

PATOGENICIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD A *PHOMA EXIGUA* Desm. DE TRES PORTAINJERTOS Y DOS VARIEDADES DE LIMONERO (*CITRUS LEMON* L.)

Besoain, X.A.; Gardiazabal, F. y Opazo, P.G.
Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso.
Casilla 4-D, Quillota, Chile.

Palabras clave: *Phoma exigua*, patogenicidad, atizonamiento, limoneros.

Key words: *Phoma exigua*, pathogenicity, shoot blight, lemons.

RESUMEN

En la localidad de La Serena, IV Región del país, se detectaron plantas de limonero de dos años de edad con síntomas de atizonamiento a nivel de brotes y presencia de canchros en el tronco con abundante exudación de goma, produciendo en algunos casos la muerte de las plantas. A partir de la zona de avance de estas lesiones se aisló en forma consistente micelio correspondiente a *Phoma exigua* Desm. A partir de aislamientos puros de este hongo se inocularon frutos y plantas de limonero, obteniéndose en estas últimas los mismos síntomas antes descritos. De este modo se demostró la patogenicidad de la cepa obtenida, la que fue recuperada a partir de las lesiones, manteniéndose la mismas características del cultivo. Se realizaron además pruebas de susceptibilidad de dos variedades de limón crecidas sobre tres portainjertos y la de éstos por separado. Los resultados demostraron que todas las combinaciones fueron afectadas, existiendo diferencias en susceptibilidad, siendo la variedad *Génova* más susceptible que la variedad *Eureka*.

Se concluye que esta sintomatología, sería una nueva enfermedad que afecta al cultivo del limón, la que denominamos "Cancrosis y atizonamiento del limonero", causada por *Phoma exigua* Desm.

INTRODUCCION

A comienzos de la primavera de 1988 se detectó en un huerto de cítricos ubicado en la provincia de La Serena, localidad Pan de Azúcar, plantas de 2 años de edad de *Citrus lemon* L. var. *Génova* injertadas sobre *Citrus macrophylla*, las que presentaban lesiones necróticas o canchros y atizonamiento a nivel de ramas y troncos principales, un rápido colapso de ramas, y en

SUMMARY

[*Patogenicity and susceptibility of Phoma exigua* Desm. to three rootstocks and two variety of lemon (*Citrus lemon* L.)]

In La Serena, IV Region of Chile two years aged lemon plants (*Citrus lemon* L.), showing symptoms of shoot blight and canchrosis in the trunk together with plenty gum exudation were detected which, sometimes caused them to die. Considering progress of these lesions, micelium from the *Phoma exigua* Desm. species was isolated. Based on pure isolations of this fungus, fruit and lemon plants were inoculated which resulted in the same symptoms mentioned above. Thus pathogenicity of the resulting strain was proved, which was recovered from the lesions and maintained the same characteristics of the culture. Besides two varieties of lemon plants grown in three rootstocks were submitted to proofs of susceptibility, while the latter were proved separately. Results showed that every combinations got affected revealing differences in susceptibility, being *Geneve* more liable than the *Eureka* variety. It is concluded that these symptoms mean a new disease that affecting lemon culture which we call "Cancrosis and shoot blight of lemon plant", caused by *Phoma exigua* Desm.

algunos casos la muerte de los árboles (Figura 1).

A partir de la zona de avance de las lesiones se detectó la presencia del género *Phoma* como causante de este problema. De acuerdo con antecedentes bibliográficos existe una especie del género *Phoma* afectando a cítricos, *Phoma tracheiphilla*, causante del "Mal secco", enfermedad que fue observada por primera vez en Sicilia en 1920 y fue atribuido después de muchos años de controversia al género *Deuterophoma* descrito por Petri en 1989 y reclasificado en el género *Phoma* en 1971

(Ciccarone, 1971; Pionnat, 1982).

