

# Sobrevivencia y distribución en el suelo de *Phytophthora nicotianae*<sup>1</sup>

Ana Fernández Morales<sup>2</sup>, Veronica Toledo<sup>3</sup>, Wendy Wong<sup>4</sup> y Angela Porra<sup>5</sup>.

**Resumen.** Se determinó la sobrevivencia de los propágulos de *Phytophthora nicotianae* en suelo ferralítico rojo naturalmente infestado. El suelo se colocó en recipientes dentro de campanas de cristal a 24-28 °C y mensualmente se determinó la presencia del patógeno en el suelo. Para la distribución horizontal, se tomaron muestras de suelo en 50 puntos en 1 ha y se cuantificó el número de propágulos por gramo de suelo en cada muestra. Para la distribución vertical, se tomó suelo naturalmente infestado, de 0 a 30 cm de profundidad. Para el aislamiento y cuantificación del patógeno, se emplearon un medio selectivo y un método de cebo con hojas de tabaco. Los propágulos del patógeno permanecieron viables durante 15 meses, lo que supone que el patógeno pueda permanecer en el suelo de una campaña tabacalera a otra. La densidad de inóculo inicial de la población fue elevada (172 propágulos/g de suelo) y la misma disminuyó paulatinamente con el transcurso de los meses, hasta que no fueron detectados en el suelo. La distribución horizontal del patógeno en el suelo, fue en forma de agregado y sigue una función binomial negativa. Los propágulos se detectaron en todas las profundidades estudiadas, pero el número de ellos fue superior entre los 5 y 10 cm (225 propágulos).

**Palabras claves:** Distribución horizontal, distribución vertical, pata prieta, propágulos.

**Abstract.** The survival of *Phytophthora nicotianae* propagules in naturally infected, ferralitic soil was determined. A soil sample was collected in glass vials and kept inside chambers at 24-28 °C. The presence of the pathogen in the soil was determined monthly. For horizontal distribution, soil samples of 50 points in 1.0 ha were taken and for vertical distribution soil samples from 0 to 30 cm depth were taken. The selective medium and the bait method using tobacco leaves were used for quantification and isolation. Pathogen propagules were viable for 15 months, therefore, it is hypothesized the pathogen survives in the field from one tobacco crop to another. The starting population density was high (172 propagules/g of soil) and decreased slowly until no pathogen was detected in the soil. At every depth studied pathogen propagules were detected, but between 5-10 cm depth the number of propagules was significantly higher (225 propagules).

**Key words:** Black shank, horizontal distribution, propagules, vertical distribution.

## INTRODUCCION

La enfermedad pata prieta producida por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, constituye un grave problema para todos los tipos de tabaco en diversas regiones del mundo. La agricultura tabacalera cubana no escapa a esta problemática y durante varios años las pérdidas han

sido cuantiosas, fundamentalmente en semilleros; pero también en las plantaciones hay un ascenso paulatino de la enfermedad.

En Cuba, durante muchos años, se establecieron semilleros y plantaciones en campos fijos, que motivó el incremento desmesurado del inóculo del patógeno en el suelo, el desarrollo de epidemias y pérdidas anuales de

<sup>1</sup> Investigaciones conducidas como parte de la Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas de Dr. Ana Fernández Morales.

<sup>2</sup> Jefe del Laboratorio de Micología. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ministerio de la Agricultura, Gaveta Postal 634, 11300. Ciudad de La Habana, Cuba, E-mail: inisav@ceniai.inf.cu

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones del Tabaco. Km 8 ½ . Carretera del Tumbadero, San Antonio de Los Baños, La Habana,

<sup>4</sup> Laboratorio de Micología. Ministerio de la Agricultura, Gaveta Postal 634, 11300, Ciudad de La Habana, Cuba, E-mail: inisav@ceniai.inf.cu

<sup>5</sup> Laboratorio de Micología. Ministerio de la Agricultura, Gaveta Postal 634, 11300, Ciudad de La Habana, Cuba, E-mail: inisav@ceniai.inf.cu

consideración, aun con la aplicación de fungicidas químicos. Esta situación requirió estudios biológicos y ecológicos y de métodos de lucha que permitieran la disminución del inóculo en el suelo y las infecciones en el cultivo (Sandoval y Saenz, 1992; Stefanova y Sandoval, 1995; Fernández, 1995).

