

## NOTA TÉCNICA

# IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN MUESTRAS PROVENIENTES DEL ESTADO ARAGUA, VENEZUELA

Luis Salazar<sup>1</sup>, Diego Diamont<sup>1</sup> y Glenda Aponte<sup>1</sup>

## RESUMEN

Al servicio de diagnóstico de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos del INIA-CENIAP, en Maracay, Venezuela, ingresaron dos muestras de *Stevia rebaudiana* que presentaban marchitez ascendente con necrosis en la base del tallo. Esta especie ha sido introducida como cultivo en el país por su potencial como edulcorante. Para el aislamiento del patógeno se procedió a realizar siembra directa, la cual consistió en separar cada órgano de la planta, desinfectarlos con NaClO al 2 % y colocarlos en medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA, con estreptomycin), bajo condiciones de cámara de aislamiento; se incubó a 28 °C por 48 h. Luego, se aislaron las colonias típicas en PDA con estreptomycin. Una vez obtenidos los cultivos puros, se procedió con los postulados de Koch. Para la inoculación se utilizaron plantas de estevia de 60 días de edad cultivadas en sustrato estéril. Las plantas fueron inoculadas por infiltración con una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios por mL del patógeno para luego ser colocadas en cámara húmeda. Se realizaron observaciones diarias hasta la visualización de los síntomas. A partir del reaislamiento del hongo se procedió a describir sus características macro y microscópicas y se utilizaron claves taxonómicas para su identificación. Se observaron colonias blancas que se tornaron posteriormente a color púrpura, así como conidios, macroconidios y clamidosporas. La prueba de patogenicidad demostró que el hongo *Fusarium oxysporum* fue el causante de la enfermedad en plantas de estevia.

**Palabras clave adicionales:** Aislados, *Fusarium*, patógeno

## ABSTRACT

### Identification of the causing agent of *Stevia rebaudiana* wilt in samples from Aragua State, Venezuela

Two samples of *Stevia rebaudiana*, presenting upward necrotic wilt in the stem, were brought to the diagnostic service for phytopathogen-produced diseases of INIA-CENIAP, in Maracay, Venezuela. This species has been introduced in the country due to its potential as a sweetener. The pathogen was isolated by direct seeding, which consisted in separating each plant organ, disinfecting them with 2 % NaClO, and placed in potato dextrose agar culture medium (PDA, with streptomycin), under conditions of isolation chamber; tissue was incubated at 28 °C / 48 h. Then, typical colonies were isolated on PDA with streptomycin. After obtaining pure cultures, we proceeded with Koch's postulates. For inoculation 60-days old *Stevia* plants, grown in sterile substrate, were used. Plants were inoculated by infiltration using a suspension of  $1 \times 10^6$  conidia of the pathogen per mL. Inoculated plants were placed in a wet chamber and daily observations were made until symptoms onset. Fungus was reisolated and macro and microscopic aspects of the fungus were characterized. Identification of the pathogen was achieved by using a taxonomic identification key. White colonies were observed which later became purple. Microscopic structures such as conidia, chlamydospores and macroconidia were also observed. The pathogenicity test demonstrated that the fungus *Fusarium oxysporum* was causing of the disease in *Stevia* plants.

**Additional key words:** *Fusarium*, isolates, pathogen

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el consumo de edulcorantes naturales ha incrementado considerablemente, por lo que es común su venta en supermercados y

tiendas naturistas. Uno de los edulcorantes más importantes proviene de plantas de estevia, cuya industrialización produce mates, néctares y hojas micropulverizadas (Jarma et al., 2010; Vázquez et al., 2014). En Venezuela son pocos los estados

---

Recibido: Agosto 7, 2014

Aceptado: Febrero 9, 2015

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), Unidad de Protección Vegetal, Maracay, Venezuela. e-mail: luisagronomia@gmail.com; ddiamont@yahoo.com; gaponteve@gmail.com

en que actualmente se produce estevia y sólo existen reportes de áreas cultivadas en el estado Aragua (González et al., 2014), así como en Monagas, Mérida, Sucre y Yaracuy en donde ya se tienen experiencias en el manejo del cultivo en pequeñas unidades de producción; sin embargo, no existe información acerca del comportamiento y la interacción de hongos patógenos con el cultivo, ni se han diseñado alternativas de biocontrol para ser integradas en el manejo agronómico en condiciones tropicales. De no ser consideradas estas medidas, se corre el riesgo de que se presenten los mismos problemas ya reportados en otros países, en donde los hongos fitopatógenos afectan, además de raíces y tallos, a las hojas, de las cuales se extrae el edulcorante (Zañon, 2000).

