

12.1 Identificación de Hongos Fitopatógenos en cultivos de Terceira, Azores

Prendes, C. ⁽¹⁾; Lorenzo, CD.; Melo, C. ⁽²⁾; Cabrera, R. ⁽¹⁾; Giménez, C. ⁽¹⁾ & Lopes, D.J.H. ⁽²⁾

(1) U.D.I. Fitopatología. Facultad de Biología. Universidad de La Laguna, Avda. Francisco Sánchez s.n. 38206. La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España, Tfno: (+34)922318347, Fax: (+34)922318347, e-mail: clorenzo@ull.es

(2) Dep. de Ciencias Agrarias. Centro de Biotecnología. Sección de Protección de Plantas. Universidad de Açores. 9701-851, Angra do Heroísmo, Terceira, Azores, Portugal.

12.1.1 Introducción

Uno de los principales problemas que se plantean a la hora de trabajar con los hongos, es la identificación de los mismos. La clasificación morfológica de los hongos se realiza a partir del estudio de las estructuras reproductoras y de las hifas, crecimiento del micelio, tamaño y ornamentación de las esporas, etc. Sin embargo, en ocasiones estos criterios no son suficientes para diferenciar especies de hongos con características similares entre sí, a lo que hay que sumar el hecho de que algunos organismos fúngicos no dan lugar a estructuras reproductoras utilizadas habitualmente para su identificación.

En este aspecto, los avances en biología molecular en general, y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en particular, han facilitado enormemente el análisis de microorganismos, aportando una capacidad superior para caracterizar y clasificar cepas y facilitar el estudio de la diversidad genética de poblaciones (Malvárez, 2001). La técnica de la PCR se dio a conocer en el año 1983, y se basa en la síntesis "in vitro" de millones de copias de determinadas secuencias específicas de DNA. El factor clave de la aplicación de la técnica de PCR para la caracterización de microorganismos, hongos en este caso, es la determinación de oligonucleótidos iniciadores (primers) específicos para la identificación de los límites del sitio a amplificar. Usando primers adecuados, pueden ser estudiados diferentes aspectos en diferentes niveles taxonómicos (Malvárez, 2001).

La zona más idónea del genoma fúngico para realizar

estudios a nivel molecular debe presentar una serie de características: tiene que estar presente en todos los hongos, ser fácilmente amplificada y además poseer regiones variables que permitan diferenciar los organismos a niveles taxonómicos tales como variedades, especies o géneros. De ahí que la mayor parte de los estudios filogenéticos y de identificación molecular se hayan centrado en el estudio de los genes que codifican para el RNA ribosómico (DNAr), ya que poseen regiones de secuencia conservada así como regiones con diferente grado de variación (Turenne, 1999; Arenal, 2000).

12.1.2 Material y Métodos

12.1.2.1 Recolección y tratamiento de las muestras

La recogida de muestras para la determinación del agente causal deberá ser representativa de los síntomas observados en el campo. Si, por ejemplo, con lo que nos encontramos es un cáncer, bastará con recoger trozos que contengan parte enferma y parte sana. Si los síntomas apuntan a una necrosis vascular, un trozo de tallo con los vasos necrosados será suficiente, por norma general. Recomendaciones análogas sirven para la recolección de hojas y ramas enfermas. (Tello *et al.* 1.991). Cada muestra se coloca en una bolsa de plástico desinfectada y etiquetada. En las etiquetas se ponen los datos identificativos, tanto de la muestra como de la planta y del cultivo, así como la fecha

de recolección y todos aquellos datos que se consideren importantes para hacer un seguimiento, lo mas completo posible de cada planta si así fuera necesario. En el laboratorio se seleccionan las muestras cortando pequeños trozos que contengan parte enferma y parte sana, para luego, previa desinfección, seguir dos caminos para su identificación: una parte se empleará para su estudio morfológico y otra parte para se analizará por PCR (ampliación y secuenciación).

I. Estudio Morfológico.

Las muestras seleccionadas son sembradas en cámaras húmedas y en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) para que se desarrollen los hongos presentes en ellas.

Antes de poner el material vegetal en medio de cultivo hay que realizar un tratamiento adecuado del mismo, siguiendo dos caminos:

1. Parte de las muestras son sembradas llevando a cabo un lavado previo con agua destilada estéril, para eliminar los restos extraños sin alterar la micoflora asociada a la superficie foliar.
2. Otra parte es tratada con productos desinfectantes que eliminan determinados hongos no deseados, de crecimiento rápido, dejando manifestarse a otros. Los productos empleados son los siguientes:
 - * Etanol al 70%, con un tiempo de tratamiento de 1 a 5 minutos y dos aclarados posteriores en agua destilada estéril de 3 minutos de duración para rehidratar los tejidos tratados con etanol.
 - * Lejía comercial al 10% en tratamiento de 1 a 3 minutos seguido de tres aclareos con agua destilada estéril de 10 minutos cada uno.

I.a.- Siembra de las Muestras

Tras el tratamiento previo de las muestras, la siembra del material vegetal puede efectuarse de dos maneras:

1. Siembra en cámara húmeda:

Para favorecer el crecimiento del hongo empleamos cámaras húmedas mediante placas Petri estériles, en cuyo interior colocamos papel de filtro. A continuación, humedecemos el papel de filtro con agua destilada esterilizada para alcanzar una humedad del 100% y colocamos el material seleccionado. Todo el proceso se realiza en la cámara de flujo laminar.

