

PRIMER REPORTE DE *STEMPHYLIUM SOLANI* EN LISIANTUS

Luis Cedeño¹, Chrystian Carrero¹, Romina Ruíz², Gustavo Fermín², Henry Pino¹ y Kleyra Quintero¹

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Los Andes (ULA), Santa Rosa, Mérida; ²Laboratorio de Biodiversidad y Variabilidad Molecular del Instituto Jardín Botánico de Mérida, Facultad de Ciencias, ULA, Mérida. Venezuela. E-mail: cedenol@ula.ve.

Recibido: 11 de septiembre de 2011.

Aceptado: 30 de noviembre de 2011.

RESUMEN

Cedeño, L., Carrero, C., Ruíz, R., Fermín, G., Pino, H. y Quintero, K. Primer reporte de *Stemphylium solani* en Lisiantus. Fitopatol. Venez. 24:38-41.

Se determinó que *Stemphylium solani* Wollr. fue el agente causal de la enfermedad de quema foliar observada en plantas de lisiantus (*Eustoma grandiflorum*) cultivadas durante 2009 y 2010 en invernaderos localizados en distintos sectores de Mérida, estado Mérida, Venezuela. La identificación del patógeno se hizo sobre la base de la morfología, las dimensiones y el radio largo/ancho de las conidias. Adicionalmente, su identidad fue confirmada molecularmente por secuenciación de la región nuclear ITS1-5.8S RNA-ITS2. Este es el primer reporte formal de *Stemphylium* infectando Lisiantus.

ABSTRACT

Cedeño, L., Carrero, C., Ruíz, R., Fermín, G., Pino, H. and Quintero, K. First report of *Stemphylium solani* in Lisiantus. Fitopatol. Venez. 24:38-41.

It was established that *Stemphylium solani* Wollr. was the causal agent of a foliar blight disease observed on lisianthus plants (*Eustoma grandiflorum*) grown during 2009 and 2010 under greenhouse conditions at different locations of Mérida, Mérida State, Venezuela. The identification of the pathogen was based on morphology, size and length/width ratio of the conidia; additionally, its identity was molecularly confirmed by sequencing of the ITS1-5.8S RNA-ITS2 nuclear region. This is the first formal report of *S. solani* infecting Lisianthus.

INTRODUCCIÓN

La floricultura, desde hace aproximadamente seis años, se ha convertido en una actividad de destacado impacto económico en la región andina de Venezuela, particularmente en el estado Mérida. Esta escalada ha sido posible por la introducción de materiales exóticos que incluyen a las astromelias, gerberas, lisiantus, lirios y helechos hoja de cuero, entre otros, destinados a la producción de flor cortada y follaje verde. Por razones históricas conviene señalar que en las floristerías y mercados de la referida entidad, actualmente resulta difícil conseguir los claveles que por muchos años matizaron con sus vívidos colores diversos sectores de los páramos andinos. El deterioro del cultivo se hizo patente por los efectos de las enfermedades de fusariosis y roya, las cuales constituyen serios factores limitantes del cultivo.

En el estado Mérida, la mayor producción de flores está concentrada en los municipios Miranda y Rivas Dávila, donde el lisiantus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinnery) se cultiva exclusivamente en invernaderos destinados a la producción de flor cortada.

Las primeras pruebas de introducción del lisiantus se hicieron en el 2002 cuando a campo abierto se sembró un material proveniente de EE.UU. Esta iniciativa fracasó por la ocurrencia de enfermedades cuyas causas no fueron identificadas y, principalmente, por desconocimiento de las exigencias agronómicas del cultivo. Más tarde, en el año 2005, se realizaron nuevos intentos de producción bajo sistemas de cobertura y los resultados obtenidos fueron tan promisorios que los floricultores se sintieron satisfechos con la rentabilidad del cultivo como flor cortada. El incentivo fue tal que para 2007 la superficie cultivada en Mérida se incrementó significativamente. Actualmente la producción comercial de lisiantus está distribuida en los municipios Libertador (Urbanización Los Corrales), Rivas Dávila

(Bailadores), Campo Elías (Palo Negro-vía Jají), Santos Marquina (Loma de Los Ángeles) y Miranda (Timotes). Además, es interesante señalar que algunos floricultores de San Antonio de Los Altos, Edo. Miranda, también han decidido involucrarse en la producción de lisiantus.

