

## MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni

Martha Carolina Arturo<sup>1</sup>, Celina Torres González<sup>1</sup>, Enrique Javier Peña<sup>1</sup> y Jaime E. Díaz<sup>1</sup>

### RESUMEN

En cultivos comerciales de *Stevia rebaudiana* localizados en Golondrinas (Valle del Cauca) y Puerto Tejada (Cauca) se determinó la incidencia y severidad de enfermedades ocasionadas por microorganismos. La investigación se desarrolló en fases de reconocimiento de la sintomatología, identificación de agentes causales y determinación de pruebas de patogenicidad. Se encontraron 22 hongos, varios de los cuales constituyen nuevos reportes, y dos bacterias como agentes causales de los marchitamientos, necrosis de la raíz, manchas foliares y necróticas. En Puerto Tejada el porcentaje de daño fue más alto, mientras que en Golondrinas se encontró mayor diversidad de microorganismos. Los microorganismos no mostraron preferencias entre hojas, tallo y raíz. Para ambas zonas los microorganismos con mayor presencia fueron *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp. y *Alternaria* sp.

**Palabras clave adicionales:** Asteraceae, fitopatógenos, incidencia, severidad

### ABSTRACT

#### Microorganisms pathogen of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

The impact and severity of diseases caused by microorganisms (fungi and bacteria) that affect the *Stevia* plant were analyzed in commercial crops located in Golondrinas (Valle del Cauca) and Puerto Tejada (Cauca). The research included the phases of recognition of symptoms, identification of causal agents, and pathogenicity tests. The presence of 22 fungi (several of which constitute new reports) and two bacteria were detected and reported as the cause of fading, root necrosis, leaf spots and necrosis. Puerto Tejada showed the greatest amount of damages in plants compared to those in Golondrinas, where plants had a wider variety of microorganisms. It was established that the different microorganisms have no preferences among leaf, stem, and roots. *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. presented the highest frequency for both locations

**Additional key words:** Asteraceae, phytopathogens, incidence, severity

### INTRODUCCIÓN

*Stevia rebaudiana* Bertoni, originaria del noroeste semi-árido paraguayo, es una hierba de cuyas hojas se extraen glucósidos aproximadamente 300 veces más dulce que el azúcar de caña, con un equivalente calórico de cero (Niño, 2003). La introducción de *Stevia* a Colombia en 1994, generó el inicio de las investigaciones sobre la adaptación y comercialización de esta especie en la región tropical entre el gobierno Departamental de Antioquia y la empresa JAIDO (Maya, 2003).

La susceptibilidad a enfermedades fúngicas se incrementa ante niveles excesivos de agua (Álvarez, 2005), o suelos con alto contenido de materia orgánica (Herbotecnia, 2004).

Las enfermedades reportadas para el cultivo de *Stevia* son pocas y controlables (Álvarez, 2005).

Las enfermedades de tipo fungoso son las más importantes; aunque no existe mucha información sobre éstas y sus mecanismos de control. En Paraguay, Canadá, Brasil se reportan los géneros *Phomopsis* sp., *Curvularia* sp., *Botryodiplodia* sp., *Phlyctaena* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Septoria* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia* sp., *Sclerotium* sp. y *Fusarium* sp., (Zañon, 2000). En Canadá se han identificado como agentes causales *Septoria steviae* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Maya, 2003).

Las manchas foliares causadas por *Septoria* sp. y *Alternaria* sp. reducen el valor y calidad comercial de la hoja, mientras que los ataques al cuello de la raíz causados por *Rhizoctonia* sp. son abundantes, especialmente en épocas de altas temperaturas (Martínez, 2000; Zañon, 2000; Niño, 2003).

En Colombia no se han adelantado

Recibido: Julio 2, 2008

Aceptado: Mayo 18, 2009

<sup>1</sup> Universidad del Valle A.A. 25360. Cali, Valle, Colombia. e-mail: cetorres@univalle.edu.co

investigaciones para reconocer problemas de fitopatogenicidad en plantaciones comerciales de *Stevia*, ni se han identificado zonas agroecológicas potencialmente adecuadas para su desarrollo (Bonilla et al., 2007). El desconocimiento de la biología de los fitopatógenos, dificulta el desarrollo de paquetes tecnológicos para su cultivo y mejores controles fitosanitarios.

