



Camino A 60 cuadras Km 5 1/2 | X5020ICA - Córdoba – Argentina  
Contacto: [aafitopatologos@yahoo.com.ar](mailto:aafitopatologos@yahoo.com.ar) - <http://aafitopatologos.com.ar>

## ***Neopestalotiopsis clavispora*: patógeno asociado al cultivo de frutilla**

Ibañez, J. M.; Lattar, T. E.; Obregón, V. G. (Capítulo NEA)

Laboratorio de Fitopatología Hortícola. INTA EEA Bella Vista, Centro Regional Corrientes. Ruta Prov. N°27, km 38,3.

Contacto: [obregon.veronica@inta.gob.ar](mailto:obregon.veronica@inta.gob.ar)

### **Resumen**

El cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Dutch.) posee gran importancia en Argentina, con aproximadamente 1500 hectáreas cultivadas. En el año 2013 se observaron daños severos en plantas de frutilla en lotes productivos de Corrientes, Tucumán y Santa Fe (Argentina). Los síntomas incluían zonas internervales necróticas rojizas, de color óxido en las hojas más viejas, además de lesiones necróticas en frutos, raíces y corona. A través de sucesivos monitoreos, recolección de muestras, aislamientos y secuenciación de fragmentos de ADN del patógeno, se logró identificar a *Neopestalotiopsis clavispora* como el agente causal de dicha enfermedad. Debido a las condiciones ambientales, este patógeno representa una severa amenaza para el cultivo, provocando pérdidas considerables, con incidencias de hasta 70% en lotes productivos de la provincia de Corrientes. Para evitar pérdidas económicas, es necesario realizar un manejo integrado de la enfermedad.

### **Introducción**

En Argentina, se cultivan aproximadamente 1500 hectáreas de frutilla (*Fragaria x ananassa* Dutch.) con rendimientos que varían de 45 a 51 mil toneladas. Las provincias de Santa Fe, Tucumán, Buenos Aires, Jujuy, Corrientes y la región Patagonia se destacan en la producción de este cultivo (Kirschbaum et al., 2017).

La frutilla es afectada por diferentes patógenos, entre ellos *Neopestalotiopsis clavispora*. Este hongo fue identificado por primera vez en Argentina en el año 2018 (Obregón et al., 2018) en Corrientes. A partir de ese momento, se iniciaron investigaciones para conocer características biológicas, epidemiológicas y de manejo.

### **Taxonomía de *Neopestalotiopsis***

Este género pertenece a la división Ascomycota y se encuentra ubicado dentro de la familia Amphisphaeriaceae. Recientemente, Maharachchikumbura et al. (2014) propusieron dividir el género *Pestalotiopsis* en tres en función de características morfológicas y del análisis filogenético de secuencias: *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*. En base a ello, se distinguieron 30 clados de *Neopestalotiopsis*, 43 de *Pestalotiopsis* y 3 de *Pseudopestalotiopsis*.

### **Sintomatología**

El síntoma principal se observa en hojas, y consiste en zonas internervales necróticas rojizas, de color óxido en las hojas más viejas, comenzando desde los márgenes y cubriendo

toda la hoja a medida que la enfermedad avanza (Figura 1). Estos síntomas están asociados a áreas necróticas y decoloración de las raíces y la corona (Obregon *et al.*, 2020). La zona necrótica puede aparecer en la parte superior o inferior de la corona, es decir que no posee un patrón de distribución. En cuanto a los frutos, frecuentemente presentan lesiones necróticas circulares a ovaladas que se extienden desde la inserción de los sépalos hacia el centro de los frutos.

*Neopestalotiopsis clavispora* provoca pérdidas considerables ya que causa la muerte de las plantas, alcanzando altos valores de incidencia en Corrientes debido a las elevadas temperaturas y humedad, condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de este patógeno.

En Argentina, se han observado daños severos en plantas de frutilla en campos productivos de las localidades de Bella Vista, Corrientes, Famaillá y Coronda desde el año 2013. A raíz de esa situación, el Laboratorio de Fitopatología Hortícola de la EEA Bella Vista del INTA inició una serie de ensayos para generar información sobre esta nueva enfermedad. A continuación, se presenta una revisión de los trabajos realizados por el Laboratorio para caracterizar al patógeno y su epidemiología en Bella Vista, Corrientes.

