

***Stemphylium vesicarium*, CAUSANTE DE QUEMA FOLIAR EN AJO Y CEBOLLA EN MÉRIDA, VENEZUELA**

Luis Cedeño, Chrystian Carrero, Kleyra Quintero, Henry Pino y Wilmer Espinoza

RESUMEN

El agente causal de quema foliar severa en ajo (*Allium sativum*) y cebolla (*Allium cepa*) cultivados, respectivamente, en los municipios Rangel y Sucre del estado Mérida, fue identificado como *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. Simmons. Los síntomas de la enfermedad fueron reproducidos en plántulas de ajo 'Mejicano Rojo' y cebolla 'Yellow Granex', inoculadas por aspersión de una suspensión conidial de aislamiento obtenido de

ajo 'Mejicano Rojo'. La identidad del inóculo se confirmó en hojas infectadas que 15 días después de inoculadas fueron incubadas en cámara húmeda hasta la aparición de conidióforos y conidios. El presente trabajo es el primer reporte de *S. vesicarium* causando quema foliar severa en ajo y cebolla en Venezuela.

SUMMARY

The causal agent of severe foliar blight on garlic (*Allium sativum*) and on onion (*Allium cepa*) at the Rangel and Sucre municipalities of Merida State, was identified as *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. Simmons. Disease symptoms were reproduced on seedlings of garlic 'Mejicano Rojo' and onion 'Yellow Granex', inoculated by spraying a conidial suspension of isolate

obtained from garlic 'Mejicano Rojo'. Inoculum identity was confirmed on infected leaves that 15 days after inoculation were incubated in a moist chamber until the appearance of conidiophores and conidia. The present paper is the first report of *S. vesicarium* causing severe leaf blight disease on garlic and onion in Venezuela.

RESUMO

O agente que causa a queima das folhas severa no alho (*Allium sativum*) e cebola (*Allium cepa*) cultivados, respectivamente, nos municípios Rangel e Sucre do estado Mérida, foi identificado como *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. Simmons. Os sintomas da enfermidade foram reproduzidos em plântulas de alho 'Mejicano Rojo' e cebola 'Yellow Granex', inoculadas por asper-

são de uma suspensão conidial de isolamento obtido do alho 'Mejicano Rojo'. A identidade do inóculo confirmou-se em folhas infectadas que 15 dias depois de inoculadas foram incubadas em câmara úmida até a aparição de conidióforos e conidios. O presente trabalho é o primeiro relato de *S. vesicarium* causando queima de folhas severa em alho e cebola na Venezuela.

Introducción

En Venezuela los estados Mérida y Lara son los principales productores de ajo y cebolla, respectivamente (MAC, 1999). En ambas entidades la productividad de estos cultivos es superior al

promedio nacional. Las 5620 ton de ajo producidas por Mérida en 1997 representaron 47,5% de la producción nacional. En ese mismo año, en Lara se cosechó 62,7% de la producción nacional de cebolla, mientras que Mérida sólo

contribuyó con 1,3%. Es de destacar que durante los últimos años en Mérida la producción de cebolla ha experimentado incrementos.

En los Andes de Venezuela las hojas del ajo y la cebolla son comúnmente atacadas por *Alternaria porri*, causante

de la "Mancha Púrpura" (MP), enfermedad de notable incidencia económica en todas las áreas productoras de *Allium* spp. del mundo, especialmente en aquellas con ambientes húmedos y calurosos (Miller y Lacy, 1996). Usualmente los síntomas de

PALABRAS CLAVE / Ajo / Cebolla / Quema Foliar / *Stemphylium vesicarium* /

Recibido: 12/07/2002. Modificado: 24/02/2003. Aceptado: 05/03/2003

Luis Cedeño. Ingeniero Agrónomo, Universidad de Oriente, Venezuela. Master en Patología Vegetal, Universidad de Georgia, Athens. EEUU. Profesor-Investigador Titular, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Universidad de Los Andes (ULA). Dirección: Instituto de

Investigaciones Agropecuarias, (ULA). Mérida 5101, Venezuela. e-mail: cdnol@ula.ve
Chrystian Carrero, Ingeniero Agrónomo, Universidad del Zulia, Venezuela. Master en Manejo de Bosques, ULA. Profesor-Investigador Asistente del Instituto de Investi-

gaciones Agropecuarias, ULA.

