Hongos asociados a patologías en plantaciones cubanas de eucalipto

Fungi associated with pathologies on cuban eucalyptus plantations

Einar Martínez de la Parte, Michel Pérez Miranda y José Antonio Díaz

Departamento de Fitopatología y Diagnóstico, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5ta. B y 5ta. F, Playa, La Habana, C. P. 11600, emartinez@inisav.cu.

RESUMEN

En Cuba se considera cada vez más al eucalipto como una de las especies forestales más importantes. Por su rápida y alta producción de biomasa, es apta para una amplia variedad de usos. En el país, en los últimos años se han incrementado las áreas dedicadas a su cultivo. A pesar de esto existen pocos registros de la incidencia de hongos fitopatógenos en plantaciones cubanas de eucalipto. El objetivo del presente trabajo fue identificar especies de hongos asociadas a patologías presentes en estas plantaciones. Se muestrearon plantaciones de E. saligna *en Pinar del Rio,* E. grandis *en Santiago de Cuba y de* Eucalyptus *sp. en Ciego de Ávila. Se colectaron muestras de tallo, ramas y hojas con diferentes sintomatologías. Estas muestras fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCL, 1-3 %) y colocadas en cámaras húmedas. Para el aislamiento de hongos fitopatógenos, secciones de tejido simpatomático desinfectadas, fueron sembradas en placas con Agar Agua (2 %) y PDA suplementados con sulfato de estreptomicina (100 µg/mL). A partir de las diferentes patologías se identificaron 10 especies fúngicas. En tallos con síntomas de cáncer se encontró* Acremonium *sp.,* Crysoporthe cubensis, Graphium *sp. y* Lasiodiplodia theobromae*; en ramas con cáncer o tizón se identificó a* Cryptosporiopsis eucalypti, L. theobromae *y* Pestalotiopsis guepinii, *mientras que* Coniella fragariae, Cryptosporiopsis eucalypti, Kirramyces epicoccoides, Pestalotiopsis disseminata *y* Phomopsis eucalipti *estuvieron asociados a manchas foliares.*

Palabras claves: *Crysoporthe cubensis, Cryptosporiopsis, Kirramyces, Lasiodiplodia theobromae, Pestalotiopsis disseminata*

ABSTRACT

In Cuba, eucalyptus are considered as one of the most important forest species. Because of it rapid and high biomass production, it is suitable for a wide range of uses. During last years, areas dedicated to their cultivation are increasing within the country. Despite this there are few records of the incidence of phytopathogenic fungi on Cuban plantations of eucaliptus. The aim of this work was to identify fungal species associated to pathologies present in these plantations. Plantations of E. saligna *in Pinar del Río,* E. grandis *in Santiago de Cuba and* Eucalyptus *sp.in Ciego de Ávila were sampled. Samples of stems, branches and leafs with different symptomatologies were collected, disinfected with sodium hypochlorite (NaOCL, 1-3 %), and placed in humid chambers. For fungal isolation, sections of disinfected symptomatic tissues were placed in Water Agar (2 %) and Potato Dextrose Agar plates supplemented with streptomycin sulphate (100 µg/mL). From the different pathologies ten fungal species were identified. On stems with canker symptoms* Acremonium *sp.,* Crysoporthe cubensis, Graphium *sp. and* Lasiodiplodia theobromae *were detected; on branch with canker or blight* Cryptosporiopsis eucalypti, L. theobromae *and* Pestalotiopsis guepinii *were identified. While* Coniella fragariae, Cryptosporiopsis eucalypti, Kirramyces epicoccoides, Pestalotiopsis disseminata *and* Phomopsis eucalypti *were associated with foliar spots.*

Key words: *Crysoporthe cubensis, Cryptosporiopsis, Kirramyces, Lasiodiplodia theobromae, Pestalotiopsis disseminata*

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Eucalyptus* son en su mayoría nativas de Australia, pero debido a su importancia económica han sido plantadas intensivamente fuera de su centro de origen (Barradas *et al*., 2016). En 2009 el área mundial sembrada con *Eucalyptus* sobrepasaba los 20 millones de hectáreas, siendo Brasil, la India y China los tres países con mayores plantaciones (Iglesias-Trabad *et al*., 2009).

