

***Colletotrichum nymphaeae* COMO AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN PLANTACIONES DE FRUTILLA DEL CENTRO DE SANTA FE**

Cabral, Ana M.¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias-UNL
Director/a: Fernandez, Laura N.
Codirector/a: Favaro, M. Alejandra

Área: Ingeniería

Palabras claves: Caracterización molecular, frutilla, *Colletotrichum*

INTRODUCCIÓN

En Argentina, la producción de frutillas ronda las 1.700 hectáreas, con una producción total aproximada de 50.000 toneladas anuales y un consumo promedio anual de 1 kg por persona (SAGYP, 2023). La Provincia de Santa Fe, junto a Tucumán y Buenos Aires son las tres grandes regiones productoras de frutilla de Argentina y representan un 80% de la producción nacional (SAGYP, 2023). Socialmente, la importancia de este cultivo radica en el uso intensivo de mano de obra, siendo una de las principales fuentes de trabajo con gran influencia en la economía y en el desarrollo de la región.

Dentro de los sistemas productivos, las enfermedades son un factor sumamente importante que afecta tanto la calidad comercial como los rendimientos que se pueden obtener del cultivo de frutilla. En ese sentido, la antracnosis causada por el complejo de especies del género *Colletotrichum* es una enfermedad de gran impacto en este cultivo. Bajo condiciones favorables puede provocar pérdidas de rendimiento superiores al 50%. *Colletotrichum* spp. se encuentran entre los más comunes y dañinos hongos fitopatógenos en los sistemas productivos (Dowling et al., 2020). Los síntomas más comunes son la podredumbre de fruta y el tizón de la flor, pero hojas, pecíolos, estolones, raíces y coronas también pueden infectarse (Wang et al., 2019). En el caso de los frutos, pueden ser colonizados en cualquier estado de desarrollo. Cuando son pequeños, con frecuencia todo el ramillete muere. En los frutos más desarrollados en general, se producen varias lesiones caracterizadas como necróticas, hundidas, de color marrón oscuro. A medida que la enfermedad progresa se desarrolla el signo sobre la misma, conformado por masas conidiales anaranjadas, producidas en acérvulas (Wang et al., 2019).

Tradicionalmente, el agente causal de esta enfermedad fue asociado a tres especies de *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*. Todas producen síntomas semejantes, pero la podredumbre de frutos está asociada con mayor frecuencia a *C. acutatum*. Estas especies han sido reportadas en las regiones frutilleras de nuestro país a partir de varios estudios sobre las características morfológicas (Mónaco et al., 2000). Sin embargo, estos criterios no son suficientes para diferenciar fehacientemente especies dentro del género *Colletotrichum* debido a la plasticidad morfológica que presentan (Cannon et al.,

Título del proyecto: "Bases para el manejo sustentable de antracnosis en la producción de frutilla santafesina"

Instrumento: PIBAA 28720210100313CO

Año convocatoria: 2022

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Favaro, Ma. Alejandra



2012). En el año 2009, con base en la biología molecular, se avanzó notablemente en la sistemática de *Colletotrichum*. Los avances recientes, comunican para el género *Colletotrichum* 280 especies que se dividen en 16 complejos y 15 especies únicas (Liu et al., 2022). En diferentes regiones del mundo, se ha informado que cinco complejos de especies de *Colletotrichum* causan la antracnosis en frutilla: el complejo *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. dematium*, *C. boninense* y *C. truncatum* (Ji et al., 2022).

Así, a pesar del impacto que tienen las enfermedades ocasionadas por *Colletotrichum* spp. en frutilla, aún se desconoce cuáles son las especies que realmente están involucradas en estas enfermedades en la provincia de Santa Fe y en consecuencia se ignora su sensibilidad a fungicidas, lo que dificulta establecer estrategias de control eficientes.

OBJETIVOS

Caracterizar al agente causal de la antracnosis en frutilla a través de estudios morfológicos, moleculares y de patogenicidad para contribuir al manejo de la enfermedad en las zonas productoras de la provincia de Santa Fe.

METODOLOGÍA

Durante los últimos tres años se monitorearon plantaciones de frutillas de las localidades de Coronda, Arroyo Leyes y Cayastá. Para la obtención de aislados, frutos con síntomas típicos de antracnosis fueron colocados en cámara húmeda para desarrollo del signo. Mediante la técnica de toque de esporas, se realizaron aislados en medio agar papa dextrosa (APD) enmendado con sulfato de estreptomicina 0,5 g.l⁻¹ (Cai et al., 2009). Las placas se incubaron a 25°C con 12 h de luz: 12 h de oscuridad durante siete a diez días. A partir de los cultivos obtenidos se realizaron aislados monospóricos mediante técnica de transferencia de un conidio germinado. Los mismos se conservaron en papel de filtro deshidratado con sílica gel en el freezer a -20°C para posteriores ensayos.

