

27. Agroalimentos

Caracterización e impacto de patógenos de suelo en el cultivo de zanahoria en el albardón costero santafesino

Paviotti, Sofía¹; Fernandez, Laura¹; Maumary, Roxana¹; Favaro, María Alejandra²

¹ autor; ² orientador

ssofipaviotti@gmail.com; mfavaro@fca.unl.edu.ar;

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Litoral

Resumen

El departamento Garay es la principal zona de producción del cultivo de zanahoria en la provincia de Santa Fe, cultivándose anualmente entre 1000 y 1500 ha. En los últimos años se detectó en esta región la presencia de patógenos de suelos, los cuales afectan la calidad y rendimiento del producto obtenido. La implementación de estrategias de manejo eficientes está limitada por el desconocimiento de la identidad de los patógenos presentes. Este trabajo tuvo como objetivo contribuir al conocimiento y caracterización de patógenos de suelo presentes en el cultivo de zanahoria en esta región. Para ello, se realizaron aislamientos monosporicos los cuales se identificaron morfológicamente mediante la observación macroscópica y microscópica. Se diferenciaron así dos grupos, uno de pigmentación crema y otro salmón a púrpura, ambos pertenecientes al género de hongos *Fusarium sp.* Posteriormente se realizó extracción de ADN de las distintas cepas, se amplificaron dos genes mediante PCR y las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en GenBank. El análisis molecular permitió determinar que los patógenos presentes se corresponden con *Fusarium solani* y *F. oxysporum*, los cuales generan en las raíces cavidades irregulares de coloración marrón a negra y podredumbre seca.

Palabras clave: Zanahoria, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, departamento Garay.

Introducción

En la Argentina se cultivan anualmente entre 7.000 y 9.800 hectáreas de zanahoria (Alessandro & Gabriel, 2011). El mayor porcentaje de la producción se destina al consumo en fresco y un pequeño porcentaje al deshidratado y otros procesos industriales. La producción

de raíces cubre la actual demanda del mercado interno, destinándose una pequeña y variable proporción a exportaciones a países limítrofes. Si bien existen variaciones intercensales, las provincias con mayor superficie cultivada con esta hortaliza son: Mendoza (32,7 %), Buenos Aires (21,4 %), Santiago del

Estero (16,2 %), Santa Fe (7,8 %), Córdoba y San Juan, las que en conjunto suman el 87 % del total nacional (Alessandro & Gabriel 2011).

El departamento Garay es la zona principal de cultivo de zanahoria en la provincia de Santa Fe. Se ubica en el centro este de la provincia y forma el conocido “albardón costero” que rodea a la Ruta provincial N° 1, extendiéndose desde la localidad de Santa Rosa de Calchines hasta Helvecia (Figura 1).



Figura 1: Departamento Garay, provincia de Santa Fe.

En esta región, la producción hortícola aporta hasta el 70% de PBI. El principal cultivo hortícola es la zanahoria, cultivándose anualmente entre 1.000 y 1.500 ha. (1.200 ha. en el año 2016), lo que representa entre el 33% y el 50% de la superficie anual implantada con hortalizas (Gaviola, 2013).

El número de empresas agropecuarias hortícolas del departamento es de 160 y la superficie media oscila entre 10 y 35

ha según distrito. Los volúmenes de zanahoria cosechados varían entre 50.000 y 65.000 t anuales. Esta región ha tomado importancia provincial y nacional en los últimos años, desplazando a este cultivo del cinturón hortícola rosarino y convirtiéndose en un núcleo fuerte de producción debido a la presencia de suelos ideales para el cultivo, el grado de especialización por parte de los productores y la utilización de nuevas tecnologías (Gaviola, 2013).

Las variedades de zanahoria se clasifican según su constitución genética en híbridas o variedades de polinización abierta. En Argentina se observa que las variedades híbridas solo son ocupadas en un 14% de la superficie total de las principales zonas productoras (Gaviola, 2013). Encontrándose Santa Fe y Buenos Aires como las provincias donde son principalmente utilizadas, siendo Nantindo, Bolero, Esperanza, Maestro y Natasha los cultivares más difundidos (Alessandro & Gabriel, 2011; Gaviola, 2013).