En Cuba se considera al eucalipto como una de las especies forestales más importantes. Por su rápida y alta producción de biomasa, es apta para una amplia variedad de usos como son madera para aserrío y para pulpa, producción de papel, paneles aglomerados, postes, producción de leña y cujes para la cosecha del tabaco (Jiménez-Terry y Agramonte, 2013), lo que ha determinado en los últimos años el incremento de las

Recibido: 2/10/2016
Aceptado: 19/12/2016

áreas dedicadas a su cultivo. A pesar de esto, existen pocos registros de la incidencia de hongos fitopatógenos en plantaciones cubanas de eucalipto. El objetivo del presente trabajo fue identificar especies de hongos asociadas a patologías presentes en estas plantaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon plantaciones de *E. saligna* en Pinar del Río, *E. grandis* en Santiago de Cuba y de *Eucalyptus* sp. en Ciego de Ávila. Se colectaron muestras de tallo, ramas y hojas con diferentes sintomatologías. En el laboratorio las muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl, 1-2 %), lavaron con agua destilada estéril, colocaron en cámaras húmedas e incubaron bajo alternancia de luz/oscuridad a una temperatura entre 25-28 °C.

Se sembraron secciones del tejido vegetal afectado en placas con agar agua (2 %, Applichem) y agar papa dextrosa (PDA, 39 g/L, BIOCEN) suplementados con sulfato de estreptomicina (100 µg/mL). Las colonias obtenidas se transfirieron para su caracterización a placas con PDA y con agar extracto de malta (AEM, 48 g/L, BioCen).

A partir del crecimiento fúngico desarrollado en las cámaras húmedas y las placas con medio de cultivo, se realizaron preparaciones fijas en lactofenol + azul algodón (Merck Millipore), las cuales fueron observadas bajo el microscopio óptico (Carl Zeiss, modelo Axioskop 40, a 40x y 100x). Los diferentes aislados se caracterizaron morfológicamente y se identificaron de acuerdo a los criterios taxonómicos descritos por Mordue (1971), Old *et al.* (2003), Gryzenhout *et al.* (2004), Crous *et al.* (2006; 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de plantas de *Eucalyptus* spp. con síntomas de cáncer en el tallo y/o ramas, rajadura de tallos y ramas, tizón de ramas y manchas foliares, se identificaron 10 especies fúngicas (*Tabla 1*). De estas, ocho son patógenos reconocidos del eucalipto que bajo determinadas condiciones pueden causar afectaciones tanto en viveros como en plantaciones.

Chrysoporthe cubensis (sinónimo de *Cryphonectria cubensis* (Bruner) Hodges, *Diaporthe cubensis* Bruner) fue detectado en árboles de *Eucalyptus* spp. de las provincias de Pinar del Río, Ciego de Ávila y Santiago de Cuba (*Tabla 1*). El primer registro mundial de *C. cubensis* como agente causal de cáncer en eucalipto fue realizado por S. C. Bruner (1917), quien describió la sintomatología presente en árboles cubanos y a su agente causal (Old *et al.*, 2003; Gryzenhout *et al.*, 2004). Posteriormente esta especie ha sido informada en Cuba sobre árboles de *Eucalyptus botryoides* Sm., *E. grandis, E. resinifera* Sm., *E. saligna* y *E. urophylla* ubicados en La Habana (Camino-Vilaró *et al.*, 2006; Gryzenhout *et al.*, 2006; 2009), Sancti Spíritus y Camagüey (López *et al.*, 2003). El cancro del eucalipto causado por el hongo *Chrysoporthe* spp. es una de las enfermedades más importantes en plantaciones establecidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Winfield, 2003; Gryzenhout *et al.*, 2009). Actualmente, *C. cubensis* presenta una amplia distribución mundial (Gryzenhout *et al.*, 2004; 2006; Farr y Rossman, 2017), y el cáncer del tallo causado por *C. cubensis* constituye una de las principales patologías de las plantaciones de eucalipto en todo el mundo. La infección en árboles jóvenes puede conducir rápidamente a la muerte de los mismos y en los más viejos produce el debilitamiento del tallo (Chen *et al.*, 2010).