En el país no hay señalamientos sobre los problemas de fitopatogenicidad en las unidades de producción de estevia por ser un cultivo nuevo; sin embargo, el desconocimiento de la biología de los patógenos dificulta el desarrollo de tecnologías para el cultivo y sus respectivos controles fitosanitarios, considerando que las enfermedades de tipo fúngico son las más importantes. En Paraguay y Brasil se reportan los géneros *Phomopsis*, *Curvularia*, *Botryodiplodia*, *Phlyctaena*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Septoria*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* y *Fusarium* (Zañon, 2000).

Las manchas causadas en las hojas por *Septoria* sp. y *Alternaria* sp. reducen el valor y calidad comercial de las mismas, 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). Estos aspectos son indicadores importantes para elaborar un programa de manejo fitosanitario, donde constantemente se evalúen las distintas opciones y poder detectar a tiempo el agente causal de la marchitez en cultivo de estevia.

El objetivo de esta investigación fue identificar el agente causal de la marchitez de plantas de estevia en muestras provenientes del estado Aragua en Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron consignadas al Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Causadas por Hongos de la Unidad de Protección

Vegetal del INIA-CENIAP. El material vegetal provino de la hacienda Tucupido, ubicada en el sector Tucupido del municipio Santiago Mariño, estado Aragua.

Las plantas procesadas presentaron marchitez ascendente con necrosis en la base del tallo. Para el aislamiento del patógeno las muestras fueron llevadas al laboratorio, donde las hojas, tallo y raíz fueron separadas, lavadas con agua corriente y desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % durante 2 minutos. Luego se secaron con papel absorbente y posteriormente se tomaron secciones de aproximadamente 3 mm que fueron sembradas en medio de cultivo artificial papa dextrosa agar (PDA con estreptomycin) en una cámara de aislamiento. Las placas fueron incubadas a temperatura de 28 °C por un lapso de 48 horas; luego las colonias se sembraron en PDA con el propósito de obtener un cultivo puro.

**Identificación del patógeno.** Se utilizaron aislados de tres y de siete días de crecimiento para evaluar las características macroscópicas y microscópicas de valor taxonómico. En los aislados de tres días de crecimiento se observaron las características macroscópicas como el diámetro de la colonia, color y aspecto del micelio, mientras que en las colonias de siete días se realizaron las observaciones y mediciones microscópicas de macroconidios, microconidios y clamidosporas usando un ocular micrométrico en preparados permanentes. En el caso de la esporulación, ésta se cuantificó mediante el uso de una cámara de Neubauer. Para la identificación del agente causal se utilizaron las claves taxonómicas (Toussoun y Nelson, 1976).

**Obtención del inóculo para las pruebas de patogenicidad.** Una vez obtenidas las colonias de cultivo puro, se realizó la preparación del inóculo utilizando el hongo patógeno, cultivado por siete días creciendo en PDA con estreptomycin a 28 °C. Cumplido el tiempo, se agregó a cada placa 20 mL de agua destilada estéril (ADE) y con un bisturí se separó suavemente el micelio y los conidios del hongo. Para determinar la concentración del inóculo, se colocó una gota de esta suspensión en la cámara de Neubauer, se procedió a contar con un microscopio compuesto. La concentración del inóculo fue de  $1 \times 10^6$  conidios por mL.

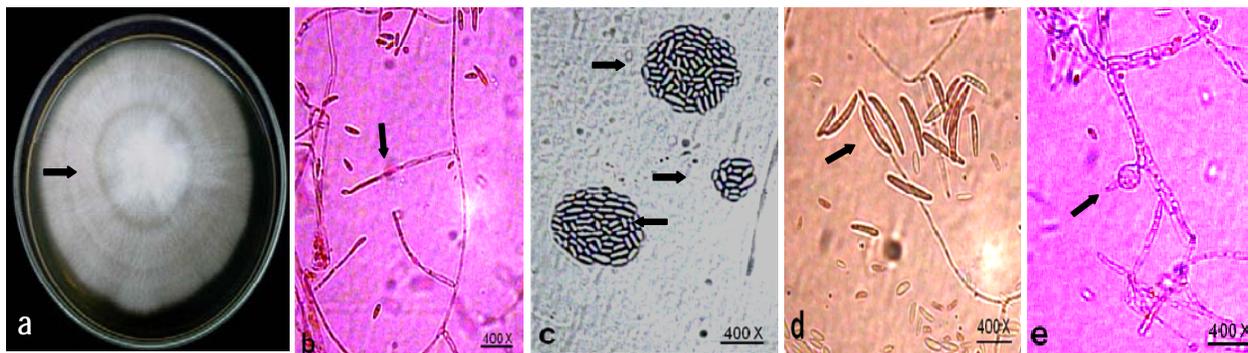
Para comprobar la patogenicidad del aislado se utilizaron 12 plantas sanas de estevia de 60 días de edad, sembradas en bolsas de polietileno de 2 L

