

PUDRICIÓN MARRÓN AMARILLENTO CAUSADA POR *Discohainesia oenotherae* EN FRUTOS DE FRESA EN MÉRIDA-VENEZUELA

Luis Cedeño, Chrystian Carrero, Yulimar Castro,
Javier Calderón y Kleyra Quintero

RESUMEN

Sobre la base de la morfología y el tamaño de las estructuras producidas in vitro e in situ por los sinanómorfos *Hainesia lythri* y *Pilidium concavum*, se identificó *Discohainesia oenotherae* como la causa de pudrición marrón amarillenta en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) en Mérida, Venezuela. En extracto de malta agar (EMA) *H. lythri* formó conidiomas cupulados y discoides con características de esporodoquio. Los conidióforos se observaron hialinos, 1-2 septados, cilíndricos y ramificados. Las células conidiógenas fueron filiales hialinas y enteroblásticas. Los conidios se apreciaron hialinos, falcados como canoas, con ápice agudo y base estrechamente obtusa, pared celular delgada, aseptados, de 6,5 (5,5-8,0) x 1,9 (1,5-2,0) µm. Los conidiomas y conidios producidos

sobre frutos inoculados midieron 442,6 (292,6-585,3) µm en diámetro y 6,5 (5,0-8,0) x 1,7 (1,5-2,5) µm, respectivamente. Los conidiomas de *P. concavum* aparecieron en cultivos viejos en EMA, como corpúsculos semiesféricos, duros, negros, con la porción superior irregularmente deprimida y 526,8 (390,2-682,9) µm de diámetro. Estos corpúsculos contenían conidios morfológicamente similares a los producidos por *H. lythri* los cuales midieron 6,3 (5,0-8,0) x 1,7 (1,5-2,0) µm. La enfermedad se reprodujo en frutos maduros de fresa 'Chandler' inoculados con suspensión conidial ($1,5 \times 10^6$ conidios/ml). *H. lythri* fue aislado continuamente de los frutos inoculados. Los frutos testigo no presentaron los síntomas de la enfermedad.

SUMMARY

Based on morphology and size of the structures produced in situ and in vitro by the synanomorpha *Hainesia lythri* and *Pilidium concavum*, *Discohainesia oenotherae* was identified as the cause of tan brown rot on strawberry fruits in Merida, Venezuela. On malt extract agar (MEA) *H. lythri* formed cupulate to discoid conidiomata which showed sporodochia features. Conidiophores were hyaline, 1-2 septate, cylindrical, and branched. Conidiogenous cells appeared as phialide, hyaline and enteroblastic. Conidia were hyaline, falcate as canoe, with acute apex and narrow obtuse base, thin-walled, 6.5 (5.5-8.0) x 1.9 (1.5-2.0) µm and non-septate. Conidiomata and conidia produced on inocu-

lated fruits measured 442.6 (292.6-585.3) µm in diameter and 6.5 (5.0-8.0) x 1.7 (1.5-2.5) µm, respectively. The conidiomata of *Pilidium concavum* appeared on old MEA cultures, as hard hemispheric black bodies with upper portion irregularly depressed and were 526.8 (390.2-682.9) µm in diameter. These bodies contained conidia of 6.3 (5.0-8.0) x 1.7 (1.5-2.0) µm which were morphologically similar to those produced by *H. lythri*. The disease was reproduced on mature fruits of 'Chandler' strawberry inoculated with conidial suspension (1.5×10^6 conidia/ml). *H. lythri* was continuously isolated from inoculated fruits. Control fruits did not show the disease symptoms.

