

Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos del tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de montaña.

Isolation and identification of phytopatogen fungi of the tomato (*Solanum lycopersicum*) under mountain conditions.

Autores: Lic. Noryaysi Abreu-Romero, MSc. Irliadis Urgelles-Cardoza, MSc. Amaury Díaz-Rodríguez, Lic. Arley Abreu-Romero, Tec. Deilys Herrera-Gómez

Organismo: Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz. El Salvador, Guantánamo, Cuba.

E-mail: noryaisi@cdm.qtmo.inf.cu

Resumen.

La producción agrícola en Cuba es afectada por la prevalencia de ciertas plagas; la falta de información acerca de las enfermedades de los cultivos afectados constituye un impedimento en el desarrollo de las estrategias para su control. Esta investigación identificó a los hongos patógenos del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de montaña, previo un aislamiento de estos fitopatógenos, en medio de cultivo sintético. El trabajo se realizó en áreas de un productor perteneciente a la CCSF Luis A Carbó del Consejo Popular de Limonar. El muestreo se realizó al azar, se tomaron plantas con síntomas de enfermedad que luego fueron sometidas a cultivo *in Vitro* para el aislamiento de los posibles patógenos y otros microorganismos saprófitos que fueron identificados por sus características microscópicas y macroscópicas. Se aislaron e identificaron los siguientes hongos fitopatógenos: *Phytophthora sp*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Fumago sp.* y otros aún no identificados.

Palabras clave: hongos fitopatógenos; cultivos vegetales; plagas.

Abstract.

The agricultural production in Cuba is affected by the incidence of certain plagues; the lack of information about the illnesses of the affected cultivations constitutes an impediment in the development of the strategies for its control. This investigation identified to the pathogen fungi of the cultivation of the tomato (*Solanum lycopersicum*) under mountain conditions, previous an isolation of these phytopatogens, amid synthetic cultivation. The work was carried out in areas of a producer belonging to the CCSF Luis A. Carbo of the Popular Council of Limonar. The sampling was carried out at random, for that which took plants with illness symptoms that then were subjected to cultivation *in Vitro* for the isolation of the possible pathogens and other saprophyt microorganisms that were identified by its microscopic and macroscopic characteristics. They were isolated and identified the following phytopatogen fungi: *Phytophthora sp*, *Alternate sp.*, *Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Fumago sp.* and other even not identified.

Keyword: phytopatogen fungi; vegetable cultivations; plagues.

Introducción.

La familia Solanaceae es reconocida mundialmente por su importancia en términos de vegetales cultivables y el amplio rango de utilidad agronómica de sus especies, que incluyen al importante género *Solanum* (The Internacional Solanaceae Genome Project, 2004). Esta familia es considerada el tercer taxa botánico más importante a nivel agronómico, hecho que ha generado que mundialmente se invierta un gran esfuerzo en estudiar la biología, ecología y diversidad de hábitat de muchas de sus especies. En cuba, es una de las especies más cultivadas son comúnmente atacadas por patógenos que limitan la producción y la calidad final del producto.

Los hongos causan la mayoría de las enfermedades de las plantas que son portantes para los seres humanos. El efecto de estos en los cultivos es devastador y produce pérdidas económicas considerables en todo el mundo. El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las principales hortalizas en un gran número de países ya que posee gran importancia económica. Sin embargo, presenta graves problemas de daños causados por hongos.

A nivel mundial los hongos fitopatógenos originan grandes pérdidas en la producción de hortalizas, plantas ornamentales y forestales. El ciclo de vida de los hongos fitopatógenos transcurre entre las plantas hospederas y el suelo, por lo tanto, la supervivencia y patogenicidad de los hongos depende de las condiciones ambientales (humedad y temperatura) y características intrínsecas de las plantas (resistencia) Agrios, (1996).

Los hongos como fitopatógenos.