En relación a otras especies de *Phoma* no hay antecedentes que este patógeno afecte a plantas de cítricos, aunque sí existen ensayos relacionados con las pudriciones que causaría a distintas especies hortofrutícolas en post-cosecha (Paulson & Schoeneweiss, 1971). Es así como en limones var. *Génova* se determinó a *P. exigua* como causante de una pudrición negra, firme, localizada en la parte basal de los frutos. Los daños se presentaban principalmente en la piel y en menor grado en la pulpa (Latorre, 1987).

Por otro lado, existen antecedentes de ataques de este patógeno a otros cultivos como *Solanum tuberosum* (papa). Schoeneweiss (1972), describe a *P. exigua* como causante de atizonamientos severos en plantas ornamentales de *Vinca minor*, especialmente cuando existen condiciones de bajas temperaturas y fuertes lluvias. Los síntomas, en el caso de *Vinca*, aparecen inicialmente como lesiones a nivel del suelo, en los tallos, guías y en la base de brotes nuevos, provocando marchitez, oscurecimiento y muerte del tallo afectado. En el caso de *Nerium* se presenta un decaimiento y marchitez a nivel de brotes laterales.

Debido a que existen antecedentes previos de estos problemas patológicos asociados al género *Phoma* afectando a plantas de cítricos a nivel mundial (Garnsey & Timmer, 1988), y en atención a los síntomas y severidad del daño observado en terreno, se planteó la siguiente investigación que tuvo como objetivos:

-Determinar la patogenicidad del aislamiento correspondiente al género *Phoma*, aislado de limoneros enfermos.

- Identificar la especie del género *Phoma* aislada.

- Evaluar la susceptibilidad de este aislamiento en 2 variedades de limonero sobre 3 portainjertos, y sobre los portainjertos no injertados en relación a sus respectivos testigos.

MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo esta investigación se realizaron aislamientos a partir de la zona de avance de lesiones presentes en plantas de limonero var. *Eureka*, provenientes de La Serena, aislándose en forma consistente en Agar papa dextrosa acidulado (APDA), micelio correspondiente al género *Phoma*. Para determinar la patogenicidad del hongo aislado se llevaron a cabo ensayos tanto en frutos de limón como en plantas, los que fueron realizados en la Estación Experimental La Palma, perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, ubicada en la provincia de Quillota, V Región.

Para este efecto se utilizó tanto el invernadero como el laboratorio de Fitopatología perteneciente a dicha Facultad.

Para la correcta identificación del aislamiento, se caracterizó tanto la colonia como las estructuras reproductivas del hongo, midiéndose 50 conidios y 50 picnidios. Para la correcta determinación de la especie, se enviaron 2 cultivos puros al Commonwealth Mycological Institute (CMI) Kew, Inglaterra.

Patogenicidad en frutos.

A partir del aislamiento de *Phoma* obtenido, se realizaron pruebas para determinar preliminarmente su patogenicidad en frutos de limón, inoculándolos con 2 trozos de 8 mm de diámetro de micelio puro del hongo cultivado en APDA, siendo depositados ambos trozos en lados opuestos en el fruto mediante una incisión con un sacabocado de 8 mm de diámetro. Los frutos fueron previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos, posteriormente inoculados y colocados en cámara húmeda a $22^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por espacio de 7 días. Se inocularon 4 frutos dejándose los respectivos testigos, a los que se les adicionó sólo APDA estéril.

Patogenicidad y evaluación de susceptibilidad en plantas de limonero.

Para la realización de las pruebas de patogenicidad se inocularon plantas de limonero de las variedades *Génova* y *Eureka* injertadas sobre: *Citrus macrophylla*, *Citrus sinensis* y *Citrus volkameriana*, inoculándose también los portainjertos sin injerto, y dejándose los respectivos testigos.