Introducción

El estado Mérida es un importante productor de fresas (*Fragaria x ananassa* Duchesne) en Venezuela. Sin embargo, durante frecuentes visitas realizadas a mercados y puestos de venta ambulante, se ha comprobado que las fresas que se están comercializando en la región presentan un acentuado

y generalizado estado de deterioro que afecta a productores, vendedores y consumidores. Los análisis preliminares han revelado que los daños están siendo causados por tres enfermedades de pudrición, a saber, antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds; Cedeño y Carrero, 1997), moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.; Maas, 1987) y otra cuya sintomatología

no había sido previamente observada en el área. La antracnosis y el moho gris son las que están ocasionando pérdidas económicas más significativas.

La enfermedad de causa desconocida, cuya identificación constituyó el propósito de la investigación que se reporta, aparece con menor frecuencia y fue observada por primera

vez en Abril de 1999, en una plantación comercial de fresa 'Chandler' ubicada en el sector "La Sabanota" del Municipio Sucre. Posteriormente fue detectada en sectores de "El Mojoso" y "Las Playitas" de Bailadores. Recientemente se observó en fresas provenientes de Mucuchies. El síntoma típico de la enfermedad es una lesión de color marrón amari-

PALABRAS CLAVE / Fresa / *Fragaria x ananassa* / *Hainesia lythri* / *Pezizella oenotherae* / *Pilidium concavum* /

Recibido: 30/01/2001. Aceptado: 15/03/2001.

Luis Cedeño, Ingeniero Agrónomo, Universidad de Oriente (UDO). M.Sc. en Fitopatología (University of Georgia, USA). Profesor Titular, Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Universidad de los Andes

(ULA). Dirección: Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (IIAP), ULA, Apartado 77 (La Hechicera), Mérida 5101-A, Venezuela.
e-mail: lurace@telcel.net.ve

Chrystian Carrero, Ingeniero Agrónomo, Universidad del Zulia. M.Sc. en Manejo de Bosques (ULA). Profesor Asistente, Laboratorio de Fitopatología, IIAP-ULA.
Yulimar Castro, T.S.U. en Agrotecnia,

Javier Calderón, Ingeniero Agrónomo.
Kleyra Quintero, T.S.U. en Agrotecnia. Asistente del Laboratorio de Fitopatología, IIAP-ULA.

RESUMO

Sobre a base da morfologia e o tamanho das estruturas produzidas *in vitro* e *in situ* pelos sinanórfos *Hainesia lythri* e *Pilidium concavum*, foi identificado *Discoghainesia oenotherae* como a causa de podridão marrom amarelada em frutos de morango (*Fragaria x ananassa*) em Mérida, Venezuela. Em extrato de malta agar (EMA) *H. lythri* formou conidiómas cupulados e discóides com características de esporódoquios. Os conidióforos se observaram hialinos, 1-2 septados, cilíndricos e ramificados. As células conidiógenas foram filídes hialinas e enteroblásticas. Os conídios foram apreciados hialinos, falcados como canoas, com ápice agudo e base estreitamente obtusa, parede celular delgada, aseptados, de 6,5 (5,5-8,0) x 1,9 (1,5-2,0) μm . Os

conidiómas e conídios produzidos sobre frutos inoculados mediram 442,6 (292,6-585,3) μm em diâmetro y 6,5 (5,0-8,0) x 1,7 (1,5-2,5) μm , respectivamente. Os conidiómas de *P. concavum* apareceram em cultivos velhos em EMA, como corpúsculos semiesféricos, duros, negros, com a porção superior irregularmente deprimida e 526,8 (390,2-682,9) μm de diâmetro. Estes corpúsculos continham conídios morfológicamente similares aos produzidos por *H. lythri* e mediram 6,3 (5,0-8,0) x 1,7 (1,5-2,0) μm . A doença se reproduziu em frutos maduros de morango 'Chandler' inoculados com suspensão conidial ($1,5 \times 10^6$ conídios/ml). *H. lythri* foi isolado continuamente dos frutos inoculados. Os frutos experimentados não apresentaram os sintomas da doença.

lento, levemente hundida, de consistencia esponjosa y bordes levantados, la cual, por lo general, se localiza en los tejidos próximos al cáliz (Figura 1). Tanto externa como internamente la lesión aparece rodeada por una banda de tejidos blandos (macerados) que permite extraerla fácilmente dejando un hueco de forma cónica. Los síntomas descritos coincidieron con los registrados para la pudrición marrón amarillenta, cuyo agente causal es *Hainesia lythri* (Desmaz.) Höhn (Maas, 1987).

