

ARTÍCULO ORIGINAL

Micobiota asociada a enfermedad en plantas de *Lavandula hybrida* Reverchon

María Cristina Sandoval^I, María Sol Gilardino^I, Cintia Sabrina Ruiz^I, María Cristina Noelting^{II}

^IFacultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta 4, km 2 (1836) Llavallol, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: msand@ciudad.com.ar. ^{II}Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Ruta 4, km 2 (1836), Llavallol, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN: Los lavandines (*Lavandula hybrida* Reverchon) y lavandas (*Lavandula officinalis* Chaix ex Villars) son utilizados en la industria farmacéutica, cosmética, perfumística y veterinaria. El lavandín es la especie de mayor superficie de producción, debido a su elevado rendimiento de aceite esencial con buena calidad y flores secas. En Argentina en el año 2012, en el sur de la provincia de Buenos Aires, se observaron plantas de *L. hybrida* cultivadas en el campo con lesiones oscuras en hojas y tallos. Asimismo, se constató la muerte de plantas muy afectadas. Este problema motivó la realización del presente estudio, con el objetivo de identificar la causa del daño observado. Se escogieron veinte plantas de un total de cuarenta examinadas y se obtuvieron segmentos de tejidos sintomáticos, que fueron desinfectados y colocados en placas Petri con agar papa glucosado (APG) al 2%. Sobre los segmentos crecieron colonias fungosas, identificadas como *Phomopsis lavandula* (Gabotto) Cif. & Vegni, *Fusarium oxysporum* Schltdl, *Selenophoma* sp. Maire y *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj. Para confirmar su patogenicidad, los explantes obtenidos de diez plantas sanas fueron inoculados por separado con una suspensión de cada uno de los hongos. Este material se sembró en placas Petri con APG. La prueba reprodujo los síntomas observados en el campo sólo en el material inoculado con *Selenophoma*. Entre las 24-48 h después de la inoculación, todos los tejidos desarrollaron amarronamiento y necrosis. El patógeno se reaisló de tallos y hojas cumpliendo con los postulados de Koch. Los testigos permanecieron asintomáticos. Este es el primer informe de *Selenophoma* como agente causal de amarronamiento y necrosis en *L. hybrida*, en Argentina.

Palabras clave: lavanda; lavandín; *Selenophoma*; amarronamiento; necrosis.

Mycobiota associated with a disease in plants of *Lavandula hybrida* Reverchon

ABSTRACT: The lavandin (*Lavandula hybrida* Reverchon) and the lavender (*Lavandula officinalis* Chaix ex Villars) are used in the pharmaceutical, cosmetic, and veterinary industries. The lavandin is the species with the most extended production area for its high yield of good quality essential oil and dried flowers. In 2012, in the south of Buenos Aires province (Argentina), *L. hybrida* plants with dark and necrotic lesions on leaves and stems, with death of the most affected plants, were observed in the field. This problem justified the present study to identify the cause of the damage observed. Segments of symptomatic tissues of twenty plants, chosen from a total of forty plants examined, were disinfected and placed into Petri dishes with potato dextrose agar (APG 2%). Fungal colonies developed on all the tissue segments. The isolates were identified as *Phomopsis lavandulae* (Gabotto) Cif. & Vegni, *Fusarium oxysporum* Schltdl, *Selenophoma* Maire, and *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj. Pathogenicity of each fungus was separately examined by inoculating leaves and stem of ten healthy plants with the fungal suspension using a hypodermic syringe; the control was inoculated with sterile distilled water. This material was cultured in Petri dishes with PGA. In this test, only the material inoculated with *Selenophom* reproduced the symptoms observed in the field. Between 24-48 h after inoculation, all the tissues developed browning and necrosis. The pathogen was then reisolated from leaves and stems fulfilling Koch's postulates. The controls remained symptomless. This is the first report of *Selenophoma* as the causal agent of browning and necrosis in *Lavandula hybrida* in Argentina.

Key words: lavender; lavandin; *Selenophoma*; browning; necrosis.

