

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Colletotrichum* CAUSANTES DE LA PODREDUMBRE AMARGA DEL MANZANO EN LA PROVINCIA DE SANTA FE

Fernandez L.N.^{1,2}

¹CONICET, ²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral laurafernandez1@gmail.com

Área: Ingeniería

Sub-Área: Agronomía

Grupo: Y

Palabras clave: *Colletotrichum*, manzanos de bajos requerimientos de frío, Santa Fe

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente el cultivo de manzanos en Argentina estuvo restringido a las Provincias de Neuquén y Valle de Río Negro. Desde hace 15 años, el grupo de trabajo de Cultivos Intensivos de la FCA-UNL, trabaja en la adaptación de diferentes especies de frutales, como posibles fuentes de diversificación productiva y desarrollo socio-económico para la provincia de Santa Fe. Dentro de las variedades de manzanos de bajos requerimientos de frío se destacan “Caricia” (IAPAR 77; 'Anna' × 'Prima'), “Princesa” ('Anna' × 'NJ56') y “Eva” (IAPAR 75; 'Anna' × 'Gala') y su comportamiento ha demostrado ser muy auspicioso en la región (Gariglio y col., 2014).

Con la incorporación de nuevos cultivos, surgen también nuevas problemáticas, como por ejemplo, falta de conocimientos acerca de las enfermedades que los afectan. En éste sentido en el año 2014 Favaro y col., observaron en frutos de manzano una podredumbre blanda, cuyo agente causal fue identificado como *Colletotrichum* spp. Este hongo es responsable de la podredumbre amarga (PA), enfermedad detectada por primera vez en los Estados Unidos en 1867 (Sutton, 1990) y hoy común en la mayoría de zonas productoras de manzana de clima templado, donde provoca pérdidas que pueden superar el 50% (Shi y col., 1996; Agrios, 2005; Jiang y col., 2014, Velho y col., 2015).

El género *Colletotrichum* se clasificó como el octavo grupo más importante de hongos patógenos de plantas en el mundo, basado en su importancia científica y económica (Dean y col., 2012). Históricamente la identificación de las especies de *Colletotrichum* se ha basado en el uso de caracteres taxonómicos y el rango de hospedantes (Hyde y col., 2009 a, b; Freeman y col., 1998) ante esto *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* son las dos especies tradicionalmente asociadas a la PA (Sutton, 1990). Sin embargo, con el avance de las técnicas de caracterización molecular en los últimos años se han reportado nuevas especies asociadas a la enfermedad como *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae*, *C. fructicola*, *C. melonis*, *C. theobromicola*, *C. siamense* (Kou y col., 2013; Baroncelli y col., 2014; Velho y col., 2015; Munir y col., 2016). Estos adelantos hicieron que se reorganice la taxonomía del género y actualmente se considera que *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* conforman dos complejos taxonómicos, dentro de los cuales se incluyen las especies mencionadas, entre otras (Damm y col., 2012; Weir y col., 2012).

A pesar de la importancia que tienen las enfermedades ocasionadas por hongos del género *Colletotrichum* en manzanas, existen carencias de conocimiento acerca de la etiología, de las relaciones patógeno-hospedero, y de sus características epidemiológicas, lo que dificulta establecer estrategias y métodos de control eficientes (Stadnik y col., 2009). Esto resulta de interés especialmente teniendo en cuenta que las especies de *Colletotrichum* pueden diferir en la sensibilidad a los fungicidas (Saldarriaga-cardona y col., 2008; Schilder, 2003). Es importante destacar que esta enfermedad no ha sido

Proyecto: CAI+D 2016-2019 – C.P: 50020150100034LI

Director del proyecto: Favaro, Ma. Alejandra

Director del becario/tesista: Gariglio, Norberto F.

reportada en la Provincia de Santa Fe ni en Argentina, por lo cual el presente trabajo constituye la primera contribución en este sentido.