El objetivo del trabajo fue confirmar la identidad del supuesto agente causal y demostrar su patogenicidad. Un resumen de este estudio fue presentado en XVI Congreso Venezolano de Fitopatología (Cedeño *et al.*, 1999).

Materiales y Métodos

Aislamiento e identificación del patógeno

Los aislamientos se realizaron a partir de frutos maduros e inmaduros cosechados en "La Sabanota", "El Mojoso" y "Las Playitas". Después de lavar durante 1h con agua corriente los frutos infectados, de la parte interna se cortaron pequeños segmentos (ca. 2mm²) los cuales fueron seguidamente sumergidos por 3 min en solución 0,5% de hipoclorito de sodio, lavados tres veces en agua destilada estéril (ADE), secados con papel absorbente estéril y sembrados en placas de agua agar 2% acidificado con ácido láctico (AAA). Las placas se

incubaron a 25°C en la oscuridad. Posteriormente los cultivos emergentes fueron subcultivados en placas de Petri con extracto de malta agar (EMA), papa-dextrosa agar (Difco PDA) y papa-zanahoria agar (PZA), las cuales se incubaron por 5 días a 25°C en la oscuridad y luego a temperatura ambiente (22°C) bajo un régimen de 12h de luz blanca fluorescente. Los montajes se hicieron en formalina 4%. Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss, modelo Axioplan con rejilla micrométrica y cámara fotográfica incorporadas. La identidad específica del patógeno se estableció comparando la morfología y el tamaño de las estructuras reproductivas asexuales producidas *in situ* e *in vitro* con las descritas por Sutton (1980).

Inoculación

Las pruebas de patogenicidad se realizaron aplicando una gota de suspensión conidial ($1,5 \times 10^6$ conídios/ml) en frutos maduros, con y sin heridas, de fresa 'Chandler'. Previamente los frutos fueron lavados con agua corriente, tratados por 5 min con hipoclorito de sodio 0,5%, sumergidos en varios cambios de ADE, secados con papel absorbente estéril y colocados en cápsulas de Petri desechables, las cuales se depositaron en bandejas de plástico con tapa de cierre hermético que contenían papel absorbente humedecido con ADE. Las heridas se hicieron en tejidos próximos a los sépalos utili-

zando un sacabocado estéril de 3mm. Con una pipeta Pasteur estéril en cada herida se aplicó una gota de suspensión preparada con cultivos en PZA y ADE. Los frutos utilizados como testigo sólo recibieron ADE. Inmediatamente después de la inoculación (DDI) las bandejas se incubaron a temperatura ambiente (22°C) y a partir de las 72h se efectuaron observaciones periódicas para evaluar el desarrollo de la enfermedad. De los materiales inoculados se realizaron aislamientos para confirmar el cumplimiento de los postulados de Koch. Las pruebas de inoculación se hicieron tres veces.

Resultados y Discusión

Aislamiento e identificación del patógeno

Consistentemente los aislamientos obtenidos de frutos maduros e inmaduros originaron en EMA, PDA y PZA cultivos fúngicos de características similares. El EMA resultó ser el mejor sustrato porque permitió el crecimiento más rápido y la mayor producción de conidiómas. En todos los sustratos el micelio creció en forma de bandas concéntricas de color beige a marrón claro. Los conidiómas (Figura 2) se observaron como esporódoquios con forma de copa y de disco, con o sin pedículo, de bordes uniformes o festoneados e inicialmente fueron hialinos, luego cambiaron a marrón claro y posteriormente a marrón rojizo o casi negro. Los coní-