2. Siembra en medios de cultivo:

Se ha utilizado PDA (Papa Dextrosa Agar) para la siembra del material vegetal, aplicando 10 ml de medio en cada placa Petri. En la cámara de flujo laminar los trozos de material vegetal, previamente desinfectados, se siembran en la placa.

I.b.- Cultivos Puros

Las condiciones de humedad creadas en el interior de las placas, así como las temperaturas apropiadas, favorecen el desarrollo de los hongos presentes en las porciones de material, al cabo de 3 ó 4 días aproximadamente.

El aislamiento de hongos, para obtener cultivo puro, se lleva a cabo repicando, en placas Petri con medio de cultivo PDA, pequeñas porciones de micelio procedente de los hongos desarrollados a partir del material de siembra. También este procedimiento se realiza en cámara de flujo laminar bajo condiciones de rigurosa asepsia.

I.c.- Determinación y Descripción del Hongo Aislado

Tras la incubación del hongo, se procede a su determinación y descripción de la siguiente manera:

1. Descripción morfológica y medición de sus estructuras en el microscopio óptico, conjuntamente con la realización de microfotografías.
2. Búsqueda bibliográfica.
3. Establecimiento de una micoteca con los hongos hallados para posteriores estudios.

Para la determinación de los hongos se han empleado las fuentes bibliográficas adecuadas en cada caso (Von Arx,

1987; Ellis, 1993; Goidànich 1994; Lanier, 1978; Watanabe, 2.002), utilizando, cuando es posible, trabajos monográficos de los géneros en estudio (Booth, 1977, Guba, 1961).

II. Análisis por PCR (Amplificación y Secuenciación)

La identificación de los organismos fúngicos mediante la técnica de la PCR se llevó a cabo a través de dos vías: por un lado, a partir de los aislados crecidos en placas con medio de cultivo PDA y por otro a partir del propio material vegetal. El protocolo seguido para la extracción del DNA en ambos casos fue el establecido por el fabricante sigma-aldrich empleando el kit de extracción REExtract-N-AmpTM Plant PCR Kit: se colocaron discos de material vegetal de aproximadamente 0.5-0.7 cm o bien una pequeña cantidad del micelio fúngico a estudiar en un eppendorf de 1,5ml. Se añaden 100 µl de la solución de extracción y se agita en el vortex durante unos segundos. Posteriormente los eppendorf se incuban a 95°C durante 10 min (baño seco). Luego se añaden 100 µl de la solución de dilución y se agitan en el vortex de nuevo. Si la muestra no va a ser procesada de inmediato es necesario conservarla a 2-8°C hasta el momento de su utilización.

Una vez extraído el DNA, se procedió a su amplificación. Se tomaron 4ul de la solución de DNA y se depositaron en un eppendorf de 200ul, al cual se le añadieron 16ul de la siguiente mezcla: agua PCR (5,2ul/muestra), Red extract (10ul/muestra), Primers (0,4ul/muestra).

El reactivo Red extract pertenece al kit completo de extracción REExtract-N-AmpTM Plant PCR Kit citado anteriormente, y contiene la mezcla de buffer, sales, dNTPs y Taq polimerasa necesarios para que tenga lugar la amplificación.

Para la amplificación del DNA extraído directamente del micelio fúngico se empleó la pareja de primers generales ITS1-ITS4, mientras que para amplificar el DNA extraído directamente del material vegetal se emplearon, además de los primers generales, parejas de primer diseñados específicamente

para detectar aquellas especies patógenas que se suponían causantes de la sintomatología observada.

Las muestras analizadas fueron amplificadas y posteriormente los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% con tampón TBE 1x. Como indicador de tamaño molecular se utilizó el marcador de 50-2000 pb. Tras la tinción de los geles en una solución de bromuro de etidio 1:10000, éstos se visualizaron y fotografiaron. Aquellas muestras que presentaban una señal de amplificación clara fueron purificadas utilizando el kit de purificación GenElute™ PCR Clean-Up Kit. Una vez purificadas, se mandaron a secuenciar y posteriormente, las secuencias de los distintos organismos endófitos se contrastaron con las almacenadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), identificando así los hongos a nivel de especie en la mayor parte de los casos.

12.1.3 Resultados

Se han obtenido, mediante los métodos descritos, los siguientes hongos, en cada uno de los cultivos estudiados

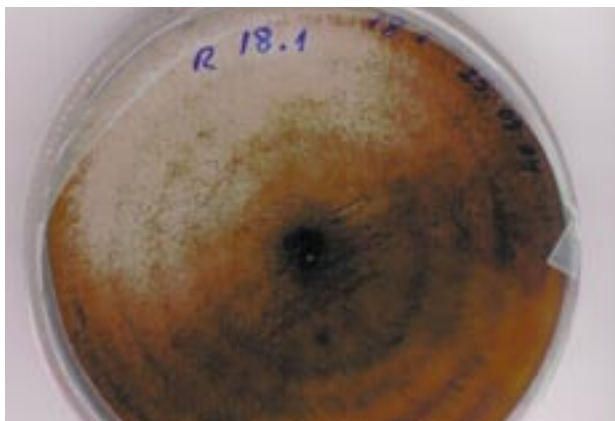
Platanera

Alternaria alternata (Fr.:Fr.) Keissler, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. In Penz, *Colletotrichum musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f.sp. *cubense* (E.F.Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hans, *Pestalotia leprogena* Speg., *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweb. & Hochapfel, *Phoma musaecola* Tassi, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Verticillium teobromae* (Tureoni) E. Mason & S.J. Hughers