Kleyra Quintero, TSU en Fitotecnia. Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, ULA.

Henry Pino, TSU en Fitotecnia. Sección Frutales, Instituto de

Investigaciones Agropecuarias de la ULA.

Wilmer Espinoza. Perito Agropecuario. Sección Agronomía General, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, ULA

MP son indistinguibles de los que caracterizan la "Quema Foliar causada por *Stemphylium*" (QFS) (Suheri y Price, 2000). Las manifestaciones iniciales de MP aparecen en las hojas más viejas como pecas blancas que bajo condiciones ambientales favorables se expanden y se convierten en lesiones hundidas de color púrpura con margen amarillo a marrón pálido (Suheri y Price, 2000). Al principio la QFS se presenta como lesiones elongadas de color blanco que posteriormente se tornan púrpura, hundidas y rodeadas por un margen blanquecino (Hill, 1996, Basallote-Ureba *et al.*, 1999).

En siembras comerciales de cebolla y ajo localizadas, respectivamente, en sectores de los municipios Libertador (El Morro) y Rangel (Mucurubá) del estado Mérida, en octubre del 2000 y mayo del 2001, se detectaron daños severos de quema foliar. En hojas enfermas de ambos cultivos, incubadas en condiciones de cámara húmeda, consistentemente se observaron conidióforos y conidios, cuyas características coincidieron con las del género *Stemphylium* (Ellis, 1971; Simmons, 1967, 1969). En ningún caso se encontraron conidios de *A. porri*. En junio de 2001, estructuras semejantes fueron observadas en plantas de cebolla provenientes de Quibor, estado Lara, las cuales mostraban quema foliar.

En el género *Stemphylium* se han descrito 19 especies y dos variedades (Farr *et al.*, 1989) pero sólo las especies *S. botryosum* Wallroth y *S. vesicarium* (Wallr.) E. Simmons, han sido reportadas como causa de quema foliar en *Allium* spp. cultivadas en EEUU.

El objetivo del presente trabajo fue identificar la causa de quema foliar severa en plantas de ajo y de cebolla cultivadas, respectivamente, en sectores de los municipios Rangel y Libertador del estado Mérida.

Materiales y Métodos

Aislamiento e identificación del patógeno

Los aislamientos fueron realizados de hojas con síntomas de quema foliar, las cuales fueron tomadas de plantas de ajo (mayo y junio de 2001) y de cebolla (octubre de 2000) cultivadas, respectivamente, en los municipios Rangel (Mucurubá) y Libertador (El Morro) del estado Mérida. Los aislamientos se realizaron sembrando en placas de agua agar acidificado con ácido láctico (AAA), pequeños segmentos de tejidos infectados y conidios cosechados de lesiones en hojas incubadas en cámara húmeda, utilizando una aguja de disección estéril. Las placas fueron incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad. Las colonias emergentes fueron purificadas por transferencia repetida de ápices hifales a placas de papa-dextrosa-agar (PDA), siendo seguidamente conservados bajo refrigeración en tubos con PDA inclinado. A los fines de promover el desarrollo de las estructuras reproductivas, los cultivos puros fueron subcultivados en placas que contenían sustrato preparado con segmentos de hojas de ajo y agar (HAA) y en tubos con PDA, incubados ambos materiales en los mesones del laboratorio (22°C) y bajo un régimen de 12h de iluminación proveniente de una lámpara suspendida 40cm por encima de los cultivos. La lámpara tenía 2 tubos de luz blanca fluorescente (General Electric F400 Extra-life-EX, 40W Daylight) y dos de luz negra (Roblan 110V BLB40W). Se usaron segmentos de hojas frescas y de hojas deshidratadas (secas) por 1h en estufa a 60°C , las cuales habían sido esterilizadas en autoclave por 15min a 121°C y 15 libras/pulg.² de presión. A partir de cultivos de 14-21 días en HAA se tomaron segmentos de hojas de ajo

con conidióforos y conidios, los cuales fueron montados en portaobjetos, fijados con formalina al 4% y examinados en un microscopio Zeiss modelo Axioplan. En 100 conidióforos y conidios y en 50 pseudotecios y ascosporas, se registraron las características morfométricas. Adicionalmente en los conidios se determinó la pigmentación, el radio largo/ancho (l:a), el número de septos transversales, la presencia o ausencia de constricciones laterales, la ornamentación superficial de la pared y la forma del ápice. Los datos acumulados fueron comparados con los registrados en Blancard y Laterrot (1986), Simmons (1967, 1969) y Ellis (1971).

Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad fue evaluada en plántulas de ajo 'Mejicano Rojo' y de cebolla 'Yellow Granex' de dos meses de edad, las cuales estaban creciendo en envases de plástico que contenían mezcla estéril de turba y arena (1:1, p/p), y fueron inoculadas con suspensiones conidiales de 1.05 y 2.78×10^7 conidios/ml, respectivamente, aplicadas con aspersadora manual. En ambos casos se utilizaron cultivos de 21 días en HAA de un mismo aislamiento proveniente de ajo 'Mejicano Rojo'. La suspensión conidial fue preparada inundando los cultivos con agua destilada estéril (ADE) y frotándolos suavemente con un pincel pequeño de cerdas blandas. La concentración conidial (conidios/ml) se determinó en un haematocítmetro y luego al inóculo se le agregó 1 gota de solución Tween-20 (1 gota en 1000ml de ADE). Dos días antes de la inoculación, las plantas se mantuvieron por 48h en condiciones de cámara húmeda. La prueba se hizo dos veces y cada vez fueron inoculadas 12 plántulas de ajo y 18 de cebolla. Sólo las hojas de las plántulas de ajo fueron

frotadas con gasa que contenía arena estéril, con el propósito de romper la cutícula para facilitar la infección. Como testigo se usaron 4 plántulas de ajo y 6 de cebolla, las cuales fueron asperjadas con ADE más Tween-20. Después de la inoculación las plántulas fueron regadas abundantemente e inmediatamente cubiertas con bolsas de polietileno transparente para mantener la humedad relativa próxima a saturación. Las plántulas fueron transferidas al invernadero y las cubiertas de plástico retiradas a los 3 días. Los síntomas fueron observados a los 10 y 15 días después de la inoculación (ddi). Después de la última evaluación, las hojas de las plántulas inoculadas y de las plántulas testigo fueron cortadas e incubadas en cámara húmeda hasta la aparición de conidióforos y conidios, cuyas características se analizaron para confirmar la identidad del inóculo.

Resultados y Discusión

Los aislamientos obtenidos de ajo y de cebolla originaron colonias de un hongo, cuyos conidióforos y conidios presentaron la morfología que caracteriza al género *Stemphylium* (Ellis, 1971; Simmons, 1967, 1969). En PDA el hongo produjo micelio superficial denso de color grisáceo que desarrolló pseudotecios inmaduros cerca del borde de las placas. En HAA preparado con hojas frescas el hongo desarrolló más conidios que pseudotecios, mientras que cuando se usaron piezas de hojas deshidratadas, la producción de conidios fue escasa y la de pseudotecios abundante.

Los conidióforos se apreciaron cilíndricos con el ápice dilatado, septados, rectos a variablemente curvados, simples y raras veces con una ramificación, percurrentes, marrón amarillento a marrón oliváceo y de $87.2 \times 4.9 \mu\text{m}$ (Fig. 1). La célula conidiogena mostró dos ban-

