

## Patogenicidad de *Pestalosphaeria hansenii* Shoemaker & J. A. Simpson en plántulas de pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. y Golf.)

Pathogenesis of *Pestalosphaeria hansenii* Shoemaker & J. A. Simpson on Caribbean Pine seedlings

---

Alfredo Maggiorani\*, Luis Rangel\*\*, Aurora Cadenas\*\*, Pietro Pietrantonio\*\*, Liliam Bracamonte\*\*, María T. Rondón\*\* y Otton Holmquist\*\*

Recibido: 28-01-08 / Aceptado: 30-06-08

### Resumen

En 2004 en un vivero de Corporación Venezolana de Guayana-PROFORCA, Venezuela, se observaron plantas con acículas basales de color marrón claro, acículas con las zonas intermedias amarillentas y apicales con zonas marchitas amarillas y zonas de color marrón rojizo, acículas con puntos blanquecinos en la superficie y oscurecimiento de las raíces, detectándose 30% de plantas muertas. De todas esas regiones, se aisló *Pestalosphaeria hansenii*. La patogenicidad del hongo y su forma de penetración en las acículas se determinó mediante pruebas de inoculación, asperjando una solución de esporas (SE) sobre plántulas, usando cuatro tratamientos: T<sub>1</sub>- aspersión de SE en acículas intactas; T<sub>2</sub>- aspersión de SE en acículas con heridas; T<sub>3</sub>- no SE/con heridas y T<sub>4</sub>- no SE/sin heridas. En T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> se obtuvo 94% de plantas enfermas en la primera prueba y 81% en la segunda, con acículas con ápices color rojizo de donde se aisló el hongo, determinándose que no se necesita la presencia de heridas para penetrar e infectar los espacios intercelulares de las acículas. Este es el primer reporte en Venezuela de *Pestalosphaeria hansenii* infectando acículas de pino caribe en vivero aunque en 2001 había sido reportado atacando conos y semillas.

**Palabras clave:** *Pestalosphaeria hansenii*, ascomiceto, *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, pino caribe, acículas, vivero.

---

\* Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Mérida, Venezuela. amaggiorani@inia.gob.ve

\*\* Laboratorio Nacional de Productos Forestales. LABONAC. Mérida, Venezuela

### Abstract

In 2004, at a nursery of CVG Proforca, Monagas state, a disease appeared with the following symptoms, from where *Pestalotia hansenii* was isolated: basal needle bundles light brown, or with the medium ones yellowish, or with the apical ones with yellowish wilted zones and zones of reddish brown color, needle bundles with whitish points on the surface and blackening of roots, detecting 30% of dead plants. The fungus pathogenicity and its way of penetrating into the needle bundles were determined by two inoculating tests, spraying a spore solution (ES) on needle bundles of plants of caribbean pine produced in Mérida city, using four treatments (T): T<sub>1</sub> – spraying of ES on intact needle bundles; T<sub>2</sub>: spraying of ES on wounded needle bundles; T<sub>3</sub>: no ES/ without wounds and T<sub>4</sub>: no ES/with wounds. It was obtained in T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>, 94% (average) of diseased plants in the first test and 81% in the second one, with needle bundles with reddish tips, from where the fungus, that does not need entry doors to penetrate and infect needle bundles intercellular spaces, was re-isolated. This is the first report for Venezuela of *P. hansenii* infecting needle bundles of caribbean pine plants at the nursery.

**Key words:** *Pestalotia hansenii*, ascomycete, *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, caribbean pine, nursery.

## Introducción

Para el establecimiento de extensas plantaciones de pino caribe (*Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barrett et Golfari) se necesita producir una cantidad muy grande de plántulas que en Venezuela son mayoritariamente sembradas en tubetes. Las enfermedades foliares en estos viveros de gran extensión, pueden provocar pérdidas considerables si no se toman las precauciones necesarias para su control, especialmente la implementación de un programa de aspersion con fungicidas.

Son pocas las enfermedades citadas en viveros de pino caribe en Venezuela. Carrero (2000) reportó por primera vez para nuestro país a *Cylindrocladium pteridis* F. A. Wolf, causando quema de acículas en plántulas provenientes de viveros del oriente de Venezuela, realizando inoculaciones que demostraron su patogenicidad para este cultivo. Este autor (Carrero, 2000), luego de realizar inoculaciones para pruebas de patogenicidad, en

condiciones de Laboratorio, manifiesta el haber aislado varios hongos, entre los cuales menciona a una especie referente al género *Pestalotiopsis*, que fue separada y descartada al inicio de este estudio, como contaminante.