con sustrato estéril. Se inocularon 10 plantas por el método de infiltración en la base del tallo con la suspensión de conidios del patógeno y se colocaron en un umbráculo donde se realizaron las observaciones periódicas hasta visualizar los primeros síntomas. Se dejaron dos plantas inoculadas con ADE como testigos. Una vez transcurrido este lapso, se hicieron reaislamientos del tejido vegetal con síntomas típicos de los cuales crecieron colonias de la misma especie.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación del agente patógeno.** Se obtuvieron colonias de un hongo en medio de cultivo PDA con estreptomycin, de crecimiento moderado, inicialmente de micelio algodonoso,

abundante, de color blanco, luego de tres días cambió a color púrpura, con una dimensión de 4 cm de diámetro en seis días. Se evidenció la presencia de microconidios de 6,9-16,3  $\mu\text{m}$  de largo y 2,3-4,6 de ancho, usualmente unicelulares o con un septo, de forma oval a elipsoidal, tipo amerospora sin tabiques, de pared lisa, algunos rectos o curvos, originados de fiálides cortas laterales y macroconidios con 3 a 5 septos transversales, de forma falcada, tipo alantospora (su forma se asemeja a una banana), de 25,5-32,5  $\mu\text{m}$  de largo y 4,6-6,9  $\mu\text{m}$  de ancho, clamidosporas globosas, solitarias o en pares, intercalares 6,9-11,6  $\mu\text{m}$  de largo y 6,9-11,6  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 1). Las características del aislamiento corresponden a la descripción dada por Toussoun y Nelson (1976) para la identificación taxonómica de *Fusarium oxysporum*.



**Figura 1.** Características macro y microscópicas para la identificación taxonómica del aislamiento correspondiente a *Fusarium oxysporum*. a) Colonia del hongo con formación de micelio blanco algodonoso. b) Fiálides laterales. c) Microconidios unicelulares o con un septo, de forma oval a elipsoidal agrupados en masa o solitarios. d) Macroconidios con 3 a 5 septos transversales, de forma falcada. e) Clamidospora globosa y solitaria

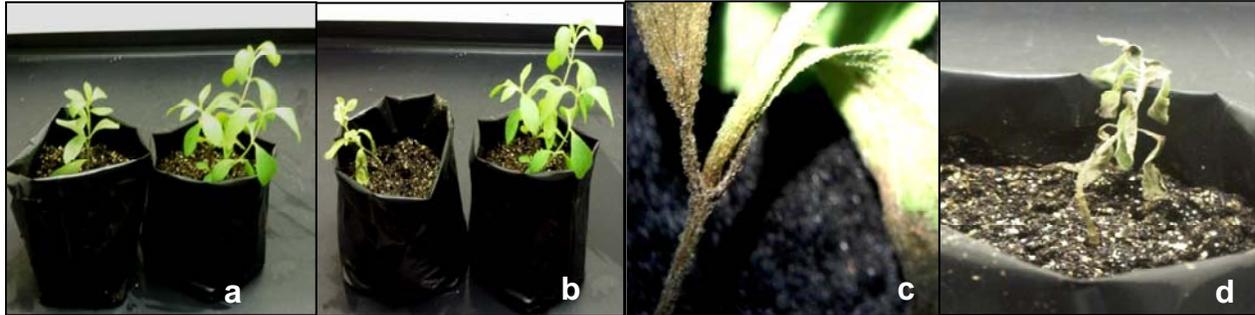
**Prueba de patogenicidad.** Los síntomas desarrollados en las plantas se evidenciaron luego de cuatro días de ser inoculadas con el microorganismo. En la Figura 2 se pueden observar las lesiones de color pardo en la zona del cuello, que luego se extendieron por todo el tallo. Estas necrosis avanzaron progresivamente hacia la parte superior y produjeron estrangulamiento en la zona de avance. De igual forma, las hojas presentaron síntomas de marchitez. Las plantas murieron en un período de siete días. A partir de las lesiones se realizó el reaislamiento y se pudo constatar la presencia de *Fusarium oxysporum*. Los testigos inoculados sólo con agua destilada estéril no presentaron síntoma de la enfermedad.