Tabla 1. Especies fúngicas detectadas asociadas a patologías en plantaciones de *Eucalyptus* spp.

Especie	*Tronco*	*Ramas*	*Hojas*
E. grandis	*Acremonium* sp., *Crysoporthe cubensis, Graphium* sp., *Lasiodiplodia theobromae* y *Pestalotiopsis guepinii*	*Cryptosporiopsis eucalypti, L. theobromae* y *Pestalotiopsis guepinii*	*Coniella fragariae, C. eucalypti, Kirramyces epicoccoides, Pestalotiopsis disseminata* y *Phomopsis eucalipti*
E. saligna	*Acremonium* sp., *C. cubensis* y *L. theobromae*	*L. theobromae* y *P. guepinii*	*C. fragariae, K. epicoccoides, P. disseminata* y *P. eucaliptii*
Eucalyptus sp.	*Acremonium* sp., *C. cubensis* y *Pestalotiopsis guepinii*	*P. guepinii*	*C. fragariae* y *P. eucaliptii*

Los eucaliptos son hospedantes de un amplio rango de especies de Botryosphaeriaceae. Estas especies causan varios síntomas en los eucaliptos, pero los más frecuentes son muerte regresiva de brotes y ramas, cáncer del tallo seguido por exudación de quino y en casos más severos la muerte del árbol hospedante (Slippers *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011). Hasta la fecha, dentro de la familia Botryosphaeriaceae se han identificado 17 géneros, siendo *Lasiodiplodia* uno de los más importantes (Phillips *et al.*, 2013).

En el presente estudio se detectó a *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffiths & Maubl asociada a árboles de *E. grandis* y *E. saligna* con síntomas de cáncer en tallo y en las ramas. Esto coincide con lo informado por Li *et al.* (2015), quienes detectaron la presencia de *L. theobromae* como agente causal de cáncer en ramas de *E. urophylla x grandis* cultivada en China. Sin embargo, en el futuro deben llevarse a cabo estudios moleculares para descartar la presencia de otras especies de *Lasiodiplodia* en plantaciones de eucalipto.

Se detectó en la provincia de Santiago de Cuba *Kirramyces epicoccoides* (sinónimo de *Teratosphaeria suttonii* (Crous & M.J. Wingf.) Crous & U. Braun; *Phaeophleospora epicoccoides* (Cooke & Massee) Crous, F.A. Ferreira & B. Sutton) asociado a manchas de color púrpura y tamaño variable en hojas de *E. grandis* (*Fig. 1 A* y *B*). A pesar de que este patógeno está ampliamente distribuido en todas las zonas geográficas donde se cultivan eucaliptos (Old *et al.*, 2003), no existen informes anteriores de su presencia en el país (Camino-Vilaró *et al.*, 2006; Farr y Rossman, 2017). Esta especie puede afectar tanto a viveros como plantaciones adultas, pero su mayor importancia la tiene en los viveros de eucalipto, donde puede llegar a causar defoliaciones severas (Keane, 2000; Old *et al.*, 2003).