Shoemaker y Simpson (1981) desde Papua, Nueva Guinea reportan *Pestalosphaeria hansenii* n.sp. causando manchas foliares sobre pino caribe. En China, estudiando las especies de *Pestalosphaeria* y *Pestalotiopsis*, Zhu, Ge y Xu (1991) llegaron a la conclusión de que *Pestalotia foedans* Sacc. et Ellis descrita en 1884 es un sinónimo de *Pestalotiopsis foedans* (Sacc. et Ellis) Steyert descrita en 1949, estados asexuales de *Pestalosphaeria hansenii*. Holmquist, Bracamonte y Cadenas (2001) aislaron *Pestalotiopsis foedans* por primera vez para Venezuela atacando conos y contaminando semillas de pino caribe.

Por otra parte, Ely (2002) estudió las manchas foliares en plantas de vivero de *Eucalyptus urophylla* causadas por *Pestalotiopsis foedans* y luego de efectuar inoculaciones en plántulas, concluyó que esta especie no es capaz de penetrar directamente en los tejidos foliares de eucalipto, sino que por el contrario, necesita para su penetración a los tejidos de su hospedante de una puerta de entrada, en este caso facilitada por heridas inducidas con una aguja hipodérmica estéril, ataque de insectos (áfidos) e infecciones previas de otros hongos (*Cylindrocladium pteridis*), en menor grado.

En 2004, en un vivero de CVG Proforca ubicado en Uverito, estado Monagas, se observaron plantas enfermas de pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) con una muerte regresiva, extendiéndose entre un 25 a un 100% del área foliar, con las acículas basales de color marrón claro, o con las intermedias amarillentas o con las apicales con zonas marchitas amarillas y zonas de color marrón rojizo o puntos blanquecinos en la superficie de algunas acículas. Algunas plantas presentaban un oscurecimiento de las raíces. El porcentaje de plantas muertas se estimó en un 30%.

Ante la magnitud de la infección de las acículas y el relativamente alto porcentaje de muerte de las plantas, de las cuales invariablemente se aisló el hongo *P. foedans*, y teniendo en mente que es de vital importancia el producir plantas sanas, fuertes y vigorosas que toleren el estrés causado por su traslado final al campo, se realizó este trabajo para determinar la patogenicidad del hongo en plántulas de pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) durante la etapa de vivero, así como el establecer si el hongo necesita de una puerta

de entrada o puede penetrar por sí solo a los diferentes tejidos de las plántulas de pino caribe.

En este trabajo, mantenemos el nombre de *Pestalotiopsis foedans* (Sacc. et Ellis) Steyeart para este hongo, que ahora encontramos tan común cuando aislamos de acículas de pino caribe de viveros o plantaciones que presentan amarillamiento o no, provenientes de diversas regiones del país y que nos hacen pensar que actúa como un endófito que, en determinadas circunstancias y con gran presión del inóculo, podría convertirse en un patógeno importante.

## **Materiales y métodos**

### ***Recolección de plantas enfermas***

De un vivero de CVG-PROFORCA ubicado en Uverito, estado Monagas, se colectaron muestras de plantas enfermas de pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) con lesiones en las acículas y oscurecimiento de las raíces, las cuales se trasladaron al laboratorio de Fitosanidad Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes (ULA), Mérida, donde se mantuvieron bajo refrigeración (4 °C) hasta la realización del proceso de aislamiento del agente causal de la enfermedad y la realización de las pruebas de patogenicidad.

### ***Aislamiento de *Pestalotiopsis foedans****

#### ***Preparación del medio de cultivo***

Se utilizó el medio Agar Malta (AM), en la proporción de 15 g de agar, 20 g de malta, ½ pastilla de Cloranfenicol (antibiótico) en 1 l de agua. El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C, 15 lbs/pulg<sup>2</sup> por 20 min. y fue dispensado en cápsulas estériles (9 mm x 15 mm).

#### ***Selección y siembra de tejido vegetal enfermo***

Las secciones de tejido vegetal enfermo de 2 mm x 2 mm fueron seleccionadas y tomadas de la zona de transición de tejido sano a tejido enfermo de

las acículas, de acuerdo con: a) acículas basales de color marrón claro, b) acículas intermedias amarillentas, c) acículas apicales con zonas amarillas, d) acículas con zonas marrón rojizo (deficiencia de fósforo), e) acículas con puntos blanquecinos en su superficie, f) acículas basales con zonas oscurecidas y g) raíces con zonas oscurecidas. Así mismo, de una planta totalmente atacada, se tomaron secciones de tejido enfermo de la base del tallo y las raíces oscurecidas.

