

IDENTIFICACION DE *Botryodiplodia theobromae* COMO LA CAUSA DE LESIONES Y GOMOSIS EN CITRICOS

Luis Cedeño^{1,2} y Ernesto Palacios-Prü²

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Apdo. 220 y ²Centro de Microscopía Electrónica, Apdo. 167, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela.

Recibido: 15 de Enero de 1992.

RESUMEN

Cedeño, L. y Palacios-Prü, E. 1992. Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causa de lesiones y gomosis en cítricos. Fitopatol. Venez. 5: 10 - 13.

Se determinó que *B. theobromae*, anamorfo de *Physalospora rhodina*, es el causante de las lesiones y la gomosis que presentan los limoneros (*Citrus aurantiifolia*) y los naranjos (*Citrus sinensis*) cultivados en Caño Amarillo, Municipio Autónomo Panamericano, Estado Táchira, Venezuela. La afección se observó en los tejidos de las ramas próximos a las heridas causadas por la poda. Generalmente las plantas infectadas mostraban abundante secreción gomosa y lesiones corticales que al principio eran de color marrón-claro y posteriormente se tornaban necróticas. La madera localizada inmediatamente por debajo de la corteza infectada se apreció siempre de aspecto grisáceo. En harina de avena-agar, el hongo produjo colonias de color oscuro-grisáceo y picnidios inmersos en estromas negros y pilosos, que se levantaban como columnas y alcanzaban hasta 8 mm de altura. En el exterior de estos estromas frecuentemente se apreciaron gotas de un exudado que, aparentemente, indicaban la posición de los ostíolos picnidiales. El análisis microscópico de las secciones estromáticas longitudinales, reveló la presencia de una cantidad variable de cavidades picnidiales, en cuyo interior se observaron conidios hialinos, aseptados y provistos de una pared celular gruesa e igualmente conidios pigmentados de color marrón-oscuro, septados y con estrías longitudinales en su superficie. Las inoculaciones realizadas en limón 'Volkameriano' fueron positivas y permitieron reproducir la gomosis y las lesiones observadas en el campo.

INTRODUCCION

En noviembre de 1990, en un sector de Caño Amarillo, localidad perteneciente al Municipio Autónomo Panamericano del Estado Táchira, Venezuela, se encontraron limoneros (*Citrus aurantiifolia* L.) y naranjos (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), que mostraban en los tejidos más próximos a las heridas causadas por la poda reciente, abundante secreción gomosa y lesiones corticales. Al principio las lesiones eran de color marrón-claro, pero posteriormente se observaron necróticas. Los tejidos de la madera localizados inmediatamente por debajo de la corteza infectada se apreciaron siempre de color gris. Los primeros aislamientos realizados en agar-agua con ácido láctico, originaron colonias fúngicas, que cuando fueron subcultivadas en harina de avena-agar produjeron un micelio oscuro-grisáceo y estructuras reproductivas con características semejantes a aquellas descritas para la especie *Botryodiplodia theobromae* Pat. (7).

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad y en el análisis descriptivo aplicado a nuevos aislamientos del patógeno, los cuales avalan que *B. theobromae* es el causante de las lesiones y la gomosis que ocurren en los cítricos de Caño Amarillo.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento e identificación del patógeno. De los límites de las secciones se cortaron segmentos de ca 2 mm de

ABSTRACT

Cedeño, L. y Palacios-Prü, E. 1992. Identification of *Botryodiplodia theobromae* as the cause of lesions and gummosis on citrus. Fitopatol. Venez. 5: 10 - 13.

It was determined that the fungus *B. theobromae*, anamorph of *Physalospora rhodina*, is the causal agent of lesions and gummosis observed on branches of lemon (*Citrus aurantiifolia*) and orange (*Citrus sinensis*) trees in the locality of Caño Amarillo, Táchira State, Venezuela. The disease symptoms appeared immediately after pruning, in tissue next to the cutting sites. Infected plants showed copious gumming and cortical lesions which were initially light brown and later they became necrotic. Often, wood tissues located below the infected cortex appeared gray colored. On oatmeal-agar, the fungus produced dark-gray colonies, and it formed pycnidia within hairy columnar stromata which sometimes reached up to 8 mm in height. Frequently, exuded drops were observed on the external surface of the stromata, apparently indicating the position of the pycnidia ostioles. Microscopic examination of stromatic longitudinal sections, revealed a variable number of pycnidia cavities with unicellular, hyaline and thick-walled conidia, as well as dark-brown pigmented, septate and often longitudinally striate conidia. In pathogenicity tests, inoculated 'Volkamer' lemons showed the same symptoms observed in the field.