Desde que esta planta ornamental fue introducida a los Andes venezolanos, se han venido investigando y reportando importantes daños causados por *Colletotrichum acutatum* (3), *Botrytis cinerea* (5) y *Leveillula (Oidiopsis) taurica* (4).

Durante cuatro épocas distintas de dos años consecutivos (2009 - 2010), un productor regional de flores consignó ante el Instituto de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad de Los Andes, plantas enfermas de lisiantus cultivadas en invernaderos construidos en sectores de "Los Corrales" y "Loma de Pueblo", pertenecientes, a los municipios Libertador y Santos Marquina del estado Mérida, respectivamente. En general, las plantas mostraban quema en las hojas y los botones florales y lesiones hundidas en los entrenudos del tallo. Cuando la lesión alcanzó a estrangular el tallo, todos los tejidos situados por arriba del área afectada, primeramente se marchitan y luego mueren adquiriendo aspecto de quemado (Fig. 1). Sobre las lesiones frecuentemente se observaron las estructuras reproductivas asexuales (conidióforos y conidias) típicas de las especies de hongos que pertenecen al género fúngico *Stemphylium*.

El presente trabajo tuvo como objetivo fundamental identificar al agente causal de la enfermedad mediante análisis tradicionales y moleculares y comprobar su patogenicidad experimentalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del patógeno. Los aislamientos se realizaron en placas que contenían agar agua acidificado

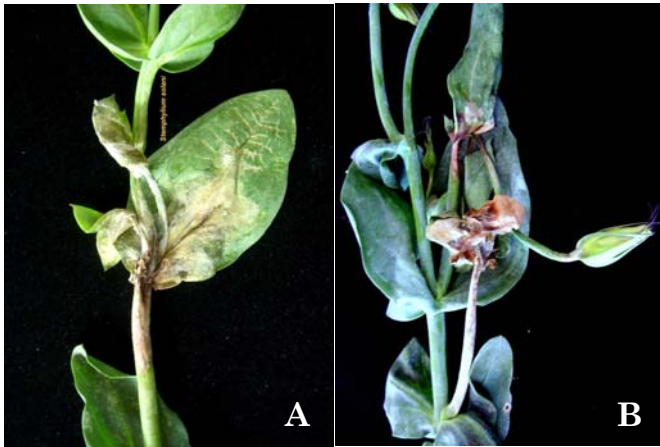


Figura 1. Quemadura foliar causada por *Stemphylium solani* en lisianthus. A: síntomas iniciales; B: síntomas avanzados.

con ácido láctico al 50% (AAA, pH 4,5), a partir de plantas que un productor local de flores consignó para diagnóstico en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP-ULA), localizada en el sector Santa Rosa del estado Mérida. Del margen de las lesiones se cortaron pequeños fragmentos de tejido infectado que fueron secuencialmente sumergidos por 1 min en solución 0,5% de hipoclorito de sodio (NaClO), lavados en tres cambios de agua destilada esterilizada (ADE), secados con papel absorbente esterilizado y sembrados asépticamente en AAA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y 12 h de fotoperiodo. Las colonias emergentes se transfirieron a placas que contenían medios preparados con papa-dextrosa agar (PDA) y alimento para conejos agar (APCA, conejarina), para posteriormente obtener de uno de ellos los cultivos monoconidiales que serían empleados en las pruebas tradicionales y moleculares a ejecutar para determinar la identidad del patógeno. La identificación tradicional se realizó sobre la base de la morfología, tamaño y radio largo/ancho de las conidias (17), mientras que la molecular se hizo por secuenciación de un producto de amplificación diagnóstico. El APCA se preparó cocinando 50g de alimento para conejos en 500 mL de agua destilada (AD) durante 30 min, filtrando la suspensión y disolviendo en ella 20g de agar, y adicionando más AD hasta completar 1000mL de medio que se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121°C y 15 lbs.pulg². Los cultivos monoconidiales se obtuvieron a partir de un cultivo masal en PDA de donde se cosecharon conidias utilizando una aguja de disección esterilizada. Las conidias se depositaron en el centro de una cápsula de Petri esterilizada donde previamente se había dispensado 1 ml de ADE, procediendo inmediatamente a dispersar la suspensión con una varilla de vidrio esterilizada. El título de la suspensión se determinó colocando una gota de 10 μl en una cámara de Neubauer que permite conteos por duplicado. Luego se contaron los conidios en cinco cuadrantes y se determinó el valor promedio que fue multiplicado por 1×10^4 para estimar la concentración de conidios/ml. De la suspensión se tomó un volumen que tuviera aproximadamente 100 conidios y se mezcló con 300 μl ADE. La preparación se depositó en el centro de placas de Petri que contenían PDA, e inmediatamente fue dispersada con una varilla de vidrio sin dejarla secar. Las placas se incubaron invertidas por 2d a temperatura ambiente ($22 \pm$

2°C) y 12h de fotoperiodo. Los monocultivos emergentes se transfirieron a tubos que contenían cuñas de PDA+ 15 μg /ml de cloranfenicol y posteriormente se conservaron bajo refrigeración.