INTRODUCCIÓN

Los lavandines (*Lavandula hybrida* Reverchon) y las lavandas (*Lavandula officinalis* Chaix ex Villars) son utilizados en la industria farmacéutica, cosmética, perfumística y en veterinaria. El lavandín es la especie de lavanda de mayor superficie de producción por su elevado rendimiento de aceite esencial con buena calidad y flores secas.

La producción en Argentina es de 5 toneladas anuales, sin llegar a cubrir la demanda anual de 25 toneladas (1). Uno de los factores que dificulta el aumento de la producción es la presencia de distintas patologías provocadas, principalmente, por patógenos que causan marchitamientos vasculares y podredumbres de raíces, como son *Fusarium* Link ex Grey, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan y *Pythium* Pringsheim (2), así como patógenos que afectan las partes aéreas de las plantas, como *Phoma lavandulae* Gaboto (tizón del tallo) (3) y *Septoria lavendulae* Roberge ex Desm. (manchado foliar) (4), todas ellas se producen en condiciones de hábitats de alta humedad relativa.

Hacia fines del año 2012 se observaron en lotes de *L. hybrida* cultivados en el sur de la provincia de Buenos Aires, numerosas plantas con síntomas de amarronamiento en tallos y hojas, que se iniciaba en la parte basal de las ramas que, en el caso de ejemplares muy afectados, causó la muerte de plantas en producción.

El presente estudio se realizó con el objetivo de identificar la causa del daño observado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de la micobiota presente en *Lavandula hybrida*. El material estudiado consistió en 40 plantas de lavandín cultivadas a campo en el sur de la provincia de Buenos Aires. Se tomaron plantas con síntomas de amarronamiento en tallos y hojas, que se iniciaban en la parte basal de las ramas, los que, en el caso de ejemplares muy afectados, causaron la muerte de plantas en producción (Fig. 1).

Las plantas completas se trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias. La descripción y caracterización de la sintomatología se realizó a partir de observaciones macroscópicas y con microscopio óptico (Enosa) (45 y 100X) de muestras de hojas y tallos de plantas de lavandín sintomáticas. Se efectuaron cortes histológicos y preparaciones de estructuras fúngicas teñidas con una solución azul de algodón y lactofenol, siguiendo los

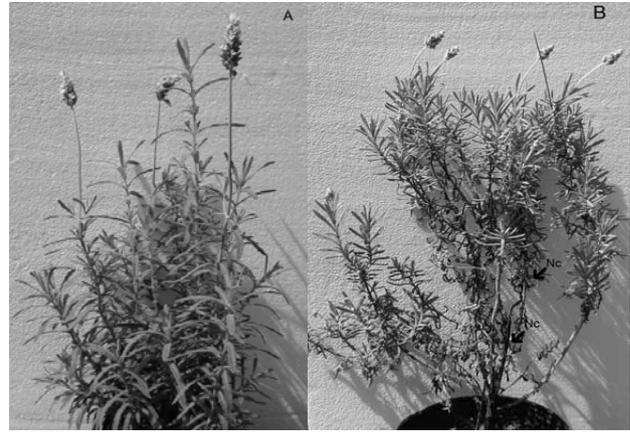


FIGURA 1. (A) Planta sana de *L. hybrida*. (B) Planta con síntomas de amarronamiento y necrosis (Nc) en tallos y hojas. / (A) Healthy *L. hybrida* plant. (B) Plant with browning and necrosis (Nc) symptoms in stems and leaves.

procedimientos indicados para la tinción de preparaciones en fresco.

Para la identificación de la micobiota presente se emplearon muestras consistentes en secciones de hojas y tallos de 0,5 cm, procedentes de veinte plantas enfermas. Estas muestras, 15 por cada planta afectada, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos y enjuagaron con agua destilada estéril. El exceso de humedad se eliminó colocando el material sobre hojas de papel de filtro estéril. A continuación, se procedió a la siembra en placas Petri de 9 cm de diámetro que contenían agar papa glucosado (APG) (Britania) al 2%. Se emplearon cinco secciones de hojas y/o tallos por placa y tres repeticiones por muestra. Las placas Petri se colocaron en una estufa (Sanjor) a 25°C durante ocho días, al término de los cuales se analizaron los caracteres macroscópicos y microscópicos de las colonias desarrolladas, utilizando para la identificación claves taxonómicas y descriptivas.

