

NOTAS MICOLÓGICAS III.

Diaporthe actinidiae Sommer & Beraha ASOCIADO A PLANTAS DE KIWI CON SINTOMAS DE MUERTE REGRESIVA EN LA V REGION-CHILE

(Mycological notes III. *Diaporthe actinidiae* Sommer & Beraha associated to kiwi plants with symptoms of die-back in the V Region - Chile)

Antonieta Palma* & Eduardo Piontelli**

*Servicio Agrícola y Ganadero V Región (SAG), Valparaíso

**Universidad de Valparaíso, Escuela de Medicina, Cátedra de Micología Casilla 92 V Valparaíso, Chile

Palabras clave: Hongos, *Diaporthe actinidiae*, muerte regresiva, kiwi.

Key words: Fungi, *Diaporthe actinidiae*, die-back, kiwi.

RESUMEN

Los síntomas detectados en una plantación de kiwi en la V Región (Quilpué) de 10-15 años de edad, que abarcaron desde necrosis foliar, canchros de ramillas, decaimiento vegetativo y muerte de brazos, motivaron el interés en determinar las posibles causas de estas lesiones.

Mediante estudios en cámara húmeda de ramillas afectadas de 1-2 años, se observó la constante presencia de conidiomas de *Phomopsis* sp. y posteriormente (2-3 meses) se desarrollaron ascomas inmersos con largos cuellos, correspondientes al género *Diaporthe*. Los estudios morfológicos del anamorfo y del teleomorfo, permitieron determinar al taxon como *Diaporthe actinidiae* (IMI.382600) y su anamorfo *Phomopsis*. Las cepas correspondieron a un ecotipo con ascosporas ligeramente de mayor tamaño, pero morfológicamente semejante al grupo de *D. medusae*. En las inoculaciones experimentales, si bien las plantas se vieron afectadas, no reprodujeron cabalmente la sintomatología observada en terreno.

Este es el primer reporte descriptivo de esta especie fúngica en nuestro país.

INTRODUCCION

El cultivo del kiwi (*Actinidia chinensis* Planch.) en Chile, comenzó a inicios de la década del 80 cuando se introdujo desde Nueva Zelandia. En las plantaciones iniciales, los aspectos fitopatológicos de este frutal

SUMMARY

Symptoms detected in a kiwi nursery in the V Region (Quilpué) such as leave necrosis, canker of twigs, vegetative decay and death of branches in 10-15 year-old plants moved us to investigate the causing agents of these lesions.

By studying 1-2 year old twigs in a wet chamber, the constant presence of *Phomopsis* sp. conidioma could be observed and after a 2-3 month period of time there was a growth of long neck immersed ascoma belonging to the genus *Diaporthe*. Morphological studies carried on the anamorph and the teleomorph made it possible to assess the taxon as *Diaporthe actinidiae* (IMI. 382600) and its anamorph *Phomopsis*. Resulting strains were an ecotype showing ascospores slightly greater in size yet morphologically similar to the group *D. medusae*. Although plants became affected during the experimental inoculations, they did not entirely reproduce the symptoms observed in the field.

This is the first descriptive report of this fungal species in our country.

no fueron relevantes y la mayor atención se orientó hacia las enfermedades de postcosecha, principalmente debidas a *Botrytis cinerea* (Latorre, 1988; Montealegre, 1996; Morales, 1985, 1996; Morales & Ulloa, 1985). Por otro lado, en la literatura internacional, se hace mención de la importancia de varios taxa fúngicos en ramas, hojas, flores y frutos en proceso de marchitamiento, causados especialmente por