OBJETIVO

Identificar y caracterizar las especies de *Colletotrichum* causantes de la PA del manzano en la Provincia de Santa Fe a fin de proporcionar información para un manejo integrado de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se inició en la estación de crecimiento 2014-2015 de diferentes montes frutales del centro de la Provincia de Santa Fe. Se recolectaron frutos de manzana maduros con síntomas de PA de los cvs 'Caricia', 'Princesa' y 'Eva'. Las muestras se colocaron en cámaras húmedas y al término de 7 días se observó el desarrollo del signo del hongo a partir del cual se realizaron aislamientos en Agar Papa Dextrosa (APD) enmendado con sulfato de estreptomina 0,5 g.l⁻¹. Las placas fueron incubadas a $\pm 25^{\circ}\text{C}$, 12 h de fotoperiodo por 7 días. A partir de los cultivos obtenidos se realizaron aislamientos monospóricos siguiendo la técnica de Ayala-Zermeño y col (2012) modificando solo temperatura y tiempo de incubación para el género *Colletotrichum*. Los aislados fueron conservados para posteriores trabajos en papel de filtro estéril a -20°C .

Para la caracterización morfológica, discos de micelio de 5 mm de diámetro se tomaron de los bordes de colonias de 7 días de crecimiento y fueron transferidos a nuevas placas con APD e incubados a 25°C . Se estimó la tasa de crecimiento (mm/día) con intervalos de 24 horas durante 7 días a través de la lectura de las medias entre los dos diámetros perpendiculares de la colonia. Se visualizó la morfología, tamaño y color de las colonias desarrolladas y mediante preparados se realizó observación al microscopio de forma y color de 50 conidios por aislado. Se tomaron fotografías y de éstos mismos conidios se midió largo y ancho mediante el programa Image Pro3. Se utilizaron dos repeticiones por aislado y el experimento se repitió tres veces. Se calculó la media y el desvío estándar para la tasa de crecimiento, largo y ancho de conidios y apresorios.

Para la identificación molecular inicialmente se obtuvo el ADN a partir de colonias crecidas durante siete días, utilizando un protocolo de extracción de ADN de rutina (Palocci y col., 1999). Luego se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) usando los cebadores GDF y GDR (Templeton y col., 1992); el gen que codifica para β -tubulina (TUB2), usando los cebadores T1 (O'Donnell & Cigelnik, 1997) y Bt2b (Glass & Donaldson, 1995) y el gen Calmodulina (CAL) usando los cebadores CL1C y CL2C (Weir y col., 2012). Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1,5% con gel red incorporado y se visualizaron con luz ultravioleta. Las amplificaciones que fueron positivas se purificaron y secuenciaron en un 3730 XL DNA Analyzer (Applied Bio-systems®) en Macrogen (Seoul, Corea). Las secuencias de ADN obtenidas fueron editadas con el programa MEGA 6.0 para posteriormente analizarlas utilizando la base de datos de GenBank mediante BLAST (Velho y col., 2015; Boratyn y col., 2013).

Para cumplimentar con los Postulados de Koch, se realizaron pruebas de patogenicidad en manzanas de los mismos cultivares de los cuales los aislamientos fueron extraídos. Se inocularon 5 frutos por aislamiento que previamente se desinfectaron 2 min en hipoclorito al 1%, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente. A cada fruto se le realizó 1 herida mediante aguja estéril en la zona ecuatorial. La zona herida y la zona opuesta sin herir fueron inoculadas con 10 μl de una

Proyecto: CAI+D 2016-2019 – C.P: 50020150100034LI

Director del proyecto: Favaro, Ma. Alejandra

Director del becario/tesista: Gariglio, Norberto F.

suspensión de 5×10^5 conidios ml^{-1} según González y col (2006). En los tratamientos testigo se utilizó agua destilada estéril en lugar de inóculo. Los frutos se colocaron en cámara húmeda a una temperatura de 25 °C y diariamente fueron observados para registrar la aparición de síntomas y signos. El patógeno fue re-aislado de los síntomas y se estudiaron sus características morfológicas.