Para la caracterización morfológica de las estructuras de los hongos, se utilizaron 50 preparaciones por cada hongo estudiado, en solución azul de algodón y lactofenol. La medición de la longitud y diámetro (μm) de 100 conidios se realizó con un ocular micrométrico (Carl Zeiss Gena) con 45 aumentos. El procedimiento se realizó dos veces. Después de la identificación, se obtuvo un cultivo puro de cada hongo por siembra de punta de hifa en APG 2%, que fue depositado en el cepario de la cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad se usó como inóculo un cultivo puro de cada hongo en APG, aislado en la etapa anterior. Se preparó una suspensión en 100 ml de agua destilada estéril con una concentración de 2×10^8 UFC. Fragmentos de hojas y tallos de 2 cm de longitud, separados de diez plantas sanas de lavandín y previamente desinfectados con hipoclorito de sodio 2%, se inocularon con 3 ml de la suspensión de cada hongo por separado, utilizando una jeringa hipodérmica de 5 ml con aguja fina de 0,11 x 0,40 cm. Las hojas y tallos testigos fueron inoculados sólo con agua destilada estéril.

El material tratado y el testigo se sembraron en placas Petri con APG, empleando cinco hojas o tallos por placa y tres placas por repetición. Las placas se llevaron a una estufa de cultivo a 25°C de temperatura. Las observaciones se realizaron cada 24 horas, durante 14 días, luego de la inoculación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de la micobiota presente en *Lavandula hybrida*

Los microorganismos identificados en plantas sintomáticas y la frecuencia de detección de cada uno fueron los siguientes: *Phomopsis lavandulae* (Gabotto) Cif. & Vegni (16%), *Fusarium oxysporum* Schltdl (15%), *Pestalotiopsis maculans* (Corda) Nag Raj (9%) y

Selenophoma Maire presente en el 100% de las muestras estudiadas, como único género fúngico (60%), o bien en forma conjunta con uno o más de los hongos restantes (40%).

Las características distintivas que permitieron la identificación de estos hongos fueron las siguientes: *P. lavandulae*: colonias blancas, micelio de aspecto algodonoso abierto con formación de picnidios (cuerpos fructíferos asexuales) oscuros con aspecto carbonoso, gregarios, ostiolados de 60-75 μm de largo y 70 - 92 μm de ancho. En el interior de los picnidios se observaron conidioforos simples, cortos, hialinos con dos tipos de esporas unicelulares. Esporas alfa (α) hialinas, elipsoides de extremos redondeados bigutuladas de 5,6 x 2,2 μm . Estilosporas (esporas beta β) filiformes y flexuosas en forma de gancho sin septos de 15-17 x 0,5 -1 μm (Fig. 2).

F. oxysporum: colonias con abundante micelio aéreo algodonoso de color blanco y coloración violácea en el envés. Microconidios unicelulares hialinos rectos formados sobre fiálides laterales cortas. Macroconidios fusiformes, moderadamente curvados, 5 septos transversales con la célula basal elongada y célula apical atenuada. 8-11 μm de largo y 2, 7 a 3 μm de ancho (Fig. 3).

