

## ■ Hongos patógenos aéreos asociados con la muerte regresiva en ramas de aguacate en el sur de España

Arjona-Girona<sup>1</sup>, T. Ariza-Fernández<sup>1</sup>, D. Sarmiento<sup>2</sup>, J. Navarro<sup>2</sup>, V. Ruiz<sup>2</sup>, C. J. López-Herrera<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>. Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Córdoba (ESPAÑA)

<sup>2</sup>. TROPS. S.A.T. 2083. Vélez- Málaga, Málaga (España)

### RESUMEN

En California se han identificado a hongos como *Neofusicoccum parvum*, *N. australe* y *N. luteum* en ramas de aguacate afectadas por muerte regresiva. *N. parvum* se ha encontrado también en México afectando a frutos. *Lasiopodia theobromae* causa muerte regresiva en plantaciones de aguacate de Perú. Asimismo distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae (*N. australe*, *N. parvum*, *Diplodia* spp.) se han descrito en cultivos de almendro en España.

En el año 2014 se observó un aumento de la incidencia de la muerte regresiva de ramas en varias plantaciones de aguacate del Sur de España. Los síntomas de la enfermedad incluyen un rápido colapso de las ramas en primavera y verano, causando finalmente su seca y muerte. En el interior de las ramas se observa coloración rojiza de las zonas afectadas que avanza a marrón oscuro, especialmente en las ramificaciones.

Se realizaron prospecciones en distintas fincas desde Abril hasta Septiembre de 2014, tomándose muestras de ramas afectadas para posteriormente realizar aislamientos en el laboratorio. Los cultivos fúngicos aislados se secuenciaron e identificaron a nivel de especie.

Se encontró una gran diversidad de especies de hongos pertenecientes al género *Neofusicoccum* spp. principalmente: *N. parvum* (42%), *N. australe* (17%), *N. luteum* (15%) y *N. mediterraneum* (2%); así como *Colletotrichum gloeosporioides* (22%) y *Lasiopodia theobromae* (2%).

Tras inoculaciones artificiales se determinó el orden de virulencia de mayor a menor: *N. parvum*, *N. luteum*, *N. mediterraneum*, *N. australe*, *C. gloeosporioides* y *L. theobromae*, existiendo diferencias significativas entre *N. parvum* y el resto de especies, y sólo diferencias significativas entre *N. luteum* y *C. gloeosporioides*.

Palabras clave: Botryosphaeriaceae, *Diplodia*, *Lasiopodia*, *Neofusicoccum*, *Persea americana*.

### INTRODUCCIÓN

En los años 70 comenzó la implantación de plantaciones comerciales de aguacate en el Sur de España, dado a un microclima existente en la zona con condiciones similares a las existentes en distintas regiones del continente americano, tales como México, Perú y California, con amplia tradición y producción en dicho cultivo (FAOSTAT, 2015, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>).

En países productores de aguacate se ha observado muerte regresiva en las ramas de los árboles identificándose distintos agentes causales. En California se han identificado, entre otros, hongos como *Neofusicoccum parvum*, *N. australe* y *N. luteum* (McDonalds *et al.*, 2009). *N. parvum* se ha encontrado también en México (Molina-Gayosso *et al.*, 2012) afectando principalmente a frutos y *Lasiopodia theobromae* en Perú (Alama *et al.*, 2006). Asimismo distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae (*N. australe*, *N. parvum*, *Diplodia* spp.) se han descrito en cultivos de almendro en España (Gramaje *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de chancros de ramas de aguacate en el Sur de España, evaluando los agentes causales y estableciendo sus grupos de virulencia.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Síntomas de la enfermedad

En 2014 se comenzó a observar una alta incidencia de chancros en ramas de árboles de aguacate en plantaciones comerciales del Sur de España, con la consiguiente muerte de aquellas y pérdida de la producción.

Los síntomas de la enfermedad incluyen la aparición de algunas ramas secas del árbol en la primavera y verano con necrosis en la zona externa de la corteza, principalmente en la intersección de las ramas, que invade los vasos conductores del xilema, o bien se extiende longitudinalmente bajo la corteza. Este oscurecimiento de las ramas se traduce en una necrosis completa de estas con la frecuente aparición de un exudado blanco en las zonas más necrosadas.

