

MUERTE REGRESIVA EN PARCHITA CAUSADA POR *Lasiodiplodia theobromae* EN VENEZUELA

Luis Cedeño^{1,2}, Chrystian Carrero¹, Sari Mohali², Ernesto Palacios-Prü² y Kleyra Quintero¹

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Apdo. 77 (La Hechicera) y ² Centro de Microscopía Electrónica, Apdo. 167, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela

Recibido: 15 de Diciembre de 1995.

RESUMEN

Cedeño, L., Carrero, C., Mohali, S., Palacios-Prü, E. y Quintero, K. 1995. Muerte regresiva en parchita causada por *Lasiodiplodia theobromae* en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 8:7-10.

Lasiodiplodia theobromae (= *Botryodiplodia theobromae*), anamorpho de *Botryosphaeria rhodina*, es confirmada como la causa de la muerte regresiva que afecta las ramas de la parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), en la región situada al sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. La enfermedad está ampliamente extendida en la zona ocasionando daños que disminuyen sustancialmente los rendimientos, particularmente durante los meses más secos (Enero-Marzo). Las observaciones de campo sugieren que la infección por *L. theobromae* está asociada a escoriaciones provocadas en la corteza de las ramas por el ácaro *Tetranychus urticae* y a estrés hídrico. El hongo causa lesiones en los entrenudos de las ramas principales y en los sitios de emergencia de hojas y ramas secundarias que, posteriormente, invaden los tejidos internos provocando secamiento y muerte regresiva. Las lesiones son inicialmente marrón-claro y luego muestran centro blanco-grisáceo y margen marrón-claro. La corteza de las ramas muertas se desprendió fácilmente y en su superficie se observaron numerosos picnidios oscuros, subepidérmicos y errumpentes. El patógeno se identificó sobre la base de las características de las estructuras reproductivas asexuales y el tamaño de los conidios. Los conidios fueron inicialmente hialinos, unicelulados y de pared celular gruesa, pero más tarde se observaron pigmentados de marrón-oscuro, uniseptados, con estrias longitudinales y dimensiones de 23,4-26,1 x 12,3-13,9 µm. Inoculaciones realizadas mediante la incrustación de palillos de madera colonizados por el hongo y por aplicación de discos de agar-micelio sobre heridas causadas por escoriación y punción de la corteza, produjeron síntomas similares a los observados en el campo. *L. theobromae* fue aislado constantemente de los tejidos infectados experimentalmente.

Palabras clave adicionales: *Botryodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria rhodina*

ABSTRACT

Cedeño, L., Carrero, C., Mohali, S., Palacios-Prü, E. and Quintero, K. 1995. Passion fruit dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 8:7-10.

Lasiodiplodia theobromae (= *Botryodiplodia theobromae*), anamorph of *Botryosphaeria rhodina*, was confirmed as the cause of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) vines dieback. The disease is widely disseminated at the south of Lake Maracaibo, Venezuela, producing damages that reduce yields substantially, especially during the drier months (January- March). Field observations suggested that the infection by *L. theobromae* is associated to bark scarifications caused by the mite *Tetranychus urticae*, and to drought stress. The fungus causes lesions on the internodes of the main branches and at the sites of emergence of leaves and secondary branches, and later invade the internal tissues inducing dieback. The lesions are initially light-brown and later show a white-grayish center and light-brown margin. The bark of dead branches was easily detached, and its surface showed numerous dark, subepidermic and erumpent pycnidia. The pathogen was identified on the basis of characteristics of asexual reproductive structures, and the size of conidia. Conidia were initially hyaline, unicellular, and had thick cell walls, but later they became dark-brown pigmented, developed one septum, showed longitudinal striations and measured 23.4-26.1 x 12.3-13.9 µm. Inoculations made by inlaying wooden toothpicks colonized by the fungus, and by applying agar-mycelium disks over wounds caused by scarifications and puncturing the bark, produced symptoms similar to those observed in the field. *L. theobromae* was constantly isolated from experimentally infected tissues.