En el caso de las plantas injertadas la variedad tenía un año de edad y los portainjertos 2 años. Las plantas provenían de un vivero comercial (donadas por Agrícola Huerto California, San Isidro, Quillota), las que se encontraban en contenedores de plástico negro, con un sustrato compuesto por arena, turba y tierra de hoja (proporción 1:1:1). El sustrato había sido previamente esterilizado con vapor a 80°C por 40 minutos.

La metodología de inoculación de las plantas fue la siguiente: en las plantas seleccionadas, se realizó un corte en bisel a 10 cm sobre la zona del injerto, adicionándose un trozo de micelio puro del hongo de 5 mm de diámetro, obtenido desde la zona de extensión a partir de un cultivo en APDA de 5 días de incubación, colocándose en contacto el micelio en la zona entre la corteza y el xilema. Una vez depositado el trozo de micelio, se envolvió la herida con una cinta plástica. Los testigos fueron tratados de igual forma, pero sólo con APDA estéril. En el caso de los portainjertos, éstos se inocularon mediante el mismo procedimiento que la variedad, procurando ser

inoculados a una altura tal, que éstos tuvieran 1 cm de diámetro y dejándose los respectivos testigos.

Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas a nivel de tratamientos se empleó un test de igualdad de medias.

RESULTADOS

Identificación de la especie del género *Phoma* aislada

En relación a las características del micelio del hongo aislado, éste presentaba en un principio un color gris-rosado, existiendo una leve tonalidad anaranjada, tornándose finalmente a un color negro. Este micelio se caracterizó por producir picnidios a los 20 días de edad, mantenido el cultivo bajo una condición de luz diurna.

Los picnidios eran de color café a negro, de forma globosa sin cuello visible y con un ostiolo simple, encontrándose insertos en el micelio. Estos picnidios presentaban un ancho promedio aproximado de 200 µm. En presencia de agua liberaban masas de conidios hialinos, unicelulares, de forma ovoide, las que medían entre 3 a 4 µm de ancho por 5.5 a 8.0 µm de largo (Figura 2).

Las características anteriormente descritas más la identificación del aislamiento enviado al Commonwealth Mycological Institute (CMI), correspondieron a *Phoma exigua* Desm.

Patogenicidad en frutos.

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó la patogenicidad del aislamiento de *Phoma exigua* en frutos de limón. Este hongo se caracterizó por el desarrollo de una pudrición de consistencia firme de color café a negro existiendo necrosis tanto en la superficie como al interior del fruto.

A los 20 días post-inoculación los frutos se presentaban totalmente podridos o necrosados, cubiertos con micelio aéreo, observándose además una abundante formación de picnidios.

Patogenicidad en plantas.

En relación a las inoculaciones efectuadas en plantas de limonero con *Phoma exigua*, se comprobó su patogenicidad para todas las variedades y portainjertos señalados, causando un daño ascendente desde la zona de inoculación hacia el ápice. Este daño consistió inicialmente en un marchitamiento apical, existiendo luego formación de cancro en la zona inoculada y abundante exudación gomosa, para terminar con un atizonamiento o muerte del tejido, desde la zona inoculada hasta el ápice (Figura 3 y 4).

No obstante el resto de la planta, salvo unos centímetros desde la zona de inoculación hacia abajo, se encontraba aparentemente sana. De acuerdo con los tratamientos efectuados en las plantas inoculadas, se pudo recuperar la cepa de *Phoma exigua*.

Los síntomas obtenidos en este ensayo concuerdan con los observados a nivel de terreno en las plantas enfermas de la localidad de La Serena (Figura 1).

Evaluación de la susceptibilidad varietal.

Del ensayo de susceptibilidad llevado a cabo en las variedades *Génova* y *Eureka*, en combinación con los 3 portainjertos y de éstos sin injerto, se determinó que todos resultaron ser susceptibles a *Phoma exigua*, aunque presentaron diferentes grados de severidad de la enfermedad (Cuadro 1).