La calidad de las zanahorias en fresco queda establecida según los estándares que hacen referencia al aspecto externo requiriendo que sean uniformes en tamaño, color y forma, que estén secas, limpias, libres de enfermedades, defectos, insectos y daños. Así se definen grados de calidad de acuerdo al porcentaje de defectos graves y leves permitidos. La obtención de un producto de calidad se gesta durante la etapa de

precosecha. Por tal motivo la elección del lote, cobra una importancia fundamental ya que su historia y plan de rotación tienen enorme influencia, en la sanidad del cultivo. En este sentido, nematodos, insectos y numerosas enfermedades (algunas bacterias y hongos como *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp. y *Sclerotinia* sp.) persisten en el suelo, reduciendo así la calidad del producto obtenido (López Camelo, 2011).

Dentro de las enfermedades más relevantes que afectan la raíz se mencionan a aquellas causadas por hongos de suelo, como el género *Pythium* sp., responsable de pérdidas de rendimiento severas y disminución de la calidad (Hiltunen & White 2002; Suffert & Montfort, 2007). En infecciones severas, la incidencia puede llegar a un 40–50% (Cooper et al., 2004). Otro género de hongos presente es *Fusarium* sp. En mediciones del mercado Central de Buenos Aires se encontró una participación del mismo en un 12% de las enfermedades relevadas. Las especies encontradas fueron *Fusarium solani*, *F. equiseti* y *F. oxysporum* (Gaviola, 2013).

El género *Fusarium* sp. engloba un grupo de hongos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas, de gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Muchas especies tienen gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de

plantas cultivadas. Las enfermedades consisten en marchitamientos vasculares, manchas de las hojas, pudrición de raíces y tallos, pudrición de fruto, granos y semillas (Nelson, 2012).

La patogenicidad de *Fusarium* sp. está relacionada con factores de crecimiento como temperatura, pH y sustratos. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas (Tapia & Amaro, 2014). El rango de valores de pH óptimos de crecimiento es amplio desde pH 5 hasta 9 para la mayoría de las especies. Sin embargo *F. solani* muestra un crecimiento óptimo entre pH 6 a 7, mientras que *F. oxysporum* lo hace a pH más ácidos (pH 5) (López & López, 2004).

En la zona del albardón costero santafesino existen serias carencias de conocimiento acerca de los patógenos de suelo presentes, de las relaciones patógeno-hospedero, y de sus características epidemiológicas, lo que dificulta establecer estrategias y métodos de control eficientes. El manejo de patógenos de suelo en el cultivo de zanahoria es dificultoso dada la imposibilidad económica de realizar desinfección de suelo previa a la siembra, las escasas opciones de rotación de cultivos en la zona, el alto costo de fungicidas en relación al precio de venta del producto, entre otros.

Durante la ejecución de esta investigación se identificó cuáles son las especies de patógenos de suelo prevalentes en

cultivos de zanahoria de la región. Esto permitirá poder desarrollar estrategias de manejo adecuadas, de bajo impacto ambiental, orientadas específicamente hacia esos patógenos.

Objetivos

1. Objetivo general:

Contribuir al conocimiento y caracterización de patógenos de suelo presentes en el cultivo de zanahoria en el albardón costero santafesino.

2. Objetivos específicos:

- 1- Generar una colección de aislamientos de patógenos de suelo en el cultivo de zanahoria en el albardón costero del Departamento Garay.
- 2- Identificar morfológica y molecularmente los distintos agentes causales.