Additional key words: *Botryodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria rhodina*

INTRODUCCION

La parchita (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) es un frutal menor que ha adquirido notable importancia económica en la región situada al sur del Lago de Maracaibo. La explotación del cultivo ha sido favorecida, principalmente, por la exigencia de materia prima para la industria y el mejoramiento de las prácticas agronómicas. Con el incremento poblacional han surgido algunos problemas fitopatológicos que disminuyen los rendimientos y alteran la calidad de los frutos. En los últimos cinco años fueron reportadas dos destructivas enfermedades, la "muerte repentina" causada por *Nectria haematococca* Berk. & Broome (6) y la "antracnosis de los frutos" inducida por *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk (4).

Durante inspección realizada en Febrero de 1992, a plantaciones existentes en los asentamientos campesinos "María Dolores I", Municipio Autónomo Sucre, Estado Zulia, y "La Macarena" y "Muyapá", Municipio Autónomo Justo Briceño, Estado Mérida, se encontraron numerosas plantas cuyas ramas presentaban síntomas de muerte regresiva.

Observaciones posteriores revelaron que la enfermedad está ampliamente extendida en la zona, pero se presenta con más frecuencia durante el período de sequía (Enero-Marzo), ocasionando una apreciable disminución en los rendimientos. Las ramas enfermas presentaban lesiones blanco-grisáceas con un ligero margen marrón-claro. La corteza de las ramas muertas se desprendía con facilidad y en la superficie mostraba numerosos picnidios oscuros, subepidérmicos y errumpentes. En el interior de las ramas se localizó un micelio profuso de aspecto verde-grisáceo. Los picnidios contenían paráfisis, células conidiógenas y conidios con las características típicas de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (= *Botryodiplodia theobromae* Pat.), anamorpho de *Botryosphaeria rhodina* (Cooke) Arx (15,20). En Venezuela, *L. theobromae* ha sido asociado a enfermedades en importantes especies agrícolas y forestales (2,3,5,8,22).

El objetivo principal del trabajo que se reporta, fue confirmar si *L. theobromae* es el causante de la muerte regresiva que destruye las ramas de la parchita. Un reporte preliminar fué publicado en forma de resumen (3).

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento e identificación. Los materiales utilizados para aislar e identificar el patógeno fueron colectados en el asentamiento campesino 'Muyapá' (Septiembre, 1992). Del margen de las lesiones se cortaron fragmentos de aproximadamente 2 mm², que se desinfectaron superficialmente por 1 min en una solución preparada con hipoclorito de sodio (0,5%), ácido láctico (0,1%) y Tween-20 (0,1%). Seguidamente las muestras fueron lavadas varias veces con agua destilada estéril, secadas en papel filtro estéril y transferidas asépticamente a placas de agua-agar 2% acidificado con ácido láctico (AAA). Igualmente se hicieron siembras directas del micelio extraído del interior de las ramas. Las placas se incubaron a 26-28°C y en condiciones de 12 h de oscuridad y 12 h de iluminación con luz fluorescente. Las colonias fueron purificadas por transferencia de ápices hifales a placas de AAA y, posteriormente, subcultivadas en papa-dextrosa-agar (Difco PDA) y harina de avena-agar (HAA, harina de avena 30 g y agar 20 g), para producir los cultivos que serían utilizados en las pruebas de identificación y patogenicidad. Los cultivos fueron conservados bajo refrigeración en tubos de PDA inclinado. Varios picnidios formados en HAA fueron fijados con mezcla de formaldehído y glutaraldehído diluïdos al 3% en tampón 0,1M y pH 6,3 de cacodilato de sodio, lavados con el mismo tampón, deshidratados en soluciones de alcohol etílico (80, 95 y 100%), tratados con alcohol etílico-éter (1:1) e incluidos gradualmente en parlodión disuelto al 2, 6 y 8% en alcohol etílico-éter. En un micrótopo de deslizamiento se hicieron cortes de 10-12 µm que fueron coloreados con lactofucsina 0,025%. Para la identificación del hongo se usaron las descripciones publicadas por Punithalingam (15) y Sutton (20).