longitud, los cuales fueron primeramente tratados con una solución 0,525% de hipoclorito de sodio, luego lavados varias veces en agua destilada estéril y finalmente sembrados en placas de agar-agua con ácido láctico, que se incubaron a 26 ± 2°C. Posteriormente varios de los aislamientos obtenidos fueron subcultivados en celulosa-agar (CA; papel filtro 10 g, extracto de levadura 4 g y agar 10 g/l), harina de avena agar (HAA; harina de avena 30 g y agar 20 g/l), harina de maíz-agar (Difco HMA, 17 g/l) y papa-dextrosa-agar (Difco PDA, 39 g/l), a fin de evaluar la formación de las estructuras reproductivas y proceder a establecer la identidad del patógeno. En el estudio anatómico de los estromas se usaron cuerpos fructíferos producidos en HAA, que se incluyeron en el plástico parlodión de la siguiente manera: 1) Fijación en mezcla de formaldehído y glutaraldehído, diluidos cada uno de ellos en tampón cacodilato de sodio 0,1 M, pH 6,3; 2) Deshidratación, primeramente en soluciones seriadas de alcohol etílico (50, 80 y 100%), y luego en mezcla 1:1 de alcohol etílico 100% y éter; y 3) Infiltración en parlodión preparado al 2, 8 y 10% en igual combinación 1:1 de alcohol etílico 100% - éter. Secciones estromáticas de 10 µm fueron examinadas con la técnica de contraste diferencial de interferencia (Nomarski).

Inoculación y Reaislamiento. La actividad infecciosa del hongo fue evaluada en 8 plantas de limón 'Volkameriano', de 70-126 cm de altura, cultivadas en bolsas de polietileno. Como inóculo se usaron discos miceliales (0,5 cm diam), extraídos de colonias crecidas por 2 semanas en HAA a 26 ±

2 °C. Los limoneros se inocularon por aplicación de los discos miceliales en heridas provocadas en el tallo con un sacabocado estéril (0,5 cm diam). Inmediatamente las áreas tratadas se cubrieron por 10 d con gasa húmeda y plástico transparente. Las plantas usadas como control sólo recibieron HAA sin el hongo. A partir del décimo primer día, las plantas se revisaron diariamente para hacerle un seguimiento al desarrollo de la enfermedad. De los tejidos infectados artificialmente se practicaron aislamientos con el fin de determinar el cumplimiento de los postulados de Koch.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación. En todos los tejidos infectados naturalmente, que se usaron para aislar el patógeno, se desarrollaron colonias de un mismo hongo. La preparación HAA demostró ser el mejor sustrato para la formación de las estructuras reproductivas. En HAA el hongo produjo colonias de color oscuro-grisáceo y picnidios inmersos en estromas negros y pilosos, que se levantaban como columnas y alcanzaban hasta 8 mm de altura (Figs. 1B, 1C y