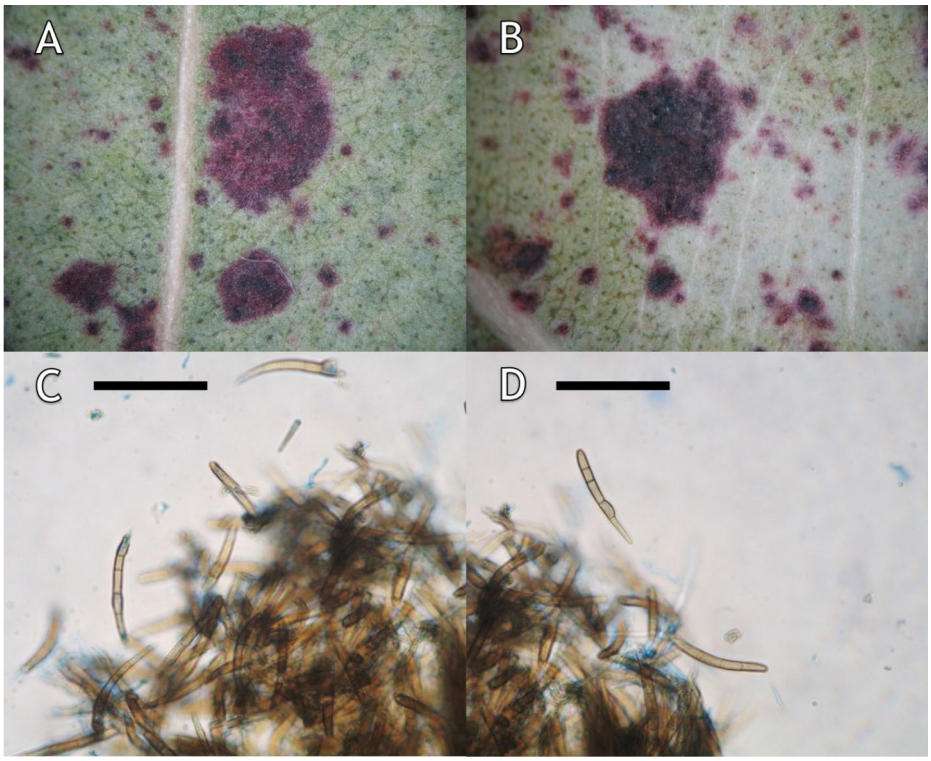

Figura 1. Manchas foliares en *E. grandis* causada por *Kirramyces epicoccoides*. A y B: manchas de color púrpura y tamaño variable, C y D: conidios de *K. epicoccoides*. Barra = 50 µm.

Existen otras dos especies de *Kirramyces* que afectan a los eucaliptos en diferentes países. Estas son *Kirramyces eucalypti* (Cooke & Massee) J. Walker, B. Sutton & Pascoe (sin. *Teratosphaeria eucalypti* (Cooke & Massee) Crous) y *Kirramyces destructans* M.J. Wingf. & Crous (sin. *Teratosphaeria destructans* (Wingfield & Crous) Wingfield & Crous). *K. eucalypti* ha sido informada afectando árboles de *E. saligna* en la provincia de Granma (Camino-Vilaró *et al.*, 2006), pero no existen registros de la incidencia de *K. destructans*

en Cuba, cuya distribución geográfica se limita al sudeste asiático (Farr y Rossman, 2017). Estas tres especies pueden diferenciarse por la morfología de sus conidios. *K. epicoccoides* presenta conidios cilíndricos, ligeramente curvados, multiseptados (frecuentemente más de cuatro septos) (*Fig. 1 B* y *C*). Los conidios de *K. eucalypti* son curvos, de tamaño variable y generalmente tienen un septo, mientras que los de *K. destructans* presentan tres septos, son finos curvos o de forma sinuosa (Old *et al.*, 2003).

La presencia de *Phomopsis eucaliptii* Zerova estuvo asociada a manchas foliares irregulares, inicialmente pequeñas, pero que coalescen y forman lesiones de color pardo y variables en tamaño. En algunas especies de eucalipto, *P. eucaliptii* puede llegar a causar defoliaciones severas (Keane, 2000).