Se ha demostrado que diferentes especies de *Phytophthora* varían en su capacidad de persistir como propágulos en estado de reposo o como colonizadores saprofiticos de material orgánico muerto (Turner, 1974). La sobrevivencia de los propágulos de *Phytophthora* en el suelo es importante, porque se considera que la mayoría de las epidemias provocadas por estas especies, provienen del inóculo que se encuentra en el suelo (Weste, 1983), por lo que la detección del patógeno en suelo antes de la siembra, permite seleccionar los campos con menor riesgo de incidencia de la enfermedad en los cultivos (Bouhot, 1975).

Entre los factores ecológicos importantes para conocer el nivel de la población del patógeno en el suelo, está la distribución de los propágulos en el mismo, que permite la optimización del muestreo y de la detección del patógeno (Tsao, 1983). Estos elementos son fundamentales para determinar el nivel de contaminación de los suelos, el cual posibilita la aplicación de medidas de lucha y la disminución de las pérdidas en el cultivo (Weste, 1983, Mackenzie, 1983).

Dentro de los factores ecológicos a investigar en nuestras condiciones, se consideró necesario conocer el tiempo de permanencia de los propágulos en el suelo en ausencia del cultivo, su distribución horizontal y vertical en el suelo, los cuales fueron los objetivos del presente trabajo.

## MATERIALES Y METODOS

### Sobrevivencia de *Phytophthora nicotianae* en suelo bajo condiciones semicontroladas

En campos de tabaco afectados por pata prieta en la Empresa Tabacalera "Lázaro Peña" en el municipio de San Antonio de los Baños de la provincia de La Habana, Cuba, se tomaron aleatoriamente muestras de suelo ferralítico rojo a una profundidad de 20 cm.

Para conocer la población del patógeno en el suelo, este se extendió sobre una bandeja esmaltada y se retiraron las partículas groseras; se homogenizó, se

cuarteó y se tomaron alícuotas de diferentes partes de la bandeja hasta constituir una muestra de 10 g que se procesó por el método descrito por Kannwischer y Mitchell (1978) modificado por Fernández *et al.* (1990). Se cuantificó la densidad de inóculo por gramo de suelo seco.

El resto del suelo traído del campo, fue humedecido hasta su saturación y se incubó en una habitación con temperaturas que oscilaron entre 24 y 28 °C, bajo una campana de cristal. Mensualmente se tomaron 10 g de suelo y se determinó la densidad de inóculo por el método de cebo descrito por Fernández y Toledo (1991). La densidad de inóculo se determinó hasta que no se detectó el patógeno en el suelo. En el estudio se emplearon 10 réplicas.

### Distribución horizontal y vertical de *P. nicotianae* en el suelo

Para la distribución horizontal del patógeno en el suelo, se realizaron muestreos antes de la siembra en campos destinados a la producción de tabaco en la Empresa Tabacalera "Lázaro Peña". En una hectárea de cada campo (2), se tomaron muestras de suelo en 50 puntos [5 puntos por hilera (total 10 hileras)]. Las muestras se trasladaron al laboratorio y se procesaron por el método descrito en el primer acápite y se empleó el medio selectivo de Kannwischer y Mitchell (1978) modificado (Fernández *et al.*, 1990). Se cuantificó el número de propágulos por gramo de suelo y se determinó el tipo de distribución del inóculo en el suelo, para lo cual se determinaron los índices de la razón varianza/media y de la potencia de Taylor (Southwood, 1978). Para determinar el número de muestras óptimas para detectar el patógeno en el suelo, se tomaron muestras de suelo de 20, 30, 40 y 50 puntos en 1 ha en dos campos de tabaco con antecedentes de pata prieta. El número de propágulos por gramo de suelo se determinó de la forma antes descrita.