Se han descrito al menos 100,000 enfermedades en plantas que son causadas por hongos (Agrios, 1995). Los hongos fitopatógenos atacan a una amplia gama de hospederos y los signos y síntomas que generan en ellos varían dependiendo de la relación que establezca el patógeno con el hospedero. A continuación se presentan algunas de las enfermedades en plantas causadas por hongos, incluyendo la descripción de las lesiones y las variaciones de las mismas cuando un patógeno ataca diferentes hospederos.

La relación entre un fitopatógeno, la planta y el desarrollo de la enfermedad está influenciada por la naturaleza del patógeno y su hospedero, además de las condiciones ambientales prevalecientes: los tres interactúan y forman parte integral del triángulo de la enfermedad en donde cada componente representa un lado del triángulo Kavanagh, (2005).

En esta propuesta, para que una enfermedad ocurra deberán coincidir los siguientes Factores: la presencia de un hospedante susceptible, un patógeno virulento y las condiciones favorables para que el patógeno pueda invadir o colonizar los tejidos del hospedante. Si algunas de estas tres condiciones no se presentan, la enfermedad no se produce por lo antes expuesto este trabajo tuvo como objetivo el aislamiento e identificación de cepas patógenas que atacan al cultivo del tomate en condiciones de montaña.

Desarrollo.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó durante el periodo enero- marzo de 2015, se muestreo plantaciones del cultivo del tomate en áreas del productor Danny Morales, el muestreo se realizó al azar de las plantas con síntomas de enfermedad, que luego fueron sometidas a cultivos para el aislamiento de los posibles patógenos y otros microorganismos saprófitos que fueron identificados por sus características microscópicas y macroscópicas

La investigación se realizó en dos fases: Fase de Campo.- se realizo en el área del productor, Danny Morales perteneciente a la CCSF “Luis A Carbó” del Consejo Popular de Limonar donde se encuentra el área. Fase de laboratorio.- Las muestras recolectadas fueron analizadas en el laboratorio de microbiología del centro de Desarrollo de la Montaña La evaluación tuvo una duración de 2 meses teniendo como inicio el 1 de enero y como término el 1 de marzo del 2015.

Metodología Utilizada

Fase de Campo

El campo visitado se encontraba sembrado de tomate, colindante con cultivos de col, pimiento, frijol y maíz. Todas estaban en producción.

Tabla: 1 Ubicación del área de investigación.

Áreas	Productor	Lugar	Cultivo
Cultivos barrios	Danny Morales	San Júan	Tomate

Muestreo

En la parcela levantada se recolectaron muestras de hojas, frutos, tallos y raíces con síntoma de enfermedad colocadas en bolsas de polietileno, para ser llevados al laboratorio de Microbiología del CDM donde se procedió a la caracterización de la sintomatología, aislamiento e identificación del agente causal. La recolección de las muestras se realizó en diferentes plantas de manera aleatoria.

FASE DE LABORATORIO

Descripción, toma de fotografías y observación al microscopio

Una vez recolectadas las muestras se trasladaron al laboratorio donde se realizó su descripción considerando: el tamaño de la hoja, apariencia de la superficie, la presencia de la afectación abundancia y color. Por otro parte se realizó la toma de fotografías y posteriormente la observación al microscopio.

Aislamiento de hongos presentes en las muestras

Para realizar el aislamiento de los hongos presentes en las muestras se procedió según se describe a continuación.

En el caso de las hojas enfermas se realizó el aislamiento de cepas a partir de:

1. Superficie de la hoja
2. Cámara Húmeda
3. Siembra directa en medio PDA

Para el aislamiento se siguió el protocolo que se describe a continuación

- Posteriormente se humedece un hisopo con agua estéril y se pasa sobre la hoja tratando de recolectar la mayor cantidad de muestra posible.
- Una vez que se tiene el hisopo con muestra se sumerge en un tubo de ensayo con 1 -ml de agua destilada. A partir de esta muestra se realizan diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .
- Se colocan 100µl de cada muestra en medios de cultivo sólido PDA
- Se recorta el fragmento de la hoja donde se encuentra la lesión y se le realiza el procedimiento de desinfección (lavado con agua destilada por 30 segundos, seguido de lavado con hipoclorito al 1%, con alcohol al 70% y finalmente lavado con agua)
- Se coloca en cámara húmeda. para su aislamiento según salgan los microorganismos.
- Luego una parte de esa muestra en colocada directo al medio de cultivo.
- Las placas sembradas se incuban a 30°C, por una semana con el monitoreo diario del crecimiento.