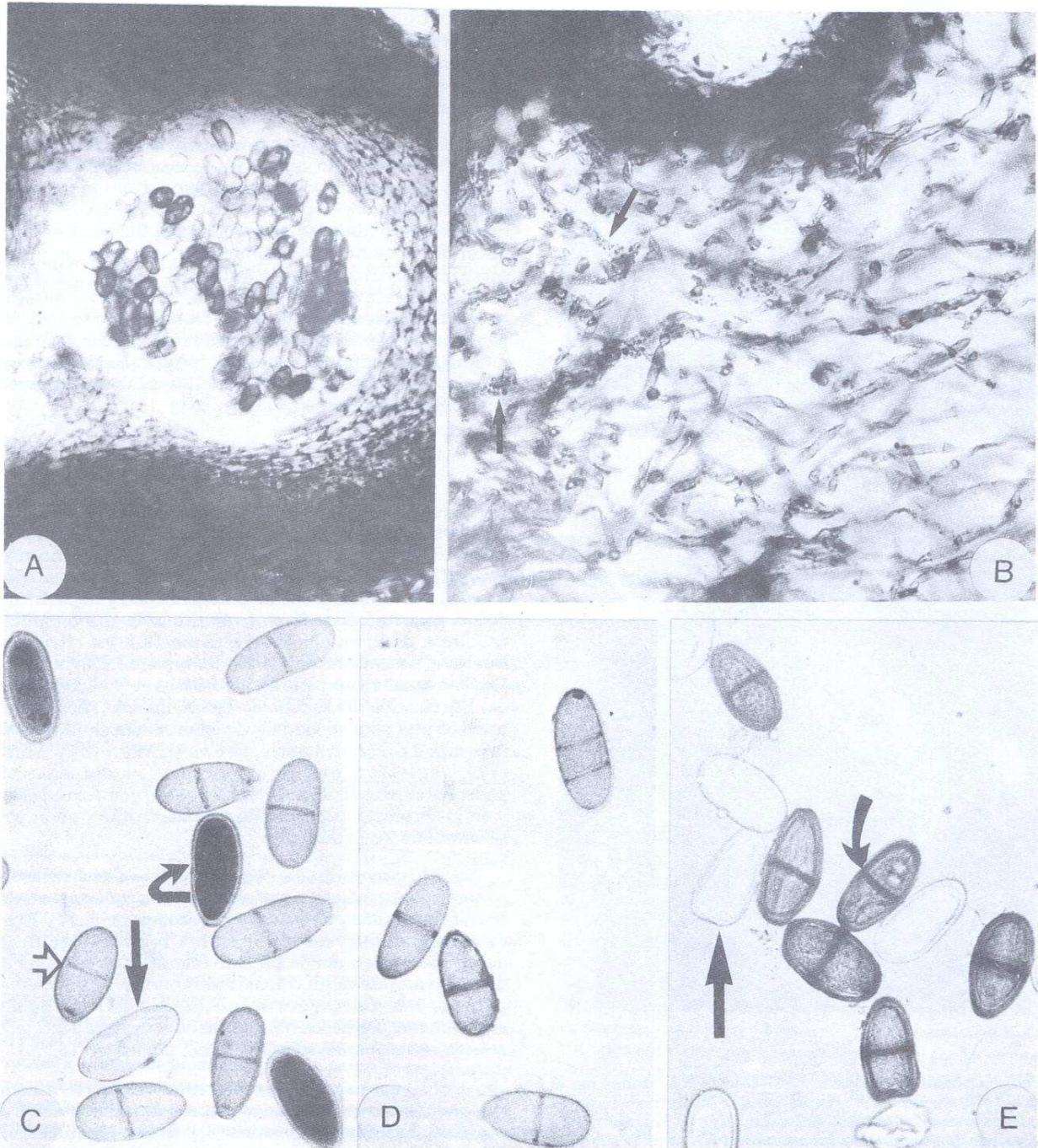


Fig. 2. *Botryodiplodia theobromae* en harina de avena-agar. A. Sección de un estroma en la que se aprecia una cavidad picnidial con conidios hialinos y aseptados y conidios septados con distintos grados de pigmentación (X 336,6). B. Imagen ampliada de las hifas que cubren los estromas. Las flechas indican los granulos de secreción que contribuyen a la formación de los estromas (X 1.742,4). C. Conidios aseptados sin pigmentación (flecha recta), conidios uniseptados fuertemente pigmentados (flecha curva) y conidios uniseptados con escasa pigmentación (cabeza de flecha) (X 1.584). D. Conidios uni y biseptados. (X 1.536,8). E. Conidios hialinos y aseptados (flecha recta) y conidios uniseptados con un grado de pigmentación intermedio (flecha curva) (X 1.663,2).