Manzanero

Alternaria mali Roberts, *Aspergillum* sp, *Botryosphaeria lutea* A.J.L. Phillips, *Botryosphaeria ribis* Gross. & Duggar, *Phoma glomerata* (Corda) Woll., *Rhizoctonia solani* Kühn., *Verticillium* sp.

Fig. 12.1



Melocotonero

Alternaria alternata (Fr.:Fr.) Keissler, *Fusarium lateritium* Nees, *Pestalotia gracilis* Kleb.

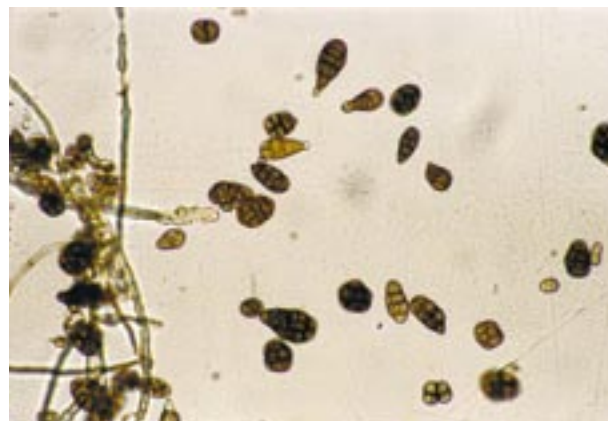
Naranja

Alternaria citri Ellis & Pierce apud Pierce, *Botryosphaeria ribis* Gross. & Duggar, *Cephalosporium* sp, *Colletotrychum gloeosporioides* (Penz). Penz. & Sacc. In Penz, *Phytophthora* sp

Alternaria

Este género incluye gran cantidad de especies patógenas de plantas, en muchos casos con hospedadores específicos. Las colonias son efusas, generalmente de color gris, marrón oscuro o negro. El micelio se encuentra inmerso total o parcialmente en el sustrato y las hifas son coloreadas, de color marrón oliváceo o marrón claro. Los conidióforos presentan una gran diferencia con las hifas vegetativas, formando ramificaciones simples o irregulares de color marrón claro. Los conidios se forman solos o en cadenas acrópetas. Consisten en un cuerpo ovoide o elipsoidal con una base claramente redondeada, con varios septos transversales y unos pocos septos longitudinales. Los conidios terminan en un cuello de longitud variable. Su coloración va de marrón claro a oscuro. (Ellis, 1993).

Fig. 12.2



Alternaria alternata (Fr.:Fr.) Keissler

Presenta hifas tabicadas y coloreadas, en las que se desarrollan los conidióforos. Estos conidióforos surgen solitarios o en grupos pequeños, simples o ramificados, rectos o flexuosos, a veces geniculados; son de color oliváceo pálido a medio, o marrón dorado, de longitud superior a 50 µm, y de 3 a 6 µm de grosor. Tiene una o varias cicatrices conidiales. Los conidios crecen de forma acrópeta dando lugar a largas cadenas, frecuentemente superior a 10, que pueden ser simples o ramificadas (Ellis, 1993). Estos son de color marrón pálido, por lo que las colonias en placas petri adquieren un color oscuro (fig. 12.1), de forma muy variada, desde ovoides a piriformes, pero siempre presentan un cuello, de un grosor entre 2 y 5 µm, de forma cónica o cilíndrica, que no excede de la tercera parte de la longitud del conidio, de 3-8 septos transversales y generalmente 1-2 septos longitudinales (fig 12.2), y paredes que pueden ser lisas o ligeramente rugosas. Se han descrito podredumbres en cítricos, manzanas y peras; clorosis en hojas jóvenes de manzanas, albinismo en semillas de cítricos y otras plantas, diversas alteraciones foliares en plantas ornamentales, etc.

Alternaria citri Ellis & Pierce apud Pierce

Colonias difusas, de oliváceas a negras. Conidióforos simples

o ramificados, rectos o flexuosos, septado, de color marrón claro o marrón oliváceo. Conidios solitarios o en cadenas cortas (2-7), recto o ligeramente curvados, forma variada pero comúnmente oclavada u oval, de color que va desde meloso a marrón oscuro u oliváceo, lisos o verrucosos, con mas de 8 septos transversales y numerosos oblicuos o transversales. (Ellis, 1.993). Produce la mancha parda de los cítricos. Se ha encontrado actuando conjuntamente con *Colletotrichum gloeosporioides*. Las reseñas bibliográficas señalan la existencia de sinergismo entre los dos hongos aislados, siendo el agente primario de la enfermedad *A. citri*, actuando *C. gloeosporioides* como organismo secundario ya que interviene indirectamente en el proceso infectivo, es decir, se comporta como un hongo saprofito. *A. citri*, también causa la podredumbre negra del fruto. El hongo penetra por la cicatriz estilar y provoca en el interior de ésta una podredumbre seca de evolución lenta que después de la recolección se produce un oscurecimiento del eje central.