Esta investigación se realizó con el propósito de identificar los posibles microorganismos patógenos que causan enfermedades en la planta de *Stevia*, en dos cultivos comerciales, a fin de proporcionar información necesaria para el cultivo de esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectó el material enfermo en dos plantaciones de *Stevia* (Cuadro 1), determinando el tamaño de la muestra a través de una prueba

piloto de 20 plantas tomadas al azar en campo, mediante un muestreo aleatorio simple (Méndez et al., 2001; Kingler, 2004).

En cada muestra se evaluó la incidencia y severidad de necrosis, chancros, perdigones, clorosis, en hoja, tallo y raíz. Se utilizó una escala descriptiva para dividir las plantas en sanas (0 %), con lesiones moderadas (25 %) e infestación intensa (65 %) (Castaño, 1990). Las muestras se observaron en el estereoscopio para caracterizar y clasificar la sintomatología presentada (Ávila, 2004; Roberts y Boothroyd, 1981). De las muestras seleccionadas se tomó una sub-unidad representativa de 12 muestras al azar, de cada órgano de la planta. Se utilizaron métodos y técnicas clásicas para la identificación y aislamiento de hongos y bacterias con el fin de obtener colonias puras (Ávila, 2004; Torres, 2004).

**Cuadro 1.** Características de la localidad y del material de *Stevia* recolectado en las dos zonas de estudio

Departamento	Zona	Temperatura (°C)	Altitud (msnm)	pH	Textura suelo	Área (m <sup>2</sup> )	Población vegetal	N° de muestras
Valle del Cauca	Golondrinas	21	1600	6,6	Franca	2500	20.000	25 hojas
								39 tallos
								20 raíces
Cauca	Puerto Tejada	26	900	6,8	Franco arenoso	1049	5.000	20 hojas
								55 tallos
								47 raíces

Se aplicaron técnicas de micro-cultivo y cinta adhesiva para observar conidias, conidióforos, tipo de hifa y coloración de hongos. En bacterias se observó forma, tamaño, color, tinción de Gram y prueba de KOH (Ávila, 2004). La caracterización e identificación de los fitopatógenos se realizó a través de claves morfológicas (Sañudo et al., 2001; Garcés et al., 2003).

En las pruebas de patogenicidad con plantas de 90 días se utilizaron concentraciones de  $1 \times 10^5$  esporas·mL<sup>-1</sup> para inocular hongos y de  $1 \times 10^3$  células·mL<sup>-1</sup> para inocular bacterias (Torres, 2004). Las pruebas se realizaron en casa de mallas de la estación experimental del Departamento de Biología de la Universidad del Valle (25 °C, 1002 msnm). Los hongos se inocularon mediante aspersión, punción con bisturí y contacto directo con algodón estéril. Las bacterias se inocularon sólo por inyección, punción y aspersión. Para cada inóculo se realizaron tres réplicas. Al testigo se le

aplicó sólo agua destilada estéril. Se evaluó severidad de la enfermedad y se realizó el análisis de estructuras y morfometría (Torres, 2004).

Los datos obtenidos en campo y laboratorio se analizaron mediante tablas de distribución de frecuencias, histogramas y gráficos para determinar la presencia o ausencia de microorganismos patógenos en los órganos de la planta. La información se procesó utilizando el programa estadístico SPSS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación y diagnóstico de la enfermedad

Los daños (quemazones y marchitamientos, manchas en hojas) y enfermedades (microorganismos, necrosis y marchitez) se distribuyeron en un rango de lesiones clasificadas como insignificantes, moderadas y abundantes (5, 25 y 40 % de lesiones, respectivamente). La

