

Podredumbre basal en plantas adultas de tabaco tapado causado por *Pythium aphanidermatum*

Basal rot in adult plants of capped tobacco caused by *Pythium aphanidermatum*

Daymara I. Vaillant Flores, Einar Martínez de La Parte y Rebeca Ramírez Ochoa

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5ta. B y 5ta. F, Playa, La Habana, emartinez@inisav.cu

RESUMEN

En la campaña tabacalera de 2016 se observaron plantas adultas de tabaco var. Criollo 98 con lesiones húmedas, que iban de las raíces a la base del tallo, a nivel de la línea del suelo. Además de las lesiones de color pardo oscuro en la base del tallo, las plantas afectadas mostraban una marchitez foliar acelerada, la cual ocasionaba la muerte de estas, pocos días después de aparecido los primeros síntomas. Con el objetivo de determinar el agente causal de esta patología, se tomaron muestras de raíces, base y zona superior del tallo con síntomas, las cuales fueron analizadas por los métodos de cámara húmeda y siembra en placas con PDA suplementado con sulfato de estreptomycin. Los aislados obtenidos se caracterizaron morfoculturalmente y se realizaron pruebas de patogenicidad para corroborar los postulados de Koch. Las características morfoculturales de los aislados permitieron identificarlos como *Pythium aphanidermatum*. Los ensayos in vivo mostraron que pasado los 10 días de inoculación, las plantas inoculadas desarrollaban síntomas similares a los detectados en campo. En ninguna de las muestras se logró aislar a *P. nicotianae*. En Cuba *P. aphanidermatum* está informado como uno de los patógenos comúnmente asociados a daños en semilleros de tabaco ocasionando damping off. Sin embargo, no se encuentran informes relacionados con su incidencia en campo afectando plantas adultas de tabaco.

Palabras claves: Oomycete, nicotiana, Criollo 98, *Phytophthora nicotianae*.

ABSTRACT

During the tobacco campaign of 2016, were detected adult plants of cv. Criollo 98 with wet dark brown lesions from roots to the stems base at soil level. Affected plants also showed an accelerated foliar wilt which caused its death few days after first symptoms occurred. In order to identify the causal agent of this symptomatology, roots and stem samples were taken and analyzed by the methods of blotter test and sowing in Petri's plates containing PDA supplemented with streptomycin sulphate. Obtained isolates were characterized and pathogenicity tests were conducted to fulfill Koch's postulates. Morpho-cultural characteristics allowed to identified the presence *Pythium aphanidermatum* in all of the samples analyzed. In vivo tests showed that from 10 dpi inoculated plants developed symptoms similar to those detected in the field. In none of the analyzed samples was possible to isolate *P. nicotianae*. In Cuba, *P. aphanidermatum* is reported as one of the pathogens commonly associated with Damping off in seedbeds of tobacco. However, reports related with its incidence in fields affecting adult plants were not found.

Key words: Oomycete, nicotiana, Criollo 98, *Phytophthora nicotianae*.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del tabaco es una de las actividades fundamentales de la agricultura no cañera cubana, especialmente por los ingresos a la economía nacional provenientes de la exportación (Fernández *et al.*, 2016; Domínguez *et al.*, 2018). En los últimos años la producción en el país de este importante rubro ha experimentado un crecimiento de 20 500 t en 2010 a 30 800 t en 2017 (FAO, 2019). Para mantener estos niveles de producción se requiere de una atención máxima durante todo el ciclo del cultivo, con el ob-

jetivo de obtener cosechas abundantes y conservar la exquisita calidad que caracteriza al tabaco cubano (Fernández *et al.*, 2012).