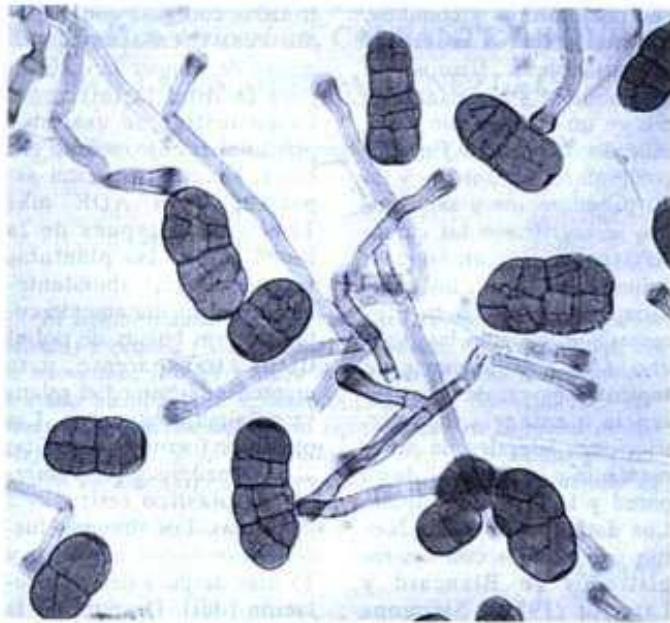


Fig. 1. Conidióforos y conidios de *Stemphylium vesicarium*

das oscuras y en la dilatación promedió 7,5 (6,9-8,2) μm de diámetro. Los conidios se manifestaron dictiosporos, solitarios, oblongos a elipsoidales con ápice obtuso, color marrón amarillento a marrón oliváceo, 3-7 septados, contritos en los tres septos transversales más largos, con pared espinosa y cicatriz basal oscura (Figura 1). Los aislamientos provenientes de ajo (AA) y cebolla (AC) produjeron conidios de 41,2 (36,5-45,9) \times 18,5 (17,1-20,0) μm ($l/a= 2,2$) y

30,5 (27,0-34,0) \times 16,5 (15,1-17,9) μm ($l/a= 1,8$), respectivamente.

Después de 3 semanas de crecimiento en placas de HAA y en tubos con PDA, incubados a temperatura ambiente y bajo 12h de iluminación, los cultivos de AA y AC habían formado abundantes conidios y pseudotecios, pero estos últimos estaban inmaduros. Transcurridos 4 meses después de la siembra, los pseudotecios no tenían ascos ni ascosporas y sólo alcanzaron la madurez cuan-

do esos mismos cultivos se mantuvieron por más de 2 meses bajo refrigeración (4°C). Los pseudotecios se observaron negros, ostiolados y de cuello corto. Los pseudotecios de AA promediaron 508,9 (428,3-589,6) μm de altura y 360,4 (322,9-397,5) μm de diámetro, mientras que los de AC tuvieron 435,9 (353,0-544,2) μm de altura y 373,1 (308,9-426,6) μm de diámetro. Los ascos se apreciaron hialinos, bitunicados, clavados y midieron 126,8 (109,5-143,1) \times 25,5 (23,6-27,4) μm . Los ascos contenían 4, 6 u 8 ascosporas muriformes, oblongas a elipsoidales, de color marrón claro o marrón dorado a marrón oliváceo, con hasta 7 septos transversales y 31,5 (28,8-34,2) \times 14,4 (12,9-16,0) μm (Figura 2).

En función de las características morfológicas antes descritas, se determinó que los aislamientos fúngicos investigados pertenecen a *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) Simmons (Ellis, 1971; Hill, 1996; Simmons, 1969), fase conidial de *Pleospora allii* (Rab.) Ces. & de Not. (Simmons, 1969). Este hongo es ampliamente conocido como causa de lesiones en hojas de ajo (Boiteux *et al.*, 1994), cebolla (Miller *et al.*, 1978; Shishkoff y Lorbeer, 1989), espárrago (*Asparagus officinalis* L.; Falloon *et al.*, 1987) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.; Blancard y Laterrot, 1986). En cebolla también pudre el tallo (Hill, 1996). Los aislamientos AA y AC presentaron diferencias en la relación l/a , sin embargo, ambos valores estuvieron dentro del rango de variación (1,3-2,7) reportado por Simmons (1969). Los pseudotecios producidos por el AC fueron menos altos pero más anchos que los desarrollados por el AA.

Las plántulas de ajo y de cebolla que fueron inoculadas con el AA desarrollaron síntomas de quema foliar similares a los observados en el campo. Iguales resultados

fueron obtenidos por Basallote-Ureba *et al.* (1999) y Boiteux *et al.* (1994) cuando inocularon ajo y cebolla con aislamientos *S. vesicarium* provenientes de ajo. Shishkoff y Lorbeer (1989) también lograron infectar cebolla con un aislamiento obtenido de espárrago.