P. maculans: colonias con micelio inicialmente blanco seguido del desarrollo de zonas concéntricas oscuras, debido a la formación de conidiomas acervuloideos (cuerpos fructíferos asexuales). Los conidiomas sur-

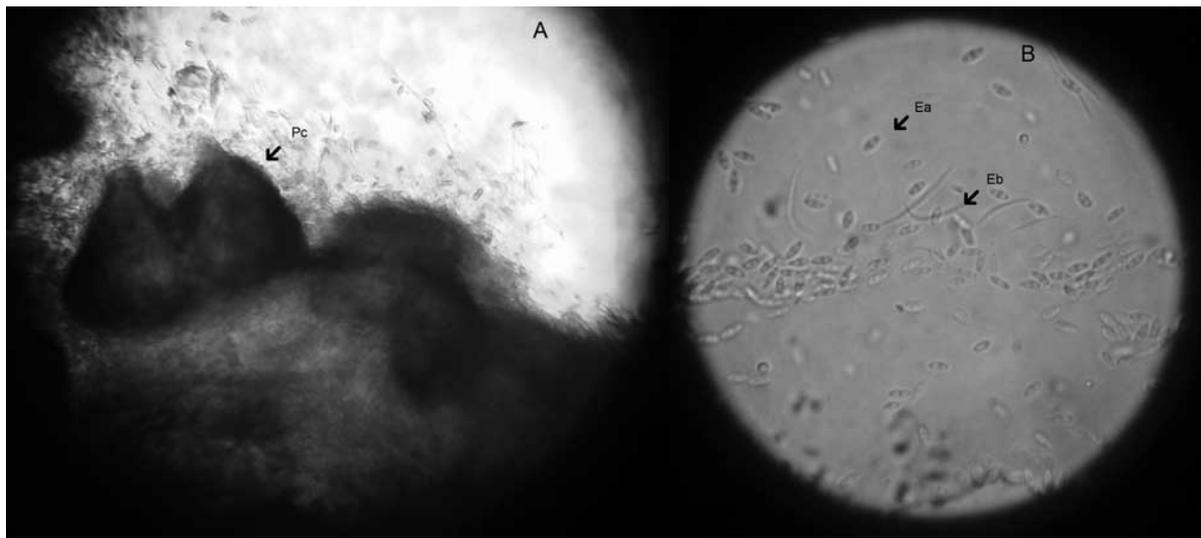


FIGURA 2. (A) *Phomopsis lavandulae*: picnidios (Pc) gregarios oscuros, piriformes de aspecto carbonoso 45X. (B) Esporas alfa (E α) y estilosporas beta (E β) 100X./ (A) *Phomopsis lavandulae*: pycnidia (Pc) dark gregarious, pyriform aspect carbonaceous. (B) Alpha spores (E α) and beta stilosporas (E β) 100X.