2B). En el exterior de los estromas frecuentemente se observaron gotas de exudado que, aparentemente, indicaban la posición de los ostíolos de los picnidios (Fig. 1B). En las cavidades picnidiales se apreciaron conidios hialinos y pigmentados (Fig. 2A), y células conidiógenas hialinas y cilíndricas, que emergían de las capas celulares que cubren la pared picnidial. Las células conidiógenas y los conidios se observaron siempre rodeados por paráfisis septadas. Al secarse el exudado, los conidios se apreciaron aglomerados en la superficie de los estromas. Inicialmente los conidios

aparecieron hialinos, aseptados, subglobosos a elipsoidales, con la porción basal truncada y provistos de una pared celular gruesa; posteriormente mostraron una pigmentación marrón-oscuro, un septo en la región ecuatorial en forma de disco y estrías orientadas en dirección del eje mayor (Fig. 2E). Algunos conidios pigmentados no presentaron septos (Fig. 2C), mientras que en otros con diferentes grados de pigmentación se observaron hasta dos septos (Fig. 2D). Los conidios hialinos midieron 21-26 μm x 10-12 μm y los pigmentados 22-29 μm x 12-14 μm .

En los medios CA y HAA el hongo desarrolló una gran cantidad de clamidosporas uni y bicelulares y escasas dictioclamidosporas. Generalmente las clamidosporas mostraron forma globosa y alargada; sin embargo, ocasionalmente se visualizaron clamidosporas con morfología similar a la de los conidios.

Inoculación y reaislamiento. Todas las plantas de limón 'Volkameriano' que se inocularon a través de heridas fueron infectadas y desarrollaron gomosis y lesiones parecidas a las observadas en el campo (Fig. 1A). Al momento de retirar el plástico transparente, la gasa se apreció abundantemente inundada de exudado gomoso. En ninguna circunstancia las plantas usadas como testigo presentaron síntomas de infección. Lo anterior implica que la secreción gomosa es una consecuencia de la interacción patógeno-huesped. El hongo invadió los tejidos de la madera más rápidamente que los de la corteza. *B. theobromae* fue constantemente aislado de las plantas infectadas experimentalmente.

DISCUSION

Las características morfológicas y las dimensiones de los conidios permitieron determinar que el hongo aislado es la especie *B. theobromae* Pat. (= *Diplodia natalensis* Pole-Evans), cuyo teleomorfo es *Physalospora rhodina* (Cooke) (8). Las pruebas de patogenicidad y la confirmación de los postulados de Koch avalan que *B. theobromae* es el causante de la enfermedad que afecta a los cítricos en la localidad de Caño Amarillo. Recientemente, Davis, Farrald y Davila (4) señalaron que en los cítricos cultivados en el valle del Río Grande del Estado de Texas, EE.UU., *B. theobromae* provocó una enfermedad de sintomatología similar a la aquí investigada. Por otra parte, Brown y Eckert (3) y Whiteside (11), registran que *B. theobromae* causa en cítricos podredumbre radical, muerte regresiva, gomosis en el tronco y en los brotes, y podredumbre en las frutas y en la porción terminal de los pedúnculos.

B. theobromae es un parásito facultativo que generalmente infecta a sus plantas huéspedes penetrando a través de heridas y de tejidos en descomposición (7). El hongo es de aparición frecuente en las regiones tropicales y subtropicales, en donde ha sido identificado como la causa de enfermedades en aproximadamente 280 especies de plantas vasculares, entre las cuales destacan aguacate, algodón, cacao, café, cambur, caña de azúcar, caucho, lechosa, mango, maní, palma africana, pino, tabaco, etc (6,7,9).

La literatura especializada registra opiniones contradictorias en relación al proceso de pigmentación de los conidios. Ekundayo y Haskins (5) y Brown (2), indicaron que los conidios se pigmentan después que haber salido de los picnidios, mientras que Alasoadura (1) y Uduebo y Madelin (10), señalaron que la pigmentación y la formación de septos ocurre en el interior de los picnidios. Al respecto, es importante mencionar que las observaciones derivadas del estudio que se reporta, coinciden con las apreciaciones de