Para la identificación molecular se extrajo el ADN de colonias crecidas en APD durante diez días siguiendo la metodología descrita por Gupta et al. (2013). Posteriormente se amplificaron tres regiones génicas, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): el gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (gapdh) usando los cebadores GDF y GDR; el gen β -tubulina (tub2) usando los cebadores T1 y Bt2b y el gen Histona-3 (his3) usando los cebadores CYLH3F y CYLH3R. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne TC-312 en mezclas de reacción de 20 μ l. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1,5% por electroforesis en solución tampón 1x TAE (Tris-Acetato 40 Mm, EDTA 1 mM). Posteriormente se visualizó bajo luz ultravioleta (300 nm) utilizando un transiluminador Biostep UST-30M-8E. Los productos obtenidos se secuenciaron en MacroGen (Seoul, Corea). Las secuencias obtenidas se analizaron y alinearon con el programa MEGA X utilizando el algoritmo MUSCLE. Posteriormente se comparó con especímenes tipo de la base de datos de GenBank.

Se corroboró la patogenicidad de los aislados mediante infecciones artificiales. Cada aislado se inoculó en frutos de la variedad de la cual se obtuvo, usando la metodología descrita por Nam et al. (2013). Frutillas visualmente sanas, de tamaño comercial y con color verde predominante se desinfectaron superficialmente con etanol (70% v/v) por 3 min y solución de hipoclorito de sodio (1% v/v) durante 1 min. Inmediatamente, las frutas se enjuagaron tres veces en ADE durante 2 min y se secaron en papel absorbente estéril. Posteriormente, con ayuda de una aguja estéril se realizaron tres heridas equidistantes de 0,5 mm de diámetro y 1 mm de profundidad en cada fruto. Sobre cada herida se depositó una gota de 10 μ l de una

suspensión de 1×10^5 conidios mL^{-1} . Sobre las frutas sin herir se realizaron tres puntos de inoculación depositando una gota de suspensión en cada uno. Por cada aislado se ensayaron 3 frutos heridos y 3 frutos sin herir. Sobre las frutas testigo se colocaron gotas de ADE. Los frutos inoculados se mantuvieron en cámaras húmedas a 25°C con un fotoperíodo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad. Las cámaras fueron monitoreadas diariamente registrando los primeros síntomas y su evolución hasta los 10 días post inoculación (dpi).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

De frutas con síntomas típicos de antracnosis (Figura 1A) se obtuvieron 21 aislados monospóricos. Las colonias presentaron bordes regulares, definidos, con micelio sub-aéreo color blanquecino-grisáceo y el envés color crema-rosa (Figura 1B). El patrón de crecimiento de las colonias fue circular, con masas mucilaginosas de acérvulas color salmón-naranja, distribuidas en forma concéntrica sobre las colonias (Figura 1C). Pasados los 7 días, las colonias empezaban a tomar una coloración gris oscuro a negro y las acérvulas comenzaban a oscurecerse. Todos los aislados presentaron hifas hialinas, multinucleadas, septadas y ramificadas. Los conidios observados fueron hialinos, de bordes rectos con uno de sus extremos de terminación redondeada y el opuesto acuminado (Figura 1D). El valor medio del largo de los conidios fue de $15,11 \mu\text{m}$ con un mínimo de $9,34 \mu\text{m}$ y un máximo de $26,25 \mu\text{m}$ mientras que el ancho tuvo un valor medio de $4,21 \mu\text{m}$ con un mínimo de $2,71 \mu\text{m}$ y un máximo de $5,97 \mu\text{m}$. No se visualizó desarrollo de estructuras de origen sexual o teleomorfo. Dada la superposición de valores en el tamaño de los conidios previamente reportada entre las especies de los complejos de *Colletotrichum*, no fue posible definir fehacientemente la/s especies presentes con los datos morfológicos. En consecuencia, mediante estas características sólo pudo determinarse que los 21 aislados de *Colletotrichum* pertenecen al Complejo *C. acutatum*.

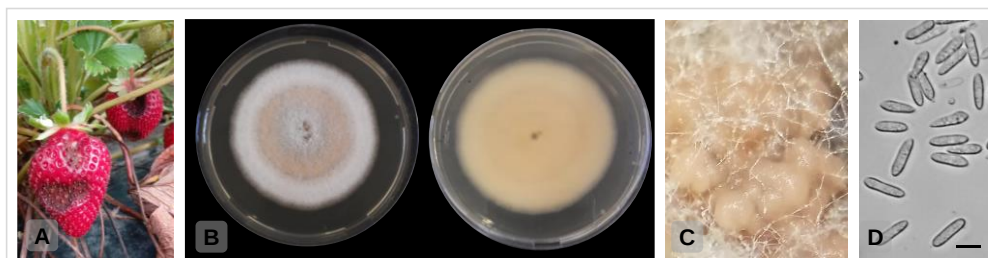


Figura 1: *Colletotrichum nymphaeae*, desde el campo al laboratorio. A-Síntomas a campo de antracnosis en Cv. “San Andreas”; B-Frente y reverso de colonias de 7d creciendo en APD; C-Detalle de acérvulas; D-Conidios. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$

Para complementar esta caracterización morfológica y determinar correctamente las especies presentes, se realizó la identificación molecular. Los 21 aislados obtenidos se caracterizaron exitosamente mediante la secuenciación del gen *tub2*, arrojando entre un 99,8 a 100% de identidad con la especie *Colletotrichum nymphaeae*. En base a estos resultados, se seleccionaron 6 aislados representativos que se caracterizaron mediante la secuenciación de dos genes adicionales: *gapdh* e *his3*, a los fines de confirmar la identificación. En todos los casos, los resultados de BLAST arrojaron un porcentaje de identidad con *Colletotrichum nymphaeae* de 100% para *gapdh* y 99,7 a 100% para *his3*.