Inoculación y reaislamiento. En las pruebas de patogenicidad se usaron plantas sanas cultivadas en bolsas de polietileno, cuyas ramas principales tenían un grosor promedio de 0,5 cm. En cada rama se inocularon cuatro entrenudos intermedios desinfectados superficialmente con alcohol etílico 70% y lavados abundantemente con agua destilada estéril. Como inóculo se utilizaron palillos de madera colonizados por el hongo y discos de HAA-micelio (0,5 cm diám). Los palillos se esterilizaron en autoclave por 20 min a 121°C y posteriormente fueron transferidos a cultivos del hongo creciendo en HAA por 3d a 26-28°C. Cinco días más tarde, los palillos colonizados fueron retirados e incrustados en los entrenudos hasta la médula, cortados a nivel de la superficie de las ramas y cubiertos con parafilm. En los controles se insertaron palillos estériles sin el hongo. El otro método de inoculación consistió en aplicar discos de HAA-micelio cortados del margen de los cultivos fúngicos de 3d de edad, en ramas sin y con heridas provocadas frotando moderadamente la corteza con una esponjilla de metal (escoriación) y por punción con una aguja estéril. En los controles se aplicaron discos de HAA estéril sin el hongo. Los sitios de inoculación se mantuvieron protegidos por 3d con plástico transparente. Inmediatamente después de la inoculación las plantas se incubaron en el invernadero y frecuentemente fueron examinadas para observar el desarrollo de la infección. A partir de los materiales inoculados se hicieron reaislamientos para verificar el cumplimiento de los postulados de Koch.

RESULTADOS

Síntomas. El patógeno produce lesiones que ocasionan defoliación y muerte regresiva en las ramas de la parchita. Las lesiones se originan en los entrenudos y en los sitios de emergencia de hojas y ramas secundarias. La manifestación

inicial de la enfermedad es la presencia de manchas marrón-claro que luego se ensanchan mostrando centro blanco-grisáceo y margen irregular marrón-claro. Cuando la infección alcanza los tejidos internos, las hojas se vuelven amarillas y posteriormente se caen. Simultáneamente las ramas comienzan a presentar síntomas de muerte regresiva. La corteza de las ramas muertas se desprendió con facilidad y en la superficie se observaron numerosos picnidios oscuros, subepidérmicos y errumpentes. En los tejidos localizados debajo de las lesiones se apreció un micelio profuso de aspecto verde-grisáceo. En algunas de las ramas que presentaban las manifestaciones típicas de la enfermedad, también se observaron lesiones corticales producidas por ácaros que, aparentemente, facilitan la infección.

Aislamiento e identificación. Los numerosos aislamientos realizados a partir de los materiales infectados naturalmente, consistentemente originaron colonias fúngicas de características idénticas. En PDA y HAA las colonias fueron inicialmente blancas, luego grises y finalmente oscuro-grisáceas. El hongo formó picnidios a las 2 y 3 semanas de crecimiento en HAA y PDA, respectivamente. En PDA los picnidios aparecieron individualmente, pero en HAA se observaron inmersos en masas estromáticas oscuras y pilosas que se levantaban como estructuras columnares. Los picnidios eran oscuros, de paredes constituidas por células pseudoparenquimáticas, ostiolados y en su interior se visualizaron paráfisis, células conidiógenas y conidios (Fig.1). Las células conidiógenas, hialinas y ampuliformes, se formaron a partir de la capa de células más interna de la pared picnidial y formaron un sólo conidio. Las paráfisis se apreciaron filamentosas, hialinas y septadas. Los conidios fueron inicialmente unicelulares, hialinos y de pared celular gruesa, pero posteriormente se volvieron bicelulares, pigmentados de marrón-oscuro, presentaban estrias longitudinales en la superficie y midieron 23,4-26,1 × 12,3 - 13,9µm (media más o menos desviación estándar) (Fig.2). El pigmento se observó acumulado en la pared celular, el septo y las estrias.