Identificación molecular del patógeno. De colonias producidas en placas con PDA se cosechó la mayor cantidad posible de micelio e inmediatamente fue transferido a un tubo de micro centrífuga de 1,5 ml el cual contenía 70 μl de solución R (100 mM NaCl, 10 mM de tris-Cl pH 7,5, 1 mM EDTA y 1 % SDS). Seguidamente el tubo fue colocado por 15 minutos en baño de María a 95°C , y posteriormente incubado durante 5 min en hielo (11). A la preparación se le agregaron 100 μl de cloroformo y después de agitarla fue centrifugada a máxima velocidad durante 2 min. El sobrenadante fue recuperado y mezclado con un volumen de isopropanol 100 %, procediendo luego a centrifugar a la misma velocidad durante 5 min. Al pellet se le adicionó un volumen de etanol 70 % e inmediatamente se procedió a centrifugar por 1 min a máxima velocidad. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min y posteriormente el ADN fue resuspendido en 20 μl de ADE (14). La concentración y calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, el cual contenía 50 μg /ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó durante 30 min a 100 V. El buffer utilizado para preparar el gel y realizar la corrida fue el TAE 1X (40 mM de Tris-Acetato y 1 mM de EDTA (14). Para la visualización del ADN total se usó un transiluminador UV y el registro fotográfico se hizo con una cámara fotográfica digital Hp Photosmart R717. Para la identificación del patógeno en estudio se realizó la amplificación por PCR de la región que abarca el primer espaciador interno (ITS1), el gen ARNr 5.8S completo y el segundo espaciador (ITS2), para lo cual se emplearon los cebadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (15) en una mezcla de reacción de 20 μl con los mencionados cebadores empleando la GoTaq[®] Green Master Mix, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (Promega, Madison, WI). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720 con el siguiente programa de ciclos de amplificación: una desnaturalización inicial a 94°C por 120 seg, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, anillamiento a 53°C por 60 seg y extensión a 72°C por 90 seg, luego de lo cual se permitió la finalización de la reacción con un paso de extensión final a 72°C por 5 min. Los fragmentos amplificados se observaron nítidamente en una electroforesis horizontal llevada a cabo como se señaló anteriormente. Para secuenciar el fragmento de interés se procedió a precipitar el amplificado con sales y etanol (14), el cual se envió a secuenciar por ambas bandas en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y editadas con el programa BioEdit (9), para posteriormente compararlas con las secuencias disponibles en la base de datos de dominio público GeneBank mediante la aplicación del programa BLAST (18).

Pruebas de patogenicidad. Se utilizaron cuatro tallos de plantas sanas: tres se inocularon con el hongo bajo estudio y el restante fue usado como control referencial (testigo). En cada tallo, previamente desinfectado con alcohol isopropílico 70 %, lavado con ADE y herido mediante raspado con bisturí esterilizado, se inocularon los 4 entrenudos más jóvenes aplicando discos-micelio de 0,9 cm de diámetro cortados de colonias crecidas por 5 d en APCA. En el tallo

testigo se aplicaron discos de APCA sin el hongo. Seguidamente los discos se fijaron con cinta Parafilm®. Las plantas se incubaron en condiciones de cámara húmeda utilizando bolsas de plástico transparente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación del patógeno. A partir de los materiales enfermos que fueron procesados en distintas épocas de los años 2009 y 2010, consistentemente se aisló un hongo del género *Stemphylium* que en PDA únicamente produjo micelio, esporuló abundantemente en APCA y moderadamente sobre fragmentos de tallo de *lisanthus* incluidos en AAA. Sin embargo, es importante señalar que las colonias producidas en APCA pierden rápidamente la habilidad de fructificar en este mismo sustrato. Las estructuras reproductivas asexuales producidas *in vitro* fueron similares a las observadas sobre las lesiones resultantes de infecciones naturales. Las conidias formadas *in situ* midieron 46,6-(50,4)-54,2 µm de largo x 13,0-(15,7)-18,0 µm de ancho, con un promedio para el radio largo/ancho de 3,2. En APCA las conidias midieron 42,5-(49,4)-56,2 µm x 12,5-(13,7)-15,0 µm, con un promedio para el radio largo/ancho de 3,6 µm (Fig. 2).