especies de *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Diaporthe* y *Botryosphaeria* entre otros (Dingey, 1969; Beraha, 1970; Hawthorne *et al.*, 1982; Hawthorne & Otto, 1986; Pratella, 1995). En la década del 90, se detecta en el país la presencia de un hongo que produce picnidios (*Phomopsis* sp.) en la V y VII Región, causando muerte regresiva de ramas y ramillas en kiwi (Latorre, B. (PUC Ch.), y Besoain, X (UCV), datos no publicados) y en un reporte sanitario de vigilancia del SAG (1999), se menciona la presencia de *Diaporthe actinidiae* en ramillas de Kiwi, en la VI Región, asociando el nombre del agente al tipo de hospedero, sin datos morfológicos que permitan comentar y corroborar el hallazgo. El género *Phomopsis* (Coelomycetes), es el único anamorfo conocido del género *Diaporthe* (Diaporthales, Ascomycota) y sus características morfológicas distintivas son: presencia de conidiomas con células conidiógenas filídicas largas y cilíndricas que producen generalmente 2 tipos de conidios (alfa y beta).

La identificación de las especies del género, basada principalmente en las características morfológicas es dificultosa, debido a: a) solamente la cuarta parte de las especies del taxón produce conidios beta, b) su presencia es influenciada por los niveles de carbono y nitrógeno en el medio, c) las variaciones morfológicas de los aislamientos en cultivo, d) la plasticidad de su genoma, e) el amplio rango de hospederos que puede abarcar un fenotipo, f) la poco frecuente asociación con su teleomorfo (*Diaporthe* spp.), que sólo se conoce en un quinto de las especies (Wehmeyer, 1933; Kobayashi, 1970; van der Aa, *et al.*, 1990; Brayford, 1990; Roskopf *et al.*, 2000). *Phomopsis* se aísla frecuentemente de raíces, tallos, hojas y frutos de diversas angiospermas y gimnospermas, pero a veces también de briófitas y pteridofitas (Farr *et al.*, 1989; Uecker, 1988).

La presente nota, corresponde al seguimiento realizado durante más de 2 años en ramillas, ramas y brazos, de Kiwi de 10-15 años, con síntomas de muerte, en una plantación de las variedades Hayward, Matua y Tomuri en la V Región (Quilpué).

Nuestros objetivos consisten en describir morfológicamente los aislamientos de *Diaporthe actinidiae*, junto a ciertos aspectos patológicos causados por este agente en kiwi.

MATERIAL Y METODO

a) Recolección del material vegetal, aislamiento y cultivo del hongo

Desde el año 1998 al 2000, se tomaron muestras del material afectado desde plantas femeninas y masculinas de kiwi en distintas épocas del año, especialmente desde Septiembre a Noviembre y de Marzo a Mayo (inicio y final de la cosecha).

A partir de muestras con clara sintomatología de muerte regresiva, se efectuaron aislamientos

desde tejido enfermo (brotes, ramillas y hojas con manchas necróticas en las distintas variedades de las plantas), mediante cortes en los picnidios y el estroma de los peritecios, los cuales se disgregaron en agua estéril. Las suspensiones de ascosporas y conidios se sembraron por dilución, en la superficie de placas con PDA a 25°C. La germinación de estas estructuras, dió origen principalmente a conidiomas (pero en el tiempo también la presencia de peritecios), los que se transfirieron a nuevas placas de PDA para la obtención de cultivos puros, durante un período de 2 semanas a la temperatura ambiente del laboratorio (18-22°C) y bajo un régimen mixto de luz diurna y luz negra (UV±400nm) nocturna. Para los estudios morfométricos, una pequeña porción de la capa conidiógena se removió mediante cortes finos de los conidiomas maduros, montándose en una gota de lactofenol con azul de algodón o lactofucsina. De los 3 aislamientos puros obtenidos, se midieron 50 conidios (alfa y beta), 20 conidióforos y 50 ascos y ascosporas.

La producción abundante de peritecios y conidiomas se obtuvo también mediante trozos de ramilla y parte de madera con lesiones necróticas visibles, principalmente en ramillas de 2-4 años. Estas se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente (±18°C) y se sometieron a un régimen de luz natural durante 2-4 meses (Fig.3).