Materiales y Métodos

- 1- Generación de una colección de aislamientos de patógenos de suelo
Se recolectaron zanahorias de diferentes lotes en producción con sintomatología típica de patógenos de suelo. A partir de los márgenes de la lesión se cortaron fragmentos de tejido necrótico típico (5 mm²), se desinfectaron en 0,5 % de NaOCl por 15 seg, se lavaron 3 veces en agua destilada estéril y se cortaron en siete fragmentos pequeños de 1-2 mm (Suffert & Guibert, 2007). Los fragmentos se sembraron en medio

Agar Papa Glucosado (APG) para el aislamiento general de patógenos, y en medio selectivo MS2 para *Phytilium* spp. (17,5 g de agar harina de maíz, 2 ml de suspensión acuosa de pimaricina al 2,5%, 2 ml de suspensión alcohólica de rifampicina al 0,75% en 1 l de agua) (Breton & Rouxel 1993). Las placas se incubaron a 20°C durante 7 días para el desarrollo de la colonia fúngica. A partir de los cultivos obtenidos se realizaron aislamientos monospóricos que fueron conservados en papel de filtro deshidratado con sílica gel en el freezer a -18°C.

- 2- Identificación morfológica y molecular de los aislamientos

Los aislamientos monospóricos obtenidos se caracterizaron morfológicamente por medio de la observación macroscópica de las colonias desarrolladas en cámaras húmedas y medios de cultivo, donde se determinó el color y su velocidad de crecimiento. La observación microscópica de estructuras somáticas y reproductivas se realizó utilizando microscopio y claves taxonómicas. Posteriormente, se obtuvo el ADN de los aislamientos a partir de micelio y esporas de colonias crecidas durante siete a diez días en medio APG a 25°C en oscuridad. Se utilizó un protocolo de extracción de ADN de rutina (Palocci et al., 1999). Luego se amplificó, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la región ITS (del

inglés “*internal transcribed spacer*”) del ADN nuclear ribosomal (rDNA) utilizando los cebadores universales ITS1/ITS4 (Suffert & Guibert 2007; White et al., 1990), y el factor de elongación de la traducción 1- α (TEF, del inglés *translation elongation factor*), utilizandolos cebadores ef1 y ef2 (O’Donnell et al., 1998). Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados y las secuencias fueron comparadas con las depositadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para su identificación, utilizando BLAST. Debido a que se trata de patógenos no reportados en la región, para cumplir los Postulados de Koch y evaluar la patogenicidad de los distintos aislamientos obtenidos se utilizó la metodología descrita por Suffert y Guibert (2007). Para ello, zanahorias maduras se desinfectaron con 0.3% NaOCl durante 1 min, se lavaron tres veces en agua estéril y se cortaron en secciones de 4 cm de largo. Las porciones de raíz, se lastimaron con una aguja y en su superficie se depositaron discos de micelio (0,5 cm de diámetro) obtenidos de márgenes de colonias crecidas durante 7 días. En otro sector de la misma raíz, los discos de micelio se depositaron sin realizar heridas. Los trozos de zanahoria inoculados se mantuvieron en cámara húmeda a 20°C y se utilizaron zanahorias asperjadas con agua como control. Para cada

aislamiento se inocularon 10 zanahorias, y el experimento fue repetido dos veces. El patógeno fue reaislado a partir de los síntomas producidos y se verificó que sus características coincidan con las previamente identificadas.

Resultados y Discusión

1. Colección de aislamientos de patógenos de suelo

Se recolectaron zanahorias provenientes de diferentes lotes del albardón costero santafesino con lesiones provocadas por patógenos de suelo, cuya sintomatología se muestra en la Figura 2, la misma se conforma por cavidades irregulares, de coloración amarronada a negra y presencia de podredumbre seca.



Figura 2: zanahorias ‘Bolero’, con lesión típica de las que se realizaron los aislamientos.

Del tejido sintomático observado en la Figura 2 se obtuvieron 9 aislamientos monospóricos, provenientes de distintas zanahorias (Tabla 1).

Tabla 1: Aislamientos trabajados. Origen, variedad y patogenicidad.