Las secciones de tejido vegetal seleccionadas se esterilizaron superficialmente colocándolas en alcohol etílico absoluto durante 1 min., pasándolas luego a una cápsula de Petri con agua destilada, esterilizada (ADE) por 30 seg., y después, se colocaron sobre papel de filtro esterilizado para su secado. Las secciones esterilizadas se colocaron en cápsulas con AM, a razón de cinco secciones por cápsula. Los hongos obtenidos se purificaron e identificaron mediante la observación de las características macros y microscópicas.

#### *Presencia de **P. foedans** en tejidos internos de acículas enfermas*

Para detectar la presencia del hongo en los tejidos internos de las acículas sanas y enfermas, se realizaron cortes longitudinales a mano con ayuda de escalpelo, para su posterior observación al microscopio.

#### *Producción de plantas de pino caribe*

Las semillas de pino caribe fueron esterilizadas con Captan. Se sometieron a un tratamiento pre-germinativo previo a su siembra en tubetes que contenían un sustrato de arena y corteza de pino, el cual fue esterilizado con vapor de agua. Los tubetes se colocaron en bandejas, dentro de un umbráculo con 60% de sombra, temperatura de  $19 \pm 2$  °C y humedad relativa de  $75 \pm 2\%$ . Cuando las plantas alcanzaron una altura de 15 cm se procedió a realizar las pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch) mediante la inoculación del hongo **P. foedans**.

#### *Preparación del inóculo*

La solución de esporas (SE) usada como inóculo se preparó utilizando el contenido conidial de dos cápsulas de siete (7) días de crecimiento de **P. foedans**, el cual se desprendió del medio de cultivo agregando 50 ml

de adherente esparcidor (ADE) con dos gotas de Tween 20 y raspando la superficie de la colonia, obteniéndose una concentración de esporas de  $10^5$  esporas/ml. Para confirmar la viabilidad del hongo se colocaron dos muestras de cada suspensión de conidios en el medio agar malta (AM); así mismo, para comprobar la madurez de los conidios, se preparó un montaje de tres muestras de cada suspensión para ser observadas en el microscopio, las cuales presentaban septación, tamaño ( $20-21 \times 8 \mu\text{m}$ ) y apéndices (2-3) adecuados para ser infectivas.

### *Pruebas de postulados de Koch con **P. foedans***

Las plántulas de pino caribe fueron cubiertas con bolsas plásticas por 24 horas previo a su inoculación con **P. foedans**. Se efectuaron dos pruebas de patogenicidad, con un intervalo de 15 días, teniéndose en cada una, un total de 24 plantas distribuidas en seis (6) plantas por tratamiento:

- T<sub>1</sub> - aspersión de SE en acículas intactas
- T<sub>2</sub> - aspersión de SE en acículas con heridas
- T<sub>3</sub> - no SE/sin heridas
- T<sub>4</sub> - no SE/con heridas

A las acículas de las plántulas de los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub> se les hizo pequeñas heridas superficiales con una aguja esterilizada. Las plántulas de los tratamientos T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> (tratamientos testigo) se asperjaron con una suspensión de 50 ml de ADE más dos gotas de Tween 20 (adherente). Luego de la inoculación, las plántulas se mantuvieron dentro de un umbráculo de plástico ubicado en el laboratorio de Fitosanidad Forestal a temperatura de  $19 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , 40% de luminosidad y humedad relativa de  $75 \pm 2 \%$  durante 15 días, para inducir la rápida germinación de los conidios y el desarrollo de las hifas del hongo, garantizando así la infección de las acículas.

### *Diseño experimental y análisis de datos*

En la primera prueba, las plántulas inoculadas con el hongo (T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>) se distribuyeron en 4 columnas aleatoriamente en una bandeja, mientras que las plántulas de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> se ubicaron en una bandeja por encima del nivel de la anterior, distribuidas en dos columnas en forma aleatoria. En la segunda

prueba, las plántulas de todos los tratamientos se cubrieron con bolsas plásticas, las cuales se retiraron a las 48 h de iniciada la prueba. A los datos de plantas sanas y enfermas obtenidos en la segunda prueba, se les aplicó una prueba de  $\text{Chi}^2$ , con un procedimiento de tabla de  $2 \times 2$ , con 1 grado de libertad, y con un valor de  $\alpha = 0,001$  de probabilidad.