Las muestras con lesiones fueron transportadas al Laboratorio de Fitopatología del S.A.G. (V Región) donde se realizaron una serie de análisis de laboratorio, descartando mediante diferentes métodos analíticos la presencia de otros microorganismos (bacterias fitopatógenas).

c) Pruebas de patogenicidad

El inóculo obtenido de los aislamientos desde material enfermo, ramillas y ramas afectadas por *Phomopsis* sp., tales como, trozos de micelio y conidiomas en cultivo, fue inoculado en 6 plantas y 2 testigos por variedad (Hayward, Matua, Tomuri), mediante cortes, en ramillas de plantas de 2 años previa desinfección en alcohol al 90%, para luego ser cubierto con parafilm. A los 10, 20, 30 y 40 días se observaron los resultados. Los testigos fueron inoculados sólo con agar papa dextrosa.

RESULTADOS

Identificación

Se observó en los cultivos (PDA) a 23°C presencia de micelio inicialmente blanquecino, algodonoso, solevantado, que adquiere en el tiempo coloración grisácea a negruzca en el centro, reverso crema a amari

lento. A los 10-14 días se forman conidiomas pequeños, abundantes, de color negro, inmersos y erumpentes, cónicos a ovoides, 300-850 μm de diámetro, de paredes gruesas y multicelulares, con un cuello inconspicuo, con uno o más ostíolos que exudan conidios en masas mucosas, de color cremoso a amarillo ambar. Células conidiógenas fialídicas, enteroblásticas, cilíndricas, a veces ramificadas, septadas, hialinas, alfa conidios hialinos ovales a elípticos, unicelulares, bigutulados de tamaño 6 a 8 x 2 a 3 μm y beta conidios hialinos, filiformes, curvados en un extremo, de tamaño 20-23 x 1-1,5 μm (Fig. 6-7-8). Conidios tipo C ausentes.

Teleomorfo presente sólo sobre madera y ramillas enfermas de 2 - 6 años, correspondiendo a peritecios simples, 200 a 550 μm de diámetro, solitarios negruscos, a veces agregados, erumpentes, inmersos en un estroma, de paredes delgadas con cuellos prominentes, largos (210-700 x 35-100 μm), flexuosos. Ascosporas hialinas, biseriadas, bicelulares, constreñidas en el septo, gutuladas, elipsoidales a fusoides, lisas, 10 -13 x 2,5 - 3 μm , que se liberan en el ápice del ostíolo en un líquido de color blanquecino a cremoso (Fig. 5).

Sintomatología

La sintomatología inicial observada fue: necrosis de la parte foliar (Fig. 1) y de ramillas; pardeamiento y necrosis cortico vascular, hasta compromiso medular y en casos severos; muerte de brazos y decaimiento vegetativo generalizado. No se observó daño directo en frutos,

En parte de los brazos principales, la acción del patógeno causa su muerte, debiendo someterse a poda severa las zonas afectadas.

Ensayos de patogenicidad

A los 10 días de la inoculación, se observó a nivel de ramilla, necrosis cortical en la zona inoculada y al mismo tiempo necrosis foliar parcial, localizada en parte de las hojas cercanas. La manifestación de los síntomas fue de lenta ocurrencia, en comparación a lo observado en terreno. En el tiempo de observación (40 días), no se pudo aislar el agente inoculado. Las plantas jóvenes, posteriormente a la inoculación, fueron podadas durante el mes de junio y al momento de la brotación presentaron cierta recuperación.

DISCUSION

La primera etapa de esta nota, describió las características fenotípicas de *D. actinidiae* y trató de confirmar su presencia en parte de la sintomatología presentada en terreno.

En el ensayo de patogenicidad, se observó principalmente un daño local (necrosis) en la zona de inoculación, con daño foliar inicial. No obstante, nuestra metodología limitada en el tiempo por la infraestructura, no pudo complementarse con mayores ensayos biológicos, descartándose las inoculaciones en hojas *in vivo*, como las realizadas por Hawthorne & Otto, (1986). Por otro lado, la realización de pruebas de patogenicidad, deberían haberse efectuado también en plantas adultas (en ramillas de 3 o más años), que pudiesen expresar mejor la sintomatología, situaciones que ameritan nuevos estudios.