AISLAMIENTO	ORIGEN	VARIEDAD	PATOGENICIDAD
Z ₁	Santa Rosa	Desconocida	Positiva
Z ₂	Santa Rosa	Desconocida	Positiva
Z ₃	Santa Rosa	Desconocida	Positiva
Z ₄	Santa Rosa	Hanna	Positiva
Z ₅	Santa Rosa	Hanna	Positiva
Z ₆	Santa Rosa	Bolero	Positiva
Z ₇	Santa Rosa	Bolero	Positiva
Z ₈	Santa Rosa	Hanna	Negativa
Z ₉	Santa Rosa	Bolero	Negativa

A partir de los aislamientos obtenidos se realizaron pruebas de patogenicidad, cuyos resultados se resumen en la Tabla 1. Se observó que de los 9 aislamientos obtenidos, sólo Z₈ y Z₉ no presentaron síntomas.

El resto las actividades se continuaron solo en aquellos aislamientos donde la patogenicidad se manifestó.

2. Descripción morfológica y molecular

La observación macroscópica y microscópica de las colonias obtenidas en los diferentes aislamientos permitió determinar que todos pertenecían al género *Fusarium* sp. No fue posible aislar *Pythium* sp. en ninguno de los casos.

Las colonias logradas se diferenciaron por el color y aspecto del micelio. Así, lograron conformarse dos grupos, como se presenta en la Figura 3. El primer grupo, conformado por Z₁, Z₃, Z₅ y Z₆, presenta colonias color crema con micelio

ralo. El segundo grupo de colonias color salmón o púrpura y micelio sub-aéreo, está integrado por los demás aislamientos (Z₂, Z₄ y Z₇).

La velocidad de crecimiento en placa a

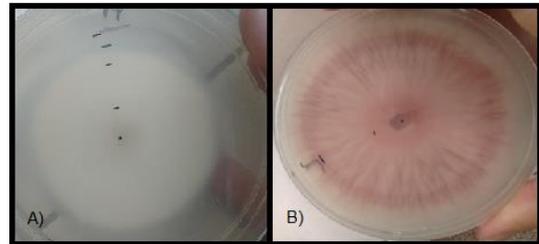


Figura 3: Pigmentación de las colonias, A) Z₃ perteneciente al grupo color crema y B) Z₇ perteneciente al color púrpura.

temperatura constante de 21°C presentó diferencias entre los distintos aislamientos, alcanzándose diferentes radios de crecimiento. Los aislamientos Z₂, Z₄ y Z₇ presentaron el mayor crecimiento, y sus colonias lograron un radio de 4,10 cm a los 6 días, mientras que los aislamientos Z₅ y Z₆ presentaron la menor tasa de crecimiento, alcanzando un radio de colonia de 2,26 cm en el mismo tiempo. Los demás aislamientos mostraron un comportamiento intermedio (Figura 4).

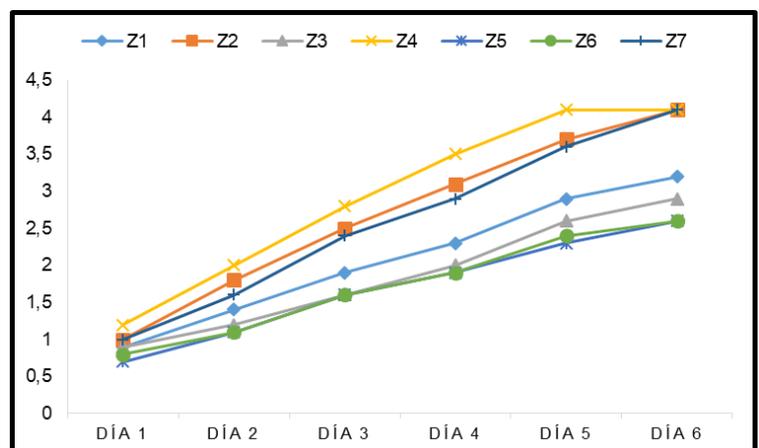


Figura 4: Radio de crecimiento en cm de cada aislamiento.