Inoculación y reaislamiento. Las inoculaciones realizadas por incrustación de palillos y aplicación de discos de HAA-micelio sobre heridas causadas por raspado y punción, resultaron positivas y permitieron reproducir en ramas sanas síntomas similares a los observados en el campo. Los controles y las ramas inoculadas sin heridas no presentaron señales de infección. El método de inoculación más efectivo fue el que se realizó por escoriación, por cuanto la infección se desarrolló más rápidamente que en los correspondientes a palillos y punción. En consecuencia, sólo se reportan los resultados obtenidos este método de inoculación. Las primeras manifestaciones de infección aparecieron a las 48 h después de la inoculación como pequeñas lesiones de color marrón-claro. Dos días más tarde, las lesiones se habían tornado ligeramente hundidas y mostraban centro blanco-grisáceo y margen marrón-claro. Para esa fecha las hojas mostraban síntomas de amarillamiento y marchitez y varias ramas habían comenzado a secarse en forma progresiva y descendente. Una semana más tarde, todas las ramas inoculadas estaban muertas y habían perdido la mayor parte de las hojas. En las ramas muertas se formaron abundantes picnidios idénticos a los encontrados en las infectadas naturalmente. El hongo inoculado fue aislado frecuentemente de las ramas infectadas experimentalmente, pero no de las ramas control ni de las inoculadas sin heridas.

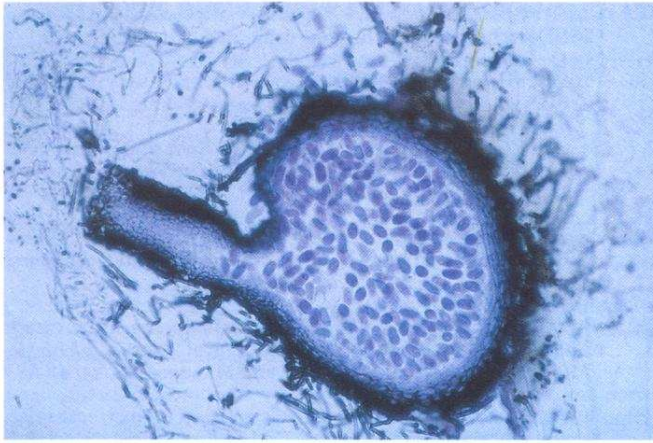


Fig 1. *Lasiodiplodia theobromae*, sección longitudinal de un picnidio producido en papa-dextrosa-agar, mostrando conidios inmaduros coloreados con fucsina ácida 0,025%(filtro azul).

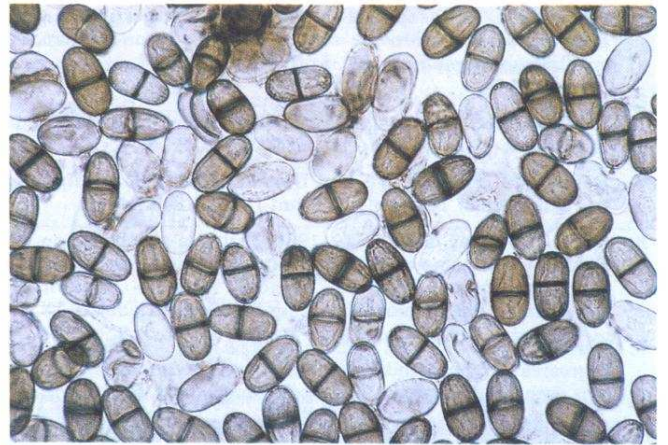


Fig. 2. *Lasiodiplodia theobromae*, conidios maduros e inmaduros.