#### Muestreo y aislamiento de hongos

Se realizaron prospecciones en distintas plantaciones de aguacate, desde Junio hasta Septiembre de 2014, tomándose muestras de ramas afectadas, que presentaban los síntomas descritos anteriormente (Figura 1).



**Figura 1. Síntomas de la muerte regresiva en árboles de aguacate del Sur de España**

Para la obtención de los aislados se realizaron siembras de trozos de rama afectada en PDA acidificado (con 0,2% de ácido láctico), previa desinfección superficial en hipoclorito sódico (40 g. de cloro activo/L) al 20% durante tres minutos y tres lavados consecutivos en agua destilada. Las colonias fúngicas obtenidas se identificaron preliminarmente mediante su observación macroscópica en PDA.

#### **Extracción de ADN y determinación de la especie**

Para confirmar la identificación macroscópica preliminar se realizaron extracciones de ADN a partir del micelio fúngico liofilizado siguiendo el protocolo de Choi *et al.* (1992).

Se obtuvo un polvo fino triturando en mortero el micelio fúngico liofilizado, añadiéndose buffer de lisis (1M Tris-HCl pH8, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl, SDS y 2- mercaptoetanol). A continuación se extrajo el ADN con fenol/cloroformo/isoamílico y cloroformo/isoamílico, se concentró con acetato de sodio 3M y etanol, realizándose lavados con etanol al 70% para purificar y eliminar posibles impurezas. Este ADN se sometió a una amplificación por PCR con los cebadores ITS4 e ITS5 que amplifican una región conservada del genoma fúngico. El ciclo de PCR utilizado fue el siguiente: 95°C durante 3 minutos; 30 ciclos de 56°C durante 30 segundos (temperatura de anillamiento), 72°C durante 2 minutos y 95°C durante 30 segundos, y finalmente a 72°C durante 10 minutos, conservándose posteriormente las muestras en el termociclador a 4°C hasta su recogida. Una vez comprobado por electroforesis (gel de agarosa al 1% en buffer TAE: 0.04M Tris-Acetato, 0.001M EDTA) el tamaño de banda amplificado, y la concentración de este ADN medido en un nanodrop "nd-1000" (Thermo Scientific, Wilmington, USA), se realizaron las diluciones oportunas y se enviaron las muestras a la Unidad de Genómica del SCAI de la Universidad de Córdoba, para su secuenciación. Definido el perfil, se estudió la secuencia con el programa "Chromas" y posteriormente se introdujo la secuencia en la base de datos "Blast" para encontrar porcentajes de similitud con otros organismos secuenciados e incluidos en esta base de datos. De esta forma y apoyado por los métodos de identificación tradicionales se determinó el género y especie de los aislados fúngicos obtenidos.

#### **Pruebas de patogenicidad**

Las pruebas de patogenicidad se realizaron sobre plantas de aguacate del cv. Topa-Topa de 18 meses de edad. A lo largo del tallo de las plantas se depositaron discos de micelio de cada hongo crecido en PDA, sellándose con parafilm, en 5 puntos a igual distancia entre sí, con una eliminación previa del tejido externo mediante un sacabocados de 5 mm de diámetro. Como control se usó discos de PDA sin micelio fúngico. Se utilizaron 5 repeticiones por aislado.

Las plantas se mantuvieron en invernadero a temperatura controlada  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se realizaron medidas de la lesión longitudinal necrótica cada 3 días durante un periodo total de 9 días. Pasado este tiempo se calculó el área bajo la curva del progreso epidémico estandarizado (ABCPEE).

#### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos del ABCPEE, se utilizó el programa "Statistix 9", realizando un análisis de la varianza completamente al azar. En caso de existir diferencias significativas las medias de los tratamientos se compararon utilizando el test de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) de Fisher en función de la significación ( $P < 0.05$ ) (Steel & Torrie, 1985).