## Resultados y discusión

En las dos pruebas de patogenicidad realizadas, se pudo detectar acículas parcialmente necrosadas, acículas con los ápices de color rojo o de color amarillo, acículas con puntos blancos en su superficie, así como acículas con zonas amarillo-rojizas comenzando en el ápice y llegando hasta la mitad de la acícula. Estos síntomas son similares a los observados en las plantas enfermas colectadas en el vivero ubicado en Uverito, estado Monagas.

En la primera prueba, el porcentaje de plantas mostrando los síntomas de la enfermedad fue de:  $T_1=75\%$ ,  $T_2=100\%$ ,  $T_3=100\%$  y  $T_4=75\%$ . En la segunda prueba, el porcentaje fue de:  $T_1=87,5\%$ ,  $T_2=100\%$ ,  $T_3=25\%$  y  $T_4=0\%$ . El porcentaje de supervivencia de las plantas, en la primera prueba, de los tratamientos testigo ( $T_3$  y  $T_4$ ) fue de un  $50\%$ . Se presume que la muerte de un  $50\%$  de las plantas pudo deberse a un estrés hídrico y a las altas temperaturas soportadas, por haberse ubicado en la parte superior del invernadero (sitio cercano al techo de plástico). Esto fue corregido en la segunda prueba para cual se observó un  $100\%$  de supervivencia de las plantas.

De las acículas con la presencia de los síntomas arriba descritos, luego de 8 días de efectuadas las inoculaciones, se aisló el hongo *P. foedans*, completándose satisfactoriamente la prueba de patogenicidad. Asimismo, de aquellas plantas testigo con síntomas de la enfermedad también se aisló el hongo, constatándose así la alta capacidad de infestación del hongo. El resultado de la prueba  $\text{Chi}^2$ , realizada a los datos obtenidos en la segunda prueba de inoculación, mostró diferencias altamente significativas con una  $P > 10,828$ .

Las características microscópicas determinadas de *P. foedans* fueron: conidios de  $20,88\ \mu\text{m}$  de largo x  $8,0\ \mu\text{m}$  de ancho. Los apéndices apicales flexuosos, naciendo de una misma cresta central, no ramificados, en número

de tres, de 22  $\mu\text{m}$  de largo y 1,1  $\mu\text{m}$  de grosor. Estos valores se encuentran dentro de los rangos de tamaño de conidios de *P. foedans* citados por Shoemaker y Simpson (1981), Zhu *et al.* (1991) y Ely (2002). La observación de los cortes longitudinales mostró la presencia de hifas de *P. foedans* en los tejidos intracelularmente en las acículas enfermas, las cuales no se detectaron en las acículas sanas.

## Conclusiones

- Las pruebas de Koch demostraron la patogenicidad de *P. foedans* en pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*).
- *P. foedans* se detectó en los tejidos intercelulares de acículas enfermas.
- *P. foedans* no necesita de puertas de entrada para invadir las acículas de pino caribe.

## Referencias bibliográficas

- CARRERO, C. 2000. Identificación de la especie *Cylindrocladium* que afecta el pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) en Uverito, estado Monagas, Venezuela y su sensibilidad a fungicidas. Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Centro de Estudios de Postgrado. Programa de Manejo de Bosques. Tesis de Magister Scientiae. Mérida, Venezuela. Mimeografiado. 37 p.
- ELY, F. 2002. Etiología y epidemiología de los principales hongos patógenos foliares de *Eucalyptus urophylla* Blake en Venezuela. Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Centro de Estudios de Postgrado. Programa de Manejo de Bosques. Tesis de Magister Scientiae. Mérida, Venezuela. Mimeografiado. 108 p.
- HOLMQUIST, O., BRACAMONTE, L. y CADENAS, A. 2001. *Pestaloptiosis hanseni*, nuevo parásito sobre conos y contaminantes de la semilla de *Pinus caribaea* en Venezuela. *Acta Científica Venezolana*, 52(3).



- SHOEMAKER, R. and SIMPSON, J. 1981. A new species of *Pestalosphaeria* on pine with comments on the generic placement of the anamorph. *Canadian Journal of Botany*, 59(6): 986-991.
- ZHU, P., GE, Q. and XU, T. 1991. The perfect stage of *Pestalotiopsis* from China. *Mycotaxon* 40: 129-140.