Una vez que se observó el desarrollo de las colonias en cada placa, se separaron y purificaron los diferentes fenotipos.

Para el proceso de purificación se hizo una selección de cepas que presentaban un fenotipo representativo en cada placa.

Se resembraron dichas cepas en medio sólido PDA y se incubaron a 30°C por una semana con el monitoreo diario del crecimiento, obteniendo finalmente las cepas purificadas.

Identificación de enfermedad.

La identificación del agente causal requiere de la ejecución de varios pasos consecutivos que pueden variar según las circunstancias, pero generalmente consisten en lo siguientes.

- Observación de síntomas y signos (señas de patógenos sobre la planta).
- Observación de aislamiento in vitro.
- Correlación de lo observado con la bibliografía pertinente como libros de fitopatología general (agrios 1995), ilustración de géneros imperfectos Barnett & Barry (1972), fitopatología experiencias en la amazonia peruana" Sánchez (2001), Arenas, (2008; Koneman, (2001).

Luego de obtenidas las cepas se montaron preparaciones para llevar al microscopio una vez obtenidas las preparaciones se examinaron al microscopio utilizando el objetivo 40X, el cual nos permitió apreciar de manera clara las estructuras microscópicas presentes en las preparaciones realizadas a partir de cepas de los hongos filamentosos obtenidos. Estas estructuras se compararon con bibliografía de referencia para determinar el género fúngico en cuestión.

Resultados y discusión.

En las la parcela del cultivo de tomate de las áreas del productor visitada se identificaron un total de 5 hongos los que se encontraban distribuidos de la siguiente forma ver cuadro 2.

Tabla N° 2 Hongos identificados en el cultivo del tomate.

Productor	Muestra	Nombre científico	Órgano que afecta	Cultivo
Danny Morales	M-1	Fusarium Sp	Raíz	Tomate
	M-2	Curvularia Sp	Hojas	
	M-3	Phitoptora Sp	Hojas y frutos	
	M-4	Alternaria Sp	Hojas	
	M-5	Fumago Sp	Hojas	

Se identificaron las cepas aisladas realizando la técnica de observación microscópica del patógeno según se describió en el apartado de metodología; posteriormente, las que observadas al microscopio con el objetivo 40X. El fenotipo macroscópico y microscópico fue documentado para las 5 cepas aisladas.

Fusarium sp, Esta enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo causando grandes pérdidas en el cultivo de tomate. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de 6 años. Es favorecido por temperaturas cálidas (20°C) asociada a alta humedad relativa. El hongo penetra en la planta a nivel del suelo ya sea por el tallo o raíces superficiales, luego por los haces vasculares es trasladado a toda la planta. Existen tres razas del hongo numeradas del uno al tres, esto obedece al orden cronológico en que fueron descubiertas. El manejo de esta enfermedad es basado en la siembra de variedades resistentes. Lo primero que se observa a campo es un amarillamiento en las hojas basales posteriormente se marchitan se secan pero permanecen adheridas a la planta. Esta sintomatología va progresando hacía la parte superior de la planta a veces sólo toma un sector de la misma. Al comienzo las plantas muestran marchites en las horas más calurosas del día recuperándose al final del mismo pero finalmente se marchitan y mueren. Las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón.



Figura .1 Planta de tomate con síntoma de marchitamiento provocado por el patógeno

Macroscópica: colonia de color blanco con micelio algodonoso. Microscópicas: presenta macroconidias que son esporas de pared delgada, hialinas, largas, moderadamente curvas en forma de hoz o de banana y multiseptadas características de este género.