CUADRO 1. Susceptibilidad varietal evaluada en días de sobrevivencia para las diferentes combinaciones de plantas de limonero y de portainjertos, analizados mediante el test de igualdad de medias.

Tratamiento portainjerto/ variedad	Promedio de días de so- brevivencia	IGUAL- DADES
T1 <i>Citrus macrophylla</i>	16.00	A B
T2 <i>Génova/C. macrophylla</i>	56.75	B C
T3 <i>Eureka/C. macrophylla</i>	90.75	C D
T4 <i>Citrus volkameriana</i>	30.75	A B
T5 <i>Génova/C. volkameriana</i>	7.25	A
T6 <i>Eureka/C. volkameriana</i>	107.50	D
T7 <i>Génova/Citrus sinensis</i>	80.25	C D

* Letras distintas indica diferencias significativas al 5%.

Del Cuadro 1, se desprende que existe una diferencia en susceptibilidad entre variedades, siendo mayor en *Génova* y por otro lado, un efecto del portainjerto, situación que se visualiza al comparar el mayor grado de resistencia que posee la variedad *Génova* al estar injertada sobre *C. macrophylla* y *C. sinensis* en relación a la menor sobrevivencia estadísticamente significativa ($P=0.05$) sobre *C. volkameriana*. No obstante lo ocurrido en la variedad *Génova*, la combinación *Eureka/C. volkameriana* fue la que presentó el mayor grado de resistencia, sobreviviendo las plantas en promedio 107.5 días.

DISCUSION

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, entre ellos el Compendio de Enfermedades de los Cítricos (1988), se desprende que no existen antecedentes de la especie *P. exigua* afectando a plantas de limonero a nivel mundial. Por lo tanto, ésta sería la primera determinación de este taxon afectando a plantas de cítricos.

Existe una determinación previa de ataques de esta especie a los frutos de limón de la var. *Génova* en post-cosecha (Latorre, 1987), los que concuerdan con los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad realizada a los frutos. No obstante, otra especie del género como *P. tracheiphilla* es causante de una importante enfermedad en plantas de cítricos denominada "Mal secco" (Bazzi & Scrivani, 1954; Graniti, 1963; Tramier & Mercier, 1963; Ciccarone, 1971; Solel et al., 1972; Grasso, 1984).

Debido a la sintomatología que presentaban las plantas afectadas se podría haber pensado que los síntomas observados correspondían a los provocados por *P. tracheiphilla*, el cual provoca un desecamiento o rápido atizonamiento de las extremidades de las ramas, además de necrosis a nivel de la corteza, lo que induce a la marchitez y enrollamiento de las hojas, finalizando con la muerte de éstas (Tramier & Mercier, 1963).

En relación a nuestros resultados, se observó que las plantas presentaban marchitez apical, atizonamiento y formación de cancro y en la zona de inoculación, abundante exudación gomosa. El tejido desde la zona de inoculación hacia el ápice se marchita, existiendo un menor desarrollo de la lesión desde la zona de inoculación hacia abajo. Esto contrasta con lo observado por Ciccarone (1971), donde explica que si la infección por *P. tracheiphilla* comienza en la parte alta del árbol (brotes), la enfermedad

se extiende a las hojas y las ramas principales y el colapso es mucho más lento, es decir, este patógeno puede infectar a la planta tanto basipétalmente como acropétalmente, situación levemente distinta a la observada en este trabajo.

Por otro lado, la combinación *Génova/C. volkameriana* fue una de las más susceptibles a la inoculación de *P. exigua*, dado que las plantas sobrevivieron en promedio 7,5 días. Estos resultados podrían compararse con los realizados por Grasso (1984), quien determinó grados de resistencia a *P. tracheiphilla* y ésta varía según la especie. Para *Citrus lemon*, escasa; *C. macrophylla*, escasa; *C. volkameriana*, media y *C. sinensis* elevada, pero no determinó un efecto con diferentes variedades.