En la campaña tabacalera correspondiente a 2016 en campos de tabaco tapado de la variedad Criollo 98, pertenecientes a la Empresa de Acopio y Beneficio del Tabaco Lázaro Peña, del municipio de San Antonio de los Baños, provincia de Artemisa, se observaron plantas con manchas de color pardo oscuro en la base

del tallo, cercano a la línea del suelo. En ocasiones las plantas afectadas presentaban exudación en el área del tallo con pudrición. Además mostraban una marchitez foliar acelerada, la cual ocasionaba la muerte de estas, pocos días después de aparecido los primeros síntomas (*Fig.*). Esta sintomatología ocasionaba severos daños en varios de los campos de tabaco tapado que ponía en riesgo la producción de esa campaña con el consiguiente impacto

económico. Los síntomas eran muy similares a los descritos para la enfermedad conocida como pata prieta, causada por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Sin embargo, las raíces de las plantas afectadas no presentaban pudrición, y cuando se seccionó el tallo de las plantas afectadas no se observaron las agallas típicas asociadas a *P. nicotiane*. El objetivo del presente trabajo es identificar el agente causal de la sintomatología detectada.



Figura. Síntomas presentes en los campos afectados. A-plantas con marchitez (flechas) y B-Planta con pudrición en la base del tallo.

Figure. Symptoms present in affected fields. A-wilted plants(arrows) and B-Basal rot.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación

Se muestrearon varios campos afectados, colectándose plantas sintomáticas enteras, las cuales fueron trasladadas al laboratorio de micología del Departamento de Fitopatología del INISAV. Las muestras de raíces y tallos fueron lavados con abundante agua corriente y desinfectadas con hipoclorito de sodio (1 %). Secciones del tejido desinfectado fueron colocadas en cámaras húmedas, montadas en placas Petri de 15 cm de diámetro y se incubaron a temperatura ambiente con alternancia de luz y oscuridad. Simultáneamente, secciones de tejido sintomático desinfectado fueron colocadas en placas Petri de 9 cm de diámetro que

contenían Agar Papa Dextrosa (PDA) (39 g/L, Bio-Cen) suplementado con sulfato de estreptomina (100 µg/mL) para el aislamiento del agente causal de la sintomatología. Las placas fueron incubadas a 28 ± 2 °C, observadas cada 24 horas hasta que aparecieron las primeras colonias, las cuales fueron transferidas a nuevas placas y tubos con cuñas de PDA e incubados a 28 °C, 35 °C y 40 °C. Transcurridos siete días de incubación y a partir de las colonias obtenidas, se realizaron preparaciones microscópicas en una solución de azul de lactofenol (Merck Millipore), las cuales fueron examinadas en el microscopio óptico (Leica, 40x). Los aislados fueron caracterizados morfológicamente y se identificaron según los criterios taxonómicos descritos por Dick (1990) y Erwin y Riberiro (1996).

Pruebas de patogenicidad

Para cumplimentar los postulados de Koch, se realizaron pruebas de patogenicidad con los diferentes aislados obtenidos. Se realizaron inoculaciones en cinco plantas de tabaco, variedad Criollo 98, con crecimiento superior a los 15 cm. Las plantas se desinfectaron en la base del tallo, sumergiéndolas durante 3 min en etanol al 70 %. Luego se realizó en condiciones de asepsia un corte en la base del tallo, donde se introdujo un ponchete de 5 mm de diámetro con crecimiento del aislado en medio PDA. Los cortes fueron sellados con papel de parafilm (Parafilm M). Plantas a las cuales se les colocó un ponchete de agar sin crecimiento miceliar en la base del tallo fueron empleadas como control negativo. Todas las plantas fueron sembradas en macetas de 255 cm³, y se examinaron diariamente hasta que aparecieron los primeros síntomas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación

En las muestras colocadas en cámara húmeda y en las placas con PDA se desarrollaron colonias blanquecinas

de textura algodonosa. Se observó que los aislados obtenidos presentaban micelio cenocítico, con hifas hialinas, esporangios lobulados filamentosos, oogonios de tipo globosos y terminales, con un diámetro de 24 a 27 µm, con anteridios intercalados y con un anteridio por oogonio. Estas características coinciden con las descritas para el género *Pythium*.