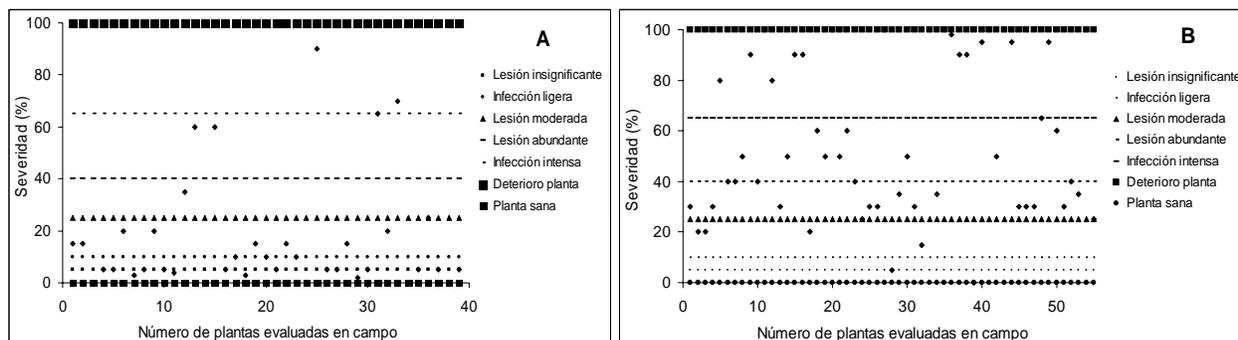
morfología de las lesiones fue similar a la mencionada por diversos autores (Orrego, 2001; Maya, 2003; Llanos, 2004) y son descritas de la siguiente forma: en la hoja, manchas necróticas de color café con bordes delimitados de color marrón, presencia y/o ausencia de halo clorótico, perdigones, marchitez y clorosis; en el tallo, apariencia seca, débil con manchas pequeñas y chancros; en la raíz, necrosis y ausencia de pelos radicales.

En la localidad de Golondrinas las lesiones de hojas se atribuyeron al microclima creado por el follaje (Agrios, 1991; Martínez, 2000), y en el tallo a microorganismos del suelo que atacan los tejidos conductores y obstaculizan la traslocación de nutrientes provocando destrucción de la planta. En Puerto Tejada se detectó vegetación arvense dentro del área de siembra y frutos con lesiones provenientes de árboles cercanos, lo cual fue considerado como posible fuente de inóculos, infectando la plantación a través de la raíz perenne de la especie (Álvarez, 2005).

El desarrollo de los cultivos en ambas plantaciones se vio amenazado por las condiciones agroecológicas, el manejo inadecuado de sistemas de riego (medio que facilita la dispersión de esporas de hongos) y prácticas agronómicas inadecuadas que favorecen el desarrollo de

microorganismos (Agrios, 1991). Igualmente, la presencia de animales domésticos dentro del cultivo pudo contribuir a la dispersión de enfermedades (Martínez, 2000). Los porcentajes de severidad mostraron evidencia de afección y pérdidas en diferentes grados de acuerdo con la escala descriptiva de la enfermedad. El cultivo en Puerto Tejada presentó grandes diferencias, mostrando que los controles realizados fueron insuficientes e influyeron en el establecimiento de fitopatógenos (Martínez, 2000).

En Golondrinas las plantas afectadas se concentraron en la escala de lesiones insignificantes, muy pocas presentaron niveles de afección superiores al 60 % (Figura 1). En Puerto Tejada un número considerable de plantas alcanzó grados de severidad por encima del 40%, en los niveles de lesiones abundantes, infección intensa y deterioro de la planta. En esta zona las condiciones agroecológicas desfavorables (altas temperaturas, mal drenaje y encharcamiento) favorecieron la aparición de lesiones en el cultivo, afectando el crecimiento y desarrollo de la planta. Por otra parte, la magnitud de los daños es magnificada por la aplicación de biocontroladores que promueven el desarrollo de fitopatógenos e influyen en la intensidad del ataque (Zañón, 2000; Llanos, 2004; Álvarez, 2005).



**Figura 1.** Porcentaje de severidad de daños en las plantas de *Stevia*. A. Zona de Golondrinas (febrero 2005). B. Zona de Puerto Tejada (junio 2005)

### Caracterización de los patógenos

Entre los géneros de hongos causantes de enfermedades se encontraron *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp. y *Cladosporium* sp. *Phomopsis* sp. se detectó en hoja y no en tallo (Cuadro 2). También se identificaron como nuevos reportes *Ascochyta* sp.,

*Thielaviopsis* sp., *Pestalotia* sp., *Cercospora* sp., *Helminthosporium* sp., *Drechslera* sp., *Nigrospora* sp. y micelios estériles, que afectan el crecimiento, la reproducción y la calidad del producto (Llanos, 2004).

