
INFORME TECNICO

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA ETIOLOGÍA DE LA MUERTE DE PLANTAS DE ALMENDRO

Ing. Marangi, María Julia
Ing. Alonso Cayumán, Javier
Lamas, Magalí
Dra. Pose, Graciela Noemí



A: AER INTA Valle Medio
Villa Galense, Luis Beltrán, Río Negro
Ing. Diana Fernández

DE: CIT Río Negro – UNRN
Mitre 331, Villa Regina, Río Negro
Ing. María Julia Marangi, Ing. Javier Alonso, Magalí Lamas, Dra. Graciela Pose

ASUNTO: Estudio microbiológico de la etiología de la muerte de plantas de almendro.

FECHA: Villa Regina, Agosto de 2018

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio microbiológico a fin de determinar la posible implicancia de microorganismos como causa de la muerte de un árbol de almendro en una plantación situada en Luis Beltrán, Valle Medio de Río Negro. Debido a la sintomatología observada se sospechaba de un posible caso de “Marchitamiento por *Verticillium*” (*Verticillium* Wild) en almendros, causada por *V. dahliae*.

INDICE

- 1- Introducción
 - Muestras
 - Sintomatología
- 2- Objetivos
- 3- Procedimiento
- 4- Resultado
- 5- Conclusión
- 6- Recomendaciones

1- INTRODUCCIÓN

Durante el mes de noviembre de 2017 se ha producido el marchitamiento y muerte de un árbol de almendro, siendo la sintomatología observada coincidente con casos de “Marchitamiento por *Verticillium*” (*Verticillium* wilt). Marchitamiento y muerte de ramas de árboles de almendro causado por este hongo ha sido reportado (Zhang y col., 2008; Nouri y col., 2012). A fin de confirmar esto o determinar el origen de la patología, si fuera microbiológico, se realizaron los ensayos correspondientes.

Los síntomas del marchitamiento causado por *Verticillium dahliae* varían entre hospedadores, y ninguno es absolutamente diagnóstico. Sin embargo, prematura clorosis y necrosis foliar y una coloración café o marrón o vetas en el sistema vascular son características de todos los hospedadores (<http://u.osu.edu/ornamentaldiseasefacts/sample-page/verticillium-wilt/verticillium-advanced/>).

En general, los síntomas aparecen en las hojas como marchitamiento, clorosis y aspecto quemado. Ramas afectadas pueden estar dispersas por toda la copa de los árboles o pueden ocurrir solamente en un lado. Si los síntomas progresan, se produce la muerte de la rama, pudiendo perecer ramas grandes enteras. En infecciones severas todo el árbol puede marchitarse y morir repentinamente (<https://pnwhandbooks.org/node/3425/print>).

Como resulta conveniente para el aislamiento de especies de *Verticillium* no partir de muestras con tejido muerto, se realizaron dos estudios, uno sobre material enviado inicialmente, en esta condición, y otro sobre material con síntomas pero no completamente seco.

Muestras

Las muestras fueron recolectadas en una plantación de Luis Beltrán en noviembre de 2017 sobre un árbol ya seco. Esta consistió de ramas, hojas y raíces de la misma.

En el segundo, la muestra consistió en ramas sintomáticas de 2,5 cm de diámetro o más, que tenían entre 20 y 30 cm de largo. Fueron recolectadas en marzo de 2018.

También fueron enviadas muestras de suelo que no pudieron ser analizadas por el contenido de humedad (tomadas luego de un período de lluvias).

En todos los casos, estas fueron enviadas por AER – INTA Valle Medio.

Sintomatología

Caso 1: Planta de almendro que se secó completamente. Se recogieron ramas, hojas y raíces de la misma. Se recibieron algunas ramas con avanzado grado de marchitez pero no completamente secas (Imagen 1).



IMAGEN 1. A: Árbol muerto a campo. B y C: Muestras enviadas, ramas marchitas y ya secas, respectivamente.