Las lesiones provocadas por infección artificial presentaron la misma morfología y pigmentación que identifican la mancha púrpura inducida por *A. porri*, uno de los patógenos foliares de más común ocurrencia en las especies *Allium* (Suheri y Price, 2000), especialmente en aquellas que se cultivan en regiones con clima caliente y húmedo (Miller y Lacy, 1996). En el campo los síntomas de quema foliar por *S. vesicarium* en *Allium* spp. son indistinguibles de los que caracterizan la mancha púrpura por *A. porri* (Suheri y Price, 2000), ya que en ambas patologías resultan manchas con tinte púrpura (Basallote-Ureba *et al.*, 1999) y, además, las lesiones inducidas por *A. porri* son frecuentemente invadidas por *S. vesicarium* (Miller y Lacy, 1996). Para Suheri y Price (2000) los síntomas de mancha púrpura constituyen un complejo causado por los dos patógenos antes mencionados. En espárrago el patógeno produce igualmente manchas púrpuras y manchas marrón amarillento a marrón con márgenes rojizos o púrpura oscuro (Johnson y Lunden, 1984).

En ambos cultivos la infección comenzó a manifestarse como pecas blancas que más tarde se convirtieron en manchas fusiformes a elongadas con centro marrón claro a marrón amarillento y una ligera pigmentación púrpura (Figuras 3 y 4). Frecuentemente las manchas se unieron originando necrosis extensiva hacia o desde el ápice foliar. Conforme avanzaba la necrosis los tejidos afectados se iban tornando filiformes y retorcidos. Cuando las hojas de plántulas inoculadas



Fig. 2. Ascus con ascosporas de *Pleospora allii*, teleomorfo de *S. vesicarium*.



Figura 3. Lesión causada por *S. vesicarium* en hoja de ajo 'Mejicano Rojo'.

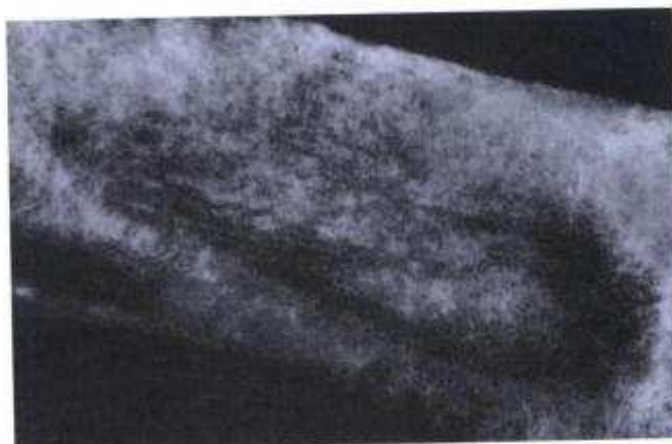


Figura 4. Lesión causada por *S. vesicarium* en hoja de cebolla 'Yellow Granex'.

se incubaron por 3 días en cámara húmeda, los tejidos infectados se ennegrecieron a causa de la aparición de conidióforos y conidios, cuyas características coincidieron con la descripción de *S. vesicarium* (Ellis, 1971; Simmons, 1969). En hojas de cebolla los conidióforos se observaron emergiendo por los estomas en fascículos con hasta 7 estructuras (promedio= 3,5 conidióforos/estoma). Las plántulas testigo no desarrollaron síntomas de infección bajo las mismas condiciones de incubación. De esta manera se comprobó que *S. vesicarium* fue el causante de los daños de quema foliar que durante 2000 y 2001, respectivamente, ocurrieron en campos de cebolla y de ajo de los municipios Libertador y Rangel del estado Mérida.

El hongo produjo pseudotecios inmaduros en hojas inoculadas de ajo y de cebolla incubadas en condiciones de cámara húmeda. El teleomorfo no fue observado en plantas de ambos cultivos infectadas naturalmente. En Michigan, EEUU (Evans y Sthephem, 1984) y en España (Basallote-Ureba *et al.*, 1999), respectivamente, los pseudotecios de *P. allii* fueron encontrados en restos foliares de espárrago y de ajo infectados naturalmente. Los pseudotecios se desarrollaron mejor cuando residuos foliares de ajo infectados por *S. vesicarium* fueron incubados

a bajas temperaturas y humedad relativa próxima a saturación (Prados-Ligero *et al.*, 1998). En condiciones naturales la formación de pseudotecios fue mayor en residuos infectados sin enterrar que en los enterrados (Prados-Ligero *et al.*, 1998). Las estructuras sexuales alcanzaron la madurez entre 1-4 meses después que los residuos fueron depositados en la superficie del suelo y 15 días después de haber sido enterrados (Prados-Ligero *et al.*, 1998).