En Golondrinas se encontró mayor abundancia y diversidad de microorganismos, atribuido a condiciones ambientales propicias (alta

temperatura y humedad, vientos fuertes) que facilitan la dispersión, el crecimiento y desarrollo de los mismos. A pesar de ser numerosos los fitopatógenos, éstos no ocasionaron graves afecciones en campo, quizás por la competencia entre los microorganismos y la presencia en las muestras del hongo *Paecilomyces* sp, reconocido como regulador biológico (Madigan et al., 2004). En el caso de Puerto Tejada, la presencia de patógenos no fue considerable, pero su acción fue

mayor debido a la dificultad de los microorganismos para establecerse en nuevas áreas cuando no existen cultivos sensibles que permitan su desarrollo, lo cual favorece su poder de infección y efectividad (Roberts y Boothroyd, 1981). También se encontraron hongos del grupo de Mycelia Sterilia y levaduras con fuertes olores, no identificadas, explicando su presencia posiblemente al carácter saprofítico u oportunista.

**Cuadro 2.** Presencia de hongos en los órganos de *Stevia rebaudiana* en las dos zonas de estudio

Género	Golondrinas			Puerto Tejada		
	Hoja	Tallo	Raíz	Hoja	Tallo	Raíz
<i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp.	X	X	X	X	X	X
<i>Pestalotia</i> sp., <i>Ascochyta</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp.	X					
<i>Alternaria</i> sp., <i>Curvularia</i> sp.	X			X		
<i>Colletotrichum</i> sp.		X		X	X	
<i>Cercospora</i> sp., <i>Helminthosporium</i> sp.			X			
<i>Thielaviopsis</i> sp., <i>Drechslera</i> sp.		X				
<i>Nigrospora</i> sp.					X	
<i>Cladosporium</i> sp.				X		

Nota: Sumado a esta lista se encontraron 7 hongos del grupo Mycelia Sterilia y un hongo del grupo anamorfo no identificado

En las muestras de tejido se encontraron dos tipos de bacteria: B1 en hoja y B2 en raíz, que resultaron negativas en las pruebas KOH y tinción de Gram. La bacteria B1 con aspecto de bacillos diminutos, en medio de cultivo agar nutritivo formó colonias grandes y redondas, con superficie blanco amarillento y apariencia cremosa, brillante; y fuerte olor desagradable. La bacteria B2 en forma de bacillos, se encontró reunida en colonias pequeñas e irregulares, con superficie color amarillo fuerte; aspecto brillante, viscoso y olor fétido. Posiblemente pertenecen a *Pseudomonas* sp. y *Ralstonia* sp.

No se encontraron reportes de bacterias en estudios realizados en otros países en el cultivo de *Stevia*, por lo que la evidencia en la zona de Golondrinas parece indicar cierta sensibilidad del cultivo a este tipo de patógenos en condiciones del trópico. La zona de Puerto Tejada no reportó presencia de bacterias en el cultivo, siendo los hongos los microorganismos predominantes.

*Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. se encontraron en hoja, tallo y raíz en las dos localidades (Figura 2). *Colletotrichum* sp. se encontró asociado sólo a hoja y tallo. Los análisis para evaluar la presencia de estos hongos en la planta no mostraron

diferencias significativas, por lo que se infiere que estos microorganismos tienen la capacidad de obtener y aprovechar el alimento, desarrollarse y adaptarse a las condiciones que le ofrecen los diversos órganos de la planta (Garcés et al., 2003). Lo contrario ocurre con los microorganismos asociados a un solo órgano de la planta, como *Ascochyta* sp. y *Phomopsis* sp. presentes en las hojas (Figura 2A), lo que explica su preferencia por la facilidad de penetración (Agrios, 1991).

*Alternaria* sp. se destacó como el hongo de mayor incidencia en las hojas ocasionando manchas foliares. En Golondrinas fueron más frecuentes en el tallo *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. (Figura 2A) mientras que en Puerto Tejada, para el mismo órgano de la planta los de mayor incidencia fueron *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp. (Figura 2B). Para la raíz la mayor frecuencia de aparición en las dos zonas en estudio correspondió a *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp.

