

Optimización de la técnica para la detección y el aislamiento de *Phytophthora sp* en Nogal*.

Kaen, Ruth; Juri, Claudia; Latorre Mejía, Marlene; Seleme, Felisa

Cátedra de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Catamarca, Av. Maestro Quiroga. San Fernando del Valle de Catamarca. (4700). Tel. 0383-4435955. Correo electrónico: fdelvs@yahoo.com.ar

SUMMARY

To *Phytophthora* species can be detected and isolated from any infected host tissue. However, isolate it from infected soil is very difficult due to interference by antagonism, rapid growth of associated microflora and slow germination of chlamydospores. The objective of this study is to optimize the method for the detection and isolation of *Phytophthora spp.* from walnut plantation soils. Direct method, from samples of affected tissue and soil suspension, and indirect method, by using two vegetable baits, apple and leaves of avocado, which were placed on saturated soil for 24 hours and then seeded on CMA + PAR, different methods were compared. Isolation of *Phytophthora spp.* by the direct method from affected tissue is not difficult, while the isolation from soil is not an easy or effective method, this is reflected in the percentage of the isolates obtained in presence of soil (5%). The highest frequency of the pathogen was observed in leaf avocado (80%), indicating that this bait is the most efficient in the detection of *Phytophthora spp* from soil. The use of the apple enabled detecting more quickly the fungal pathogen.

KEYS WORDS: isolation, *Phytophthora spp*, walnut.

RESUMEN

Las especies del género *Phytophthora* pueden ser detectadas y aisladas a partir de cualquier tejido infectado del hospedero. Sin embargo, aislarla de suelos infectados resulta muy difícil debido a la interferencia por antagonismo, rápido crecimiento de la microflora asociada y la lenta germinación de las clamidosporas. El objetivo de este trabajo es optimizar el método para la detección y aislamiento de *Phytophthora spp.* a partir de suelos de plantaciones de nogal. Se compararon diferentes métodos. Directo, a partir de muestras de tejido afectado y una suspensión de suelo, e indirecto, mediante el uso de dos cebos vegetales, manzana y hojas de palta, que fueron colocados sobre suelo saturado durante 24 horas y luego sembrados sobre CMA + PAR. El aislamiento de *Phytophthora spp.* por el método directo, a partir de tejido afectado no presenta dificultad, mientras que el aislamiento a partir de suelo no es un método sencillo ni eficaz, esto se ve reflejado en el porcentaje de presencia obtenido en los aislamientos de suelo (5%). La mayor frecuencia del patógeno fue observada en la hoja de palta (80%), lo que indica que este cebo es el más eficiente en la detección de *Phytophthora spp* a partir de suelo. La utilización de la manzana posibilitó detectar con mayor rapidez al hongo patógeno.

PALABRAS CLAVES: aislamiento, *Phytophthora spp*, nogal.

INTRODUCCION

La pudrición del cuello y las raíces del nogal es una enfermedad producida por varias especies de *Phytophthora*, puede manifestarse en cuello, corona y/o raíces, causando pérdida de vigor, menor crecimiento de los árboles afectados, clorosis y canchros con exudado de un líquido negro y llegando incluso a provocar la muerte de las plantas.

*En el marco del proyecto Control químico y biológico de patógenos de suelo causantes de enfermedades en árboles frutales en la provincia de Catamarca. Proyecto aprobado por la SECyT. UNCa. Años 2014-2017.

En Argentina están citadas *P. citrophthora*, (Fernández Valiela, 1978) y *P. cinnamomi*, (Alcoba *et al*, 2005), como patógenos en nogal. La primera causando pérdida de vigor, canchales en corona, cuello, marchitamiento y muerte de las plantas. *P. Cinnamomi*, en cambio, causa pudrición de las raíces con el consiguiente amarillamiento del follaje, defoliación y muerte. Las especies del género *Phytophthora* pueden ser detectadas y aisladas a partir de cualquier tejido infectado del hospedero, ya sea de raíces, frutos, semillas, hojas o canchales y también a partir de clamidosporas presentes en el suelo. (Agrios, 1978; Zentmyer, 1980; Tsao, 1983). Sin embargo, aislarlo de suelos infectados resulta muy difícil debido a la interferencia por antagonismo, rápido crecimiento de la microflora asociada y la lenta germinación de las clamidosporas.

Existen algunas técnicas que posibilitan superar estas dificultades para su aislamiento como el uso de trampas vegetales o cebos biológicos que permiten atrapar el hongo, el cual se aísla posteriormente en medios selectivos.

El objetivo de este trabajo es optimizar el método para la detección y aislamiento de *Phytophthora spp.* a partir de suelos de plantaciones de Nogal.