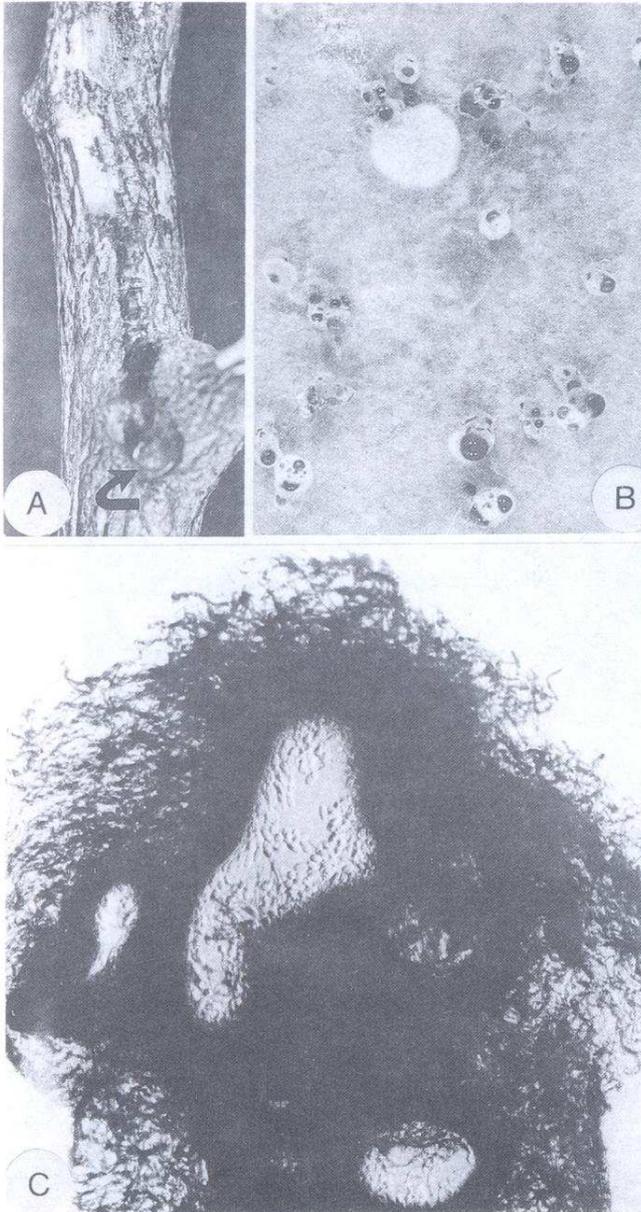


Fig. 1. *Botryodiplodia theobromae*. A. Alteraciones causadas por el hongo en el tallo de limón 'Volkameriano'. La flecha señala la secreción gomosa. B. Imagen del crecimiento en harina de avena-agar, en la que se aprecian los estromas y las gotas de exudado que, aparentemente, indican la ubicación de los ostíolos de los picnidios. C. Sección longitudinal de un estroma mostrando las cavidades picnidiales con conidios en su interior y las proyecciones hifales que emergen de su superficie (X 376,2).

Alosoadura (1) y de Uduebo y Madelin (10), por cuanto en una misma cavidad picnidial se visualizaron simultáneamente conidios hialinos y pigmentados.

La transparencia y los distintos grados de pigmentación exhibidos por los conidios de la cepa de *B. theobromae* investigada, sugieren que aparentemente existe una relación entre el color y el estado de desarrollo de los conidios, por cuanto el mayor desarrollo siempre coincidió con el nivel más alto de pigmentación. Por otra parte, la aparición de los septos frecuentemente estuvo asociada con la presencia de pigmentación y, además, la formación de estrías longitudinales pareciera ser una consecuencia del envejecimiento y la desecación.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Orlando Goliath, la edición computarizada del manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. Alasoadura, S.O. 1971. Cultures studies on *Botryodiplodia theobromae* Pat. Mycopatol. Mycol. Appl. 42:153-160.
2. Brown, G.E. 1971. Pycnidial release and survival of *Diplodia natalensis* spores. Phytopathology 61:559-561.
3. Brown, G.E. and Eckert, J.W. 1989. *Diplodia* stem-end rot. In Compendium of Citrus Diseases. J.O. Whiteside, S.M. Garnsey,

and L.W. Timmer (eds.). St. Paul, Minnesota, Am. Phytopathol. Soc. pp. 33-34.