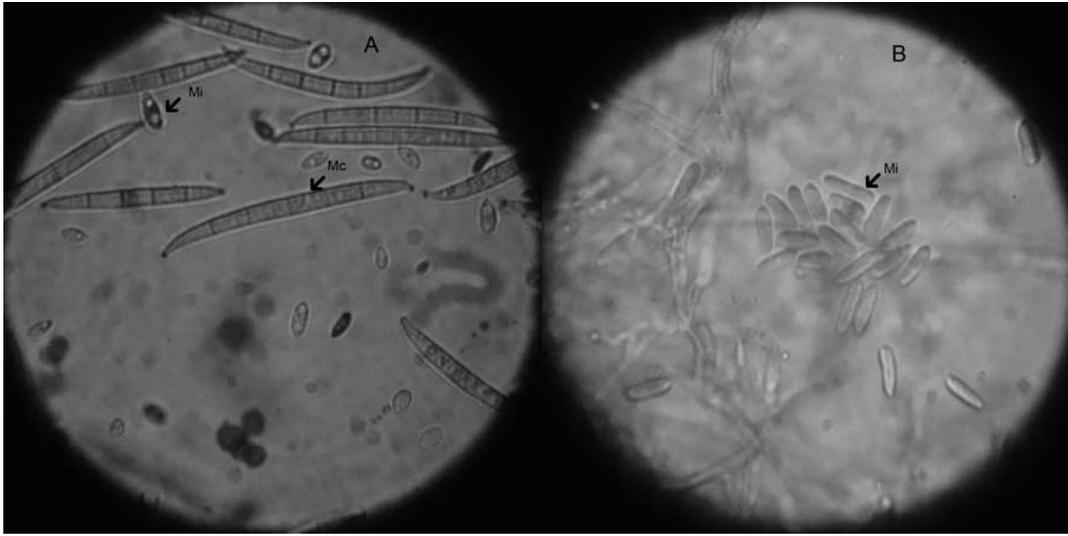


FIGURA 3. *Fusarium oxysporum* (A) Macroconidios (Mc) y Microconidios (Mi) 45X. (B) Microconidios (Mi) sobre fiálides laterales 100 X./ *Fusarium oxysporum* (A) Macroconidia (Mc) and Microconidia (Mi) 45X. (B) Microconidia on lateral phialides 100X.

gieron como pequeñas pústulas color negro de 200 μm de diámetro, sobre los que se formaron los conidios embebidos en una masa mucilaginosa de color negro. Conidios formados por cinco células, hialinas las células apical y basal, y pigmentadas las tres centrales; la cuarta célula fue distal con respecto a la célula apical, ligeramente más clara que la segunda y la tercera. La longitud de los conidios fue de 25 - 30 μm y 5 - 9 μm de ancho. La célula apical presentó 3 apéndices (setas) y la célula basal sólo 1 apéndice (Fig. 4).

P. lavandulae y *F. oxysporum* fueron citados como los hongos patógenos causantes de las dos enfermedades más importantes del cultivo: el tizón del tallo y la podredumbre vascular, respectivamente. Sin embargo, los síntomas correspondientes a estas enfermedades, amarillamiento progresivo de ramas y marchitamiento (3), difieren del amarronamiento de ramas y posterior necrosis observada en las plantas estudiadas. Igual sucede con la sintomatología causada por *P. maculans*, lesiones necróticas localizadas (antracnosis) y marchi-

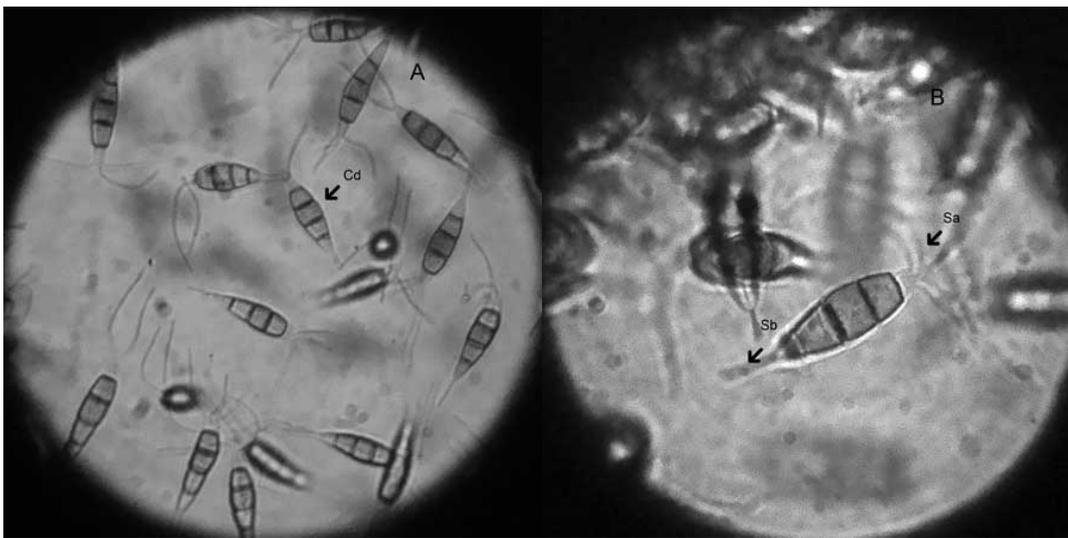


FIGURA 4. *Pestalotiopsis maculans* (A) Conidios (Cd) con cinco células 45X. (B) Célula apical con tres setas (Sa) y célula basal con una seta (Sb) 100X./ *Pestalotiopsis maculans* (A) Conidia (Cd) with five cell 45X. (B) Apical cell with three appendices (Sa) and basal cell with a appendage (Sb) 100X.

tamiento (5), y la atribuida en la literatura específica a *Selenophoma* que se corresponde con manchas foliares con halo clorótico en distintas especies (6).

Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad realizadas permitieron observar que los fragmentos de plantas inoculados con cultivos puros de *P. lavandulae*, *F. oxysporum* y *P. maculans* y los testigos no mostraron ningún tipo de síntomas.

El resultado negativo de la inoculación con *F. oxysporum* podría deberse al carácter saprófito del aislamiento inoculado, una característica común a distintos aislamientos de este hongo. Diferentes estudios indicaron, además, que *F. oxysporum* es un endófito dominante de plantas superiores (7). Una consideración similar puede postularse para los resultados negativos alcanzados en las pruebas de patogenicidad realizadas utilizando cultivos puros de *P. lavandulae* y *Pestalotiopsis*, en especial con el segundo género. *Pestalotiopsis* es un hongo cosmopolita que se encontró asociado a distintos hospedantes como saprofito, fitopatógeno y como endofítico (8, 9).

Por el contrario, en los fragmentos de plantas inoculadas con el aislamiento de *Selenophoma* se reprodujo la sintomatología que fuera observada en las plantas infectadas de forma natural en el campo. Entre las 36-48 horas luego de la inoculación, se observaron, en hojas y tallos, lesiones alargadas de color castaño con fructificaciones (picnidios) de color marrón, errumpentes

y ostioladas. Las lesiones progresaron hasta causar la necrosis completa de hojas y tallos, después del sexto día de la prueba. *Selenophoma* fue reaislado de la totalidad de hojas y tallos inoculados en las pruebas de patogenicidad con este hongo. El amarronamiento tuvo carácter progresivo hasta causar la necrosis de las ramas afectadas.

A partir de la siembra de los órganos inoculados con *Selenophoma* se obtuvieron cultivos puros de un hongo, cuyas características distintivas consistieron en: micelio parcialmente sumergido y escaso micelio aéreo dispuesto en forma radial, color blanco ceniza. La formación de picnidios gregarios comenzó a partir del tercer día y fue máxima a partir del séptimo día posterior a la incubación. Las preparaciones microscópicas, obtenidas a partir de estos cultivos puros, permitieron observar conidios hialinos delgados unicelulares de 8 - 15 x 2 - 3,5 μm (Fig. 5), lo que coincide con lo descrito por Cheewangkoon *et al.* (10) para *S. eucalypti*. Si bien las especies de *Selenophoma* se distinguen por causar manchas foliares rodeadas por un halo característico sobre distintos hospedantes (6), la sintomatología descrita en el presente estudio fue referida sólo en *L. officinalis* (11). En este camino puede postularse, a modo de hipótesis, que la sintomatología registrada en plantas de *L. hybrida* infectadas por *Selenophoma*, está relacionada con la virulencia de la cepa inoculada. Esta virulencia podría deberse a la producción de toxinas, al igual que sucede con otros hongos del orden Sphaeropsidales como *Septoria* (12).