DISCUSION

El hongo se identificó como *L. theobromae* sobre la base de la morfología de las estructuras reproductivas asexuales y las dimensiones de los conidios (15,20). Los conidios que al principio fueron unicelulares, hialinos y de pared celular gruesa, posteriormente se volvieron bicelulares, pigmentados de marrón-oscuro y mostraban estrías longitudinales al observarlos con el microscopio fotónico. La presencia de estrías es una característica típica de los conidios de este hongo y por lo tanto un carácter taxonómico importante. Con microscopía electrónica de barrido, Uduebo (21) no pudo observar las estrías; sin embargo, mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión, Yaguchi y Nakamura (24), comprobaron que las estrías son el resultado de la acumulación de una sustancia de elevada densidad electrónica, probablemente melanina, en la capa más externa de las dos que constituyen la pared celular de los conidios pigmentados.

La reproducción experimental de los síntomas de la enfermedad en plantas inoculadas con *L. theobromae* y el reislamiento frecuente de este microorganismo, dieron cumplimiento a los postulados de Koch. En consecuencia, se concluyó que *L. theobromae* es el causante de la enfermedad de muerte regresiva que ataca las ramas de la parchita en la región localizada al sur del Lago de Maracaibo. La enfermedad es el resultado de lesiones que aparecen en los entrenudos y en los sitios de emergencia de hojas y ramas secundarias. Es importante señalar que Urtiaga (22) en su "Índice de Enfermedades en las Plantas cultivadas de Venezuela y Cuba", registra a *L. theobromae* en frutos de parchitas cultivadas en El Eneal, estado Lara. El hongo es un parásito oportunista que se presenta, principalmente, en las regiones tropicales y subtropicales, dónde ha sido asociado a enfermedades en aproximadamente 500 especies de plantas (15,16). La literatura especializada señala que el hongo causa podredumbre en raíces, tallos y frutos; manchas foliares, quema de plántulas, cáncer, gomosis, muerte regresiva y manchado de fibras en especies forestales (1,2,3,5,7,9,10,12,23). Comúnmente *L. theobromae* es considerado un patógeno facultativo debido a que sólo produce infección en las plantas hospederas que presentan heridas, estrés hídrico y/o deficiencia nutricional, y tejidos en descomposición (7,11,12,18,19,23). Según Olunlayo (14), las heridas causadas por insectos predisponen los tejidos a infecciones por *L. theobromae*. Recientemente, Wilson y Pitkethley (23), relacionaron la muerte regresiva inducida

por *L. theobromae* en *Mimosa pigra*, con un efecto combinado de estrés hídrico y las galerías causadas por la polilla *Neurostrata gunniella*, la cual fué introducida a Australia para controlar biológicamente esa maleza. La enfermedad no apareció en la época lluviosa aún cuando el insecto estaba presente. En el caso que se reporta, la muerte regresiva de las ramas está asociada a estrés por déficit hídrico y escoriaciones corticales causadas por el ácaro *Tetranychus urticae*. Este ácaro ha sido señalado como la plaga más dañina de la parchita cultivada en Hawaii (13), ya que las lesiones que produce en la corteza de las ramas inducen defoliación y muerte regresiva. Sin embargo, en la literatura consultada no se encontró información relacionada con la asociación entre los daños causados por el ácaro y la infección por *L. theobromae*. Observaciones de campo revelaron que la enfermedad aparece con mayor frecuencia en los meses más secos del año (Enero-Marzo), período durante el cual la parchita sufre estrés hídrico y la población de ácaros es más alta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan agradecimiento a los técnicos José Ramírez y Henry Picón del Centro de Microscopía Electrónica, y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes por el aporte de los recursos económicos que hicieron posible la ejecución del Proyecto FO-320-94-01-B.

LITERATURA CITADA

1. Britton, K.O. and Hendrix, F.F. 1982. Three species of *Botryosphaeria* cause peach tree gummosis in Georgia. Plant Dis. 66: 1120-1121.
2. Cedeño, L., Mohali, S. y Palacios-Prü, E. 1992. Ultraestructura del hongo *Botryodiplodia theobromae* causante de manchado azul en pino caribe. Memorias XXXII Reunión Anual Sociedad Americana de Fitopatología, División del Caribe, Mérida, Venezuela. p.30.
3. Cedeño, L., Mohali, S. y Palacios-Prü, E. 1993. Muerte regresiva de las ramas: nueva enfermedad de la parchita en Venezuela. Fitopatol. Venez. 6: 48.(Resumen).
4. Cedeño, L., Mohali, S. y Palacios-Prü, E. 1993. Antracnosis causada por dos cepas de *Glomerella cingulata* en frutos de parchita. Fitopatol. Venez. 6: 30-33.