Fusarium sp

ALTERNARIA SP.

Síntomas: Pequeñas manchas color café que se agrandan sobre la hoja originando una mancha con anillos concéntricos con apariencia de (Diana) tiro al blanco. Las lesiones más viejas desarrollarán un color oscuro en el patrón concéntrico. El color oscuro es causado por la producción de esporas, las cuales pueden causar nuevos puntos de infección si medidas protectivas no son tomadas. Hojas severamente infectadas se tornan amarillentas y senescentes y finalmente mueren. (Ver figura 2).



Figura 2: Manchas en hojas de tomate causada por Alternaria.

Macroscópica: colonia de apariencia algodonosa, color blanco en la parte joven, en el centro se oscurece a verde. Microscópica: conidióforos con 1 a 3 septos. Los conidióforos y conidios se observan de color café-amarillo. Conidios largos, algunas veces ovoides o elipsoides. Se observa la característica forma de granada.



Alternaria sp.

CURVULARIA SP.

Son hongos filamentosos patógenos de plantas y cereales. Es uno de los agentes causales de feohifomicosis, eumicetomas e infecciones sistémicas. Aparece en las hojas como manchas de color café que se van agrandando hasta ocuparla por completo y provocando su caída y con el tiempo la defoliación del cultivo.



Figura 3: Manchas en hojas de tomate causada por *Curvularia*.

Macroscópica: colonias de crecimiento rápidos con micelios de color verde oscuro
Microscópica conidias con divisiones tres a más transversales, o tabiques, la forma de los conidios tiene generalmente un aspecto curvado teniendo amplios puntos en cualquier extremo. Además, la célula en el centro de la curva es a menudo más grande que éstas hacia el extremo.



Curvularia sp

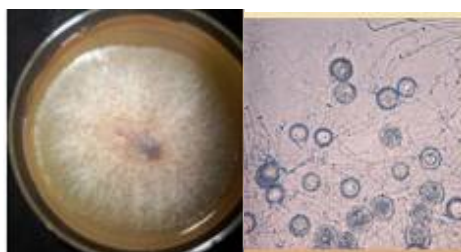
PHYTOPTORA SP.

Aparece en las hojas manchas irregulares de aspecto aceitoso que rápidamente se necrosan e invaden casi todo el foliolo. Alrededor de la zona afectada se observa un pequeño margen que en presencia de humedad y en el envés aparece un fieltro blancuzco poco patente. En tallo, aparecen manchas pardas que se van agrandando y que suelen circundarlo. Afecta a frutos inmaduros, manifestándose como grandes manchas pardas, vítreas y superficie y contorno irregular. Las infecciones suelen producirse a partir del cáliz, por lo que los síntomas cubren la mitad superior del fruto.



Figura 4: presencia del patógenos en fruto del de tomate causada por Phytophthora.

Macroscópica. Estos hongos sexualmente producen zoosporas, las que se originan por la unión de dos gametos diferentes, el oogonio y el anteridio. Estas zoosporas son esféricas y de pared gruesa. Estos hongos se reproducen asexualmente producen esporas flageladas, denominadas zoosporas. Estas zoosporas se encuentran contenidas en cuerpos fructíferos denominados zoosporangios.



Phytophthora Sp

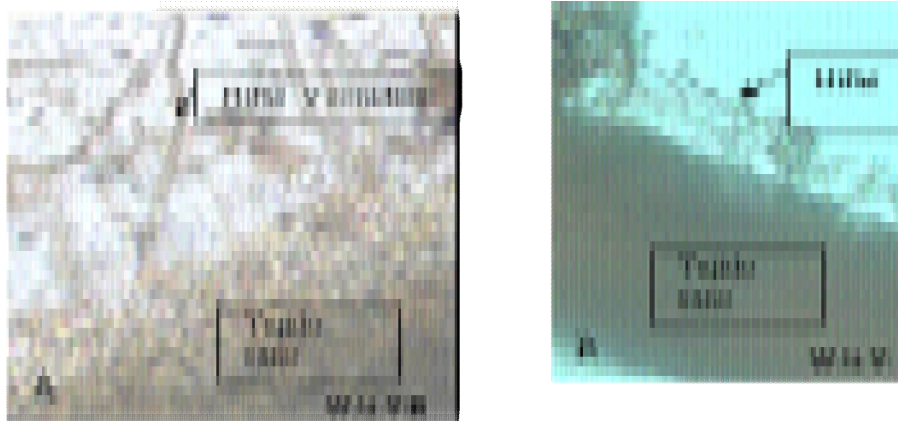
FUMAGO SP.