**RESULTADOS****Obtención e identificación de aislados fúngicos**

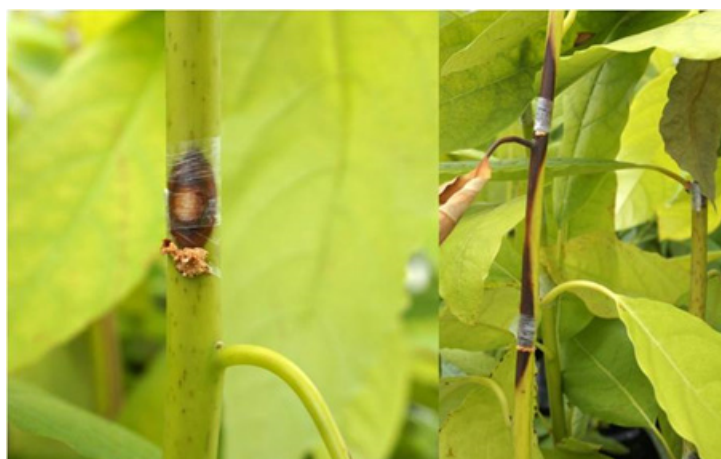
Se obtuvieron un total de 69 aislados, pertenecientes a 3 géneros distintos (*Neofusicoccum*, *Colletotrichum* y *Lasiodiplodia*) y 6 especies en distintos porcentajes: *N. parvum* (42%), *N. australe* (17%), *N. luteum* (15%) y *N. mediterraneum* (2%); así como *C. gloesporioides* (22%) y *L. theobromae* (2%) (Tabla 1).

**Tabla 1. Aislados fúngicos obtenidos**

Aislado	Especie	Aislado	Especie
NF130	<i>N. parvum</i>	NF159	<i>N. parvum</i>
NF132	<i>N. australe</i>	NF161	<i>N. parvum</i>
NF134	<i>N. parvum</i>	NF162	<i>N. luteum</i>
NF135	<i>N. parvum</i>	NF163	<i>N. parvum</i>
NF136 L1	<i>N. australe</i>	NF163 G	<i>N. parvum</i>
NF136 L2	<i>N. australe</i>	NF165	<i>N. luteum</i>
NF137	<i>C. gloesporioides</i>	NF167	<i>N. luteum</i>
NF142	<i>N. parvum</i>	NF168	<i>N. parvum</i>
NF143 L1	<i>N. parvum</i>	NF169 G	<i>N. luteum</i>
NF143 L2	<i>N. parvum</i>	NF169 P	<i>C. gloesporioides</i>
NF144	<i>N. parvum</i>	NF170	<i>N. australe</i>
NF146 C	<i>N. luteum</i>	NF170 P	<i>N. luteum</i>
NF146 L	<i>N. parvum</i>	NF171	<i>N. mediterraneum</i>
NF147 L1	<i>N. australe</i>	NF173	<i>N. australe</i>
NF147 L2	<i>C. gloesporioides</i>	NF174	<i>N. australe</i>
NF148 P	<i>C. gloesporioides</i>	NF178	<i>N. parvum</i>
NF148 G	<i>L. theobromae</i>	NF179	<i>N. parvum</i>
NF149	<i>N. luteum</i>	NF180 A	<i>N. parvum</i>
NF150 CA	<i>C. gloesporioides</i>	NF180 G	<i>N. parvum</i>
NF150 CB	<i>C. gloesporioides</i>	NF180 C	<i>C. gloesporioides</i>
NF151 G	<i>N. parvum</i>	NF181	<i>N. parvum</i>
NF151 C	<i>C. gloesporioides</i>	NF182	<i>N. parvum</i>
NF151 L	<i>C. gloesporioides</i>	NF183	<i>N. parvum</i>
NF152 G	<i>N. parvum</i>	NF184 A	<i>N. luteum</i>
NF152 L	<i>C. gloesporioides</i>	NF184 C	<i>N. luteum</i>
NF152 P	<i>N. parvum</i>	NF186	<i>C. gloesporioides</i>
NF153 CA	<i>N. parvum</i>	NF187-1	<i>C. gloesporioides</i>
NF153 CB	<i>N. parvum</i>	NF187-2	<i>N. australe</i>
NF153 G	<i>N. parvum</i>	NF189	<i>N. parvum</i>
NF155	<i>N. luteum</i>	NF190	<i>N. luteum</i>
NF156 CA	<i>N. parvum</i>	NF191	<i>N. parvum</i>
NF156 CB	<i>N. parvum</i>	NF192	<i>N. parvum</i>
NF156 G	<i>N. parvum</i>	NF193	<i>N. australe</i>
NF157	<i>N. parvum</i>	NF194	<i>N. parvum</i>

**Pruebas de patogenicidad**

Se observó un avance de las lesiones necróticas en las plantas de aguacate (Fig. 2), existiendo grandes diferencias en la velocidad de crecimiento de aquellas según los aislados inoculados.



