Patógenos fúngicos detectados recientemente sobre plantas ornamentales en Galicia

B. González, C. Rial, O. Aguín, C. Pintos y J. P. Mansilla
Estación Fitopatolóxica do Areeiro, Deputación de Pontevedra, Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra, España. bgpenalta@efa-dip.org

Palabras clave: ornamentales leñosas, palmeras, *Fusarium oxysporum* f.sp. *canariensis*, *Cylindrocladium ilicicola*, *Phytophthora ilicis*

Resumen

La Estación Fitopatolóxica do Areeiro recibe muestras de numerosas ornamentales leñosas cultivadas en Galicia, identificándose, entre otros, patógenos fúngicos. La identificación se realiza mediante la combinación de técnicas morfológicas y moleculares (PCR anidada, PCR específica, secuenciación con primers universales ITS1-ITS4). De este modo se han detectado, en años anteriores, hongos de cuarentena como *Ciborinia camelliae* y *Phytophthora ramorum*. En este trabajo se recogen hongos patógenos recientemente identificados sobre este tipo de plantas en Galicia. En *Phoenix canariensis* se ha detectado la presencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *canariensis*. En ornamentales leñosas, se detectó *Taphrina coerulescens* en hojas de *Quercus rubra*; *Didymascella thujina* sobre hojas de *Thuja plicata*; *Cylindrocladium ilicicola* y *Phytophthora ilicis* sobre hojas de *Ilex* sp.; y *Phoma glomerata* y *Volutella buxi* en hojas de *Buxus sempervirens*. *Phytophthora foliorum*, citado recientemente sobre hojas de azalea, ha sido aislado de la raíz de azalea.

INTRODUCCIÓN

Las especies ornamentales leñosas, sean árboles propiamente dichos o arbustos que puedan alcanzar porte arbóreo, así como especies ornamentales herbáceas de porte arbóreo (palmeras), son muy utilizadas como ornato en zonas públicas y privadas en Galicia. Se utilizan como plantas decorativas la camelia, el viburno, el rododendro, el acebo, el boj y palmeras como *Phoenix canariensis*. La tuya aparece como sistema de barrera física o contra el ruido. Árboles como el roble americano permiten tener sombra en los meses veraniegos y disponer de luz en invierno.

La presencia de las plantas ornamentales leñosas en todos estos lugares implica la necesidad de conocer su estado fitosanitario, para evitar daños importantes en las mismas y pérdidas económicas, tanto en los lugares de producción como en los de colocación. En la Estación Fitopatolóxica do Areeiro (EFA) se utilizan técnicas morfológicas y moleculares que permiten la identificación de patógenos fúngicos, incluidos algunos de cuarentena.

En este trabajo se comunican hongos patógenos detectados recientemente sobre plantas ornamentales muy utilizadas en Galicia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el año 2007 se recibieron, en la EFA, muestras de *Phoenix canariensis* Hort. ex J.B. Chabaud, *Quercus rubra* L., *Thuja plicata* Donn ex D. Don, *Ilex* sp., *Buxus sempervirens* L. y *Rhododendron* sp. que presentaban daños que podían ser debidos a algún patógeno fúngico. Los síntomas observados fueron: manchas oscuras a lo largo de las hojas y aspecto debilitado en palmera; deformaciones muy marcadas tipo abolladura en hojas

jóvenes de roble americano; escamas foliares afectadas de color castaño brillante y que destacaban sobre las no afectadas y verdes en tuya; manchas foliares, en un caso circulares muy definidas en haz y envés, y en otro manchas marrones difusas en el ápice de la hoja en plantas de acebo de diferente procedencia; hojas anaranjadas o rojizas con ramillos defoliados y pérdida de corteza en unas plantas de boj, y hojas con los ápices amarillos en otras plantas de boj; y zonas necrosadas en la raíz de azalea.

A partir de estas muestras, para el aislamiento e identificación de los patógenos, se emplearon dos técnicas: cámara húmeda y siembra en medios de cultivos. La cámara húmeda consistió en mantener las muestras en condiciones de humedad y temperatura controladas (90% de humedad, 22ºC) entre 2-5 días, tras lo cual se observaron primero bajo microscopio estereoscópico, y después se realizaron preparaciones para microscopía óptica, observándose características morfológicas para identificar el hongo. Esto se aplicó a las hojas de roble americano, a las escamas foliares de la tuya, a una de las muestras de acebo, y a las hojas y ramillos de los bojes.

De las hojas de palmera y acebo, y de raíces de azalea, se sembraron trozos de la línea de avance de las lesiones en medio de cultivo general PDA (Potato Dextrose Agar), incubándose en estufa entre 20-25ºC. El micelio se repicó a medios de cultivo selectivos K, CLA y V8 (Komada, Carnation Leaf Agar, V8-agar, respectivamente), donde se estudiaron las características morfológicas, complementándose con diferentes técnicas moleculares, para la identificación fúngica.