5. Cedeño, L. y Palacios-Pru, E. 1992. Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causa de lesiones y gomosis en cítricos. Fitopatol. Venez. 5: 10-13.
6. Cedeño, L., Palacios-Pru, E., Marquez, N. y Tavira, E. 1990. *Nectria haematococca*, agente causal de la muerte repentina de la parchita en Venezuela. Fitopatol. Venez. 3:15-18.
7. Davis, R. M., Farrald, C. J. and Davila, D. 1987. *Botryodiplodia* trunk lesions in Texas citrus. Plant Dis. 71: 848-849.
8. Diaz, C. y Salas de Diaz, G. 1980. Lista de patógenos en las plantas cultivadas en Venezuela. Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Región Centro-Occidental, Acarigua-Araure, Venezuela. 62 pp. (Mimeografiado).
9. Ferrari, D., Ochoa, F., Subero, L. y Arcia, A. 1993. Muerte regresiva y gomosis inducida por *Botryodiplodia theobromae* en tres especies de cítricos. Fitopatol. Venez. 6: 47.(Resumen).
10. Latham, A. J. and Dozier, W. A., Jr. 1989. First report of an apple root rot caused by *Botryodiplodia theobromae* in The United States. Plant Dis. 73: 1020.
11. Lewis, R., Jr. and Van Arsdell, P. E. 1978. Vulnerability of water-stressed sycamores to strians of *Botryodiplodia theobromae*. Plant Dis. Repr. 62: 62-63.
12. Mullen, J. M., Gilliam, C. H., Hagan, A. K. and Morgan-Jones, G. 1991. Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. Plant Dis. 75: 886-889.
13. Nishida, T. and Haramoto, F. H. 1964. Passion fruit pests and their control. Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii, Circular 63. 14 pp.
14. Olunlayo, O. A. 1983. Results of three years spraying with fungicides-insecticide combinations against inflorescence dieback disease of cashew. Plant Dis. 67: 1319-1320.
15. Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI-Descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 519.
16. Punithalingam, E. 1980. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. J. Cramer, Vaduz. 123 pp.
17. Sandlin, C.M. and Ferrin, D. M. 1991 Root and stem rot of *Brachyton populneus* caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Phytopathology 81: 1203.(Abstract).
18. Sharma, J. K., Mohanan, C. and Florence, E. J. M. 1984. A new stem canker of eucalyptus caused by *Botryodiplodia theobromae* in India. Trans. Br. Mycol. Soc. 83: 162-163.
19. Sharma, J. K. and Sankaran, K.V.1988. Incidence and severity of *Botryodiplodia* die-back in plantations of *Albizia falcataria* in Kerala, India. Forest Ecology and Management 24: 43-58.
20. Sutton, B.C. 1980. Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. C.M.I., Kew, Surrey, England. 696 pp.
21. Uduebo, A. E. 1975. Fine structural studies on the pycnidiospores of *Lasiodiplodia theobromae* Pat. Ann. Bot. 39: 605- 610.
22. Urtiaga, R. 1986. Indice de enfermedades en plantas cultivadas de Venezuela y Cuba. Impresos Nuevo Siglo, Barquisimeto, Edo. Lara, Venezuela. 202 pp.
23. Wilson, C.G. and Pitkethley, R. N. 1992. *Botryodiplodia* die-back of *Mimosa pigra*, a noxious weed in northern Australia. Plant Pathol. 41: 777-779.
24. Yaguchi, Y. and Nakamura, S. 1991. Fine-structure of walls of pycnidiospores in *Lasiodiplodia theobromae* Pat. Tokio University of Agriculture Scientific Report 35: 283-289.