Caso 2: Ramas frescas de almendros exhibiendo en la superficie zonas con manchas marrón oscuro de aspecto seco. Algunas de ellas mostraron una coloración oscura anormal en el interior, que en la mayoría de los casos parece extenderse desde el centro hacia el exterior (Imagen 2).



IMAGEN 2: Ramas frescas exhibiendo manchas marrones.

2- OBJETIVO

Determinar si la causa de la muerte del árbol de almendro en la plantación puede corresponder a un caso de "Marchitamiento por *Verticillium*" provocado por *V. dahliae*. Se pretende determinar la presencia de este patógeno en las muestras recibidas o, de no corresponder el caso, determinar el origen de la patología.

En el segundo caso se trató de determinar la presencia de *Verticillium dahliae* a partir de muestras con síntoma inicial de Marchitamiento por *Verticillium*, como es recomendado.

3- PROCEDIMIENTO

Caso 1. Se analizaron porciones de unos 10 cm. de ramas secas y aún frescas, raíces, hojas secas y hojas marchitas, pero aún verdes, del almendro que comenzó a secarse.

Las muestras fueron lavadas con agua de grifo. Se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en una solución de Hipoclorito de Sodio 1% durante 3 minutos (en el caso de las hojas, solo se sumergieron unos segundos) y se enjuagaron con agua destilada estéril dos veces.

Luego de la desinfección, en el caso de hojas, se extrajeron asépticamente trozos que fueron directamente inoculados en placas de Petri conteniendo el medio Agar Papa Dextrosa (PDA) con Sulfato de Estreptomicina (50mg/l). En el caso de las ramas y raíces, se raspó la superficie para poder acceder al sistema vascular. Trozos de este tejido fueron inoculados sobre el mismo medio. En ambos casos, las placas se incubaron a 25°C entre 7 y 15 días (Levin y col., 2003; Zhang y col., 2008; Nouri y col. 2012).

Caso 2. Se analizaron porciones de aproximadamente 10 cm. de 10 ramas sintomáticas.

Las muestras fueron lavadas bajo agua del grifo. Se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en una solución de Hipoclorito de Sodio 1% durante 3 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril dos veces.

Luego de la desinfección, se extrajeron asépticamente trozos de muestras, para ello se pelaron las ramas y se cortaron rodajas del interior de las muestras. Los trozos fueron sembrados en placas de Petri conteniendo el medio Agar Papa Dextrosa (PDA) modificado con Sulfato de Estreptomicina (50mg/l). Las placas se incubaron a 25°C entre 7 y 15 días.

4- RESULTADOS

Caso1:

Desde ramas y hojas (ambos casos) se hallaron diversos géneros fúngicos, entre ellos *Alternaria* en todas las muestras analizadas. Otros géneros aislados fueron *Arthrimum*, *Ulocladium*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* y *Phoma*. Desde trozos de raíces se determinó *Penicillium* y se obtuvieron 4 aislamientos presuntivos, 3 morfológicamente similares a *Verticillium* y uno morfológicamente similar a *Colletotrichum*.

Análisis moleculares (secuencia parcial gen Actina) sobre los aislamientos presuntivos *Verticillium* reveló la identidad de estos como *Gibellulopsis nigrescens*, saprobio común en suelos, que puede confundirse morfológicamente con estos.

Caso 2:

No se obtuvo desarrollo fúngico a partir de las muestras analizadas.

5- CONCLUSION

No se ha podido determinar la presencia del patógeno *V. dahliae* en las muestras analizadas.

6- RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios sistemáticos y más profundos, analizando un número mayor de muestras, incluyendo suelo, y realizando un seguimiento de la enfermedad desde sus síntomas iniciales para reducir la presencia de géneros fúngicos que actúan como colonizadores oportunistas de las muestras dañadas, tales como *Alternaria spp.* que dificultan el aislamiento del patógeno.

Se realizará un nuevo análisis molecular sobre los aislamientos inicialmente presuntivos *Verticillium* y se re-identificará también por análisis molecular el presuntivo aislamiento perteneciente al género *Colletotrichum*, patógeno de plantas.