4. Davis, R.M., Farrald, C.J. and Davila, D. 1969. *Botryodiplodia theobromae* trunk lesions in Texas citrus. Plant Dis. 71:848-849.
5. Ekundayo, J.A. and Haskins, R.H. 1969. Pycnidium production by *Botryodiplodia theobromae*. II. Development of the pycnidium and fine structure of the maturing pycnospore. Can J. Bot. 47:1423-1424.
6. Goos, R.D., Cox, E.A., and Stotzky, G. 1961. *Botryodiplodia theobromae* and its association with *Musa* species. Mycologia 53:262-277.
7. Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 519. Commonw. Mycol. Inst., Kew, England.
8. Punithalingam, E. 1980. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. Bibl. Mycol. 123 p.
9. Rondón, A. y Guevara, Y. 1984. Algunos aspectos relacionados con la muerte regresiva del aguacate (*Persea americana* Mill.) Agron. Trop. 34:119-129.
10. Udebo, A.E. and Madelin, M.F. 1984. Germination of conidia of *Botryodiplodia theobromae* in relation to age and environment. Trans. Br. Mycol. Soc. 63:33-44.
11. Whiteside, J.O. 1989. Diplodia-associated diseases. In Compendium of Citrus Diseases. J.O. Whiteside, S.M. Garnsey, and L.W. Timmer (eds.). St. Paul Minnesota. Am. Phytopathol. Soc. p. 14.

IDENTIFICACION DEL RAYADO BACTERIANO DE LA HOJA DEL SORGO CAUSADO POR *Pseudomonas andropogonis* EN VENEZUELA

Jullit Hernández, Y. Hernández, M.J. Garrido y G.E. Trujillo

Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apartado 4579, Maracay 2101.

Parte de una tesis presentada por el primer autor para optar al título de *Magister Scientiarum* en Agronomía en la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Trabajo parcialmente financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, UCV. Proyecto N° 0131-2050-90.

Recibido: 10 de Marzo de 1992.

RESUMEN

Hernández, J., Hernández, Y., Garrido, M.J. y Trujillo, G.E. 1992. Identificación del rayado bacteriano de la hoja del sorgo causado por *Pseudomonas andropogonis* en Venezuela. Fitopatol. Venez. 5:13-16

En diferentes muestras de sorgo (*Sorghum bicolor*) recolectadas en el campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, en Maracay, se observaron síntomas sospechosos de infección bacteriana, confinados a las hojas y tallos. Las lesiones eran húmedas, de color verde oscuro y luego marrón rojizo, de 1 cm de extensión al inicio y con el tiempo formaban rayas rojizas a lo largo de la lámina foliar. A partir de las muestras estudiadas se aislaron colonias visibles en los medios de cultivo a los 6 a 7 d después de la siembra que presentaban forma redonda, de 1 mm de diam, lisas, elevadas, brillantes y traslúcidas. La bacteria resultó ser un bastón Gram negativo, aerobico y reprodujo la sintomatología al ser inoculada sobre plantas de sorgo. De acuerdo a las pruebas bioquímicas, fisiológicas y microscopía electrónica, la bacteria en estudio fue identificada como *Pseudomonas andropogonis*.

Palabras claves adicionales: Bacteria, *Sorghum bicolor*.

ABSTRACT

Hernández, J., Hernández, Y., Garrido, M.J. y Trujillo, G.E. 1992. Identification of bacterial leaf stripe of sorghum caused by *Pseudomonas andropogonis* in Venezuela. Fitopatol. Venez. 5:13-16

On different sorghum (*Sorghum bicolor*) samples from the experimental field of the Agronomy Faculty, Universidad Central de Venezuela, suspected symptoms of bacterial infection were observed. They were confined to the leaves and stems. The lesions were humid, dark green and later red-brown of 1 cm of extension at the beginning, but later red stripes were formed through all the leaves extensions. From the studied samples, a bacterial colony was consistently isolated that could be observed in the culture media 6-7 days after sowed. It was rounded, of 1 mm of diameter, smooth raised, bright and translucent. The bacterium was rod shaped, Gram negative, and aerobic. The symptomatology was reproduced when the bacteria was inoculated on sorghum plants. According to biochemical, physiological and electron microscopic test, the agent was identified as *Pseudomonas andropogonis*.

Additional key words: Bacterium, *Sorghum bicolor*.