### Caracterización del agente causal

La determinación del agente causal del marchitamiento de corona y raíces de frutilla y la evaluación de su comportamiento/distribución a *Tabla 1. Origen de las muestras de este estudio.*

Id. Muestra	Tejido afectado	Variedad	Origen
P1237	Corona	Festival	Bella Vista
P1248	Raíz	Festival	Bella Vista
P1H	Hoja	Benicia	Tucumán
P2	Corona	Benicia	Tucumán
P5	Corona	Benicia	Tucumán
1638	Corona	S/D	Buenos Aires
1664	Fruto	Camino real	Corrientes
M1690*	Corona	S/D	Corrientes
M1686*	Corona	Geranium dissectum	Santa Fe

\*muestras de malezas con síntomas similares a los observados en las plantas de frutilla S/D sin datos

campo son factores claves para manejar la enfermedad.

### Recolección de muestras y aislamientos

Para aislar al patógeno se tomaron muestras de corona y raíces de plantas de frutilla con los síntomas antes descritos, de diferentes zonas productivas durante los años 2017-2021. Se extrajeron pequeños trozos de tejido sintomático de corona y raíces y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% durante un minuto y etanol al 70% durante otro minuto, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y finalmente se secaron en un gabinete de flujo laminar. Estas secciones de tejido desinfectado se colocaron en placas con agar papa glucosado (APG: 17 g/l de agar, 200 g/l de papa hervida, 8 g/l de glucosa). Los frutos con síntomas, se dejaron en cámara húmeda durante 24h a temperatura ambiente y el micelio formado se transfirió a placas con APG. Todos los aislamientos se incubaron a temperatura ambiente (26°C ± 2°C).

Para examinar las características morfológicas, se depositó un disco micelial de cultivo puro en el centro de la placa de Petri con medio APG y se incubó durante 7 días a temperatura ambiente. Se observó color, textura, forma y pigmentación de la colonia. Los conidios obtenidos en APG se observaron en microscopio óptico, y se registró longitud, ancho, color, número de septos transversales de 50 conidios al azar.

## Ensayos de patogenicidad

**Inoculación en corona:** se colocaron plantas de frutilla sanas en macetas de 12 cm de diámetro con sustrato estéril (turba/perlita en relación 1:1, V/V). Se inocularon 5 plantas por cada aislado. Se depositó un disco micelial de 5 mm de diámetro cultivado en APG en una pequeña herida realizada en la corona y se cubrió con algodón húmedo. Como tratamiento control, se utilizaron discos de APG estériles siguiendo la misma metodología. Las plantas fueron llevadas a un invernadero donde se las cubrió con bolsas plásticas durante cinco días para mantener la humedad.

**Inoculación en frutos:** el método fue similar al paso anterior, donde el disco micelial se depositó sobre el fruto maduro de plantas sanas.

### Extracción de ADN y amplificación

Los aislados se dejaron crecer en placas con medio APG durante aproximadamente 7 días, una vez formado el micelio se retiró con espátula y se colocó en tubos eppendorf de 2,0 ml. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Palocci *et al.* (1999).

Se amplificó la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ARNr utilizando los oligonucleótidos universales ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.* 1990; Chamorro *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016).

Se realizó la secuenciación de los productos de PCR (Macrogen Inc.). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en el GenBank (NIH), utilizando el programa MEGA7 (Altschul *et al.*, 1997).

## Resultados

Todos los aislamientos formaron colonias circulares algodonosas blancas sobre el lado superior del medio y de pigmentación amarilla clara en el reverso. Al cabo de 7 días de incubación se formaron acérvulas oscuras en el medio. Los conidios fueron fusiformes a elipsoides, con 5 células versicolor (que consisten en dos células hialinas una apical y otra basal, y tres células medianas marrones) de 8,6 x 24,6  $\mu\text{m}$  (ancho x largo; n=50). Los conidios poseen un apéndice basal y 2 a 4 apicales (Figura 2). De acuerdo con la morfología de la colonia y conidios, los aislados se identificaron como