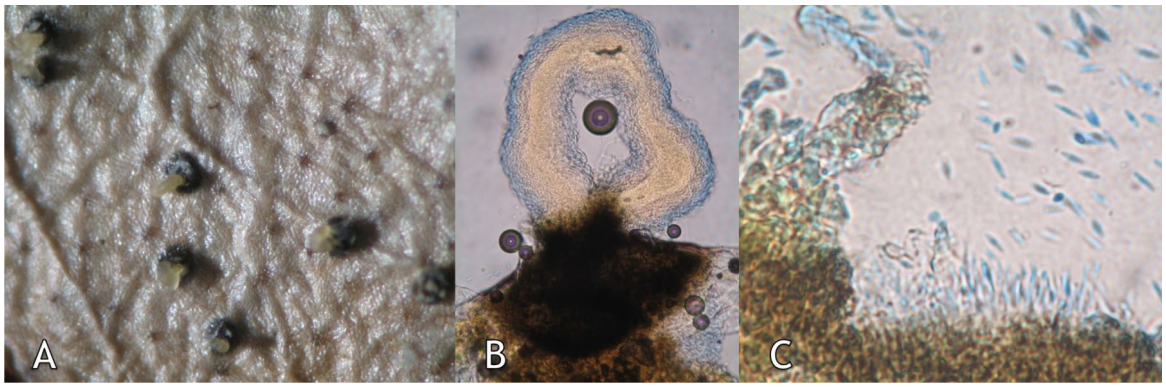

Figura 2. Phomopsis eucaliptii. A: picnidios con cirros sobre superficie foliar, B: picnidio con cirro de α-conidios al microscopio óptico (40x) y C: conidios y células conidiógenas.

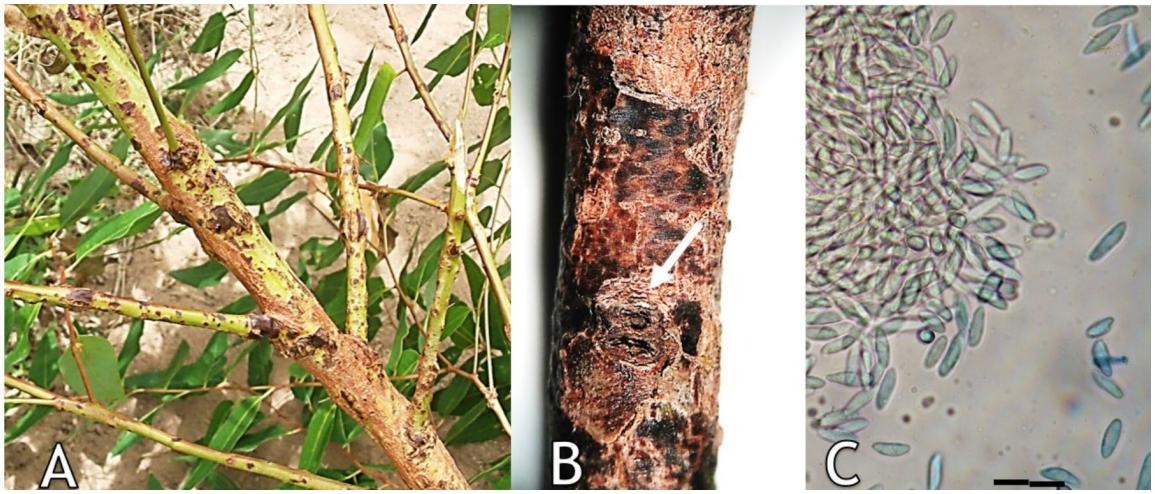

Figura 3. Cryptosporiopsis eucalypti. A: tizón en rama de *E. grandis*, B: chancro en rama de *E. grandis*, C: conidios. Barra = 40 µm.