Para la distribución vertical de *P. nicotianae* en diferentes profundidades del suelo, se tomaron muestras a las profundidades de 0-5, 5-15 y de 15-30 cm. Estas muestras se procesaron mediante el método y medio selectivo modificado y se cuantificó el número de propágulos por gramo de suelo. Se realizaron los muestreos en cinco campos con tres repeticiones en cada uno.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Sobrevivencia de propágulos de *Phytophthora nicotianae* en suelo bajo condiciones semicontroladas

Los propágulos de *P. nicotianae* permanecieron viables en el suelo 15 meses. La densidad inicial de la población fue elevada (172 propágulos/g de suelo) y la misma disminuyó paulatinamente, hasta que en abril de 1996 no se detectaron los propágulos, considerando esto, como fin de la sobrevivencia de la población del mismo en las condiciones del ensayo (Figura 1). Dale e Irwin (1990) determinaron que el potencial de inóculo declinó marcadamente en ausencia del cultivo, similar a lo observado en nuestros ensayos.

Al inicio del experimento el suelo estuvo húmedo hasta su capacidad de campo, pero con el transcurso del tiempo, el agua contenida en el mismo fue evaporándose hasta quedar completamente seco, lo que pudo influir en la pérdida de viabilidad de los propágulos de *P. nicotianae*, si se considera que la humedad del suelo es fundamental para el desarrollo de las especies de *Phytophthora*, y particularmente para este patógeno como ha sido demostrado por Duniway (1976) y Mac Donald y Duniway (1978).

Kröber (1980) estudió el comportamiento de nueve especies de *Phytophthora* en suelo esterilizado y no esterilizado, en condiciones semicontroladas y de campo, demostrando la capacidad de sobrevivencia de estas especies en ausencia del cultivo. Determinó además, que la mayoría de las especies bajo condiciones controladas y suelo estéril sobrevivieron por un período mayor (6 y 4 años) que cuando fueron sometidos en condiciones de campo y suelo no estéril (3, 2 años o menos).

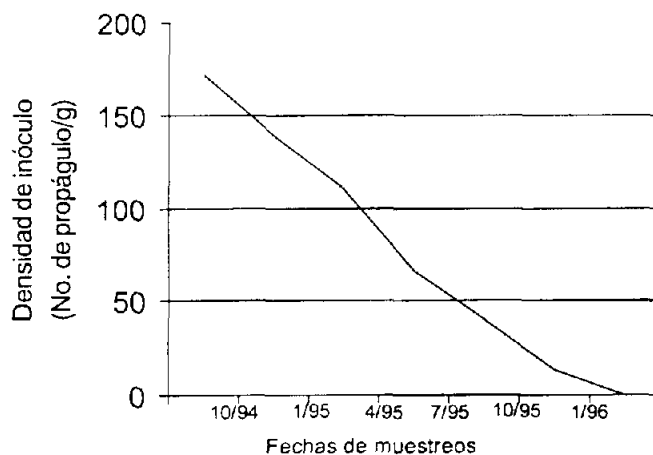
Flowers y Hendrix (1972) demostraron que *Phytophthora nicotianae* hiberna en altas poblaciones en las capas superiores del suelo y en estudios realizados en parcelas de campo, Peñalver *et al.* (1988) observaron que el hongo de la pata prieta sobrevivió por 3 ó 4 años en ausencia del cultivo.

Aunque *Phytophthora* puede sobrevivir en el suelo en forma de micelio, zoosporas, esporangios, quistes, clamidosporas y oosporas, la desecación, el frío y los microorganismos antagónicos o competitivos son factores limitantes (Weste, 1983). La desecación del suelo es el factor más importante que limita la sobrevivencia de las especies de *Phytophthora* (Weste, 1983) y se ha demostrado (Shea *et al.*, 1980; Neher y Duniway, 1992)

que la irrigación aumenta considerablemente el número de propágulos en el suelo.

Entre las diferentes estructuras del género *Phytophthora*, al parecer las clamidosporas y las oosporas por ser más resistentes, son los propágulos más aptos para su sobrevivencia en suelo. De hecho, ha sido comprobado que el micelio y esporangios de *Phytophthora meadii*, sobreviven en el suelo por tres semanas, mientras que las clamidosporas sobreviven 12 meses (Liyanage y Wheeler, 1991). Sin embargo, Bowers *et al.* (1990) observaron que oosporas de *P. capsici* sobrevivieron sólo alrededor de 12 semanas. La sobrevivencia en el suelo proporciona un reservorio de inóculo inicial que resulta difícil erradicar y suele ser suficiente para iniciar una epidemia (Weste, 1983).