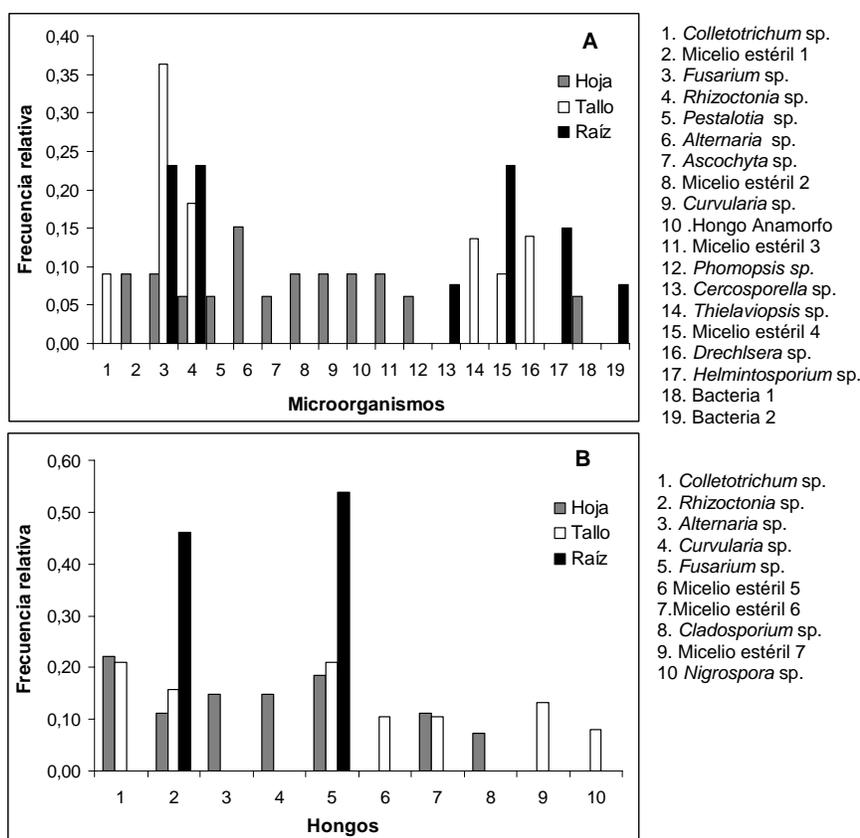
### Prueba de patogenicidad

Los microorganismos evaluados contribuyeron directamente al desarrollo de las enfermedades asociados a hoja, tallo y raíz, incluyendo las bacterias B1 y B2 (Cuadro 2). De acuerdo con la

intensidad del ataque, las enfermedades más severas en hoja fueron marchitez, mancha foliar y mancha necrótica, causadas por *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp. con 40, 36 y 26 % de afectación, respectivamente. En el tallo, las enfermedades con los mayores porcentajes fueron ocasionadas por *Fusarium* sp. (45 %) y *Rhizoctonia* sp. (39 %), al mostrar lesiones abundantes y complejas como marchitez, chancros, debilidad y necrosis. Las demás enfermedades mostraron daños menos graves y el material fue manejable para efectos comerciales. En las dos localidades las enfermedades producidas en raíz, como marchitamiento y necrosis de considerable severidad son causadas

principalmente por los hongos *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp., los cuales facilitan la invasión de microorganismos comunes del suelo produciendo mortalidad de los tejidos (Agrios, 1991).

Las bacterias en hoja y raíz presentaron baja severidad (aproximadamente 10 %), por lo que no son consideradas de alto riesgo para la planta, pero se estima que en condiciones desfavorables pueden potenciar aspectos perjudiciales para el cultivo. Los resultados de esta investigación indican que los patógenos que afectan con diferentes grados de severidad a la planta de *Stevia* son de importancia y deben estudiarse prácticas de manejo integral como medidas de prevención y control de enfermedades.