dióforos aparecieron en fascículos y fueron hialinos, cilíndricos (filiformes) y septados. Las células conidiógenas fueron filídes hialinas y enteroblásticas. Los conídios emergieron en gotas mucilaginosas que se quedan depositadas en los conidiómas y se apreciaron hialinos, aseptados, falcados como canoa, con ápice agudo y base estrechamente obtusa y midieron 6,5 (5,5-8,0) x 1,9 (1,5-2,0) μm (Figura 3). Las gotas conidiales se observaron inicialmente blancas, luego cremosas y posteriormente cambiaron a color marrón amarillento. Las características de estas estructuras reproductivas coincidieron con las descritas para *H. lythri* por Sutton (1980). En frutos inoculados los conidiómas se observaron parcialmente inmersos, globosos al principio y luego con forma de copa, sin pedículo, y tuvieron 442,6 (292,6-585,3) μm en diámetro. Los más jóvenes mostraron color rosado o el color natural de las fresas maduras. Los conídios producidos *in situ* fueron morfológicamente similares a los formados *in vitro* y midieron 6,5 (5,0-8,0) x 1,7 (1,5-2,5) μm .

En cultivos viejos en EMA (40 días) aparecieron conidiómas con forma de corpúsculos semiesféricos, negros a simple vista y ámbar bajo luz transmitida, de consistencia dura, con la porción superior irregularmente deprimida y 526,8 (390,2-682,9) μm en diámetro. Estos corpúsculos contenían conídios de 6,3 (5,0-8,0) x 1,7 (1,5-2,0) μm ,



Figura 1. Síntomas de la pudrición amarillenta causada por *Discohainesia oenotherae* en fresa 'Chandler'. En la lesión se aprecian claramente los conidiomas del sinanomorfo *Hainesia lythri*.



Figura 2. Conidioma cupulado de *Hainesia lythri* en papa-zanahoria agar.

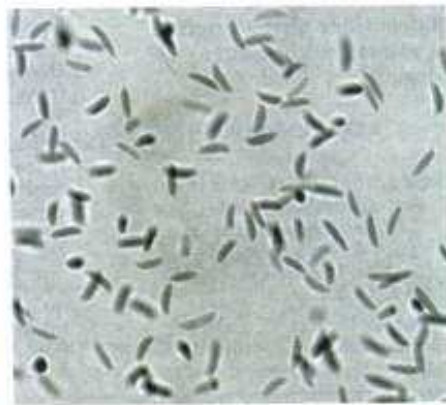


Figura 3. Conidios de *Hainesia lythri* en papa-zanahoria agar.

los cuales se apreciaron morfológicamente semejantes a los de *H. lythri*. Igualmente se visualizaron conidiomas columnares de color ámbar con los conidios emergiendo en una especie de cirrus cimentado. Las características de los conidiomas semiesféricos se correspondieron con las descritas para *Pilidium concavum* (Desmaz.) Höhn (Palm, 1991).

En consideración a las características morfométricas de los conidiomas y conidios producidos *in situ* e *in vitro*, el hongo se identificó como *Discohainesia oenotherae* (Cooke & Ellis) Nannf. [= *Pezizella oenotherae* (Cooke & Ellis) Sacc.], cuyos sinanormorfos son *H. lythri* y *P. concavum* (Palm, 1991; Sutton, 1980). Los conidios de los sinanormorfos fueron morfométricamente similares, pero los conidiomas mostraron características anatómicas y morfológicas diferentes (Palm, 1991).