MATERIAL Y METODO

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *Phytophthora spp.* es agar harina de maíz con el agregado de Ampicilina, Rifampicina y PCNB (CMA+PAR). (Harina de Maíz: 20 g; Agar – Agar: 18 g; Ampicilina: 150 ppm; Rifampicina: 250 ppm y PCNB: 100 ppm). (Tsao y Ocana, 1969).

Toma de muestras

Para el aislamiento del hongo fitopatógeno se visitaron plantaciones de nogal donde se observaron plantas con los síntomas de la enfermedad. Posteriormente se tomaron muestras de suelo alrededor de las plantas próximas a la raíz. Además se extrajo tejido afectado de raíz y tallo.

Procesamiento en laboratorio

Muestras de suelo

Las muestras de suelo se tamizaron para separar las raicillas, luego se colocaron en vasos plásticos perforados y se saturaron con agua corriente. A partir de allí se siguieron varios procedimientos:

- a: Se dejó en reposo durante 24 horas sin ningún cebo.
- b: Se extrajeron cilindros de manzana de 4 mm de diámetro y aproximadamente 3 cm de largo que fueron enterrados en el suelo saturado hasta la mitad de su longitud, dejándolos en reposo durante 24 horas.
- c: Se cortaron círculos de hojas de palta de 5 mm de diámetro, que fueron colocados sobre el suelo en estudio y se dejaron en reposo 4 días. (Fig. 1).

*En el marco del proyecto Control químico y biológico de patógenos de suelo causantes de enfermedades en árboles frutales en la provincia de Catamarca. Proyecto aprobado por la SECyT. UNCa. Años 2014-2017.



FIGURA 1. a: Trampeo de *Phytophthora spp.* en suelo saturado b: Trampeo utilizando discos de hojas de palta.

Transcurridas las 24 horas para el procedimiento a: se tomaron 10 cm³ de del suelo de cada vaso que fueron llevados a 90 cm³ de agar- agua (0,25 %), agitándose enérgicamente. Luego fue sembrado 1 ml en placa de Petri con medio de cultivo CMA + APR. Las placas fueron incubadas en oscuridad por 72 horas a 27° C.

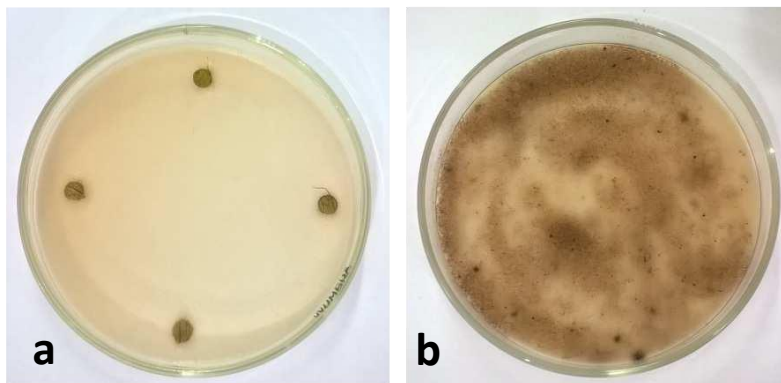


FIGURA 2. a: Siembra de hojas de palta en medio CMA, b: siembra de suspensión de suelo en medio CMA.

Para los procedimientos b y c se extrajeron los cebos (manzanas y hojas de palta) del suelo que fueron lavados con agua corriente, secados entre papel estéril, cortados en pequeños trozos y sembrados en placas con medio de cultivo selectivo CMA + APR. Se incubaron en oscuridad durante 48 horas a 27° C.

Muestras de tejido

Las muestras de tejido de cuello y tallo afectado y las raicillas extraídas de las muestras de suelo fueron desinfectadas con alcohol 70° y colocadas en medio de cultivo CMA + APR. Incubadas en oscuridad por 72 horas a 27° C.

Luego del tiempo de incubación todas las placas de Petri fueron observadas bajo la lupa estereoscópica y se realizaron preparados para la observación al microscopio óptico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron observaciones diarias bajo lupa estereoscópica de las placas de Petri sembradas con los diferentes métodos, constatándose la presencia de *Phytophthora* mediante el desarrollo de colonias con un patrón de crecimiento tipo tela de araña, confirmando el género mediante la

*En el marco del proyecto Control químico y biológico de patógenos de suelo causantes de enfermedades en árboles frutales en la provincia de Catamarca. Proyecto aprobado por la SECyT. UNCa. Años 2014-2017.

observación al microscopio de micelio cenocítico, la presencia de esporangios, estructuras sexuales y oósporas.

En todos los casos en que se sembró tejido afectado y raicillas de árboles sintomáticos, se evidenció el desarrollo del patógeno.