***Alternaria mali* Robers**

Hifas de hialinas a gris oscuro o verde oliva oscuro. Conidios de color verde oliva oscuro o pardo negruzcos, oclavados, ovalados o redondeados, formando largas cadenas. Tabiques externos generalmente lisos y, a veces, verrugosos. Pico muy corto o carecen de él. Produce toxinas (AM) específicas de sus hospederos. Causa la podredumbre en los manzanos. (Jones y Aldwinckle, 2002)

Aspergillus

Este género es fácilmente reconocible por la presencia de conidióforos erectos que terminan en una vesícula a modo de "cabeza", sobre la que se desarrollan directamente las células conidiógenas (fiálides) en empalizada, o una capa de células que portan las fiálides (estructura biseriada). Las colonias son de crecimiento muy rápido y aspecto pulverulento, de coloración variada, aunque generalmente verde y a veces oscuras, marrones o negras. El micelio se

desarrolla parcialmente inmerso o superficial en el sustrato, sin formar estroma.

Las especies de *Aspergillus* han sido descritas sobre muchos cultivos, generalmente como patógenos secundarios, ocasionando pudriciones de postcosecha. Se consideran hongos saprofitos, aunque también han sido nombrados como causantes primarios de pudriciones en semillas almacenadas. Son frecuentemente aislados de semillas, especialmente en cereales, que presentan una reducción en la geminación. Los síntomas que presenta el material vegetal afectado por las especies de este género son pudriciones blandas en la epidermis, en las que aparece el micelio del hongo.

Botryosphaeria

Saprófito, ocasionalmente parásito causando canceres. Micelio inmerso, ocasionalmente puede ser superficial, pigmentado, formando un pseudoestroma, a menudo estroma rompiente formado por células angulosas. Ascoma separado o gregario, a menudo botrioso, esférico u oval, no ostiolado, al madurar abre por el ápice. Ascas, claviformes, bitunicadas. (von Arx, 1.987).

***Botryosphaeria lutea* A.J.L. Phillips**

Anamorfo *Fusicoccum luteum* Pennycook & Samuels. Ascocarpo indistinguible de *B. dothidea*. Estroma inicialmente inmerso, posteriormente irrumpe a través del tejido del hospedero. Seudotecio con cuello corto que abre a través de un ostiolo. Ascas bitunicadas, cilíndricas, clavadas, estipitadas con 8 ascosporas, asociadas conseudoparafisis filamentosas. Ascosporas biseriadas irregularmente, hialinas, gutuladas, lisas, aseptadas, oval, fusiformes.

***Botryosphaeria ribis* Gross. & Duggar**

Anamorfo: *Fusicoccum ribis* Slippers, Crous, M.J. Wingf. Patógeno débil que causa chancros en muchas plantas leñosas. El ascocarpo irrumpe a través de los tejidos del hospedero, globoso con ostiolo central, paipado o no, marrón o

negro. Ascas bitunicadas, 8 ascosporas, clavadas, formadas entre pseudoparáfisis septadas filiformes. Ascosporas, unicelulares hialinas, de superfície lisa, fusoides o elipsoides, arredondadas nos extremos. En Azores, hemos encontrado ambas especies conjuntamente, sobre manzano, produciendo la podredumbre blanca, enfermedad de la que se considera que el agente causal primario es *B. dothidea*.

Cephalosporium

Conidióforo cilíndrico, llevando en el extremo pequeños conidios unicelulares, ovoides, hialinos, reunidos en glomérulos apicales. Comprende especies saprófitas o hemiparásitas que viven sobre semillas y frutos y que cuando germinan las semillas se activa su capacidad parasitaria. (Goidànich, 1.994). Son responsables de antracnosis.

Colletotrichum

Las especies de este género ocasionan antracnosis en muchas plantas de cultivo. Estas son bastante comunes y destructivas, y bastante similares a las producidas por *Glomerella*. Este último género quizá sea la fase sexual de la mayoría de las especies de *Colletotrichum*. El hongo produce conidios unicelulares, incoloros, ovoides, cilíndricos y en ocasiones encorvados, en acérvulos. Las masas conidiales son de color salmón o rosa. Los acérvulos son subepidérmicos y brotan a través de la superficie de los tejidos de la planta; tienen forma de disco, y son de aspecto ceroso, con conidióforos simples, cortos y erectos. *Colletotrichum* difiere de *Gloeosporium* por el hecho de que sus acérvulos tienen espinas largas y oscuras o hifas estériles en forma de filamento, las cuales no aparecen en los acérvulos de *Gloeosporium*. Sin embargo esto no siempre sucede, de ahí que la distinción que se hace entre ambos géneros con frecuencia sea imposible y se les considere como un mismo hongo.

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. In Penz
Es un patógeno secundario para la platanera. Produce antracnosis. Las colonias en PDA son de color gris claro a gris oscuro. Su teleomorfo es *Glomerella cingulata*.