Estos organismos no son parásitos si no que viven enteramente de la "mielecilla" él deposito azucarado que se forma en órganos de plantas o partir de las deyecciones de ciertos insectos particularmente escamas y áfidos. Estos se reproducen superficialmente en la cara superior como en el envés de las hojas y tallos del pimiento y platano, formando una película de color negro. El desarrollo de estos hongos están abundante que interfiere con la cantidad de la luz que llega a la planta, La presencia de fumaginas en las plantas casi no tiene importancia alguna sobre el desarrollo normal, pero cabe mencionar que indica la presencia de insectos y que puede ser señal de algún problema significativo que pudieran ocasionar los áfidos o escamas.



Figura 5: presencia del hongo en las hojas del cultivo de tomate

Macroscópica: esta puede diagnosticarse fácilmente por el hecho de que se desarrolla micelio y esporas ennegrecido sobre hojas y tallos. En la figura 12 y 14 se puede observar que estos dos géneros se adhieren las hojas por medios de hifas, esto posiblemente para no ser lavado con facilidad por las lluvias.



Fumago Sp

Conclusiones.

- Se aislaron e identificados 5 géneros fúngicos diferentes, *Alternaria Sp*, *Phytophthora Sp*, *Fusarium Sp*, *Curvularia sp*, y un hongo no parásito *Fumago Sp* afectando el cultivo del tomate en condiciones de montaña.
- Se realizó la descripción de los síntomas de cada uno de los hongos mencionados.
- Dentro de estos cinco hongos parásitos identificados, hay algunos que causan daños irreversibles a las plantas como en el caso de *Fusarium sp* que produce taponamiento de los vasos xilemáticos interfiriendo a si el transporte de la savia y ocasionando marchites de la planta.

Bibliografías.

- AGRIOS, G. N. (1995). *Fitopatología*. Editorial Limusa. Balderas, México, 838.
- Arenas, R. (2008). *Micología Médica Ilustrada*.
- Barnett H, Barry D. (1972). *Ilustred Genera Of Imperfect Fungi*.
- Kavanagh, K. (2005). *Fungi: Biology and Applications*. Editorial: Wiley, 280.

- Koneman, E. (2001). *Diagnóstico Microbiológico*: Texto y atlas a color. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina; Bogotá, 1432.
- Lucas, G.B., Campbell, C.L., & Lucas L.T. (1992). *Introduction to Plant Diseases: Identification and Management*. USA. Van Nostrand Reinhold Company, 364.
- Lucas, J. A. (1998). *Plant pathology and plant pathogens*. UK: Editorial Blackwell Science., 288.
- Martín B. (2001). Ingeniero Técnico Forestal. D. G.A.-Unidad Sanidad Forestal.Zaragoza. Disponible en www.bot.forst.tu-muenchen.de.
- Pérez, Nilda. (2004). *Manejo Ecológico de Plagas*. Ed. CEDAR. La Habana, 17-285.
- SÁNCHEZ, E. (2001). *Fitopatología "Experiencias en la amazonía peruana"*. Ucayali, Perú, 214.
- Vázquez, L. (2003). *Manejo Integrado de Plagas*. INISAV, Ministerio de la Agricultura; Ed. CIDISAV, La Habana, 48 – 408.

Fecha de recibido: 18 abr. 2017
Fecha de aprobado: 10 jun. 2017