Otro aspecto a considerar que diferencia a estas 2 enfermedades es lo expuesto por Ciccarone (1971) en donde, describe que las temperaturas óptimas para el desarrollo y producción de picnidios de *P. tracheiphilla* son entre los 20°C y 25°C. Además, los conidios presentaban las siguientes características: hialinos, unicelulares, parcialmente curvados y con un tamaño promedio de 2,0-3,0 µm por 1,0 µm, las que difieren significativamente de las medidas obtenidas del aislamiento de *P. exigua*.

Al observar en el microscopio óptico las características morfológicas del hongo aislado de plantas enfermas, éstas concuerdan con lo descrito por Boerema & Howeler, (1967); Paulson & Schoeneweiss (1971), para *P. exigua*. Por lo tanto, se concluye que esta sería una nueva enfermedad que afecta al cultivo del limón (*Citrus lemon* L.), la que de acuerdo con los síntomas observados podría ser denominada "Cancrosis y Atizonamiento del Limonero", causada por *P. exigua* Desm., existiendo una clara diferencia en la susceptibilidad a esta enfermedad de las 2 variedades evaluadas y el efecto que ejerce el portainjerto sobre ellas.

REFERENCIAS

- Bazzi, B. & Scrivani, P. (1954). Un método diagnóstico per il riconoscimento del decorso del mal secco degli agrumi. *Phytopathology* Z. 21: 333-334
- Boerema, G. & Howeler, L. (1967). *Phoma exigua* Desm. and its varieties. *Persoonia* 5: 15-28
- Ciccarone, A. (1971). Il fungo del mal secco degli agrumi. *Phytopathologia Mediterranea* 10: 68-75
- Garnsey, S.M & Timmer, L.W. (Eds) (1988). *Compendium of Citrus Diseases*. APS, Florida.
- Graniti, A. (1963). Picnidii di *Deuterophoma tracheiphilla* Petri, su organi fogliari. *Phytopathologia Mediterranea* 2: 95
- Grasso, S. (1984). Il mal secco del limone. *Informatore Fitopatológico* 3:39-42.
- Latorre, B. (1987). Efecto de *Phoma exigua* en los cítricos en post-cosecha. *Simiente* 57: 253
- Paulson, G. & Schoeneweiss, D. (1971). Epidemiology of Stem Blight of *Vinca minor*. Incited by *Phoma exigua* var. *exigua*. *Phytopathology* 61: 959- 963
- Pionnat, J. (1982). Le mal sec *Phoma tracheiphilla* (Petri) Kone et Ghik: perspectives sur la lutte chimique et les variétés résistantes. *Fruits*. 34: 237-248
- Schoeneweiss, D. (1972). Control of stem blight of *Vinca minor*. *Plant Disease Reporter* 56: 238-241
- Solel, Z.; Pinkas, J.; Loebenstein, G. (1972). Evaluation of systemic fungicides and mineral oil adjuvants for the control of mal secco disease of lemon plants / *Deuterophoma tracheiphilla*. *Phytopathology* 62: 1007-1013
- Tramier, R. & Mercier, S. (1963). Sur la presence en France d' une maladie du citronnier, le mal sec, *Deuterophoma tracheiphilla* Petri. *Rev. Path. Veg. et Ent. Agr. Fr.* 62 : 211-216.



Figuras 1, 2, 3 y 4: 1.- Planta de limonero var. *Eureka* provenientes de La Serena, con síntomas de atizamiento causado por *Phoma exigua*. 2.- Pícnidio de *Phoma exigua* liberando conidios unicelulares por 200x 3.- Planta de limonero var. *Eureka* injertada sobre *C. macrophylla*, inoculada con micelio de *Phoma exigua*, se aprecian los síntomas de atizamiento del brote. 4.- Detalle de planta de limonero var. *Eureka*, se aprecia cancro a nivel del tallo con exudación de goma.