La falta de recuperación del agente inoculado en nuestro caso, confirma en cierta medida, la necesidad de un mayor período de observación, su lenta acción patógena, o quizás, su actuación como un endófito latente, merece enfoques metodológicos diversos.

Es importante destacar que varias especies de *Diaporthe* como los integrantes del grupo *D. eres* (*D. ambigua* y *D. pernicioso*) se han asociado con muerte regresiva en manzanos, perales, ciruelos y durazneros (Harris, 1988; Smith *et al.*, 1996), presentando diversas reacciones tardías frente a inoculaciones en plantulas de diferentes edades. Reportes similares con *D. tanakae* en Japón (Nakatani *et al.*, 1981) obtuvieron la aparición de síntomas hasta 2 años después de la inoculación en manzanos y perales. Esta situación deberá analizarse con nuevos estudios, para evaluar el real poder patógeno de nuestras cepas.

D. actinidiae se asocia en la literatura a atizomamiento, muerte de ramillas y a patologías en frutos, considerándose más bien como un patógeno de post cosecha capaz de colonizar frecuentemente tejidos dañados del hospedero, tal como sucede con *Colletotrichum acutatum* y *Glomerella cingulata*, sin descartar que *Phomopsis* sp. es uno de los que causa mayor grado de necrosis en kiwi (Hawthorne & Otto, 1986). Su asociación a muerte de brazos, parece estar potenciada por la acción de otros agentes patógenos o a factores abióticos.

Existen más de 800 taxa descritos dentro del género *Phomopsis* y aún a la fecha, no existe una revisión actualizada de sus miembros. La determinación de especies en el género, ha sido fuertemente influenciada por el tipo de vegetal parasitado, sin embargo, estudios recientes han mostrado que varias especies tienen rangos amplios de hospederos y que un único hospedero es capaz de albergar más de una especie, complicando el proceso de especiación (Uecker, 1988; van der Aa, *et al.*, 1990; Brayford, 1990; Roskopf *et al.*, 2000). La literatura, registra que la mayoría de las especies de *Phomopsis*, se han determinado acorde al tipo de hospedero, situación que Wemeyer (1933) corrigió, deshechando el sustrato como un carácter primario de clasificación, por su incidencia en