En la literatura se informan varias especies de *Pythium* que afectan al tabaco en diferentes países: Liu (1976), Gayed (1979), Shah *et al.* (1984), Arnold (1986), Cartwright *et al.* (1995), Anderson *et al.* (1997), Sigobodhla *et al.* (2010), Corrêa *et al.* (2011), Gutiérrez *et al.* (2012), Khan y Haque (2013), Miao *et al.* (2014), Bian *et al.* (2016), Mufunda *et al.* (2017). Estas son *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. debaryanum*, *P. dissotocum*, *P. irregulare* Buisman, *P. myriotylum* Drechs., *P. oligandrum* Drechs., *P. recalcitrans*, *P. spinosum* Sawada, *P. splendens* H. Brun, *P. ultimum* Trow., *P. vexans* y *P. volutum*. Los caracteres taxonómicos distintivos de las especies más frecuentemente informadas se muestran en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Características morfológicas de las especies del género *Pythium* que causan podredumbre basal en tabaco (Dick, 1990; Mycobank, 2018)

Table 1. Morphological characteristics of *Pythium* species that cause tobacco basal rot (Dick, 1990; Mycobank, 2018)

Especies	Características morfológicas	Temperatura de crecimiento
<i>P. aphanidermatum</i>	-Homotalico -Micelio algodonoso, hifa de hasta 7,5 µm de ancho -Un anteridio por oogonio comúnmente intercalado -Oogonios lisos, usualmente terminales en hifas laterales de 19-29 µm	Crece a 35 °C
<i>P. dissotocum</i>	-Homotalico -Micelio sumergido con patrón radial, hifa de hasta 7 µm de ancho -Esporangios filamentosos con estructuras ligeramente hinchadas y dendroides -De 1 a 3 (-5) anteridio por oogonio -Oogonios terminales, intercalados o laterales, globosos, con (19-) 21-24 (-26) µm de diámetro	No crece a 35 °C
<i>P. irregulare</i>	-Homotalico -Micelio algodonoso con patrón radial y presencia de ensanchamiento hifal (<i>hiphal swelling</i>), globosos, ovales, limoniformes, terminales o intercalados, de hasta 25 µm de diámetro -Esporangios globosos, 10-20 µm de diámetro. -Uno o dos (hasta tres) anteridios por oogonio -Oogonios ornamentados irregulares de (15-)16-21 (-25) µm de diámetro	No crece a 35 °C

Tabla (cont.)