Los conidios en ambos casos fueron alunados, hialinos y septados promediando 4,9 y 4,2 μm de ancho y 28,4 y 25,6 μm de largo, respectivamente. El número de tabiques fue en todos los casos de 3 a 4 sin presentar variación.

Mediante la observación microscópica de las características morfológicas se identificó que todos los patógenos aislados pertenecen al género de hongos *Fusarium* sp. Dicho género presenta fiálide generalmente fina, con forma de botella, simple o ramificada, cortas o largas. Los macroconidios como se muestra en la Figura 5 presentan forma de media luna, hialinos y septados (Tapia & Amaro 2014).



Figura 5: Macroconidios del género *Fusarium* sp.

Los datos morfológicos no permitieron determinar especie, por lo que se realizó extracción del ADN de cada aislamiento, el cual fue amplificado mediante la técnica de PCR, utilizando los cebadores que codifican para ITS y TEF1- α . Las secuencias amplificadas se compararon con las depositadas en

GenBank para su identificación, utilizando BLAST y arrojaron un 100% de identidad con *Fusarium solani* en los aislamientos Z₁, Z₃, Z₅ y Z₆ y con *F. oxysporum* en Z₂, Z₄ y Z₇.

De acuerdo a la bibliografía, *F. solani* presenta tasa de crecimiento de 3,2 cm, creciendo a 25°C durante 4 días, pigmentación del micelio blanco grisáceo a azul o marrón azulado y macroconidios con 1-5 tabiques, de 35-55 μm largo y 4,5-6 μm de ancho (Booth, 1977). En cuanto a *F. oxysporum* este presenta tasa de crecimiento de 4,5 cm, también a 25°C durante 4 días, pigmentación algo variada encontrándose colonias blancas, melocotón, salmón, gris a púrpura o violeta y macroconidios con 3-5 tabiques, de 27-60 μm de largo y 3-5 μm de ancho (Booth, 1977). En comparación con los resultados obtenidos, la pigmentación de las colonias detalladas coincidió con las observadas en los aislamientos estudiados. Además el largo de los macroconidios presentó variaciones con respecto a las descritas por Booth (1977). Estas diferencias pueden deberse a modificaciones en la temperatura y al tiempo de crecimiento al que se expuso el cultivo.

Estos resultados muestran la importancia de la identificación molecular mediante PCR, que permite complementar la caracterización morfológica, determinando con mayor certeza las especies encontradas.

Por tratarse de patógenos no identificados en la región se procedió a repetir las pruebas de patogenicidad, como se muestra en la Figura 6.



Figura 6: Prueba de patogenicidad cumpliendo los postulados de Koch, A) control, B) Z₁, C) Z₃, D) Z₄, E) Z₆ y F) Z₇.

Se observaron síntomas de pudrición marrón en todas las raíces inoculadas, mientras que los controles se mantuvieron asintomáticos. Los diferentes aislamientos presentaron diferencias en cuanto a la intensidad de síntomas producidos, siendo Z₄ el que manifestó la mayor agresividad, mostrando síntomas tanto en las secciones con y sin herida. Además, Z₄ mostró síntomas de manera anticipada en comparación con el resto de los aislamientos, que lo hicieron en forma más tardía. A los 6 días de inoculación dicho aislamiento presentó síntomas bien marcados, mientras que en el resto recién comenzaban a manifestarse, haciéndose notorios a los 10 días. Notablemente, el aislamiento Z₄ fue uno de los que presentó mayor velocidad de crecimiento en placa. Esto indicaría que este parámetro podría determinar una mayor agresividad en las raíces, a pesar de que otros factores como las defensas de la planta y/o el

ambiente podrían ser decisivos en la capacidad de los aislamientos de infectar las zanahorias.