**Figura 2.** Frecuencia relativa de los microorganismos patógenos asociados a los órganos de *Stevia*. A. Hongos y bacterias en la zona de Golondrinas. B. Hongos en la zona Puerto Tejada

## CONCLUSIONES

Se identificaron los siguientes siete géneros de fitohongos aún no reportados: *Ascochyta* sp., *Thielaviopsis* sp., *Pestalotia* sp., *Cercospora* sp., *Helminthosporium* sp., *Drechslera* sp. y

*Nigrospora* sp. Además, varios hongos estériles y dos bacterias Gram negativas como causantes de daños de varios grados de severidad en los órganos de *Stevia rebaudiana*.

En las dos zonas, los microorganismos con mayor presencia fueron *Fusarium* sp., *Rhizoctonia*

sp., *Colletotrichum* sp. y *Alternaria* sp. Los dos primeros lograron afectar tanto hojas como tallos y raíces del cultivo.

Al comparar ambas zonas, los mayores porcentajes de incidencia y severidad de las enfermedades se obtuvieron en Puerto Tejada, caracterizado por su mayor temperatura, y se le asignó una calificación de alto riesgo ante la evidencia del mal estado del cultivo.

Se encontraron otros microorganismos como *Paecilomyces* sp., y algunos del grupo de *Mycelia Sterilia*, y levaduras de carácter probablemente saprófito u oportunista.

### AGRADECIMIENTO

A Darwin Grajales y Eliana Osorio, de Corpoagroestevia, por el financiamiento del trabajo de la Biólogo M.C. Arturo Solarte.

### LITERATURA CITADA

1. Agrios, G.N. 1991. Fitopatología. Limusa. México.
2. Álvarez, J. E. 2005. Inteligencia de mercados de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Escuela de Administración Finanzas y Tecnología. Antioquia. Colombia. 122p.
3. Ávila, C. 2004. Manual de Laboratorio de Fitopatología. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja. 134 p.
4. Bonilla, C.R., M.S. Sánchez y D.F. Perlaza. 2007. Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de *Stevia* en condiciones del Valle del Cauca. Acta Agronómica 56(3): 131-134.
5. Castaño, Z. J. 1990. Estandarización de la estimación de daños causados por hongos, bacterias y nemátodos en fríjol (*Phaseolus vulgaris*). Revista Fitopatología Colombiana 13: 9-19.
6. Garcés, E. M., Correa, B. Coba, M. Orozco, A. Zapata, A. Anacona y S. Sabogal. 2003. Morfología y clasificación de los hongos. Univ. Nacional de Colombia. Bogotá. 104 p.
7. Herbotecnia. 2004. Caá Heé-Yerba dulce. <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-stevia.html>. (consulta del 02-07-2008).
8. Kingler, A.R. 2004. Muestreo, filosofía, importancia y necesidad. Universidad del Valle Cali. 75 p.
9. Llanos, O.G. 2004. *Stevia*: El edulcorante 100 % natural. Asiava 65: 13-16.
10. Madigan, M., J. Martinko y J. Parker. 2004. Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. Madrid.
11. Martínez, P.T. 2000. La Hierba Dulce, Historia, Usos y Cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Ciencias de la Salud. Madrid. 125 p.
12. Maya, D.L. 2003. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Sec. Agric. de Antioquia. Medellín. 21 p.
13. Méndez, I., D. Namihira, L. Moreno y C. Sosa. 2001. El Protocolo de Investigación. Lineamientos para su Elaboración y Análisis. Trillas. México.
14. Niño, L.C. 2003. Plan de negocios de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 81 p.
15. Orrego, A. 2001. Levantamiento de enfermedades y plagas en Ka'a He'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)) Bertoni. Revista de Ciencia y Tecnología-UNA 1(3): 29-33.
16. Roberts, D. y C. Boothroyd. 1981. Fundamentos de Patología Vegetal. Acribia. Zaragoza.
17. Sañudo, B. S., M. Arteaga, W. Vallejo, R. Arévalo y E. Burbano. 2001. Fundamentos de Micología Agrícola. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. 201 p.
18. Torres, C. 2004. Manual de Laboratorio de Fitopatología. Universidad del Valle. Cali. 14 p.
19. Zañon, A.C. 2000. Yerba Dulce, informe agronómico sobre el cultivo de *Stevia rebaudiana*. Secretaria de Agricultura de Antioquia. Medellín. 24 p.