Colletotrichum musae (Berk. & M.A. Curtis) Arx,
Patógeno común en los frutos de la platanera, causante de antracnosis.

Fusarium

La mayoría de las especies de *Fusarium* son hongos de suelo con distribución cosmopolita; son activos descomponedores de restos vegetales. Algunas especies son parásitas de plantas, y otras son patógenos específicos. Este género es uno de los que produce mayor efecto negativo sobre la economía agrícola-ornamental-forestal. Las especies de este género son responsables de muchas enfermedades como marchitamientos vasculares, podredumbres radiculares y de tallos, podredumbre de frutos en general, alteraciones cromógenas de maderas, etc., y atacan al vegetal en cualquier momento de su ciclo evolutivo. Se caracterizan por un rápido crecimiento. Las colonias suelen ser pálidas o de colores brillantes, con micelio aéreo algodonoso. En algunas especies los conidióforos consisten en fálides simples, en otras, en pústulas complejas denominadas esporodoquios.

Fusarium produce típicamente dos tipos de conidios: Los macroconidios son estructuras largas, septadas, en forma de media luna o de canoa. Los microconidios suelen ser de forma esférica u ovalada, y están formados por una o dos células. Es también frecuente encontrar conidios que parecen intermedios entre los anteriores. Las clamidosporas pueden ser terminales o intercalares, simples y compuestas, solitarias, apareadas o en racimos. La superficie puede ser lisa o verrucosa, y son de forma variada: globosa, elíptica, etc., pero por lo general de forma redondeada; son características de algunas especies.

Fig. 12.3



Fig. 12.4

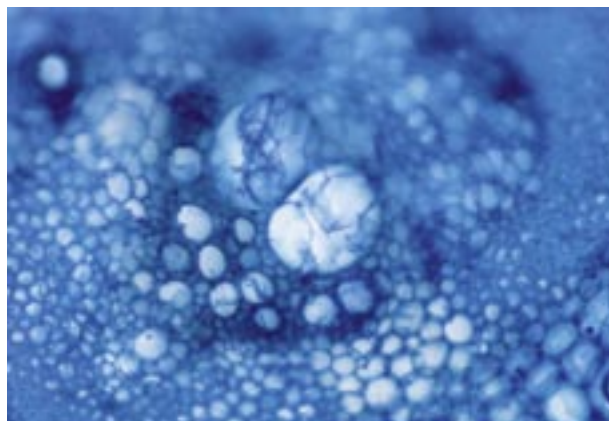


Fig. 12.5

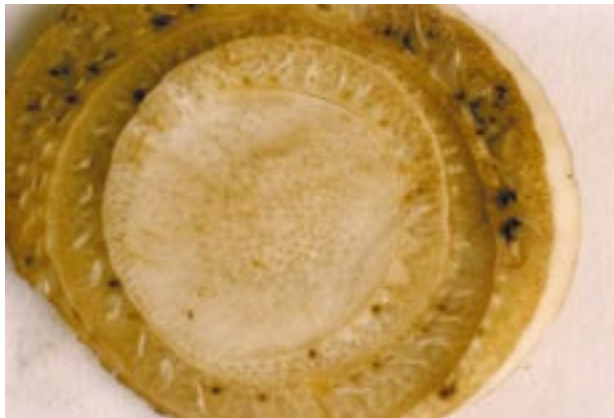
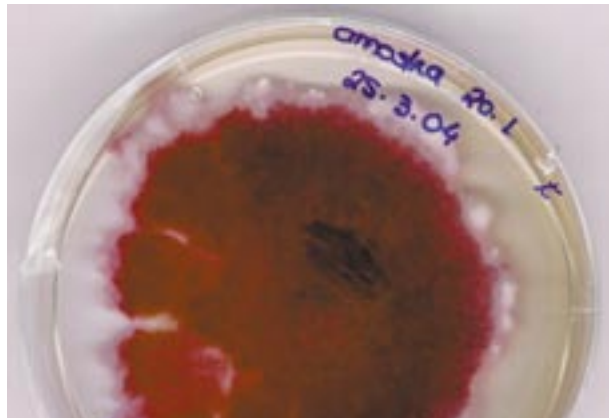


Fig. 12.6



***Fusarium lateritium* Nees**

Colonia bien desarrollada con micelio aéreo casi siempre abundante; aspecto algodonoso, a veces decumbente, blanco, rosado, amarillo, ocre, anaranjado, violáceo, azul verdoso. El sustrato es de color variable: amarillo, castaño, marrón, salmón, púrpura, rosa. Hay formación de un estroma esclerocial de color azul. Microconidios por lo general poco abundantes o escasos, 0-1 tabicados, y de forma variable: elipsoidales, fusiformes, ovales, piriformes, forma de coma.

Los macroconidios se forman sobre el micelio; forman esporodocios típicos gregarios. Son dorsiventrals, subrectilíneos, con curvatura dorsal suave y de diámetro más o menos uniforme. Tienen el ápice constreñido, a veces con una ligera curvatura a modo de garfio, más pronunciada que en la parte media. La base está bien pedicelada, y los tabiques y las paredes son más bien finas. Tienen entre 3 y 7 septos, abundando más los de 3 y 4 tabiques. Los síntomas observados se caracterizan por la presencia de canchros que

se presentaban preferentemente en ramillas de crecimiento del año anterior, así como también en madera más vieja. Los canchros se iniciaban a partir de las heridas producidas por la poda. Lo hemos encontrado actuando en melocotonero.