Especies	Características morfológicas	Temperatura de crecimiento
<i>P. myriotylum</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Homotalico -Micelio algodonoso -Esporangios filamentosos, terminales o intercalados, de longitudes variables, en su mayoría 7-17 μm de ancho -De 3 a 6 anteridio por oogonio intercalado y/o terminal -Oogonios terminales o intercalados, (sub)globosos de (20-) 26-32(-35) μm de diámetro -Oosporas apleróticas (18-)20-27(-29) μm de diámetro 	Crece a 40 °C
<i>P. oligandrum</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Homotalico -Esporangios forman agregados irregulares de elementos subglobosos con partes filamentosas que los conectan -Oogonios terminales o intercalados, ocasionalmente laterales, con (17-) 21-31 (-35) μm de diámetro, con protuberancias cónicas de 5-7 μm de largo -Anteridios por lo general ausentes, ocasionalmente 1 a 2 por oogonio -Oosporas apleróticas (14-) 18-27 (-33) μm de diámetro, con paredes de 1-2,8 μm de grosor 	Crece a 35 °C
<i>P. spinosum</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Homotalico -Micelio algodonoso con patrones radiales ligeros, hifa con 2,5-5 (-7) μm de ancho. Ensanchamiento hifal (<i>hiphal swelling</i>) que pueden ser globosos o limoniformes, terminales e intercalados, de hasta 25 μm de diámetro, de pared fina, lisa pero ocasionalmente con uno o dos protuberancias -No forma esporangios -Oogonios terminales o intercalados, globosos o fusiformes, (14-) 17-21 μm de diámetro, con ornamentaciones -Anteridios 1-3 por oogonio 	Crece a 35 °C
<i>P. splendens</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Heterotalico -Micelio algodonoso, hifa de hasta 9 μm de ancho. Ensanchamiento hifal abundante que pueden ser globosos, lisos, mayormente terminales o raramente intercalados, 25-43 (-49) μm de diámetro, con contenido oscuro y granular -Oogonios terminales o intercalados, globosos (24-) 27-32 (-38) μm de diámetro. -Anteridios terminales de 1-8 por oogonio 	No crece a 35 °C
<i>P. ultimum</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Homotalico -Micelio algodonoso con patrones radiales, hifa de hasta 11 μm de ancho. Ensanchamiento hifal globosos, intercalados, ocasionalmente terminales, de 20-25 (-29) μm de diámetro -No forma esporangios -Oogonios terminales, ocasionalmente intercalados, globosos, lisos (14-) 20-24 (-25) μm de diámetro con ornamentaciones. -Anteridios pueden ser de 1-3 por oogonio mayormente monoclinous o de 2-3 por oogonio, ya sean monoclinous o diclinous y frecuentemente rectos 	Crece a 35 °C
<i>P. volutum</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Micelio algodonoso con hifas de hasta 5,5 μm de ancho -Esporangios filamentosos, inflados, con pequeños lóbulos y crecimiento toruloide -Oogonios lisos, subglobosos, terminales en ramificaciones laterales cortas, ocasionalmente intercalados con un diámetro promedio de 30 μm -Anteridios 3-6 (-10) por oogonio 	No crece a 35 °C

Atendiendo a las características morfo culturales de los aislados y a que estos fueron capaces de crecer a temperaturas de 35 °C, estos se identificaron como *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.

En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de *P. nicotianae*. Los síntomas de la pudrición del tallo por *Pythium* pueden ser fácilmente confundidos con los descritos para la pata prieta causada por *P. nicotianae* (Mila, 2010), lo que puede conllevar a un diagnóstico de campo erróneo.

Pruebas de patogenicidad

En las plantas inoculadas los síntomas se desarrollaron a los siete días de inoculación. Inicialmente comenzaron a desarrollar en la base del tallo unas manchas de color pardas marrón, las cuales oscurecían con el tiempo. Posteriormente las hojas empezaron a mostrar síntomas de marchitez. En las raíces se observó un menor desarrollo de raíces secundarias respecto al testigo sano, lo que tuvo como consecuencia que el desarrollo de las plantas enfermas fuese inferior al de las plantas sanas. Estos síntomas se corresponden con lo observado en campo.

P. aphanidermatum por lo general se encuentra asociado a daños en plántulas de tabaco y otras solanáceas, ocasionando junto con otras especies del género, la enfermedad conocida como *damping off* (Liu, 1976; Gayed, 1979; Shah *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2012; Mufunda *et al.*, 2017). Sin embargo, Mila (2010) hace referencia a la presencia desde 1997 de afectaciones por *P. aphanidermatum* en plantas adultas de tabaco, cultivadas en Carolina del Norte, EE.UU., confundiendo en las primeras ocasiones con la pata prieta, causada por *P. nicotianae*. Esta autora refiere que la enfermedad puede estar asociada con otras especies de este género como *Pythium dissotocum*, la cual puede diferenciarse morfológicamente de *P. aphanidermatum*, ya que tiene los oogonios subglobosos, con un diámetro más pequeño, y presenta de uno a tres anteridios por oogonio. Además, *P. dissotocum* crece a temperaturas por debajo de los 35 °C (Mycobank, 2018). De igual forma, Antonopoulos y Mila (2011) refieren que la pudrición del tallo en plantas adultas de tabaco causado por *P. aphanidermatum* es una enfermedad que en los últimos diez años ha incrementado su incidencia en campos de Carolina del Norte.