El desarrollo de *Phytophthora spp.* a partir de suelo (procedimiento a:), se observó a los 6 días de la siembra en el 5 % de las cajas. Cuando se utilizó manzana como cebo la visualización del hongo fue transcurridos 3 días a partir de la siembra, en el 20 % de las cajas analizadas. En las hojas de palta la detección del patógeno fue luego de 9 días en el 80 % de las placas sembradas, (Tabla 1).

	Tiempo de incubación (Días)	0	3	5	6	9	13
Detección de <i>Phytophthora</i> según método de aislamiento	Suelo	0	0	0	5	5	15
	Manzana	0	20	25	25	25	45
	Palta	0	0	0	0	80	80

TABLA 1: La tabla indica el porcentaje de cajas de Petri en las que se detectó *Phytophthora spp.*

Las técnicas expuestas en este trabajo han permitido obtener aislamientos positivos del patógeno. Los resultados difieren en los tiempos de desarrollo de las primeras colonias y la eficiencia de detección del método. El aislamiento de *Phytophthora spp.* por el método directo, a partir de tejido afectado no presenta dificultad, mientras que el aislamiento a partir de suelo no es un método sencillo ni eficaz, esto se ve reflejado en el porcentaje de presencia obtenido en los aislamientos de suelo (5%). La baja densidad de propágulos presentes en el suelo, sumada a la competencia existente con otros microorganismos explica este resultado. La mayor frecuencia del patógeno fue observada en la hoja de palta, lo que indica que este cebo es el más eficiente en la detección de *Phytophthora spp.* a partir de suelo. La utilización de la manzana posibilitó detectar con mayor rapidez al hongo patógeno.

De lo dicho anteriormente se desprende que la utilización de cebos permite simplificar la técnica y detectar el patógeno cuando éste no pudo observarse utilizando solo suelo, es menester realizar estudios sobre la densidad de propágulo y evaluar la capacidad de diferentes cebos para aislar a *Phytophthora spp.* del suelo.

BIBLIOGRAFIA

Agrios, G. Plant Pathology 2° Edition. 1978. 703 p.

Alcoba, N. J; Bejarano, N; Catacata, J. Enfermedades de los cultivos de Jujuy y Salta. Diagnosticadas en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNJu. 1ª Edición. Eds. Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy. Ediunju. San Salvador de Jujuy. 2005. 74 pp. ISBN 950-721-226-4.

Almaraz-Sánchez, Alejandra; Alvarado-Rosales, Dionicio; Saavedra-Romero, Luz de L. TRAMPEO DE *Phytophthora cinnamomi* EN BOSQUE DE ENCINO CON DOS ESPECIES ORNAMENTALES E INDUCCIÓN DE SU ESPORULACIÓN Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, vol. 19, núm. 1, enero-abril, 2013. 5- 12.

*En el marco del proyecto Control químico y biológico de patógenos de suelo causantes de enfermedades en árboles frutales en la provincia de Catamarca. Proyecto aprobado por la SECyT. UNCa. Años 2014-2017.

Alva, Javier J.; Mattos, L. Nuevo método para aislar *Phytophthora parasítica Datur*, de raicillas de limonero patrón Rugoso *Citrus jambhiri Lush* bajo riego por aspersión. *Universalía* (2006) 11 (1).

Fernandez Valiela. Introducción a la Fitopatología volumen III: Hongos. 3ª Edición. Colección Científica INTA. Buenos Aires. 1978. pg. 275

Hermoso, R. Sánchez, E. Trapero, A. bioensayo para la detección de *Phytophthora cinnamomi* en el suelo de rodales afectados por la seca de *Quercus*. Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Mansilla, J.P., Pintos, C., Salinero, M. C. Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* (Rands.) como patógeno de viña. 1993. *Bol. San. Veg. Plagas*, 19: 541-549.

Tsao. Factors affecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soil. In; Erewin, C. D., Barnicki-Garcia, S.; Tsao, P. H. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. USA, Minnesota, The American Phytopathological Society. 219- 253.

Tsao, P. H., Ocana, G. Selective isolation of species de *Phytophthora* from natural soils on improved antibiotic medium. 1969. *Nature (London)*. 223: 636-638.

Optimización de la técnica para la detección y el aislamiento de *Phytophthora* SP en Nogal / Ruth Kaen ... [et al.]. - 1ª edición para el profesor. - Catamarca : Editorial Científica Universitaria de la Universidad Nacional de Catamarca, 2015.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: online
ISBN 978-987-661-207-4

1. Ciencias Agrarias. I. Kaen, Ruth
CDD 630.7

ISBN 978-987-661-207-4



*En el marco del proyecto Control químico y biológico de patógenos de suelo causantes de enfermedades en árboles frutales en la provincia de Catamarca. Proyecto aprobado por la SECyT. UNCa. Años 2014-2017.

Universidad Nacional de Catamarca – Secretaría de Ciencia y Tecnología

Editorial Científica Universitaria

ISBN 978-987-661-207-4