En el caso de zonas necróticas de la raíz de azalea y hojas de acebo con manchas marrones, tras la siembra y posterior repicado en V8 agar, se observó un crecimiento micelial típico de *Phytophthora* sp.. Para estimular la producción de esporangios, discos cortados de micelio, procedentes del borde de la colonia, se sumergieron en extractos filtrados de suelo no estéril y se incubaron a 20ºC bajo luz día. Transcurridas 48 horas se estudiaron sus características.

En el caso de las manchas circulares de acebo, se sembraron en PDA, proporcionando aislados que se transfirieron a medio CLA y se incubaron a 25ºC bajo luz ultravioleta cercana, examinándose a los 7 días, y considerando para la identificación sólo el hongo que crecía sobre la hoja de clavel.

El análisis molecular se realizó a partir de micelio aislado en medios de cultivo sobre celofán. La extracción del ADN se llevó a cabo utilizando el EZNA fungal DNA miniprep kit. La amplificación se hizo mediante diferentes combinaciones de cebadores: ITS1, ITS4 e ITS6 (White et al., 1990), DC6 (Cooke et al., 2000) y HK66-HK67 (Plyler et al., 1999). Los fragmentos obtenidos durante la amplificación se purificaron y secuenciaron, y las secuencias se analizaron en la base de datos del NCBI utilizando la aplicación BLAST.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las zonas dañadas de las hojas de palmera, repicadas a K y CLA, se obtuvieron macroconidios de longitud media, falcados y en general con tres septos, microconidios aseptados y ovoides en falsas cabezas sobre monofiálidas cortas, y presencia de abundantes clamidosporas, que corresponden a las características morfológicas de *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Zinder & Hansen (Summerell et al., 2002). Con la amplificación de los cebadores HK66-HK67, se obtuvo un fragmento de ADN de 567 pares de bases, que se corresponde con lo esperado para *F. oxysporum* f.sp. *canariensis*. La secuenciación del fragmento obtenido confirmó esta identificación.

Las hojas de roble americano presentaban deformaciones muy marcadas tipo abolladura, especialmente en las hojas más jóvenes. Estas deformaciones eran aisladas al inicio de la colonización y se juntaban con el tiempo, provocando el enrollamiento de la hoja y su caída prematura. De este tejido se aisló un ascomiceto que presentaba ascas libres, de aspecto columnar, tamaño entre 42-81 x 14-26 µm, con 8 ascosporas hialinas, globosas y aseptadas, correspondientes a *Taphrina coerulescens* (Desm. & Mont.) Tul.

En los ramillos de tuya se observaron escamas foliares de color castaño brillante mezcladas entre las sanas de color verde, en las que se podían distinguir puntos negros u oquedades, por presencia o caída de los apotecios respectivamente (Stone, 1997). Los apotecios estaban cubiertos por una solapa epidérmica vegetal, y en su interior había paráfisis filiformes y ascas clavadas, de tamaño entre 78-99 x 17-18 µm, con dos ascosporas ovoides, de pared gruesa, unicelulares e hialinas las más jóvenes y oscuras y tabicadas en dos células de distinto tamaño las más viejas, identificativas de *Didymascella thujina* (Durand) Maire.

En el envés de las manchas circulares y de límite bien definido de acebo, después de disponerlas en cámara húmeda, se desarrolló un micelio blanquecino que bajo microscopio estereoscópico mostraba conidióforos y conidias del género *Cylindrocladium* (Crous, 2002). El crecimiento fúngico en el medio CLA proporcionó los rasgos morfológicos siguientes: estipe y prolongación del estipe hialinos, rectilíneos, septados, y de paredes finas; la longitud del estipe desde su base hasta el punto de inserción con el aparato conidiogénico fue de 54-81 µm (media 67 µm) y desde ahí hasta la vesícula de 109-226 µm (media 168 µm). Esta vesícula apical, de carácter taxonómico, era hialina, con formas desde ovoide a elipsoidal a obpiriforme a espatulada, y diámetro de 6-11 µm. El ADN amplificado y secuenciado con los primers ITS1 e ITS4 mostró una homología del 98-99% con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI para *Cylindrocladium ilicicola*. Los estudios morfológicos y moleculares identificaron el hongo como *C. ilicicola* (Hawley) Boedijn & Reitsma.

De los fragmentos de hojas de acebo con manchas marrones sembrados en V8 agar, se observó, tras cinco días, un crecimiento micelial típico de *Phytophthora* sp. El micelio era aseptado, cenocítico, con hifas de más de 10 µm de ancho. No se observaron clamidosporas. Los esporangios, producidos en medio líquido, eran semipapilados, caducos, con pedicelos de 5-15 µm, ovoides y ovopiriformes. Su tamaño era de 23-55 x 18-30 µm, con una relación longitud/anchura media de 1,22-2,24. Las zoosporas se descargaban a través de un poro cuyo ancho medio era de 5-7 µm. Se trataba de una especie homotálica, con oogonios esféricos con un diámetro medio de 23 µm. Los anteridios eran anfiginos. La amplificación mediante PCR anidada con las parejas de cebadores ITS 4-DC6 e ITS4-ITS6 y posterior secuenciación determinó una homología del 98-99% con *Phytophthora ilicis*.