En Cuba *P. aphanidermatum* se ha asociado con el *damping off*, causando daños en semilleros de tabaco

(García y Villalón, 2006). Asociado a esta patología también se ha informado en un nuestro país a *Pythium debaryanum* Hesse (Arnold, 1986). Sin embargo, la descripción original de esta especie realizada por Hesse estuvo basada en una mezcla de hongos, por lo que *P. debaryanum* ha sido reasignado a registros de diferentes *Pythium* spp., dentro de las que se incluye *P. ultimum* (Farr y Rossman, 2018), por lo que es difícil definir a cuál especie corresponde el registro de Arnold (1986). *P. ultimum*, especie informada en nuestro país afectando tomate pero no tabaco, puede diferenciarse de *P. aphanidermatum* porque no produce esporangios, pero sí ensanchamientos hifales globosos, intercalados, ocasionalmente terminales y oogonios de menor tamaño que los de *P. aphanidermatum* (Tabla 1).

A pesar de que el tabaco es un cultivo bien estudiado en nuestro país, los autores del presente trabajo no encontraron informes previos de la presencia de este patógeno afectando plantas adultas en campos cubanos de tabaco, por lo que consideramos que este trabajo puede constituir el primer informe para Cuba de la presencia de pudrición basal de plantas adultas de tabaco causada por *P. aphanidermatum*.

Las razones más argumentadas por diferentes autores sobre la aparición en el campo de la podredumbre basal causada por *Pythium* spp. se debe al trasplante de plántulas infectadas en semilleros que no desarrollan síntomas, y que una vez establecidas las condiciones en campo pueden acarrear la enfermedad, además de la alta probabilidad de los propágulos de sobrevivir en restos de cosecha y en hospedantes alternativos (Sigobodhla, 2010; Grijalba *et al.*, 2015), por lo que el manejo de esta patología debe ir dirigida al control eficiente de este patógeno en semilleros y la eliminación en los campos de los restos de cosecha y malezas, así como una adecuada preparación del suelo para la eliminación de los niveles de inóculo de este patógeno.

REFERENCIAS

- Anderson, M. G., Fortnum, B. A. y Martin, S. B., 1997. First report of *Pythium myriorylum* in tobacco float system in South Carolina. *Plant Disease*. 81, 227.
- Antonopoulos, D. F. y Mila, A. L., 2011. Susceptibility of stem and root tissues of tobacco cultivars carrying or not the *Ph* gene to *Pythium* stem rot, caused by *Pythium aphanidermatum*. *Crop Protection*. 30, 379-383.
- Arnold, G.R.W., 1986. Lista de Hongos Fitopatógenos de Cuba. Ministerio de Cultura: Editorial Científico-Técnica, 207 p.