**Figura 2. Avance de la enfermedad en inoculaciones artificiales**

Se analizó la patogenicidad de los aislados a nivel de género ( $F=24.54$ ;  $df=2, 342$ ;  $P<0.05$ ), resultando *Neofusicoccum* el género más virulento significativamente distinto a los géneros *Colletotrichum* y *Lasiodiplodia*, entre los cuales no existieron diferencias significativas. Asimismo se analizó la patogenicidad de los aislados a nivel de especie dentro del género *Neofusicoccum* ( $F=20.03$ ;  $df=3, 276$ ;  $P<0.05$ ), resultando *N. parvum* la especie más virulenta significativamente distinta a las especies *N. australe*, *N. mediterraneum* y *N. luteum*, entre las cuales no existieron diferencias significativas. Finalmente se analizó la patogenicidad de todos los aislados a nivel de especie ( $F=26.33$ ;  $df=5, 339$ ;  $P<0.05$ ), determinándose en orden decreciente de virulencia: *N. parvum*, *N. luteum*, *N. mediterraneum*, *N. australe*, *C. gloesporioides* y *L. theobromae*, y existiendo diferencias significativas entre *N. parvum* y el resto de especies, y entre *N. luteum* y *C. gloesporioides*.

Dentro de aquellas especies con más de un representante se establecieron diferentes grupos de virulencia, obteniéndose 10 para *N. parvum*, 3 para *N. australe*, 6 para *N. luteum*, y 5 para *C. gloesporioides* (Tabla 2).

**Tabla 2. Grupos de virulencia para aislados de *N. parvum*, *N. australe*, *N. luteum* y *C. gloesporioides***

<i>N. parvum</i>	ABCPEEa		<i>N. australe</i>	ABCPEE	
NF146 L	3.5540b	a	NF187-2	1.2620	a
NF168	3.0240	ab	NF136 L1	1.1440	ab
NF134	3.0140	ab	NF170	0.7480	abc
NF143 L2	2.9600	ab	NF147 L1	0.6780	bc
NF156 CB	2.9000	ab	NF132	0.6700	bc
NF153 G	2.4100	bc	NF174	0.6560	bc
NF135	2.3500	bcd	NF136 L2	0.6300	bc
NF153 CB	2.3240	bcd	NF173	0.2320	c
NF 189	2.3040	bcd			
NF157 PB	2.2280	bcde	<i>N. luteum</i>	ABCPEE	
NF143 L1	2.1800	bcdef	NF155	1.8540	a
NF156 G	2.1080	bcdefg	NF146 C	1.4860	ab
NF161	1.8660	cdefgh	NF167	1.0860	bc
NF156 CA	1.7900	cdefgh	NF184 T-1	0.9260	cd
NF163	1.6760	cdefghi	NF149	0.8600	cde
NF144	1.6420	cdefghi	NF170 P	0.7680	cdef
NF157 PA	1.6320	cdefghi	NF162	0.7580	cdef
NF153 CA	1.5280	cdefghij	NF169 G	0.6580	cdef
NF163 G	1.4280	cdefghij	NF165	0.6060	def
NF183	1.3980	cdefghij	NF184 C	0.4600	ef
NF130	1.3580	defghij	NF190	0.3640	f
NF182	1.3420	defghij	NF193	0.3480	f
NF191	1.2680	efghij			
NF159	1.2600	efghij	<i>C. gloesporioides</i>	ABCPEE	
NF151 G	1.2100	fghij	NF150 CA	0.8160	a
NF152 G	1.1380	ghij	NF137	0.7240	ab

NF179	1.1160	ghij		NF150 CB	0.6740	abc
NF142	0.9880	hij		NF186	0.5160	bcd
NF152 P	0.8780	hij		NF151 C	0.4940	bcd
NF180 G	0.7500	ij		NF147 L-2	0.4660	cd
NF180 A	0.7320	ij		NF152 L	0.4200	de
NF194	0.6700	ij		NF151 L	0.3900	de
NF178	0.5860	j		NF148 P	0.3820	de
NF181	0.5800	j		NF180 C	0.3460	de
NF192	0.5260	j		NF187-1	0.2860	de
				NF169 P	0.1880	e

a ABCPEE: área bajo la curva del progreso epidémico estandarizado evaluada por desarrollo de la lesión necrótica longitudinal en el tallo de las plantas durante 9 días.

b Los datos son la media de 5 repeticiones, cuyos valores se compararon utilizando el test MDS de Fisher en función de la significación ( $P < 0.05$ ) (Steel y Torrie, 1985). En cada columna, números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con el test MDS.