Los resultados confirman que el inóculo de *Phytophthora nicotianae* puede persistir bajo nuestras condiciones climáticas de una campaña a otra y el inóculo es suficiente para iniciar la enfermedad en próximos cultivos.



**Figura 1.** Sobrevivencia de los propágulos de *Phytophthora nicotinae* en suelo bajo condiciones controladas.

### Distribución horizontal y vertical de *P. nicotianae* en el suelo

La distribución del inóculo del patógeno no fue uniforme en el suelo. Tomando como referencia 1 ha de cada campo, se evidenció que de 50 puntos del área muestreada en el campo 82, se detectó el patógeno en 19 puntos y en

31 no fue aislado, mientras que en otro campo (No. 41), se detectó en 8 y no se observó en 42 puntos. La distribución del inóculo en el suelo fue en forma de agregado, del tipo contagio y sigue una distribución binomial negativa (Cuadro 1; Figura 2).

Se determinó que la población del patógeno decreció con el incremento de la profundidad del suelo y la mayor cantidad de propágulos se detectó entre 0 y 5 cm (225 propágulos/ gramo de suelo); de 5 a 15 cm fue de 75 propágulos y entre 15 y 30 cm la densidad del inóculo fue de 12.5 propágulos/ gramo de suelo (Figura 3).

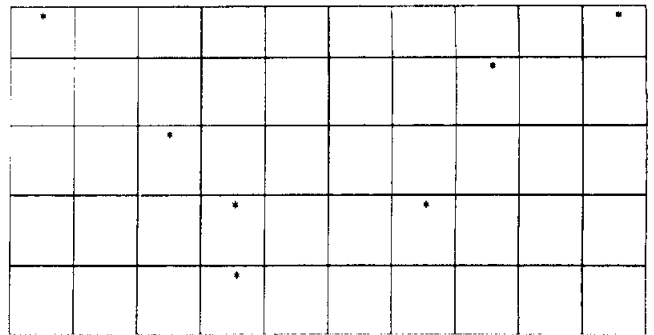
*Phytophthora* spp. pueden ser aisladas de todas las profundidades del suelo en que se desarrollen las raíces de las plantas y en los árboles forestales, se ha encontrado el patógeno hasta 85, 91 y 105 cm de profundidad (Weste y Ruppin, 1977).

Debido a que *Phytophthora* es afectada grandemente por las altas temperaturas, la radiación solar y la sequía en la superficie del suelo, es necesario para tener éxito en la detección del patógeno en el suelo, tomar las muestras entre los 3 y 5 cm de la superficie del suelo (Tsao, 1983).

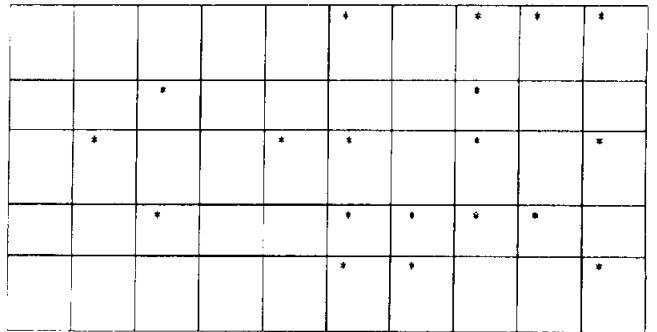
Cuando se tomaron muestras de suelo de 50, 40, 30 y 20 puntos del campo colectadas y añadidas en cuatro bolsas respectivamente, se determinó que el recobrado del hongo fue superior cuando se tomaron muestras de 40 (2-10 propágulos/g suelo) y 50 puntos (2-7 propágulos/g de suelo). Con 30 puntos muestreados se detectaron de 1-7 propágulos/g suelo y en 20 puntos 0-3 propágulos/g suelo (Figura 4). Estos resultados pueden deberse a que la toma de 20 y 30 muestras, no sean suficientes para detectar una población mayor del hongo en el suelo de los campos de tabaco.

