

DETERMINACIÓN DE *Phytophthora nicotianae*, CAUSANTE DEL CANCRO DEL TALLO DE TOMATE EN CHILE

Identification of *Phytophthora nicotianae*, causal agent of tomato stem canker in Chile

Alicia Bruna V.^{1*} y Gloria Tobar C.¹

ABSTRACT

Tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) are the main vegetable crop in Chile, with 18,000 ha cultivated, 88% of which are located between the V and VII Regions. In the last five years, a disease has frequently appeared in these regions, characterized by damping-off, stem cankers, rotting and death of roots, and brown concentric spots on fruit, and death of plants. Studies conducted in 32 fields located between the V and VII regions, demonstrated the presence of pathogenic isolates of *Phytophthora nicotianae* associated with diseased plants. The fungus was identified by morphological and biological characteristics and pathogenicity tests on plants and fruit. The identification was confirmed by the International Mycological Institute (CABI Bioscience) of the United Kingdom, which classified this *Phytophthora* in group II and identified it as A2 *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. This constitutes the first report of this pathogen affecting tomatoes in Chile.

Key words: tomato, *Phytophthora nicotianae*, tomato stem canker, *Lycopersicon esculentum*.

RESUMEN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es la principal hortaliza cultivada en el país, con 18.000 ha de superficie, concentrándose el 88% de la superficie productiva entre las regiones V y VII. En los últimos cinco años se ha presentado frecuentemente en estas regiones una enfermedad consistente en caída de plántulas en almácigo, lesiones o canchros en los tallos, pudrición y muerte de raíces, frutos con manchas pardas concéntricas y muerte de plantas. Estudios realizados en 32 predios ubicados entre las regiones V y VII demostraron la presencia de aislados patogénicos de *Phytophthora nicotianae* asociados a estas plantas enfermas. El hongo fue identificado de acuerdo a las características morfológicas, biológicas y a pruebas de patogenicidad en plantas y frutos de tomate. La identificación fue confirmada por el International Mycological Institute (CABI Bioscience) del Reino Unido, quien la clasificó en el grupo II y la identificó como A2 *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Ésta constituye la primera identificación de este patógeno afectando tomates en Chile.

Palabras clave: tomate, *Phytophthora nicotianae*, cancro del tallo del tomate, *Lycopersicon esculentum*.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439, Correo 3. Santiago, Chile.
E-mail: abruna@platina.inia.cl *Autor para correspondencia.
Recibido: 02 de enero de 2003. Aceptado: 04 de abril de 2003.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es la principal hortaliza cultivada en el país, con 18.000 ha de superficie, desde la I hasta la X Región (INE, 1997). Las mayores superficies de producción se concentran entre las regiones V y VII, con un 88% del total nacional.

En los últimos cinco años se ha observado una enfermedad que se presenta en forma frecuente, causando diversas sintomatologías, según el estado fenológico de las plantas. Los síntomas consisten en caída de plántulas en almácigo, lesiones o canchales en los tallos (Figura 1), pudrición y muerte de raíces, frutos con manchas en círculos concéntricos pardos (Figura 2) y muerte de plantas. Se le ha encontrado afectando plantaciones al aire libre y en tomates de invernadero, entre las Regiones V y VII, principal zona de producción de esta hortaliza.

Esta enfermedad tiene dos períodos críticos de infección. El primero ocurre en tomates recién trasplantados, en que una alta proporción de las plantas presentan daño por canchales en el tallo, lo que está relacionado con los riegos abundantes requeridos en esa etapa para lograr la recuperación de las plantas sometidas a estrés hídrico. El segundo período crítico se produce cerca de la cosecha, cuando los frutos de tomate quedan en contacto con el suelo húmedo, y aparecen las manchas pardas concéntricas y la pudrición posterior de los frutos.

Hasta la fecha no existe un estudio sobre él o los agentes causales de esta enfermedad, atribuyéndose a *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* o *Rhizoctonia solani*. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estudiar la etiología del cancro del tallo y la pudrición de frutos en tomates.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos

Se colectaron plantas de tomate que mostraban síntomas característicos de canchales en los tallos y de manchas en los frutos, en 32 predios ubicados

entre la V y VII regiones, y se transportaron en bolsas de papel al Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación La Platina, Santiago. Trozos de tallos y raíces seleccionados de la zona de avance de las lesiones se lavaron sumergiéndolos por una hora en agua corriente, luego se cortaron en segmentos de 1 a 3 mm y se colocaron en placas Petri en medio de agar harina de maíz (AHM) que contenía 17 g de agar harina de maíz (Difco, EE.UU.), 150 mg de ampicilina, 10 mg de piramicina, y 10 mg de benomilo. Además, se usó el medio agar-papa-dextrosa (APD) (Becton Dickinson, EE.UU.)

Los aislamientos se mantuvieron en estufa de cultivo a 24°C, y una vez que empezaron a aparecer las colonias del hongo se reaislaron a los medios AHM y APD. Los aislamientos a partir de los frutos infectados se realizaron desinfectando superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,1% y luego sembrando los trozos en AHM y APD.