## DISCUSIÓN

Este estudio muestra la alta incidencia y diversidad de aislados asociados a la muerte regresiva de ramas de aguacate en plantaciones comerciales en el sur de España. Este complejo incluye distintos géneros (*Neofusicoccum*, *Colletotrichum* y *Lasiodiplodia*) y especies (*N. parvum*, *N. luteum*, *N. mediterraneum*, *N. australe*, *C. gloesporioides* y *L. theobromae*).

*N. parvum* es la especie más abundante, aislada con una incidencia del 42%, seguida de *C. gloesporioides* con un 22%, *N. australe* y *N. luteum*, con unas incidencia del 17% y 15% respectivamente y finalmente *N. mediterraneum* y *L. theobromae* aparecen sólo ocasionalmente con una incidencia de un 2% cada una.

La presencia de *N. parvum*, *N. australe* y *N. luteum* asociada a la muerte regresiva de aguacate ha sido descrita y estudiada en California (McDonalds *et al.*, 2009). *N. parvum* y *N. australe* han sido descritos en España asociado al cultivo del almendro (Gramaje *et al.*, 2012), obteniéndose, de igual forma que en nuestro estudio, una mayor incidencia de *N. parvum*, y siendo igualmente *N. australe* un patógeno importante. *L. theobromae* ha sido descrito como agente causal de la muerte regresiva en aguacate en Perú (Alama *et al.*, 2006).

*N. luteum* fue identificado en California como el principal hongo responsable de la podredumbre terminal del pedúnculo en frutos (65%), seguido por *C. gloesporioides* con un 35% de incidencia (Twizeyimana *et al.*, 2013). Así pues estos hongos detectados en España en chancros de ramas de aguacate podrían afectar directamente al fruto causando mermas en la producción.

## CONCLUSIONES

Se trata del primer estudio de chancros de ramas de aguacate en el Sur de España, evaluándose los agentes causales y estableciéndose los grupos de virulencia para las especies más abundantes *N. parvum*, *N. luteum*, *N. australe* y *C. gloesporioides*, y siendo *N. parvum* el agente causal más importante de la muerte regresiva de ramas de aguacate en este área.

## LITERATURA CITADA

- Alama I, Maldonado E y Rodríguez-Galvéz E. 2006. *Lasiodiplodia theobromae* afectando al cultivo del palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalia* Vol. 11, pp. 4-13.
- Choi G H, Larson T G y Nuss D L. 1992. Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain. *Plant-Microbe Interactions* Vol. 5, pp. 199-128.
- Gramaje D, Agustí-Brisach C, Pérez-Sierra A, Moralejo E, Olmo D, Mostert L, Damm U y Armengol J. 2012. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia* Vol. 28, pp. 1-13.
- McDonalds V, Lynch S y Eskalen A. 2009. First Report of *Neofusicoccum australe*, *N. luteum*, and *N. parvum* Associated With Avocado Branch Canker in California. *Disease Notes* Vol. 93, p. 967.
- Molina-Gayosso E, Silva-Rojas H V y García-Morales S. 2012. First Report of Black Spots on Avocado Fruit Caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. *Disease Notes* Vol. 96, p. 287.
- Steel R G D & Torrie J H. 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*, McGraw-Hill, Interamericana de México.
- Twizeyimana M, Förster H, McDonald V, Wang D H, Adaskaveg J E y Eskalen A. 2006. Identification and Pathogenicity of Fungal Pathogens Associated with Stem-End Rot of Avocado in California. *Plant Disease* Vol. 97, pp. 1580-1584.





# ACTAS • PROCEEDINGS

## VIII CONGRESO MUNDIAL DE LA PALTA 2015

del 13 al 18 de Septiembre. Lima, Perú 2015

[www.wacperu2015.com](http://www.wacperu2015.com)