Fusarium oxysporum Schlechtend.: Fr. f.sp. **cubense** (E.F.Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hans,

Esta es la forma especializada de *Fusarium* que ataca a la platanera, causándole la enfermedad llamada "Mal de Panamá" que es letal para la platanera. Los síntomas se inician con un amarillamiento anormal en las hojas más viejas empezando por los bordes (fig.12.3). Al poco tiempo las hojas se doblan en la base de los pecíolos y se secan, quedando colgadas de las plantas. Posteriormente en las hojas jóvenes sucede lo mismo.

El patógeno se encuentra en el suelo, por lo que la infección tiene lugar a través de las raíces. El ataque se ve facilitado por heridas producidas en las mismas, bien debidas a la formación de raíces secundarias, bien por picaduras de nematodos o insectos. El hongo se instala en el xilema (fig.12.4) y la enfermedad va progresando de abajo hacia arriba. Cuando se hace un corte transversal del pseudotallo se aprecia el oscurecimiento de los vasos conductores (fig.12.5), lo que el agricultor conoce como "veteado". En cultivo puro (fig.12.6) las colonias de este hongo son de color blanquecino o incluso rojo brillante. Producen dos tipos de esporas (microconidios unicelulares, y macroconidios pluricelulares). Se han descrito 4 razas de este hongo, que afectan a distintos cultivares de plataneras en diferentes zonas del mundo.

Pestalotia

Acérvulos negruzcos, subepidérmicos. Conidios alargados, fusiformes, pluricelulares, típicamente oscuros en la parte central e hialinos en los extremos, provistos pedicelos y apéndices apicales (sétulas) hialinos (normalmente de 2-4). (Goidànich, 1.994). Son parásitos débiles o saprófitos. Pueden producir antracnosis.

Pestalotia gracilis Kleb.

Conidios con cinco células, fusiformes ligeramente curvados. Las dos células coloreadas superiores son más oscuras que la inferior, de coloración olivácea. La célula basal hialina, de forma cónica. La célula apical, hialina, cónica o cilíndrica, con 2-4, usualmente 3, sétulas muy divergentes. Pedicelo erecto (Guba, 1961).

Pestalotia leprogena Speg.

Se encuentra sobre platanera. Los cultivos puros presentan una coloración blanquecina (fig. 12.7). Conidios con 5 células, clavados, elíptico-fusiformes, curva o de lados desiguales. Las células intermedias coloreadas. Las dos superiores usualmente fuliginosas, engrosadas, opacas. La tercera, olivácea. Las células exteriores hialinas, cónicas, la basal con margen agudo. 3 sétulas (Guba, 1961) (fig.12.8).

Phoma

Las especies de este género presentan un micelio inmerso y ramificado, septado, hialino o pálido. La estructura reproductora es un picnidio, que puede ser inmerso o casi inmerso, marrón, globoso, que puede presentarse aislado o agregado y las paredes delgadas. Las células que lo conforman son de color marrón pálido y son de forma angular. Puede presentar varios ostiolos, generalmente no papilados. Los conidióforos no están presentes. Los conidios son hialinos, aseptados, de paredes finas frecuentemente gutulados y de forma elipsoidal, fusiforme, piriforme o globosa. La mayoría de las especies del género *Phoma* son saprófitas, tan sólo algunas son patógenas. Estas causan necrosis, podredumbres secas y "dumping off" (Arx Von, 1987). Las especies más comunes aparecen sobre hojas y tallo. Los hospedadores son numerosos.

Phoma glomerata. (Corda) Wollenweb. & Hochapfel (fig.12.9 y fig 12.10)

Picnidio globoso o subgloboso, marrón oscuro, ostiolo conspicuo, peridio marrón oscuro, pseudoparenquimatoso.