Cryptosporiopsis eucalypti Sankaran & B. Sutton se detectó asociado a ramas con síntomas tizón y cáncer (*Fig. 3*), así como a manchas foliares en árboles de *E. grandis* en la provincia de Santiago de Cuba. Esta especie ha sido informada en numerosos países como agente causal de manchas foliares, tizón de ramas y cáncer del tallo en varias especies de *Eucalyptus*, principalmente en trópicos húmedos (Keane, 2000; Old *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta el presente no existen informes previos de su presencia en Cuba (Camino-Vilaró *et al.*, 2006; Farr y Rossman, 2017). Las manchas foliares causadas por *C. eucalypti* tienen una alta incidencia en eucaliptos cultivados en Brasil y están frecuentemente asociadas a daños por insectos o por el viento (Keane, 2000).

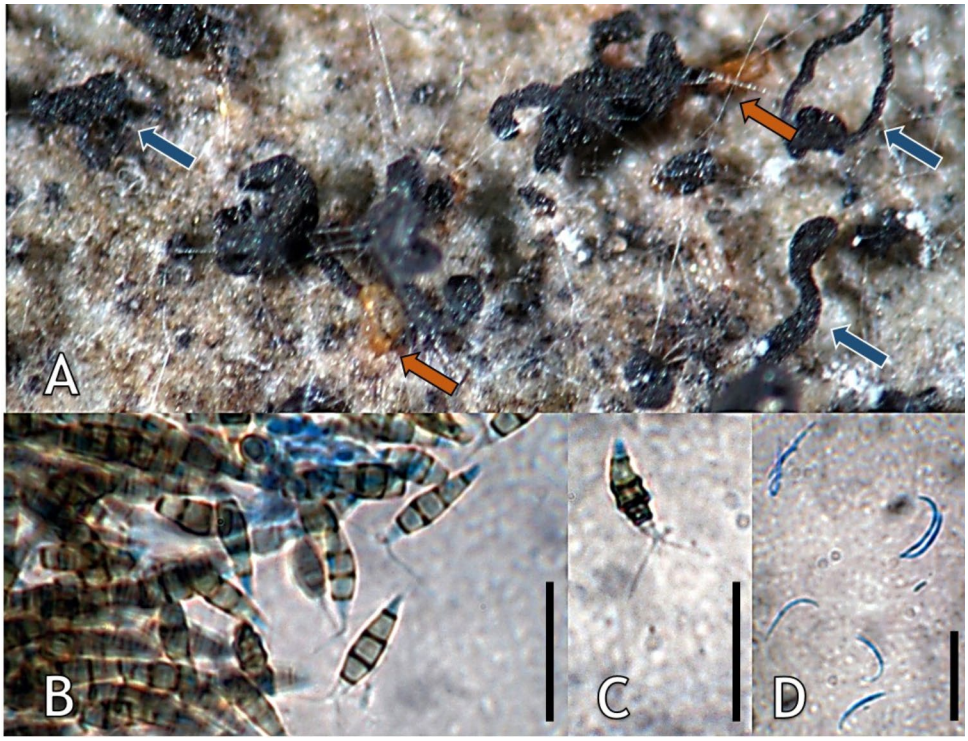

Figura 4. Pestalotiopsis disseminata. A: síntomas, B: cirros de alfa (negros) y beta (crema) conidios sobre superficie foliar, C y D: alfa-conidios, E: beta-conidios filiformes. Barra = 15 µm.

En las muestras analizadas se detectaron dos especies de *Pestalotiopsis*, *P. guepinii* (Desm.) Steyaert y *P. disseminata* (Thüm.) Steyaert. La primera estuvo asociada con árboles que presentaban síntomas de cáncer en el tallo o con rajaduras en tallo y/o ramas. *P. guepinii* es un organismo endófito común en *Eucalyptus* spp. (Alonso *et al*., 2009) y otras especies de árboles cultivados en zonas tropicales y templadas (Alonso *et al*., 2009; Farr y Rossman, 2017). La segunda especie, *Pestalotiopsis disseminata* fue detectada en hojas con manchas cloróticas de *E. saligna* de Pinar del Río y de *E. grandis* de Santiago de Cuba. En Cuba esta especie había sido informada previamente sobre *E. saligna* en la provincia de Granma (Camino-Vilaró *et al*., 2006; Farr y Rossman, 2017). Se caracteriza por la producción sobre la superficie foliar colonizada, de cirros negros (alfa-conidios típicos de *Pestalotiopsis*) y cirros de color crema (beta-conidios) (Crous *et al*., 2006), que fueron observados durante el presente estudio (*Fig. 4*). Este patógeno se transmite a través de la semilla y puede llegar a causar afectaciones severas en los semilleros, donde puede provocar la muerte de hasta el 10 % de las plantas (Keane, 2000).