RESULTADOS

Los frutos recolectados de los tres cultivares con síntomas del patógeno presentaron podredumbres deprimidas de color marrón claro. Realizando un corte transversal podía observarse que la podredumbre avanzaba hacia el corazón de la fruta formando una “V”. Luego de permanecer en cámara húmeda se pudo visualizar la presencia del signo, en forma de masas de conidios de color salmón crema. Mediante revisión de la bibliografía (Sutton, 1990; Velho y col. 2015) se pudo confirmar que los síntomas y signos desarrollados son característicos del género *Colletotrichum*. Se obtuvieron 28 aislados de éste género. El color de las colonias fue variable entre aislados. Así, lograron conformarse dos grupos según el color del micelio y la tinción del APD, siendo el grupo 1 colonias con micelio algodonoso blanco-grisáceo y reverso de color crema con sectores gris verdoso y el grupo 2 con colonias de micelio algodonoso blanco y reverso color salmón. Todos los aislados presentaron crecimiento concéntrico de masas de conidios color naranja en la zona centro de la placa y crecimiento de acérvulas color negro dispersas en el resto de la colonia. El aspecto del micelio fue ralo en los primeros 3 días y sub-aéreo con aspecto algodonoso a mayor edad de la colonia. Todos los aislados crecieron llenando las placas en seis días. La media de la tasa de crecimiento fue de $12,8 \pm 1$ mm/día, variando entre 10,2 y 14,8 mm/día. La totalidad de los aislados produjeron conidios hialinos, de forma principalmente cilíndrica con bordes rectos y terminaciones redondeadas. El valor medio del largo y ancho de los conidios fue de $14,05 \pm 0,79$ μm x $4,67 \pm 0,28$ μm con rangos de 10,3 a 20,7 μm x 3,2 a 5,9 μm . Una vez germinados, los conidios formaron apresorios de forma oval y circular de color amarronado de un tamaño medio de $9,6 \pm 0,59$ μm x $7,3 \pm 0,48$ μm (largo x ancho respectivamente) con valores mínimos y máximos de 7,1 a 16,3 μm x 5,1 a 11,7 μm . Todas estas características se corresponden con especies pertenecientes al complejo *C. gloesporioides* (Weir y col., 2012).

En lo que respecta a identificación molecular, las secuencias obtenidas presentaron entre un 99% y un 100% de identidad con *C. siamense* para los tres genes trabajados (GAPDH, TUB2 y CAL). Esto refuerza la teoría de Hyde y col., 2009 a, b; Phoulivong y col., 2010; Rojas y col., 2010; Damm y col., 2012; Cannon y col., 2010 de que los caracteres morfológicos no resultan elementos satisfactorios a la hora de distinguir especies del género *Colletotrichum*. Si bien los dos grupos conformados por las características morfológicas fueron coincidentes con el complejo *C. gloesporioides*, al cual pertenece *C. siamense*; podrían haberse esperado dos especies distintas al momento del análisis molecular. La variabilidad en la coloración de los aislamientos es considerada normal y ha sido registrada por distintos autores, entre ellos Freeman y col. (1998) y se adjudica a que la estabilidad de los rasgos morfológicos son afectados por factores ambientales.

Para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se registra a *C. siamense* afectando manzanos en Argentina. Los reportes que existen en el país refieren sólo a infecciones en hoja de *Bauhinia forficata* subsp. *Pruinosa* (Larran y col., 2015).