Fig. 12.7

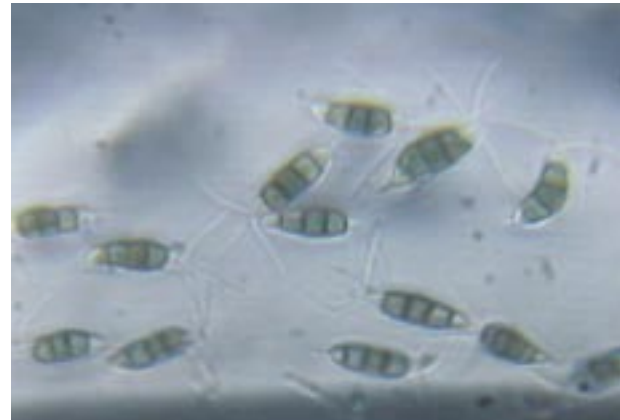


Fig. 12.8

Fig. 12.9

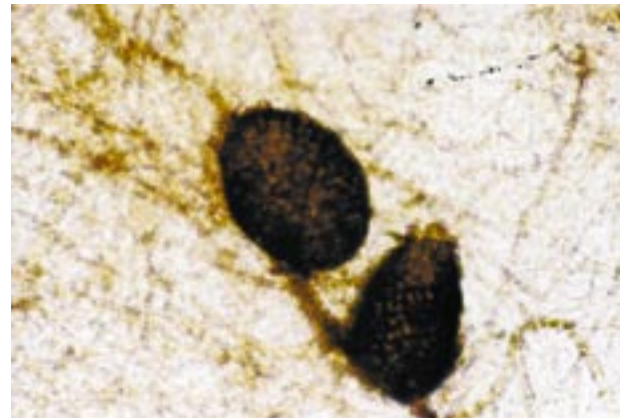
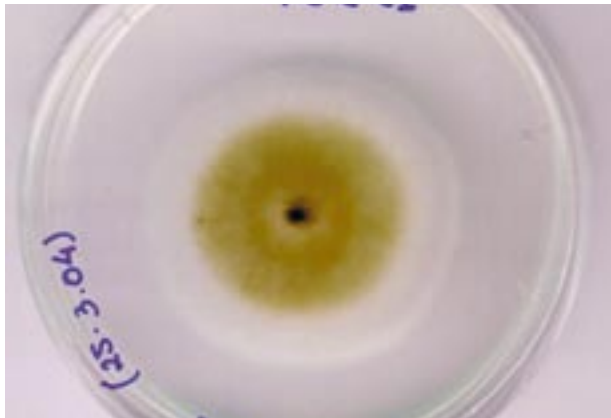


Fig. 12.10

Conidios hialinos, elipsoidales, unicelulares. Clamidospora marrón oscura, subglobosa, muriforme con septos transversales y longitudinales, bastante irregulares. (Watanabe, 2002). Encontrada en hojas de platanera.

Phoma musaecola Tassi (fig.12.11 y 12.12)
Actúa sobre las hojas de platanera.

Phytophthora

Parásito, actúa sobre todas las partes de la planta, esporangios esféricos, ovales, o elipsoides, zoosporas formadas en el esporangio, biflageladas; oogonio usualmente inmerso en el tejido del hospedero, de pared gruesa, lisa, conteniendo oospora plerótica o aplerótica, ocasionalmente ausente o desconocida, anteridio anfigino o paragino. (von Arx 1.987). Se aisló en naranjeros. Causa gomosis, podredumbres de pie y cuello y podredumbre parda de los cítricos.

Fig. 12.11



Rizoctonia

Organismo de suelo que produce enfermedades graves en muchos hospederos ya que afectan a las raíces, tallos, tubérculos, cormos, etc. Se incluye dentro de los "hongos esteriles", debido a que muchos años se pensó que eran incapaces de producir algún tipo de esporas, tanto sexual como asexual. Los síntomas más corrientes, principalmente los producidos por *Rizoctonia solani*, son ahogamiento de las plántulas, pudriciones de raíz, así como pudriciones canchros en los tallos de plantas adultas y en proceso de crecimiento. (Agrios, 1.995)

***Rizoctonia solani* Kühn**

Su forma sexual (*Thanatephorus cucumeris*) produce basidiosporas. Hifas incoloras en estadíos juveniles, pero se tornan amarillas o café claro a medida que maduran. El micelio está constituido por células alargadas y produce ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal, estrechándose ligeramente a nivel de la bifurcación y poseen un septo cerca de ella. Las características de las ramificaciones comúnmente son los únicos medios disponibles para identificarlo. En ciertas ocasiones el hongo produce ramilletes de células cortas, anchas, de forma oval o triangular y que se asemeja a esclerocios, los

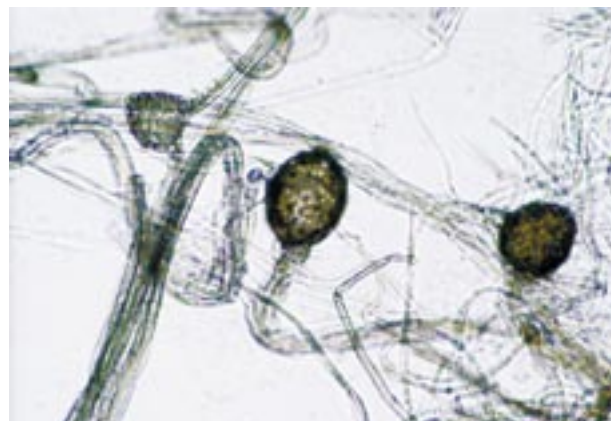


Fig. 12.12

cuales funcionan como clamidosporas, o en todo caso, dicho ramilletes se desarrollan en pequeños esclerocios de color café a negro, dispuestos en forma laxa. (Agrios, 1.995). Encontrada en platanera y manzano.

Verticillium

Se caracteriza este género por tener conidióforos hialinos ramificados de forma verticilada y los conidios unicelulares, hialinos, ovoides o elipsoidales, solitarios o reunidos en grupos en el extremo de las fálides. Dependiendo de la especie pueden existir microesclerocios.

Las especies pertenecientes al género *Verticillium* poseen un papel fitopatológico muy importante; algunas especies parecen ser específicas de los tejidos leñosos y causan alteraciones conocidas como traqueomicosis o más concretamente verticilosis. Estas se caracterizan por un amarilleamiento seguido de la desecación de las hojas; estos síntomas pueden presentarse de forma localizada en una parte de la planta o por el contrario generalizarse.