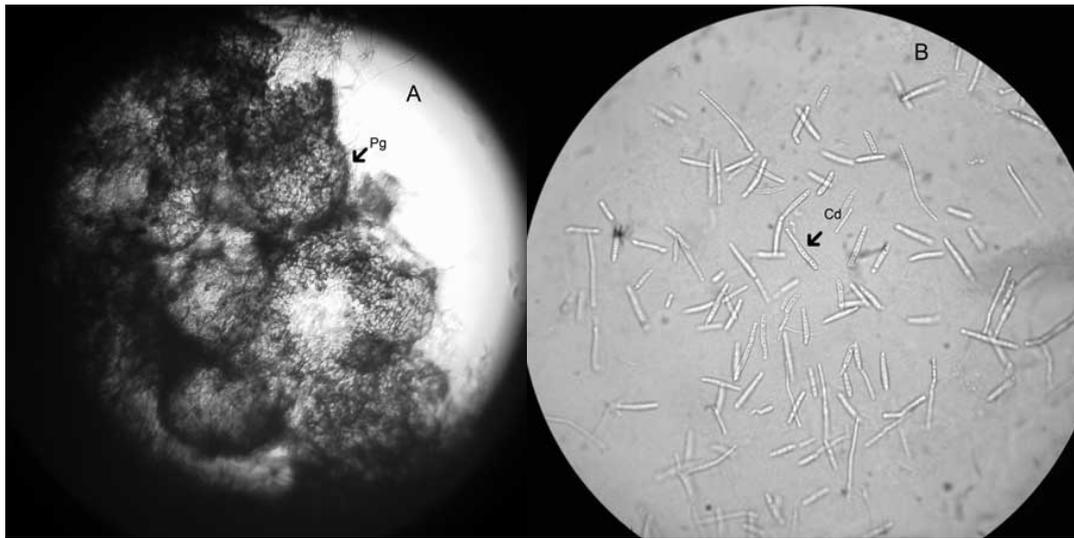


FIGURA 5. *Selenophoma* (A) Picnidios oscuros ostiolados (Pg) 45X. (B) Conidios (Cd) hialinos delgados unicelulares (Cd) 100X. / *Selenophoma* (A) Dark ostiolated pycnidia (Pg) 45X. (B). Thin hyaline unicellular conidia (Cd) 100X.

Puede concluirse que *Selenophoma* es el hongo causal del amarramiento y posterior necrosis de tallos y hojas en *L. hybrida*. La dilucidación de los mecanismos de patogenicidad, que derivan en el daño causado por *Selenophoma*, requiere de nuevos estudios; mientras que la restante micobiota asociada a *L. hybrida* se distingue por su comportamiento saprofito (*P. lavandulae*) o endofítico (*F. oxysporum* y *P. maculans*).

REFERENCIAS

1. Curioni A, Arizio O, Alfonso W. El complejo de las lavandas. En: Arizio O, Curioni A. Plantas aromáticas y medicinales Labiadas. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 2006. p. 93-122.
2. Tucker AO, DeBaggio T. The Encyclopedia of Herbs: A comprehensive Reference to Herbs of Flavors and Fragrance. Oregon: Timber Press Inc; 2009. p. 102-108.
3. Nakova M. Phytosanitary monitoring of lavender diseases. Agrarni Nauki. 2011;3(5):5-10.
4. Nagy G, Horvath A. *Septoria* leaf spot on medicinal plants in Hungary. Növényvédelem. 2010;46(4):145-153.
5. Nag Raj TR. Coelomycetous anamorphs whit appendage-bearing conidia. Ontario: Mycologue Publications; 1993. p. 43-79.
6. Latterell FM. A previously undescribed *Selenophoma* leaf spot on maize in Colombia. Plant Dis. 1986;70:472-474.
7. Appel DJ, Gordon TR. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. Molecular Plant Microbe Interaction. 1986;9:125-138.
8. Wei JG, Xu T, Guo LD, Liu AR, Zhang Y, Pan XH. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated whit plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. Fungal Diversity. 2007;24:55-74.
9. Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Chukeaetirote E, Bahkali AH, Hyde KD. *Pestalotiopsis* - morphology, phylogeny, biochemistry and Diversity. Fungal Diversity. 2011;50:167-187.
10. Cheewangkoon R, Groenewald JZ, Summerell BA, Hyde KD. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. Peersonia. 2009;23:55-85.
11. Sandoval MC, Gilardino MS, Noelting MC. Micobiota asociada a plantas de lavanda (*Lavandula officinalis* Chaix ex Villars). (Res.) Bol Soc Argent Bot.. 2013;48(Supl.):226.
12. Carver BF. Wheat Science and Trade. Iowa: Wiley-Blackell; 2009. p. 158-160.

Recibido: 17-10-2014.

Aceptado: 20-1-2015.