Identificación

Los aislamientos se identificaron sobre la base de la morfología de las colonias, las características del micelio, morfología y medidas de los esporangios, y efecto de temperaturas cardinales. Para la formación de esporangios se colocaron cilindros de AHM con micelio del hongo en un extracto de suelo sin esterilizar, bajo luz continua a 20°C por 48 h. Los esporangios formados se fijaron posteriormente con lacto-fucsina para su observación en microscopio óptico.

Los diferentes aislamientos se colocaron en placas Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo 15 mL de medio APD, y se incubaron a 37 ± 0,5°C en oscuridad durante 96 h. A continuación se midió el crecimiento radial del micelio.

Pruebas de patogenicidad

Se eligieron cinco aislamientos representativos del hongo en estudio y se colocaron en medio de cultivo APD, incubándose por ocho días a 24°C. Posteriormente, los cultivos del hongo se sumergieron en agua destilada estéril por 24 a 48 h para la producción de esporangios y zoosporas. Se utilizó una suspensión de 500 zoosporangios mL⁻¹.

El material vegetal a inocular consistió en plántulas de tomate con 3 a 4 hojas verdaderas, cultivadas en invernadero en suelo esterilizado con bromuro de metilo, y en frutos de tomate sometidos a tres métodos diferentes de inoculación:

1) Se colocó un cilindro de agar con aproximadamente 500 zoosporangios en el cuello de las plántulas; se cubrió con algodón saturado en agua destilada y se colocaron en cámara húmeda a temperatura ambiente por 15 días.

2) Se prepararon tubos de ensayo con una suspensión de 5.000 esporangios por 10 mL de agua destilada estéril, y allí se colocaron las plántulas de tomate con tres hojas verdaderas, cubriendo posteriormente el tubo con papel aluminio para evitar que llegara luz a las raíces. Las raíces y la parte basal del cuello quedaron en contacto con la suspensión del hongo. Se dejó a temperatura ambiente por 15 días.

3) Frutos de tomate con grado de madurez comercial se desinfectaron superficialmente con agua y detergente, posteriormente se lavaron con agua destilada, y se inocularon con cilindros de APD con 500 zoosporangios, que se colocaron en contacto con la superficie del fruto. Se inocularon cuatro frutos por aislamiento y se dejaron cuatro frutos como testigo. Se incubaron por siete días a 20°C en cámaras húmedas.

El hongo se reisoló de las plántulas y frutos de tomate inoculados, y se siguió el mismo procedimiento de identificación anteriormente descrito.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación

En medio APD las colonias del hongo eran blancas, de contornos circulares y con crecimiento aracnoide; en medio AHM las colonias eran transparentes y de contornos lobulados. Los esporangios presentaron papilas prominentes, generalmente unipapilados, rara vez con dos papilas. Los esporangios se caracterizaron por tener forma esférica a piriforme (Figura 3), con un pedicelo muy corto, difícil de observar al microscopio. Las dimensiones de éstos variaron

entre 32 a 52 μm de largo por 20 a 28 μm de ancho; el promedio de 100 esporangios fue de 38,5 μm de largo y 25,7 μm de ancho.

Todos los aislamientos mostraron un crecimiento miceliar a 37°C. La medición del crecimiento radial varió entre 4,7 a 8,1 mm en 96 h de oscuridad. Estas características morfológicas y la temperatura cardinal concuerdan con las descripciones dadas en la literatura para la especie *P. nicotianae* Breda de Haan (Newhook *et al.*, 1978; Stamps *et al.*, 1990; Hall, 1994).

Pruebas de patogenicidad

Los dos métodos de inoculación efectuados en plántulas de tomate fueron efectivos, causando lesiones pardas en el cuello de las plántulas, estrangulamiento, pudrición de raíces, y finalmente muerte de plántulas entre los 7 y 15 días después de la inoculación (Figura 4). En el caso de los frutos de tomate inoculados, aparecieron lesiones pardas de tipo concéntrico alrededor del sitio de inoculación, las que fueron agrandándose y terminaron con pudrición generalizada. Las plantas y frutos testigo permanecieron sanos. Los síntomas obtenidos en plántulas y frutos fueron idénticos a aquellos presentados por plantas infectadas en forma natural, y el reaislamiento del mismo hongo utilizado en la inoculación permitió satisfacer los postulados de Koch, indicando que *P. nicotianae* Breda de Haan es el agente causal del cancro del tallo del tomate.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio prueban que el agente causal del cancro del tallo y la pudrición parda de los frutos de tomate es *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan. Esta denominación no es aceptada por todos los autores y ha suscitado algunas controversias.