Verticillium ocasiona marchitamientos vasculares en gran cantidad de plantas. Las hojas de plantas infectadas pierden su turgencia, se debilitan, adquieren una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso, decaen y finalmente se marchitan, se tornan amarillas, empardecen y mueren.

Fig. 12.13



Los cortes trasversales que se hacen de tallos y ramitas infectados muestran varias zonas de color café dispuestas en forma de un anillo completo o interrumpido que consta de tejidos vasculares decolorados. En los vasos xilémicos de tallos, raíces y otros órganos infectados, puede haber micelio y esporas del hongo.

Verticillium aparece con mayor frecuencia en las zonas templadas y es considerablemente más resistente al frío que *Fusarium*. Los síntomas de marchitez por *Verticillium* son casi idénticos a los que ocasiona *Fusarium*. Sin embargo, en muchos de los hospedantes y en la mayoría de las áreas, *Verticillium* induce marchitez a temperaturas más bajas que *Fusarium* y los síntomas se desarrollan más lentamente. Con frecuencia aparecen solos sobre la parte inferior de la planta o sobre su superficie o únicamente sobre algunas de sus ramas. En muchos hospedantes, la infección por *Verticillium* da como resultado la defoliación, marchitez gradual y muerte de ramas sucesivas o un colapso repentino y muerte de toda la planta (Agris, 1995).

Verticillium teobromae (Tureoni) E. Mason & S.J. Hughers
En la platanera daña la punta de los dedos por donde penetra el agente patógeno a través de los restos de la flor que quedan adheridos a aquellos. A consecuencia de



Fig. 12.14

este ataque, la punta del fruto se ennegrece, se seca, se vuelve fibrosa y toma una forma idéntica a la ceniza del tabaco prendido., de ahí el que se conozca vulgarmente como “cigarro puro”. Puede a tacar a uno o a varios dedos. La frecuencia de la enfermedad aumenta durante los periodos de alta humedad y lluvia. Las esporas del hongo son diseminadas por el viento y contamina las flores.

Tenemos que señalar que en las plataneras de Terceira (Azores), hemos observado una sintomatología con cierto parecido a “Sigatoka”, presentando las plantas sus hojas basales con unas coloraciones características (fig. 12.12 y 12.14). Sin embargo, ni al hacer los cultivos de las hojas afectadas, ni mediante el empleo de primers específicos, en ningún momento se ha aislado o identificado la presencia del hongo responsable de dicha enfermedad, *Mycosphaerella*. Por el contrario, se aislaron, de forma repetida, un conjunto de hongos que inicialmente pueden ser los causantes de dicha sintomatología: *Alternaria alternata*, *Pestalotia leprogena*, *Phoma glomerata*, *Phoma musaecola*. Por lo tanto, provisionalmente hemos denominado a esta enfermedad con el nombre de “complejo” hasta tanto se confirme inequívocamente el o los organismos causales.

12.1.4 Bibliografía

- Agrios, G.N. (1995). *Fitopatología* (2.ª edición). Ed. Uthea. 838 pp.
- Arenal, F. (2000). Comparación de técnicas genotípicas y fenotípicas para el análisis de la diversidad en hongos, aplicadas a *Epicoccum nigrum* Link y varias especies del género *Sporormiella* Ell. & Ev. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Arx, J.A. Von, 1987. *Plant Pathogenic Fungi*. Ed. J. Cramer. Berlín, Alemania. 288 pp.
- Booth, C. 1977. *Fusarium. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species*. Ed. Commonwealth Mycological Institute. England.
- Ellis, M.B., 1993. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Editorial Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, Inglaterra. 608 pp.
- Ellis, M.B., 1993. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Editorial Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, Inglaterra. 507 pp.
- Frederick Guba, E. 1961. *Mongraph of Monochaetia and Pestalotia*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 342 pp.
- Gardes, M. & Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rust. *Molecular ecology* 2, 113-118.
- Goidànich, G. 1994. *Manuale di Patologia Vegetale*. Vol 4. Edagricole-Edizioni Agricole. Bologna. Italy. 1283 pp.
- Lanier, L., Joli, P., Bondoux, P. & Bellemère, A., 1978. *Mycologie et Pathologie Forestières*. Editorial Masson Publishing. EEUU. 480 pp.
- Malvarez, G., Rodríguez, A., Aguilar, C., Silvera, E. Y Mondino, P. (2001). Identificación de especies de *Monilia spp.*, en aislamientos obtenidos de *Prunus spp.* por PCR con primers específicos. *Agrociencia*. Vol.V nº1 pág. 48-53.
- Tello *et al.* en Andres Yeves, Mª Fé y otros., 1991. *Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nemato-*
dos fitopatógenos. M.A.P.A. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Madrid. España. 485 pp.
- Turenne, C.Y.; Sanche, S.E.; Hoban, D.J.; Karlowsky, J.A. & Kabani, A.M. (1999). Rapid Identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary Electrophoresis System. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 37. N.º 6, pp. 1846-1851.
- Watanabe, Tsuneo. 2.002. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. (2ª Edition). Ed. CRC Press.