Los resultados de esta investigación coinciden con los reportados por Arturo et al. (2009) quienes evaluaron dos localidades cultivadas de estevia en Colombia y mediante las pruebas de patogenicidad lograron determinar que el hongo con mayor incidencia en las muestras analizadas era *Fusarium* sp. La sintomatología fue similar a la mencionada por Orrego (2001), Maya (2003) y Llanos (2004).

Las condiciones agroecológicas, el manejo inadecuado de sistemas de riego y el mal empleo de las prácticas agronómicas favorecen el desarrollo de *Fusarium oxysporum* (Agrios, 1991; Arturo et al., 2009). El hongo se presenta en la plantación de estevia de acuerdo con las

condiciones ambientales, suele desarrollarse en ausencia de lluvias pero con alta humedad

ambiental, concordando con las condiciones climáticas presentes en el cultivo (Orrego, 2001).



**Figura 2.** Prueba de patogenicidad realizada en plantas sanas de estevia de 60 días de edad. a) Plantas antes de inocular. b) aparición de los primeros síntomas de la enfermedad (lado izquierdo), marchitez generalizada y clorosis de las hojas. c) Necrosis de la base de la planta y avance de la enfermedad a la parte aérea de la planta. d) Marchitez y necrosamiento en toda la planta

Se ha reportado que la incidencia de *Fusarium* puede causar secamiento de plantas hasta en 11,7 % y el hongo fue señalado en 1997 como el agente causal de marchitez y pudrición de raíces y tallos de *S. rebaudiana* en la zona de San Lorenzo, Paraguay (Herrera et al., 2012).

En diferentes países, algunas especies de hongos identificadas como causantes de enfermedades en *S. rebaudiana* son *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium dephinii*, *Septoria steviae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Alternaria steviae* (Lovering y Reeleder, 1996; Kamalakannan et al., 2006; Maiti, et al., 2007), así como *Septoria steviae* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Maya, 2003). Para el caso de Venezuela, el presente reporte señala a *Fusarium oxysporum* como causante de marchitez en estevia.

## CONCLUSIONES

A partir de plantas enfermas de estevia con síntomas de marchitez se logró aislar a *Fusarium oxysporum*. Tanto las características morfológicas y culturales, como las pruebas de patogenicidad permitieron demostrar que este hongo es el causante de la patología en la planta.

Este estudio representa el primer reporte que señala a este microorganismo como causante de marchitez en el cultivo de estevia en el país.

## LITERATURA CITADA

1. Agrios, G. 1991. Fitopatología. Limusa. México.

2. Arturo M., C. Torres, E. Peña y J. Díaz. 2009. Microorganismos patógenos de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bioagro* 21(3): 173-178.
3. González, C., M.S. Tapia, E. Pérez, M. Dornier y G. Morel. 2014. Caracterización de cultivares de *Stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes procedencias. *Bioagro* 26(2): 79-88.
4. Herrera, F., L. Gómez y C. González. 2012. El cultivo de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en condiciones agroambientales de Nayarit, México. INIFAP. Folleto Técnico N° 19.
5. Jarma, J., E. Combatt y J. Cleves. 2010. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. *Agronomía Colombiana* 28(2): 199-208.
6. Kamalakannan, A., V. Valluvaparidasan, K. Chitra, E. Rajeswari, K. Salaheddin, D. Ladhakshmi y A. Chandrasekaran. 2007. First report of root rot of *stevia* caused by *Sclerotium rolfsii* in India. *Plant Pathology* 56(2): 350.
7. Lovering, N. y R. Reeleder. 1996. First report *Septoria steviae* on *stevia* (*Stevia rebaudiana*) in North America. *Plant Disease* 80: 959.
8. Llanos, O. 2004. *Stevia*: El edulcorante 100 % natural. *Asiava* 65: 13-16.
9. Maiti, C.K., S. Sen, R. Acharya y K. Acharya. 2007. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana*. *Plant Pathology* 56(4): 723.
10. Martínez, P. 2000. La Hierba Dulce, Historia, Usos y Cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

- Ciencias de la Salud. Madrid. 125 p.
11. Maya, D. 2003. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Sec. Agric. de Antioquia. Medellín. 21 p.
  12. Niño, L. 2003. Plan de negocios de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 81 p.
  13. 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.
  14. Toussoun, T. y P. Nelson. 1976. *Fusarium*: A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. Pennsylvania State University Press, 43 p.
  15. Vázquez-Baxcajay, L., A. Robledo-Paz, A. Muratalla-Lúa y V. Conde-Martínez. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. Bioagro 26(1): 49-56.
  16. Zañon, A. 2000. Yerba dulce, informe agronómico sobre el cultivo de *Stevia rebaudiana*. Secretaria de Agricultura de Antioquia. Medellín. 24 p.