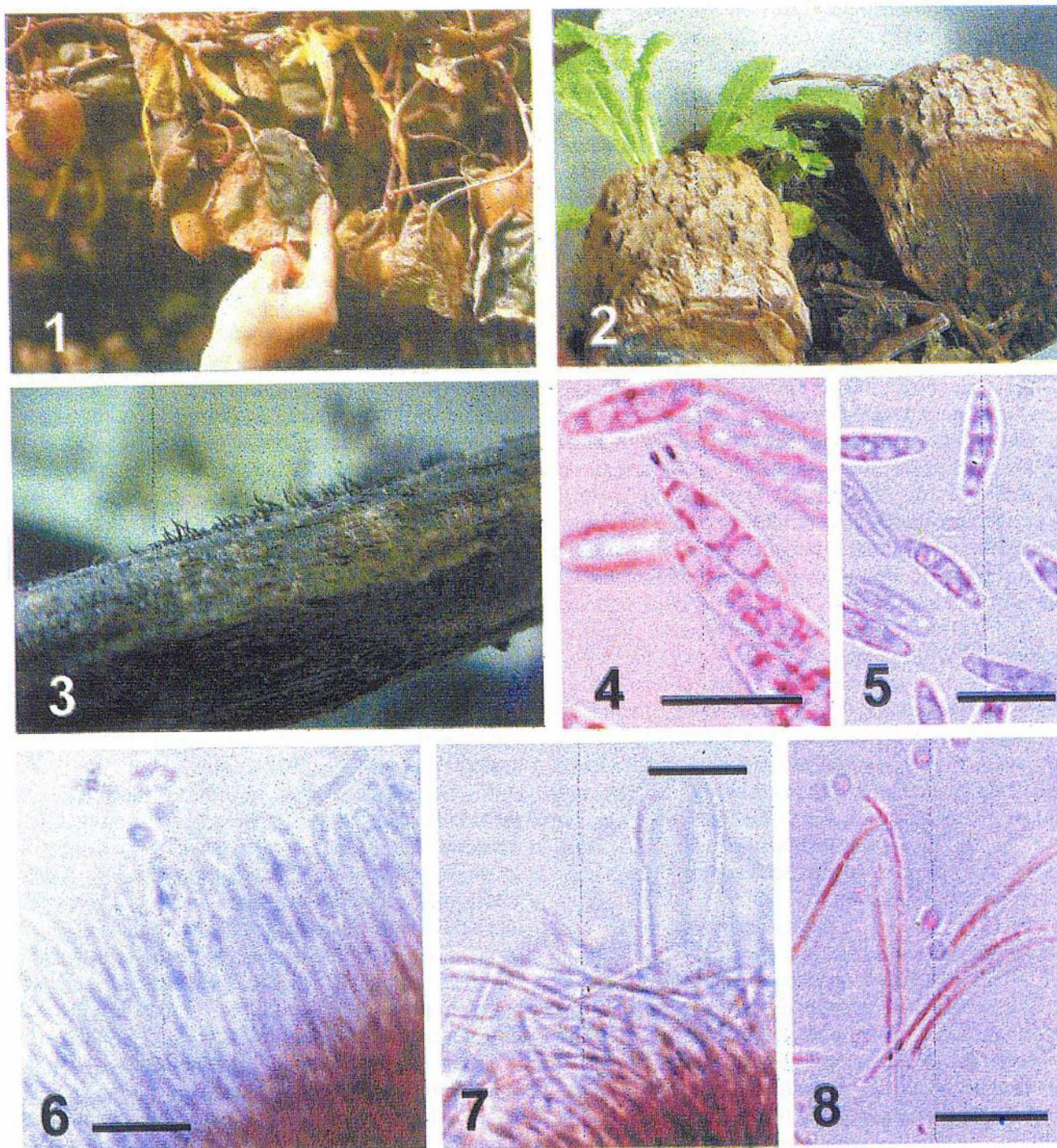


Figura 1. 1.-Necrosis foliar en plantas de kiwi adultas. 2.- Trozos del tronco de kiwi con activo crecimiento de *Phomopsis* sp. 3.- Ramillas en cámara húmeda, afectadas con visible crecimiento de *Diaporthe actinidiae*; ascas de largos cuellos. 4 - 5.- *D. Actinidiae*. 4.- Ascos y ascosporas, obsérvese el típico anillo apical. 5.- Ascosporas libres. 6 - 7.- Sección vertical de la pared interna del anamorfo picnidial de *Diaporthe* (*Phomopsis*). 6.- Conidióforos, células conidiógenas y conidios alfa. 7.- Conidióforos, células conidiógenas y conidios beta. 8.- Conidios beta, libres. Barras = 10 μ m

el aumento de la confusión taxonómica. Sin embargo, comenta que las especies con ascosporas grandes en sus teleomorfos, tienen buena correlación entre la morfología y los rangos de hospedero, no así en otros miembros del género tales como por ej. el grupo de especies agregadas *D.eres* y *D. medusae*, que aparentemente poseen una capacidad de colonizar con morfotipos similares a muchos géneros de hospederos vegetales. Estas evidencias también fueron detectadas por Brayford (1990), en 2 tipos morfológicos de *Phomopsis* presentes en ramas pequeñas y corteza de *Ulmus*, pero también en especies de *Fraxinus*, *Acer* y *Fagus*. Esta situación, puede extrapolarse a *D. actinidiae*, un taxon morfológicamente semejante al grupo de *D. medusae*, que presenta además largos cuellos periteciales erumpente desde el peridermo del hospedero, otro carácter que por ser controlado por factores ambientales, en especial la humedad y la luz, debe ser considera-

do variable (Brayford, 1990).

Las características anamórficas y teleomórficas de nuestros aislamientos son coincidentes con la descripción de la especie realizada por Sommer & Beraha (1975), a pesar que sus ascosporas semejan un ecotipo ligeramente de mayor tamaño que los descritos en kiwi por estos autores en U.S.A. (material ingresado desde Nueva Zelandia).