En términos de la identificación molecular del patógeno, el método empleado para la purificación de ácidos nucleicos fue eficiente, permitiendo la obtención exitosa de templados para la amplificación por PCR, el cual una vez llevado a cabo, permitió observar de manera reproducible la banda esperada, de aproximadamente 540 pb. Como control de amplificación se utilizó ADN genómico extraído de *Lasiodiplodia theobromae*, el cual fue sometido a las mismas condiciones de amplificación que la muestra problema. Ambos productos de amplificación pueden ser observados en la Fig. 3. La secuenciación de los amplicones permitió la identificación del patógeno bajo estudio mediante un BLAST que arrojó un 99% de máxima identidad (100% de cobertura) con la secuencia reportada para *Stemphylium solani*.

Según la base de datos *fungus-host* publicada por Micología Sistemática y Laboratorio de Microbiología (7), en Venezuela no existen registros previos de infecciones causadas por *S. solani* pero existen reportes sobre *S. lycopersici*, *S. vesicarium* y especies no determinadas (desconocidas) del mismo género en distintos hospedadores. Sin embargo, hay que señalar que la información anterior no es totalmente cierta porque desconoce que en 1997 Cedeño y Carrero (2) reportaron a *S. solani* como causa de daños severos en tomate cultivado en el estado Mérida, Venezuela. Igualmente, Palacios et al. (13) y Smith y Palacios (16), identificaron a *S. botryosum* Wallr. como patógeno de *Zinnia elegans* Jacq. y *Dalia pinnata* Cav., respectivamente.

Pruebas de patogenicidad. Todos los tallos que se inocularon experimentalmente desarrollaron lesiones similares a las observadas en plantas infectadas naturalmente. A los 4 días después de la inoculación (ddi), en todos los tallos inoculados se apreció que los tejidos estaban ligeramente deprimidos e invadidos por micelio proveniente de los discos aplicados como inóculo. Hasta aproximadamente 0,5 cm por encima y por debajo del sitio de aplicación del inóculo, los tejidos mostraban decoloración marrón-claro. Posteriormente a los 11ddi, las lesiones habían



Fig. 3. *Stemphylium solani*. A: Conidióforo con conidio en desarrollo. B: conidio con tubo germinativo.

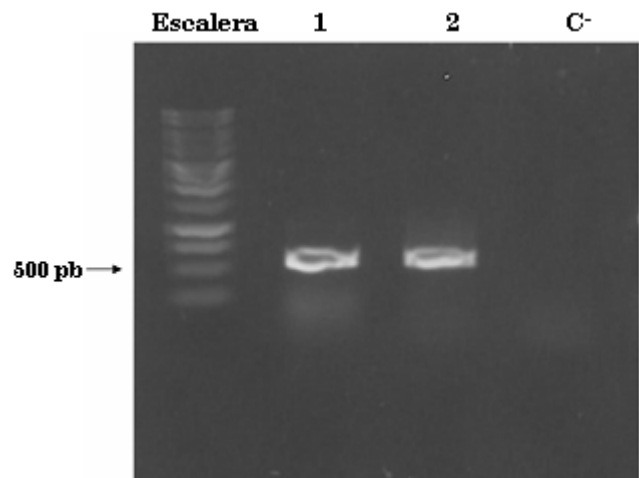


Fig. 3. Productos de amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 empleando ADN genómico del posteriormente identificado *Stemphylium solani* (1), y *Lasiodiplodia theobromae* (2). El control negativo (C-) contenía todos los componentes de la mezcla de reacción, pero sin ADN y la escalera de peso molecular empleada fue la escalera de 1 kb de Promega (Madison, MI).

alcanzado una longitud de aproximadamente 1,2 cm por debajo y por arriba del sitio de aplicación del inóculo. Durante el lapso de duración de la prueba, las plantas testigos se mantuvieron libres de síntomas. Los aislamientos realizados de los tejidos infectados artificialmente presentaron las mismas características del hongo inoculado, lo que permitió confirmar el cumplimiento de los postulados de Koch. Aparentemente, esta es la primera vez que *E. grandiflorum* es señalado como hospedador natural de *S. solani*, ya que en la literatura especializada consultada (1,7, 8,10), no aparece ningún registro que indique lo contrario.