Aunque se ha demostrado que invariablemente la población de *Phytophthora* en los niveles superiores del suelo se correlaciona bien con el potencial infeccioso, estos datos pueden ser incompletos y sujetos a ser mal interpretados, si no se toman las muestras necesarias y de todas las profundidades del suelo, según del cultivo que se trate. Para *P. cinnamomi* se plantea que a mayor profundidad del suelo se incrementó la presencia de otros microorganismos y el potencial infeccioso disminuyó, lo que indicó que la presencia de estos microorganismos limitaron el desarrollo del patógeno en dichas profundidades (Weste, 1983).

**Campo 41.**



**Campo 82.**



\* - Presencia del patógeno en el suelo.

**Figura 2.** Distribución horizontal de los propágulos de *P. nicotianae* en el suelo. Empresa “Lázaro Peña” de la provincia La Habana, Cuba.

**Cuadro 1.** Distribución de los propágulos de *P. nicotianae* en el suelo. Índice de dispersión espacial.

Índice	Campos		Dispersión espacial		
	82	41	Azar	Agregado	Contagio
Razón $S^2/X$	17.82	6.05	=1	<1	>1
Parámetro K	0.19	0.059	/	<0	>0

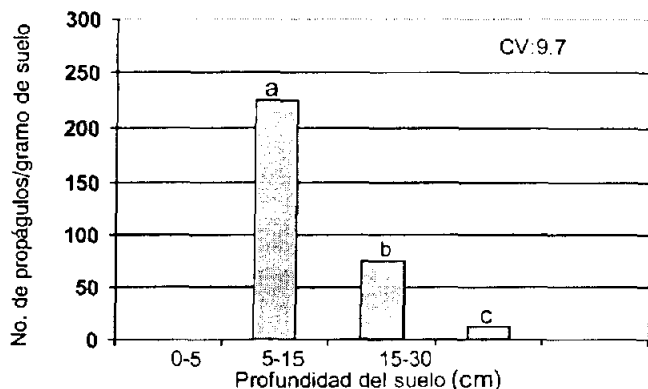


Figura 3. Distribución vertical del inóculo de *P. nicotianae* en el suelo.

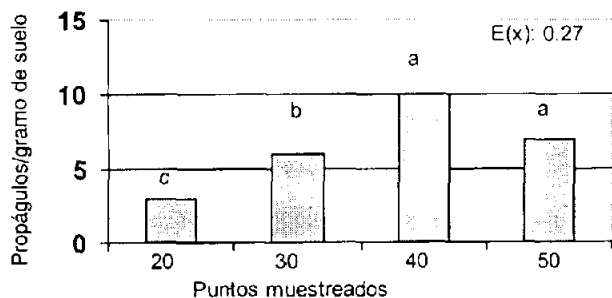


Figura 4. Detección de propágulos de *P. nicotianae* en el suelo.

### CONCLUSIONES

*Phytophthora nicotianae* sobrevive en el suelo durante 15 meses bajo condiciones de temperatura de 24-28 °C y la densidad del inóculo disminuye con el transcurso del tiempo.

Los propágulos del patógeno se encuentran distribuidos en forma de agregado del tipo contagio, siguen una función negativa y se detectan hasta 30 cm de profundidad. La densidad del inóculo disminuyó con el incremento de la profundidad del suelo y fue máximo entre los 5 y 10 cm.