En lo que hace a las pruebas de patogenicidad, todos los aislamientos fueron capaces de producir lesiones típicas de PA. Los síntomas iniciales se observaron a los 3 días post inoculación (dpi) en la zona herida de todos los frutos y a los 5 dpi en la zona no herida. A

Proyecto: CAI+D 2016-2019 – C.P: 50020150100034LI

Director del proyecto: Favaro, Ma. Alejandra

Director del becario/tesista: Gariglio, Norberto F.

medida que la infección progresaba, las lesiones crecieron en diámetro y se tornaron color marrón oscuro con hundimiento del tejido y presencia de masas de conidios. Los frutos del grupo control se mantuvieron sanos hasta el final del ensayo.

El patógeno fue re-aislado de las lesiones producidas artificialmente y sus características fueron coincidentes con las previamente descritas para el complejo *C. gloeosporioides*.

La identificación de las especies de *Colletotrichum* que causan PA es importante para un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad, debido a que muchas de las especies identificadas afectando manzano han sido reportadas también en otros frutales y hospedadores y varían en la patogenicidad y sensibilidad a fungicidas (Schilder, 2003, Saldarriaga-cardona y col., 2008; Velho y col., 2015; Munir y col., 2016). Así, Yang y col., (2011) reportaron a *C. siamense* aislado de plantas de la familia *Orchidaceae* del suroeste de China como la especie más agresiva en inoculaciones cruzadas realizadas sobre frutos de pimiento, tomate y manzanos. Por otra parte y en concordancia con lo anteriormente dicho, Munir y col., (2016) en un estudio de caracterización de especies de *Colletotrichum* que afectaban manzano en Estados Unidos, reflejaron que *C. siamense* era la especie más agresiva en las pruebas de patogenicidad, produciendo lesiones más profundas y extensas. Sin embargo, el crecimiento micelial de esta especie resultó ser más sensible a fungicidas que el de otras especies halladas, como *C. fructicola* y *C. theobromicola*. Estos resultados enfatizan la importancia de una identificación precisa dentro de cada complejo de *Colletotrichum* para poder desarrollar estrategias de manejo especie-específicas.

CONCLUSIONES

La caracterización morfométrica indicó que todos los aislados pertenecen al complejo *Colletotrichum gloeosporioides* pero sólo el análisis filogenético generado por las secuencias GAPDH, TUB2 y CAL fue capaz de revelar que *C. siamense* es la especie asociada a los síntomas de PA. Las pruebas de patogenicidad confirmaron que *C. siamense* es la especie responsable de causar antracnosis o PA en manzanos de la Provincia de Santa Fe. En función de los resultados obtenidos, se realizarán ensayos de sensibilidad a diferentes fungicidas para lograr establecer una estrategia de manejo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5^o Ed., San Diego, California. Elsevier. 494 – 495p
- Damm, U.; Cannon, P.F.; Woudenberg, J.H.C.; Crous, P.W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37e113.
- Favaro, M.A.; Lutz, A.; Scotta, R.; Peretti, R.; Pilatti, R.; Rista, L.M.; Gariglio, N.F. 2014. Patologías en frutos de manzano de bajo requerimiento de frío cultivados en la zona central de Santa Fe. III Congreso Argentino de Fitopatología, Tucumán.
- Gariglio, N.F.; Bouzo, C. & Travadelo, M. 2014. Cultivos Frutales y Ornamentales para zonas templado cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe. Ediciones UNL, Santa Fe, 292 pp.
- Hu, M; Grabke, A; Schnabel, G. 2015. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing anthracnose fruit rot of peach in South Carolina. *Plant Dis.* 99: 797-805
- Munir, M.; Amsden, E.; Gauthier, N.A.W. 2016. Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apples in Kentucky orchards. *Plant disease*, 100: 2194-2203.
- Velho, A.C.; Alaniz, S.; Casanova, L.; Mondino, P.; Stadnik, M.J. 2015. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. *Fungal Biology*, 119:229-244.
- Weir, B.S.; Johnston, P.R.; Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73:115-180.

Proyecto: **CAI+D 2016-2019 – C.P: 50020150100034LI**

Director del proyecto: Favaro, Ma. Alejandra

Director del becario/tesista: Gariglio, Norberto F.