La manifestación del patógeno del género *Fusarium* sp. ha sido reportado anteriormente en otros países como causante de sintomatologías diversas en zanahoria en los últimos años (Han et al., 2012; Stankovic et al., 2015; Zhang et al., 2014),. Entre ellas, la sintomatología semejante a la encontrada en el albardón costero es la podredumbre seca causada por *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. avenaceum*. Dicha enfermedad se caracteriza por producir lesiones deprimidas en la superficie de la raíz, con formas definidas redondeadas o irregulares las cuales presentan color marrón claro a marrón oscuro (Stankovic et al., 2015; Zhang et al., 2014).

La presencia de dichos patógenos afectando el cultivo de zanahorias fue reportado en China y Corea (Zhang et al., 2014, You-Kyoung Han, 2011). La especie *F. oxysporum* fue detectada en ambos países, mientras que *F. solani* solo lo fue en China. Las cepas descritas presentaron características similares a las observadas en el presente trabajo.

Conclusiones

Se generó una colección de aislamientos de patógenos de suelo en el cultivo de zanahoria en el albardón costero del Departamento Garay. Se logró aislar e identificar a los patógenos. Se determinó, a partir de la morfología,

que el género de los mismos es *Fusarium* sp.

Para obtener una mayor precisión se procedió con la identificación molecular, determinándose así que las especies presentes en el Albardón costero son *F. solani* y *F. oxysporum*.

Esta caracterización es la primera de este tipo en la región. Sus resultados revisten gran importancia ya que permitirán el desarrollo de estrategias de manejo especie-específicas, orientadas hacia los patógenos identificados.

Bibliografía

Alessandro, M. S., & Gabriel, E. L. (2011). El panorama varietal del cultivo de zanahoria en Argentina. Horticultura Argentina.

Booth, C. (1977). *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute.

Breton, D. & Rouxel, F., (1993). Donne'es récents sur le cavity spot de la carotte en France. Acta Hort. 150-170.

Cooper, C., Isaac, S., Jones, M. G., Crowther, T., Smith, B. M., & Collin, H. A. (2004). Morphological and biochemical response of carrots to *Pythium violae*, causative agent of Cavity Spot. *Physiological and molecular plant pathology*, 64(1), 27-35.

Gaviola, J. C. (2013). Manual de producción de zanahoria. Mendoza, Argentina: INTA, 97-98.

Han, Y. K., Han, K. S., Lee, S. C., & Kim, S. (2012). First report of fusarium wilt of carrot in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 28(2), 216-216.

Hiltunen, L. H., & White, J. G. (2002). Cavity spot of carrot (*Daucus carota*). *Annals of applied biology*, 141(3), 201-223.

López Camelo, A. (2011). Gestión de la calidad en zanahoria. Balcarce, Argentina: INTA.

López, D., & López, M. O. (2004). Influencia del PH y de los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del género *Fusarium* en Cuba. *Fitosanidad*, 8(3).

Nelson, P. E. (2012). Life cycle and epidemiology of. *Fungal wilt diseases of plants*, 51.

Paolocci, F., Rubini, A., Granetti, B., & Arcioni, S. (1999). Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. *ectomycorrhizae*. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(1), 23-30.

Stanković, I., Milojević, K., Vučurović, A., Nikolić, D., Krstić, B., & Bulajić, A. (2015). First report of *Fusarium* root rot of stored carrot caused by *Fusarium avenaceum* in Serbia. *Plant Disease*, 99(2), 286-286.

Suffert, F., & Guibert, M. (2007). The ecology of a *Pythium* community in relation to the epidemiology of carrot cavity spot. *Applied soil ecology*, 35(3), 488-501.

Suffert, F., & Montfort, F. (2007). Demonstration of secondary infection by

Pythium violae in epidemics of carrot cavity spot using root transplantation as a method of soil infestation. *Plant pathology*, 56(4), 588-594.

Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Zhang, X. Y., Hu, J., Zhou, H. Y., Hao, J. J., Xue, Y. F., Chen, H., & Wang, B. G. (2014). First Report of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* Causing *Fusarium* Dry Rot of Carrot in China. *Plant Disease*, 98(9), 1273-1273.

Financiamiento

Proyecto de Investigación Orientado 2016
PI 2010-107-16 ASaCTel .