En todos los árboles muestreados se detectó a *Coniella fragariae* (Oudem.) B. Sutton asociada a manchas foliares de forma circular, de color grisáceo a pardo rojizo. Las hojas sobre las cuales se detectaron estas manchas presentaban curvaturas en el margen de las mismas. Informes previos realizados en el país mencionan a *Coniella* sp. afectando árboles de *Eucalyptus* sp. en la provincia de Granma (Camino-Vilaró *et al*., 2006). Esta es la primera vez que se identifica a *C. fragariae* asociada a manchas foliares de *Eucalyptus* spp. en las provincias de Pinar del Río, Ciego de Ávila y Santiago de Cuba. *C. fragariae* es un patógeno foliar que afecta al eucalipto en numerosos países (Keane, 2000; Old *et al*., 2003; Farr y Rossman, 2017). Tiene incidencia tanto en viveros como en plantaciones. Se plantea que sus infecciones, que se ven favorecidas por altas temperaturas y humedades relativas, ocurren posterior al daño por insectos o a la infección por la roya del eucalipto (*Puccinia psidii* G.Winter) o de otros patógenos (Keane, 2000).

Existen otras especies de *Coniella* que afectan *Eucalyptus* spp. en otros países como son *C. australiensis* Petrak, *C. minima* B. Sutton & Thaung y *C. petrakii* B. Sutton (Keane, 2000; Old *et al*., 2003), las cuales pueden ser diferenciadas por la forma de sus conidios (Old *et al*., 2003).

En el futuro es necesario continuar con este tipo de estudios en los cuales se analicen muestras de diferen-

tes *Eucalyptus* spp., de diferentes regiones del país, para conocer la biodiversidad de hongos asociada a estas especies.

CONCLUSIONES

- En tallos con síntomas de cáncer se encontró a *Acremonium* sp., *Chrysoporthe cubensis, Graphium* sp., *Lasiodiplodia theobromae* y *Pestalotiopsis guepinii*.
- Asociados a ramas con cáncer o tizón o con rajaduras, se identificó a *Cryptosporiopsis eucalypti*, *L. theobromae* y *P. guepinii*.
- Las especies fúngicas asociadas a manchas foliares fueron *Coniella fragariae*, *Cryptosporiopsis eucalypti*, *Kirramyces epicoccoides*, *Pestalotiopsis disseminata* y *Phomopsis eucalypti*.

REFERENCIAS

Alonso, R.; S. Tiscornia; A. Couto Alfenas; L. Bettucci: "Fungi associated to bark lesions of *Eucalyptus globulus* stems in plantations from Uruguay", *Revista Árvore,* 2009, 33 (4): 591-597.

Barradas, C.; A. J. L. Phillips; A. Correia; E. Diogo; H. Bragança; A. Alves: "Diversity and potential impact of Botryosphaeriaceae species associated with *Eucalyptus globulus* plantations in Portugal", *European Journal of Plant Pathology*, 2016.

Chen, S. E.; M. Gryzenhout; L. Roux; Y. J. Xie; M. J. Wingfield; X. D. Zhou: "Identification and pathogenicity of *Chrysoporthe cubensis* on *Eucalyptus* and *Syzygium* spp. in South China", *Plant Dis*., 2010, 94:1143-1150.