Tucker (1931) propuso el nombre *P. parasitica* para todos los aislados de *Phytophthora* que se caracterizan por el tipo de crecimiento en medio de cultivo, la papila de los esporocitos, la abundancia de clamidosporas en medio de cultivo, la posición anfígena del anteridio, y la capacidad de crecer a 35°C en medio de cultivo. Este mismo

autor propuso que todos los aislados de *P. parasitica* que afecten a plantas jóvenes o adultas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) sean denominadas *P. parasitica* var. *nicotianae*, nomenclatura admitida por Gooding y Lucas (1959), Savage *et al.* (1968) y Tsao (1969).

Sin embargo, esta clasificación no fue aceptada por Waterhouse (1963), quien denominó a esta

especie *P. nicotianae* y la subdividió en dos variedades: var. *nicotianae* y var. *parasitica*. Posteriormente, Hall (1994) indicó que no hay evidencia suficiente para la separación de esta especie en dos variedades, y que no hay correlación entre morfología (o nombre) y patogenicidad. Actualmente se ha adoptado el nombre de *P. nicotianae* de acuerdo a las indicaciones del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN).



Figura 1. Síntomas de cancro del tallo en planta de tomate.

Figure 1. Symptoms of stem canker on a tomato plant.



Figura 2. Fruto de tomate con manchas circulares concéntricas de color pardo.

Figure 2. Brown concentric spots on tomato fruit.

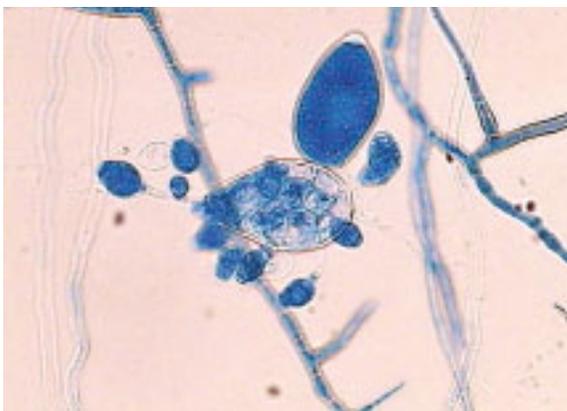


Figura 3. Esporangios y zoosporas de *Phytophthora nicotianae*.

Figure 3. Sporangia and zoospores of *Phytophthora nicotianae*.



Figura 4. Inoculación artificial de plántula de tomate con *Phytophthora nicotianae*. La planta de la derecha no fue inoculada.

Figure 4. Artificial inoculation of tomato plant with *Phytophthora nicotianae*. The plant at right side was not inoculated.

Esta identificación fue confirmada por el International Mycological Institute (CABI Bioscience) del Reino Unido, que agrega los siguientes criterios de identificación: la presencia de esporangios papilados y anteridios anfigenos colocan a este aislado en el grupo II (Stamps *et al.*, 1990) y se identifica como A2 *Phytophthora nicotianae* (sinónimo *P. parasitica*). Se ha inscrito con el N° de registro 379626 del IMI (International Mycological Institute).

CONCLUSIÓN

Las características morfológicas, biológicas y las pruebas de patogenicidad realizadas en plantas y frutos de tomate permiten concluir que el hongo descrito corresponde a la especie *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, causante del cancro del tallo de tomate. La identificación fue confirmada por el International Mycological Institute (CABI Bioscience) del Reino Unido. Este trabajo constituye la primera determinación de esta especie en tomate en Chile.

LITERATURA CITADA

- Gooding, G.V., and G. Lucas. 1959. Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 49:277-281.
- INE. 1997. VI Censo Nacional Agropecuario p. 253-308. Instituto Nacional de Estadística (INE), Santiago, Chile.
- Hall, G. 1994. *Phytophthora nicotianae*. IMI (Internacional Mycological Institute) Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 1200. *Mycopathologia* 126:61-63.
- Newhook, F.J., G.M. Waterhouse, and D.J. Stamps. 1978. Tabular keys to the species of *Phytophthora* de Bary. 20 p. *Mycol. Pap.* 143. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Savage, E.J., C.W. Clayton, J.H. Hunter, J.A. Brenneman, C. Laviola, and M.E. Gallegly. 1968. Homothallism, heterothallism and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology* 58:1004-1021.
- Stamps, D.J., G.M. Waterhouse, F.J. Newhook, and G.S. Hall. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. 28 p. *Mycelia. Papers* 162. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Tsao, P.H. 1969. Studies on the saprophytic behavior of *Phytophthora parasitica* in soil. In H.D. Chapman (ed.) *Proc. First Intern Citrus Symp.* 3:1221-1230.
- Tucker, C.M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. 208 p. *Res. Bull.* 153. Missouri Agric. Exp. Sta., Missouri, U.S.A.
- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycol. Papers* 92:1-22.
- Waterhouse, G.M., F.J. Newhook, and D.J. Stamps. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora*. p. 139-147. In D.G. Erwin, S. Bartniki-García, P.H. Tsao (eds.). *Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology*. *Ann. Phytopathol. Soc.*, Saint Paul, Minnesota, USA.