- Bian, C., Zhao, S., Jang, K. y Kang, Y., 2016. First report of *Pythium recalcitrans* infecting flue-cured tobacco. *Australasian Plant Disease Notes*. 11,7.
- Cartwright, D. K., Spurr, H. W., Jr. y Shew, H. D., 1995. Commercial potting medium as the source of *Pythium* causing a disease on tobacco transplants. *Plant Disease*. 79, 538.
- Corrêa, A.S., Rocha, A.B., Willani, S.A., Dariva, J.M., Souza, M.V. y Moraes, M.G., 2011. Yellow stunt, a tobacco disease caused by *Pythium dissotocum*, in Southern parts of Brazil. *Plant Disease*. 95, 354.
- Dick, M.W., 1990. *Keys to Pythium*. UK: University of reading press, School of Plant Science, department of botany, 64 p.
- Domínguez, Y., Pérez-Álvarez, S., Magallanes-Tapia, M.A., Chávez-Medina, J.A., Héctor-Ardisana, E.F., 2018. Analysis of genetic polymorphism in wild *Nicotiana* species and Cuban cultivated tobacco (Solanaceae) through AFLP. *Biotechnol Apl*. 35, 2201-2205.
- Erwin, D.C. y Ribero, O.K., 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul, Minnesota, USA: APS Press, 562 p.
- Farr, D.F. y Rossman, A.Y., 2018. Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/index.cfm>. (enero, 2018).
- Fernández, A., Martínez, M. L., Ariosa, M. D. y Toledo, V., 2012. Detección y Prácticas de Manejo de la enfermedad Pata Prieta causada por *Phytophthora nicotianae* en el cultivo del Tabaco. *Agroecología*. 7, 73-80.
- Fernández, A., Fernández, R. R., Rivera, C. A. y Calero, S., 2016. Desafíos en la gestión de las cooperativas de producción agropecuaria tabacaleras de la provincia Pinar del Río, Cuba. *Agroalimentaria*. 22,119-132
- García, M. y Villalón, A., 2006. El cultivo sin suelo en la producción de plántulas de tabaco. *Cuba Tabaco*. 7, 47-51.
- Gayed, S. K., 1979. The effect of steam sterilization on three pathogenic fungi in tobacco seed beds in the greenhouse. *Lighter*. 49, 14-15
- Grijalba, P. E., Zapata, R.L., Palmucci, H. E. y Baron, C., 2015. Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 50, 11-15.
- Gutiérrez, W., Melton, T. y Mila, A., 2012. *Pythium* root rot in flue-cured tobacco seedlings produced in greenhouses: Factors associated with its occurrence and chemical control. Online Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2012-0925-01-RS.
- Khan, M. R. y Haque, Z., 2013. Morphological and biochemical responses of five tobacco cultivars to simultaneous infection with *Pythium aphanidermatum* and *Meloidogyne incognita*. *Phytopathologia Mediterranea*. 52, 98-109.
- Liu, C. F., 1976. The species and distribution of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum* causing damping-off of tobacco seedlings in Taiwan. *Chung Hua Chih-Wu Pao Hu Husueh Hui Plant Prot. Bull*. 18,199-206.
- Miao, P., Wang, H.T., Li, S.J. y Kang, Y.B., 2014. First report of two pathogenic fungi on tobacco in Henan Province. *Chinese Tobacco Science*. 2, 113-116.
- Mila, M., 2010. *Pythium* stem rot of tobacco—Field. Plant Disease Fact Sheets. North Carolina State University, EE.UU. https://projects.ncsu.edu/cals/plantpath/extension/clinic/fact_sheets/index.php?do=diseaseid=16. (febrero, 2016).
- Mycobank, 2018. Mycobank Database, Fungal database, nomenclature y species Banks. Disponible en: <http://www.mycobank.org> (enero, 2018).
- Mufunda, F., Muzhinji, N., Sigobodhla, T., Marunda, M., Chinheya, C. C. y Dimbi, S., 2017. Characterization of *Pythium* spp. associated with root rot of tobacco seedlings produced using the float tray system in Zimbabwe. *Journal of Phytopathology*. 165, 737-745.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2019. FAOSTAT database. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Marzo 2019).
- Shah, H. M., Patel, D. J., Makadia, B. M. y Patel, R. C., 1984. Efficacy of certain fungicides in control of damping-off disease in Bidi Tobacco Nursery caused by *Pythium aphanidermatum*. *Indian J. Mycol. Plant Pathol*. 12, 339-341.
- Sigobodhla, T. E., Dimbi, S. y Masuka, A. J., 2010. First Report of *Pythium myriotylum* Causing Root and Stem Rot on Tobacco in Zimbabwe. *Plant Disease*, 94, 1067.
- Wong, W., Llanos, Y. y Fernández, A., 1999. Potencial infeccioso del suelo: parámetros óptimos para el desarrollo de *Pythium aphanidermatum*. *Fitosanidad*. 3.49-52.