Chen, S. F.; D. Pavlic; J. Roux; B. Slippers; Y. J. Xie; M. J. Wingfield; X. D. Zhou: "Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation-grown *Eucalyptus* species in South China", *Plant Pathology*, 2011, 60, 739-751.

Crous, P. W.; A. Giraldo; D. L. Hawksworth; V. Robert; P. M. Kirk; J. Guarro; B. Robbertse; C. L. Schoch; U. Damm; T. Trakunyingcharoen; J. Z. Groenewald: "The Genera of Fungi: fixing the application of type species of generic names", *IMA Fungus* 2014, 5(1):141-160.

Crous, P. W.; G. J. M. Verkley; J. Z. Groenewald: "*Eucalyptus* microfungi known from culture. 1. *Cladoriella* and *Fulvoflamma* genera nova, with notes on some other poorly known taxa", *Stud. Mycol.,* 2006, 55(1):53-63.

Farr, D. F.; A. Y. Rossman: "Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology", 2017, Laboratory, ARS, USDA, http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/.

Gryzenhout, M.; H. Myburg; N. A. van der Merwe; B. D. Wingfield; M. J. Wingfield: "*Chrysoporthe*, a new genus to accommodate *Cryphonectria cubensis*", *Studies in Mycology*, 2004, 50:119-142.

Gryzenhout, M.; C. A. Rodas; J. Mena Portales; P. Clegg; B. D. Wingfield; M. J. Wingfield: "Novel hosts of the *Eucalyptus* canker pathogen *Chrysoporthe cubensis* and a new *Chrysoporthe* species from Colombia", *Mycol. Res*., 2006, 110: 833-845.

Gryzenhout, M.; B. D. Wingfield; M. J. Wingfield: *Taxonomy, Phylogeny, and Ecology of Bark-Inhabiting and Tree-Pathogenic Fungi in the Cryphonectriaceae*, APS Press, St. Paul, Minnesota, 2009, 119 pp.

Iglesias-Trabad, G.; R. Carbaeira-Tenreiro; J. Folgueiia-Lozano: (2009). "Eucalyptus universalis", Global cultivated eucalypt forest map Version 1.2 In: GIT Forestry Consulting's Eucalyptologics: Information resources on Eucalyptus cultivation world wide, http://www.git-forestry.com (verified Oct 19, 2009).

Jiménez-Terry, F.; D. Agramonte: "Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales", *Biotecnología Vegetal,* 2013, 13(1). Recuperado de https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/89/456.

López, R.; C. Guerra; A. Duarte; H. Cruz; A. Fernández; A. García; Y. Varela La O; M. Berrios; N. Triguero; I. Vila: "Actualización del inventario de insectos y microorganismos nocivos a las especies forestales en Cuba", *Fitosanidad*, 2003, 7(2): 3-9.

Mordue, J. E. M.: *Pestalotiopsis guepinii*, IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, Sheet N° 320, Cab International, Reino Unido, 1971.

Old, K. M.; M. J. Wingfield; Z. Q. Yuan: *A manual of diseases of eucalypts in South-East Asia,* Center for International Forestry Research, Jakarta, Indonesia, 2003, 106 pp.

Phillips, A. J. L.; A. Alves; J. Abdollahzadeh; B. Slippers; M. J. Wingfield; J. Z. Groenewald; P. W. Crous: "The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture", *Studies in Mycology*, 2013, 76, 51-167.

Slippers, B.; T. Burgess; D. Pavlic; R. Ahumada; H. Maleme; S. Mohali; C. Rodas; M. J. Wingfield: "A diverse assemblage of Botryosphaeriaceae infect Eucalyptus in native and nonnative environments", *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 2009, 71, 101-110.

Wingfield, M. J.: "Increasing threat of diseases to exotic plantation forest in the southern hemisphere: lessons from *Cryphonectria* canker", *Australasian Plant Pathology,* 2003, 32:133-139.