*Neopestalotiopsis*

*clavispora*

(Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

Los ensayos de patogenicidad indicaron que todos los aislados de corona y raíces fueron patogénicos. Los síntomas fueron similares a los encontrados en el campo en infecciones naturales, después de 10 días de incubación en invernadero las plantas exhibieron síntomas de necrosis entre las nervaduras de las hojas, muerte de hojas y de las plantas. Se observó también necrosis en tejido de las coronas. No se observó síntomas en las plantas testigo. Se obtuvieron nuevos aislamientos de las plantas inoculadas, con características morfológicas y culturales idénticas a los aislamientos originales. La identificación molecular arrojó 100% de similitud con *N. clavispora* de secuencias depositadas en el GenBank (números de acceso KR052094 y KM264343).

### Ensayo *in vitro* de fungicidas

Se evaluó *in vitro* el efecto de 7 fungicidas sobre la inhibición del crecimiento micelial de *N. clavispora* (Obregon *et al.*, 2018).

Los fungicidas evaluados fueron: Captan (83%), Clorotalonil (72%), Iprodione (50%), Carbendazim (50%), Boscalid + Pyraclostrobin (12,8% + 25,2%), Azoxistrobina + Difenconazole (20% + 12,5%) y Cyprodinil + Fludioxonil (37,5% + 25%) a dosis comerciales. Se utilizó la técnica de dilución en placa con agar que consistió en mezclar una solución acuosa del fungicida (2 ml por repetición) con el medio de cultivo agar papa glucosado (APG), pH 6,5. Posteriormente, se colocó un disco de 7 mm de diámetro de micelio del hongo en el centro de la caja de Petri y se incubó a temperatura ambiente. Los controles se sembraron sobre el medio de cultivo sin la adición de fungicidas y se midió el diámetro de la colonia para cada tratamiento. Las mediciones se realizaron hasta que el testigo cubrió totalmente la caja de Petri (90 mm). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento (4 cajas de Petri por tratamiento). Estos datos fueron utilizados para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC). Se realizó análisis de varianza con el programa InfoStat y las diferencias entre medias de tratamientos con la prueba de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

Se observaron diferencias significativas entre tratamientos, donde los fungicidas que mostraron mayor efectividad en el porcentaje de inhibición de crecimiento fueron Cyprodynil + Fludioxonil (80%), Boscalid + Pyraclostrobin (77%) y Azoxistrobina + Difenconazole (75%). Se podría inferir que los fungicidas mencionados tienen mayores posibilidades para el control de *N. clavispora*. El resto de los tratamientos arrojaron valores de inhibición de crecimiento muy bajos.

### Epidemiología

El conocimiento de las características de su ciclo biológico y aspectos epidemiológicos son factores indispensables para el manejo adecuado de la enfermedad. Por este motivo, se realizaron monitoreos quincenales en 2 variedades de frutilla, Festival y Sensation, implantadas bajo 2 sistemas de producción utilizados en diferentes zonas productivas de frutilla: macrotunel y microtunel, sistema forzado y semiforzado, respectivamente. Los lotes consistieron en 3 repeticiones de 15 plantas cada una por tratamiento. El ensayo se llevó a cabo en lotes experimentales de la EEA Bella Vista.

Las plantas cultivadas en microtunel arrojaron valores de incidencia superiores a aquellas cultivadas en macrotunel (Figura 3). En la variedad Sensation en microtunel se observó un 71% de incidencia y en macrotunel solo 35%. En cuanto a la variedad Festival, la incidencia fue menor en los dos sistemas de producción, 47% en microtunel y 29 % en macrotunel. Hubo mayor incidencia de la enfermedad en microtunel debido a que es un sistema de producción semiforzado, lo que implica que las plantas permanecen expuestas durante los meses más cálidos y lluviosos, a diferencia del macrotunel cuya estructura es fija. En la variedad Sensation se observó mayor susceptibilidad (Ibañez *et al.*, 2022).

### Consideraciones finales

Los estudios morfológicos, moleculares y patogenicidad permitieron confirmar que *Neopestalotiopsis clavispora* es agente causal de la podredumbre de raíz y corona en plantas de frutilla. Actualmente resulta preocupante la aparición de síntomas en frutos y el daño directo

que ocasiona. Provoca daños severos en campos en Corrientes, Tucumán y Santa Fe. Existen fungicidas con posibilidad para el control de la enfermedad, aunque se debe seguir ensayando. La incidencia de la enfermedad es mayor en sistemas de producción semi-forzado.