S. vesicarium ha sido reportado en EE.UU. y en la India (Hill, 1996) como causa de quema foliar en ajo y cebolla. En el Nuevo Mundo, Brasil fue el primer país donde este hongo fue detectado ocasionando un brote severo de quema foliar en ajo (Boiteux *et al.*, 1994). En las principales áreas productoras de ajo de España la enfermedad fue detectada por primera vez durante inspecciones realizadas entre 1989 y 1993 (Basallote-Ureba *et al.*, 1999), mientras que en 1992 fue identificada en las siembras de ajo de la provincia de Transvaal en Sudafrica (Aveling y Mes, 1992).

Es la primera vez que en el estado Mérida se reporta a *S. vesicarium* como causa de daños económicamente importantes en *Allium* spp. En cebolla y ajo, la infección se presentó, respectivamente, en épocas de alta (octubre, 2000) y escasa (finales de mayo a julio, 2001) precipitación.

REFERENCIAS

- Aveling TAS, Mes M (1992) First report of *Stemphylium* on garlic in South Africa. *Plant Dis.* 76: 426.
- Basallote-Ureba MJ, Prados-Ligero AM, Melero-Vara JM (1999) Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *Plant Pathol.* 48: 139-145.
- Blancard D, Laterrot H (1986) Les stemphylias rencontrés sur tomate. *Phytopathologia Méditerranée* 25: 140-144.
- Boiteux LS, Lima MF, Menezes Sobrino JA, Lopes CA (1994) A garlic (*Allium sativum*) leaf blight caused by *Stemphylium vesicarium* in Brazil. *Plant Pathol.* 43: 412-414.
- Ellis MB (1971) *Dematiaceous hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra. 167 pp.
- Evans TA, Sthephem CT (1984) First report in Michigan of the teleomorph of *Stemphylium vesicarium*, causal agent of purple spot of asparagus. *Plant Dis.* 68: 1099.
- Falloon PG, Falloon LM, Grogan RG (1987) Etiology and epidemiology of *Stemphylium* leaf spot and purple spot of asparagus in California. *Phytopathol.* 77: 403-407.
- Farr DF, Bills GF, Chamuris GP, Rossman AY (1989) *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press, St. Paul, Minnesota. EEUU. 1252 pp.
- Hill JP (1996) *Stemphylium* leaf blight and stalk rot. En Schwartz HF, Mohan SK (Eds.) *Compendium of onion and garlic diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota. EEUU. pp. 25-26.
- Johnson DA, Lunden JD (1984) First report of purple spot (*Stemphylium vesicarium*) of asparagus in Washington. *Plant Dis.* 68: 1099.
- Miller ME, Lacy ML (1996) Purple blotch. En Schwartz HF, Mohan SK (Eds.) *Compendium of onion and garlic diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota. EEUU. pp. 23-24.
- MAC (1999) *Anuario Estadístico Agropecuario 1995-1997*. Dirección de Planificación y Estadística, Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas, Venezuela.
- Miller ME, Taber RA, Amador JA (1978) *Stemphylium* blight of onion in Texas. *Plant Dis.* 62: 851-853.
- Prados-Ligero AM, González-Andujar JL, Melero-Vara JM, Basallote-Ureba MJ (1998) Development of *Pleospora allii* on garlic debris infected by *Stemphylium vesicarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 861-870.
- Shishkoff N, Lorbeer JW (1989) Etiology of *Stemphylium* leaf blight of onion. *Phytopathol.* 79: 301-04.
- Simmons EG (1967) Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* 59: 67-92.
- Simmons EG (1969) Perfect states of *Stemphylium*. *Mycologia* 61: 1- 26.
- Suheri H, Price TV (2000) Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controlled environments. *Plant Pathol.* 49: 375-382.