Sobre los ramillos de boj aparecieron numerosas masas de color rosáceo, formadas por conidioforos simples a modo de empalizada compacta, portando conidias hialinas unicelulares, con forma de ovoide a oblonga, que permitió identificar a *Volutella buxi* (Corda) Berk. En las hojas de boj de color amarillo pajizo se desarrollaron picnidios negros con conidias, correspondientes a *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel.

De las zonas necrosadas de la raíz de azalea sembradas en V8 agar, se observó un crecimiento micelial típico de *Phytophthora* sp., con micelio aseptado, esporangios semipapilados, ovoides y caducos con pedicelos cortos. Era un especie homotálica, con oosporas esféricas, pleróticas y anteridios mayoritariamente paraginos. No se observaron clamidosporas. El ADN amplificado y secuenciado mediante PCR anidada con las parejas

de cebadores ITS4-DC6 e ITS4-ITS6 mostró una homología del 99% con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI para *Phytophthora foliorum.* La combinación de las características morfológicas y moleculares nos permitieron identificar esta especie como *P. foliorum* Donahoo & Lamour (Donahoo et al., 2006).

La importancia de los hongos patógenos detectados, expuestos en este trabajo, radica fundamentalmente en la alteración del valor estético que sus daños provocan. La mayoría dan lugar a la aparición de manchas foliares, como es el caso de *C. ilicicola, V. buxi, P. glomerata, D. thujina* y *P. ilicis*, o deformaciones, como las causadas por *T. coerulescens,* las cuales alteran el valor ornamental de las plantas afectadas, estando todos ellos ampliamente distribuidos por los jardines gallegos. Como excepción a esta premisa cabe destacar la identificación de *P. foliorum*, nueva especie del género *Phytophthora* aislada recientemente sobre hojas de azalea, que nosotros hemos identificado en las raíces de ese cultivo, así como la primera detección en Galicia, sobre palmera, de *F. oxysporum* f.sp. *canariensis*, muy próximo taxonómicamente a *F. oxysporum* f.sp. *albedinis*, que causa la temida enfermedad de cuarentena conocida como Bayoud, diferenciándose ambas formas especiales exclusivamente por técnicas moleculares, como queda detallado en este trabajo, y ante las cuales solo caben medidas profilácticas estrictas de erradicación que eviten su diseminación.

La mejora de las condiciones de cultivo, la toma de conciencia del sector viverístico hacia la utilización de un material de propagación y venta en condiciones fitosanitarias idóneas, así como la toma de medidas, fundamentalmente preventivas, de control evitarán en la medida de lo posible la dispersión de estas patologías.

Referencias

Cooke, D.E.L, Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. and Brasier, C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Genet. Biol. 30: 17-32.

Crous, P.W. 2002. *Calonectria pyrochroa* (Desm.) Sacc. p. 146-148. En: Taxonomy and Pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and Allied Genera. APS Press, USA.

Donahoo, R., Blomquist, C.L., Thomas, S.L., Moulton, J.K., Cooke, D.E.L. and Lamour, K.H. 2006. *Phytophthora foliorum* sp. nov., a new species causing leaf blight of azalea. Mycol. Res. 110: 1309-1322.

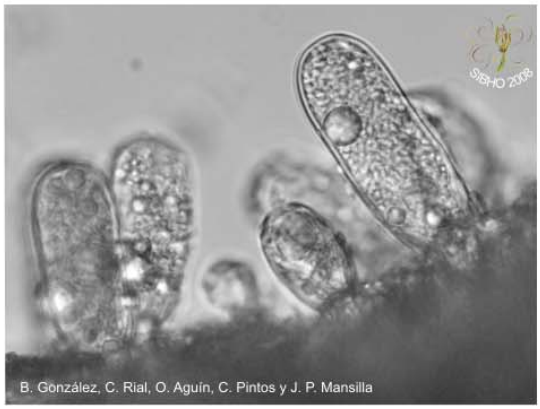
Plyler, T.R., Simone, G.W., Fernandez, D., Kistler, H.C. 1999. Rapid detection of the *Fusarium oxysporum* lineage containing the Canary Island date palm wilt pathogen. Phytopathology 89: 407-413.

Stone, J. 1997. Foliage diseases of other conifers: Cupressaceae. p. 62-63. En: E. M. Hansen and K. J. Lewis (eds.), Compendium of conifer diseases. APS Press, USA.

Summerell, B.A., Kistler, H.C. and Gunn, L.V. 2002. Fusarium wilt of *Phoenix canariensis* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*. p. 263-270. En : B.A. Summerlle, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, and L.W. Burgess (eds.), Fusarium. APS Press, USA.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322 En: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Síntoma de *Taphrina coerulescens* en envés foliar de Quercus rubra.



Ascas de *Taphrina coerulescens*.

Síntomas de *Didymascella thujina* en ramillos de *Thuja* sp.

Síntomas de *Cylindrocladium ilicicola* en haz foliar de *Ilex* sp.

Esporangio y anteridio anfigino de *Phytophthora ilicis*.

Patógenos fúngicos detectados recientemente sobre plantas ornamentales en Galicia
B. González, C. Rial, O. Aguín, C. Pintos y J. P. Mansilla