S. solani es ampliamente reconocido como un importante patógeno del tomate (*Solanum lycopersicon*), especie en la cual ocasiona la enfermedad comúnmente identificada con los términos “Mancha gris” y “Quema foliar”. Sin embargo, también produce la misma patología en berenjena, pimentón y otras especies solanáceas (10). Pruebas moleculares han revelado variaciones genéticas en aislados de *S. solani* provenientes de distintos hospedadores. Por ejemplo, Mehta (12), reportó que en Brasil el genotipo del *S. solani* que ataca el algodón es distinto al que enferma el tomate. Las conidias de los aislados obtenidos del algodón fueron más cortas y menos largas que las correspondientes a los aislados de tomate, y además, sus paredes se mostraron lisas.

En lo que respecta al presente estudio, el radio largo/ ancho de las conidias producidas tanto *in situ* como *in vitro*, fue mayor que el registrado en el reporte original de la especie (6,17). Lo anterior es atribuible al hecho de que en ambas condiciones el grosor de las conidias se ubicó por debajo del rango oficialmente aceptado, mientras que la longitud no presentó variaciones. En la investigación ejecutada por Mehta (12), también se detectaron variaciones genéticas y morfométricas.

LITERATURA CITADA

- Alfieri, Jr., S.A., Langdon, K.R., Kimbrough, J.W., El-Gholl, N.E., and Wehburg, C. 1994. Disease and disorders of plants in Florida. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, Florida. 1114 pp.
- Cedeño, L. y Carrero, C. 1997. First report of tomato gray leaf spot caused by *Stemphylium solani* in the Andes region of Venezuela. *Plant Dis.* 81: 1332.
- Cedeño, L., Briceño, A., Fermin, G., Domínguez, I., Pino, H. y Quintero, K. 2007. First record of *Colletotrichum acutatum* on lisanthus (*Eustoma grandiflorum*). *Fitopatol. Venez.* 20: 41-43.
- Cedeño, L., Rodríguez, L. A. y Quintero, K. 2009. Primer reporte en Venezuela de mildiú polvoriento causado por *Leveillula (Oidiopsis) taurica* en lisiantus. *Fitopatol. Venez.* 22: 23-24.
- Domínguez I., Cedeño, L., Briceño, A., Pino H. y Rodríguez, L. 2008. Primer reporte para Venezuela sobre quema foliar causada por *Botrytis cinerea* en lisiantus (*Eustoma grandiflorum*). *Rev. For. Ven.* 52: 173-176.
- Ellis, M. B. 1971. Deamtiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608 pp.
- Farr, D., and Rossman, A. 2010. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Obtenido de <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> en septiembre 16, 2010.
- Farr, D., Bills, G.F., Chamuris, G.P., and Rossman, A.Y. 1989. Fungi on plants and plants products in the United States. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 1252 pp.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Horst, R.K. 2001. Westcott's plant disease handbook. Kluwer Academic Publishers, Sixth Edition. Boston, Dorscht, London. 1008 pp.
- Ma, Z., and Michailides, T. 2002. A PCR-based technique for identification of *Fusicoccum* sp. from pistachio and various other hosts in California. *Plant Dis.* 86: 515-520.
- Mehta, Y.R. 2001. Genetic diversity among isolates of *Stemphylium solani* from cotton. *Fitopatol. Bras.* 26: 703.709.
- Palacios, M., Smiths B., G. y Noguera, R. 1991. Presencia e influencia de algunos hongos patógenos en cultivos de *Zinnia elegans* Jacq. en la región central de Venezuela. *Agron. Trop.* 41: 237-244.
- Sambrook, J., and Russell, D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 999 pp.
- Slippers, B., Johnson, G., and Crous, P. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycology* 97:99-110.
- Smiths B., G. y Palacios, M. 1999. Enfermedades fúngicas del cultivo de la dalia (*Dalia pinnata* Cav.) en la región central de Venezuela. *Agron. Trop.* 49: 339-248.
- Weber, G.F. 1930. Leafspot of tomato caused by *Stemphylium solani* sp. nov. *Phytopathol.* 20: 513-518.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7:203-14.