Para cumplimentar con los postulados de Koch se realizaron pruebas de patogenicidad con los 6 aislados de *C. nymphaeae* seleccionados. Todos produjeron síntomas típicos de antracnosis, corroborando su patogenicidad. Los primeros síntomas se manifestaron en forma

de lesiones necróticas puntiformes que fueron visibles a los 3 días post inoculación (dpi) en frutos con heridas y a los 4 dpi en frutos sin herir. La presencia del signo, fue visible a los 4 dpi en frutos heridos y a los 5 dpi en frutos sin herir. A los 6 dpi las lesiones empezaban a tomar aspecto hundido (Figura 2). A los 8 dpi las lesiones en frutas sin herir habían coalescido y los frutos con heridas estaban totalmente cubiertos por las lesiones. Los frutos control se mantuvieron sanos los 10 días que perduró el ensayo. Estos resultados corroboran la patogenicidad de *C. nymphaeae* en frutos de frutilla.

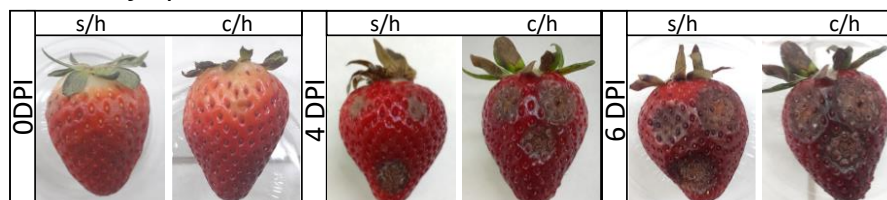


Figura 2: Síntomas desarrollados en pruebas de patogenicidad. Se muestra un aislado representativo y la evolución de los síntomas (de izquierda a derecha) 0 días postinoculación (DPI), 4 DPI y 6 DPI en frutos sin herida (s/h) y con herida (c/h), respectivamente.

Para Argentina, este trabajo resulta el primer registro de *C. nymphaeae* como agente causal de antracnosis en frutilla, identificado en base a características morfológicas y moleculares. Se requieren más estudios para poder determinar la epidemiología de la enfermedad y las medidas de manejos que pueden recomendarse a los fines de poder brindar herramientas certeras a los productores.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B., Waller, J., Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C. & Johnston, P.R. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39, 183-204.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R. & Weir, B.S. (2012). *Colletotrichum*: current status and future directions. *Studies in Mycology* 73, 181e213. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0014>.
- Dowling, M., Peres, N., Villani, S., & Schnabel, G. (2020). Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A "complex" challenge. *Plant Disease*, 104 (9), 2301-2316. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2378-FE>.
- Gupta, V.K., Tuohy, M.G., & Gaur, R. (2013). Methods for high-quality DNA extraction from fungi. En: V.K. Gupta, M.G. Tuohy, M. Ayyachamy & K.M. Turner, (Eds.), *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 403-406). Springer, New York, NY.
- Ji, Y., Li, X., Gao, Q.H., Geng, C., & Duan, K. (2022). *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry: discovery history, global diversity, prevalence in China, and the host range of top two species. *Phytopathology Research*, 4 (1), 42.
- Liu, F., Ma, Z.Y., Hou, L.W., Diao, Y.Z., Wu, W.P., Damm, U., & Cai, L. (2022). Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. *Studies in Mycology*, (101), 1-86.
- Mónaco, M.E., Salazar, S.M., Aprea, A., Díaz Ricci, J.C., Zembo, J.C., & Castagnaro, A.P. (2000). First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on strawberry in northwestern Argentina. *Plant Disease*, 84, 595.
- Nam, M.H., Park, M.S., Lee, H.D., Yu, S.H. (2013). Taxonomic Re-evaluation of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolated from Strawberry in Korea. *The Plant Pathology Journal*. 29 (3), 317-322. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.NT.12.2012.0188>.
- SAGYP (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina) (2023). Informe Sectoriales de Frutas. Informe producción de Frutilla en Argentina. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sagyp-informe-produccion-frutilla-enero-2023.pdf>
- Wang, N.Y., Forcelini, B.B., & Peres, N.A. (2019). Anthracnose fruit and root necrosis of strawberry are caused by a dominant species within the *Colletotrichum acutatum* species complex in the United States. *Phytopathology*, 109 (7), 1293-1301.