### Referencias

- Chamorro, M., Aguado, A. y De los Santos, B. 2015. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Dis* 100.7 (2016): 1495.
- Howard, C.M. y Albregts, E.E. 1973. A strawberry fruit rot caused by *Pestalotia longisetula*. *Phytopathology* 63: 862-863.
- Ibañez, J.M., Obregón, V.G., Lattar, T.E. y Pacheco, R. 2022. Incidence of *Neopestalotiopsis clavispora* in strawberry grown under two production systems in Bella Vista, Corrientes, Argentina. *Phytopathology* 112:S1.8.
- Kirschbaum, D.S., Sordo, M.H., Adlercreutz, E., Dalmazzo, P.R., Pacheco, R.M. y Misrendino, E. 2017. Panorama del cultivo de Frutilla. Boletín de Frutas y Hortalizas del Convenio INTA-CMCBA N° 61. DOI: 10.13140/RG.2.2.30332.64645.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K.D., Groenewald, J.Z., Xu, J. y Crous, P.W. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology* 79: 121-186.  
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Maharachchikumbura, S.S.N., Guo, L.D., Cai, L., Chukeatirote, E., Wu, W.P., Sun, X., Crous, P.W., Bhat, D.J., McKenzie, E.H., Bahkali, A.H., y Hyde, K.D. 2012. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity*, 56: 95-129. DOI 10.1007/s13225-012-0198-1.
- Obregón, V.G., Ibañez, J.M. y Lattar, T.E. 2020. Guía para la identificación de las enfermedades de frutilla. INTA Ediciones. <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/7799>.
- Obregón, V.G., Meneguzzi, N.G., Ibañez, J.M., Lattar, T.E. y Kirschbaum, D.S. 2018. First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Root and Crown Rot on Strawberry Plants in Argentina. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0330-PDN>.

Obregon, V.G., Ibañez, J.M., Lattar, T.E. y Meneguzzi, N.G. 2018. Eficacia de fungicidas in vitro para el control de *Neopestalotiopsis clavispora* agente causal de la podredumbre de la corona en plantas de frutilla. 40° Congreso Argentino de Horticultura.

Palocci, F., Rubini, A., Granetti, B. y Arcioni, S. 1999. Rapid molecular approach for reliable 460 identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. Fems Microbiology Ecology, 28: 23-30.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. y Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. 315-322.