### LITERATURA CITADA

- Bouhot, D. 1975. Recherches sur l'ecologie des champignons parasites dans le sol v.- Une technique selective d'estimation du potentiel infectieux des sols, terreaux et substrats infestes par *Pythium* spp. etudes qualitatives. Annual Phytopathologie 7(1): 9-18.
- Bowers, J.H.; G.C. Papavizas y S.A. Johnston. 1990. Effect of soil temperature and soil-borne matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. Plant Disease 74:771-777.
- Dale, M.L. y J.A.G. Irwin. 1990. Estimation of inoculum potentials of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* in chickpea fields and the development of a glasshouse resistance assay. Australian Journal of Experimental Agriculture 30: 09-114.
- Duniway, J.M. 1976. Movement of zoospores of *Phytophthora cryptogea* in soils of various texture and matric potentials. Phytopathology 66: 877-882.
- Fernández, A.A.; V. Toledo y X. Rey. 1990. Estandarización de la técnica de medio de selectivo para la detección de *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* en suelo. Informe interno. INISAV, Cuba.
- Fernández, A. y V. Toledo. 1991. Estandarización de la técnica de cebo para la detección de *Phytophthora nicotianae* en suelo. Informe interno. INISAV, Cuba.
- Fernández, A. 1995. Biología, detección en suelo y métodos de lucha contra *Phytophthora nicotianae* causante de la pata prieta del tabaco en Cuba. X FORUM. Ciencia y Técnica. INISAV.
- Flowers, R.A. y J.W. Hendrix. 1972. Population density of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in relation to pathogenesis and season. Phytopathology 62:474-477.
- Kannwischer, M. E. y P. I. Mitchell. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco (Abstr.). Proceeding Annual Phytopathological Society 3: 338.
- Krober, H. 1980. Survival of some *Phytophthora* species in soil. Zweigkrankheit Pflanzenschutz 87(4): 227-235.
- Liyanage, N. y B. Wheeler. 1991. Survival of *Phytophthora meadii* in Sriloucan soils. Plant Pathology 40: 436-444.
- Mackenzie, D.R. 1983. Application of modern approaches to the study of the epidemiology of diseases caused by *Phytophthora*. In: Pag. 303-313. *Phytophthora: It's Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology.* eds. D. R. Mackenzie; D.C. Erwin; S. Bartnick- García; P.H. Tsao. St. Paul Minnesota: The American Phytopathological Society.

- Mac Donald, J.D. y J.M. Duniway. 1978. Influence of the matric and osmotic components of water potential of zoospores discharge in *Phytophthora*. *Phytopathology* 6: 751-757.
- Neher, D. y Duniway, J.M. 1992. Dispersal of *Phytophthora parasitica* in tomato fields by furrow irrigation. *Plant Disease* 76:582-586.
- Peñalver, N.; J. J. Padrón y Milagros García. 1987. Utilización de un esquema de rotación para estudiar la longevidad de la *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* en los suelos. I. Ferralítico Cuarcítico Amarillo Lixiviado. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Tabaco*. No. 1:10- 4.
- Sandoval, I., Saenz, M. 1992. Estudio preliminar del biocontrol de *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* en tabaco mediante *Trichoderma* spp. Resúmenes Biotecnología Habana '92. La Habana, 8-12 Junio.
- Shea, S. R., Gillen, K. J., y Leppard, W. I. 1980. Seasonal variation in population levels of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil in diseased, freely-drained *Eucalyptus marginata* Sm. sites in the northern jarrah forest of south-western Australia. *Protection Ecological* 2: 135-156.
- Stefanova, M.; Sandoval, I. 1995. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. en el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Boletín Técnico* No 2. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana, Cuba.
- Southwood, T. R. 1978. Ecological methods with particular reference to the study of insects population. London: Chapman & Hall 78.
- Tsao, P. H. 1983. Factors affecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soil. In *Phytophthora*: 219-236 pp. Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. (Eds. Erwin, D. C. ; Bartnicki-García, S. and Tsao, P. H.) The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota. 68 pp.
- Turner, P.D. 1974. Allied pathogens of other crops. Pag. 287-300 In: *Phytophthora* Disease of Cocoa. PH. Gregory, ed. Longman, London.
- Weste, G. y Ruppin, P. 1975. Factors affecting the population density of *Phytophthora cinnamomi* in native forest in the Brisbane Ranges. Victoria. Australia *Journal of Botany* 23: 77-85. 1975.
- Weste, G. 1983. Population Dynamic and survival of *Phytophthora*: In: *Phytophthora*: 237-257 pp. Its Biology, Ecology, Taxonomy and Pathology. Erwin, D.C.; Bartnick-García, P. H. Tsao (Eds). The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.