La identificación de *Diaporthe actinidiae* fue confirmada por el Dr. Cannon y el cultivo quedó registrado en el IMI, con el N° 382600.

Agradecimientos

Se agradecen los útiles comentarios y sugerencia aportadas por la Profesora Ximena Besoain, de la Fac. de Agronomía (UCV), en la revisión de esta nota.

REFERENCIAS

- Aa, H.A. van der.; Noordeloos, M.E. & Gruyter, J.de. (1990). Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Styd. Mycol.* 32: 3-19
- Beraha, L. (1970). Stem-end rot of Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis*) on the market. *Plant Disease Reporter* 54:422-423
- Brayford, D. (1990). Variation in *Phomopsis* isolates from *Ulmus* species in the British isles and Italy. *Mycol. Res.* 94: 69-697
- Dingley, J.M. (1969). Records of plant diseases in New Zealand. *Dep. Sci. Ind. Res. Bull.* N° 19
- Farr, D.F.; Bills, G.P.; Chamuris, G.P.; Rossman, A.Y. (1989). *Fungi on plants and plant products in the United States*. American Phytopath. Soc. Press, St Paul, Minn.
- Harris, D.C. (1988). *Diaporthe perniciosa* associated with plum dieback. *Plant Pathol.* 37:604-606
- Hawthorne, B.T.; Rees-George, J. & Samuels, G.J. (1982). Fungi associated with leaf-spots and post harvest fruit rots of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in New Zealand. *New Zealand J. of Bot.* 20:143-150
- Hawthorne, B.T. & Otto, C. (1986). Pathogenicity of fungi associated with leaf spots of kiwifruit. *New Zealand J. of Agr. Res.* 29:533-538
- Kobayashi, T. (1970). Taxonomic studies of Japanese *Diaporthaceae* with special references to their life histories. *Bull. Government. Forest Res. Exp. Stat. Tokio, Japan.* N° 226 :1-242
- Latorre, B. (1988). Producción de kiwi. Pontificia Univ. Católica de Chile. Santiago. pp.409-413
- Montealegre, J. (1996). Enfermedades de post-cosecha en kiwi. Avances en sanidad vegetal de frutales y vides. Fac. Cs. Agr. y For. U. de Chile. pp. 127-131
- Morales, A. (1985). Enfermedades fungosas y calidad de la fruta. *Mundo Agrofrutícola.* 1:36-40
- Morales, A. (1996). Principales enfermedades de post cosecha de frutales de carozo, pomáceas y kiwi. Manejo y control. Avances en Sanidad vegetal de frutales y vides Fac. Cs. Agr. y For. U. de Chile. pp. 119-125
- Morales, A. & Ulloa, A. (1985). Kiwi: pudriciones fungosas en post cosecha. *Aconex* 11: 35-38
- Nakatani, F.; Hilaragi, T.; & Sekizawa, H. (1981). Studies on the canker of pear III. The small black spot on the twig. *Annu. Rep. Plant. Prot. North Jpn.* 32: 141-143
- Pratella, G.C. (1995). Note di bio-patologia e tecnica di conservazione-trasporto dei frutti. *Riv. di Frutticoltura* 6:80-83
- Roskopf, E.N.; Charudattan, R.; Shabana, Y.M. Benny, G.L. (2000). *Phomopsis amaranthicola*, a new species from *Amaranthus* sp. *Mycologia* 92: 114-122
- S.A.G. (1999). Noticias Fitosanitarias, Servicio Agrícola y Ganadero, Proyecto vigilancia fitosanitaria. Año III, N°4, Diciembre, pp. 1
- Smit, W. A.; Viljoen, C. D.; Winfield, B. D.; Winfield, M. J. (1996). A new canker disease of apple, pear and plum rootstocks caused by *Diaporthe ambigua* in South Africa. *Plant Disease* 80:1331-1335
- Wehmeyer, L.E. (1933). The genus *Diaporthe* Nitschke and its segregates. *University of Michigan Studies, Sci. Ser.* 9 :1-349