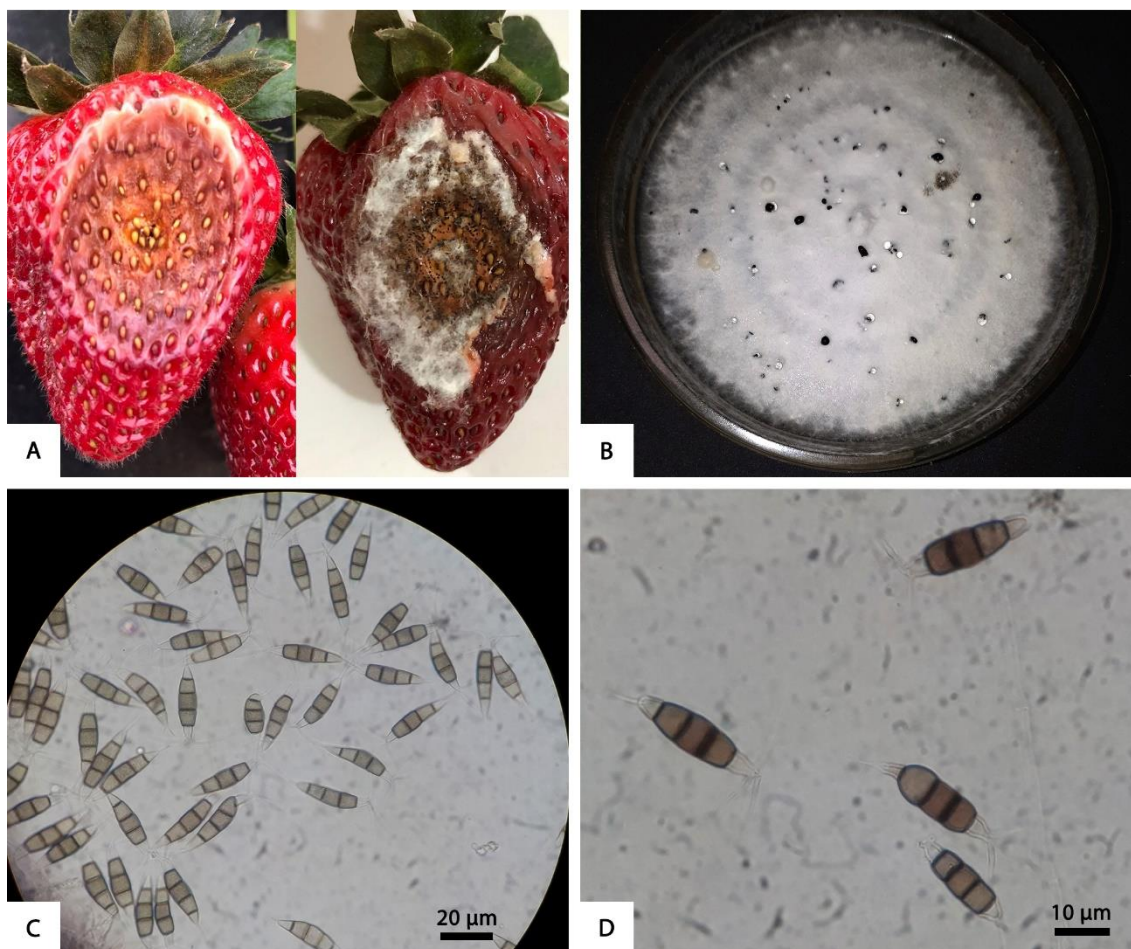
Zhao, J., Ma, Z., Liu, Z., Shang, Q., Zhao, X. y Wei, Y. 2016. *Pestalotiopsis clavispora* causing leaf spot on strawberry. Mycosystem, 35(1): 114-120

Anexo

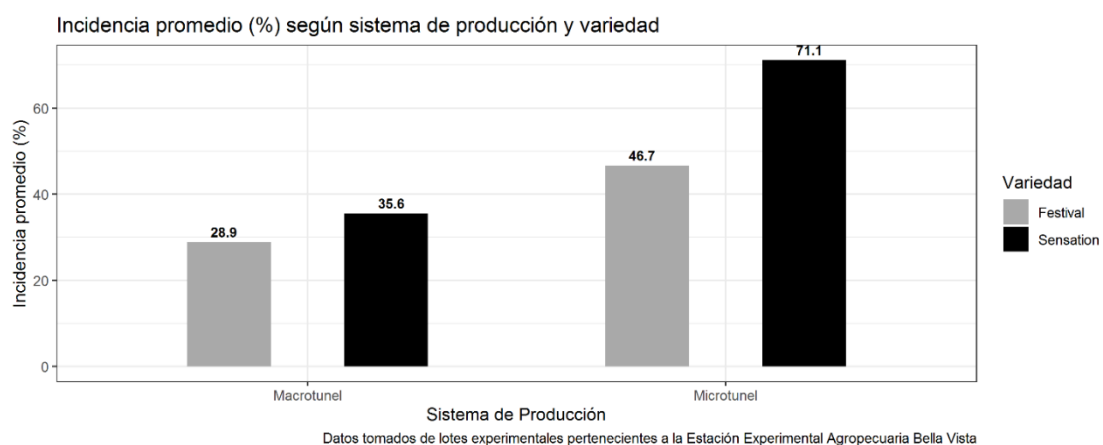


**Figura 1.** Síntomas de podredumbre de corona y raíces en plantas de frutilla provocada por *Neopestalotiopsis clavispora*.





**Figura 2.** A. Frutos de frutilla con lesión provocada por *Neopestalotiopsis clavispora*. B. Colonia de *N. clavispora* en medio APG luego de 7 días de incubación. C-D. Conidios del hongo en microscopio estereoscópico (40x).



**Figura 3.** Incidencia promedio según sistema de producción y variedad realizada en lote demostrativo de la EEA Bella Vista.