixeira 1, Rúbia Marcia Siqueira Martins 2, Rosana Faria Vieira 3, Carlos Iván Aguilar Vildoso 4, Angélica Aparecida Vieira Adami 5, Ana Cristina Ferreira.
- Panorama del cultivo de Frutilla en junio de 2017 - Kirschbaum, Daniel & del H. Sordo, María & Adlercreutz, E.A.G. & R. Delmazzo, Pablo & Pacheco, Roberto & E. Misrendino, Eduardo. (2017).
- *Phytophthora cactorum*: Caracterización, epidemiología e incidencia en la productividad y en la calidad de frutos de peral cv. Williams AUTOR: Ing. Agr. Victoria Ileana Rivero.
- Primer informe de *Neopestalotiopsis clavispora* causante de pudrición de raíz y corona en plantas de fresa en Argentina. - V. G. Obregón, N. G. Meneguzzi, J., M. Ibañez, T. E. Lattar, D. S. Kirschbaum. (2018).
- Servicio de información agroeconómico Subdirección SIA -2014. Ministerio de Producción, Trabajo y Turismo. Provincia de Corrientes.