Los conidiomas de *H. lythri* y *P. concavum* son estructuras complejas a las cuales es difícil asignarle términos (Palm, 1991). Los de *H. lythri* han sido frecuentemente referidos como esporodoquios y aunque tienen algunos de los aspectos que caracterizan estas estructuras, de acuerdo a la definición de Sutton (1980) no son esporodoquios. Se ajustan más a la definición de

estroma (Palm, 1991). Por otra parte, Shear y Dodge (1921) llamaron picnidios a los conidiomas de *P. concavum*, pero en atención a la descripción de Sutton (1980), tampoco son estructuras picnidiales porque tienen forma semiesférica, carecen de ostiolo y la capa himenial se origina dentro de un lóculo formado por una capa estromática, erumpente, subcuticular o subepidermal de textura angular (Palm, 1991). En atención a lo anterior, Palm (1991) llamó a las estructuras de *H. lythri* conidiomas cupulados o discoides, mientras que se refirió a los de *P. concavum* como conidiomas semiesféricos. La relación entre los sinanormorfos fue demostrada por Palm (1991), utilizando aislamientos monoconidiales obtenidos de los conidiomas semiesféricos de *P. concavum*, los cuales produjeron los conidiomas de *H. lythri* en medios de cultivo y en ramas de alfalfa y mora.

Inoculación

Las pruebas de patogenicidad fueron exitosas y permitieron reproducir los mismos síntomas observados en frutos infectados naturalmente. Tres días DDI, todos los frutos inoculados presentaban síntomas de infección. Característicamente los frutos mostraban

lesiones circulares de color marrón amarillento, con hasta 1 cm de diámetro, de consistencia esponjosa y bordes ligeramente levantados. En algunas lesiones se había iniciado el desarrollo de los conidiomas. Tres días más tarde, las lesiones estaban invadidas por conidiomas como esporodoquios en forma de copa y de disco. Los conidiomas jóvenes se apreciaron de color rosado y los viejos marrón amarillentos. Los conidios emergieron en masas de color inicialmente blanco, luego cremoso y posteriormente marrón amarillento. Los frutos testigo no desarrollaron síntomas de infección. *H. lythri* fue aislado continuamente de los frutos inoculados, demostrándose de esta manera el cumplimiento de los postulados de Koch.

Bajo el nombre del anamorfo *H. lythri*, *D. oenotherae* ha sido catalogado como un patógeno débil porque, por lo general, requiere de la presencia de heridas para causar infección (Lundquist y Foreman, 1986; Maas, 1987; Shear y Dodge, 1921; Viljoen *et al.*, 1992). En Sur Africa *H. lythri* ha sido referido como causa de quemadura en plántulas de *Eucalyptus* spp. previamente dañadas con fertilizante (Lundquist y Foreman, 1986). Daños leves por fertilizante son suficientes para que ocurra la infección (Viljoen *et al.*, 1992). Aunque en el estudio que se reporta el hongo atacó frutos con y sin

heridas provocadas con la aguja de disección, no se descarta la posibilidad de que la infección ocurrida en los frutos sin heridas haya sido facilitada por roturas ocasionadas en la epidermis durante la desinfección (Shear y Dodge, 1921) o por microlesiones causadas por plagas, especialmente ácaros. Un fuerte ataque de ácaros fue observado en la plantación donde se detectó por primera vez la enfermedad. Sin embargo, Stevens y Peterson (1916), reportaron haber observado plantas de fresa con frutos maduros e inmaduros infectados por *H. lythri*. En este último caso, la información permite descartar la manipulación como causa de roturas en la epidermis, pero no así obviar la posibilidad de que existieran heridas provocadas por plagas. En la India *H. lythri* fue identificado como causa de manchas foliares en fresa (Phatak y Payak, 1965), pero existen dudas al respecto, por cuanto en la descripción *in situ* e *in vitro* de picnidios de cuello corto y ostiolados, tipo de estructura que no producen los sinanormorfos de *D. oenotherae*.

El hecho de que la enfermedad no había sido reportada previamente en Venezuela, conduce a considerar la posibilidad de que el patógeno pudiera haber sido introducido en materiales de propagación importados de California por los propietarios de la fin-

ca de donde provenían los estolones que dieron origen a las plantas cultivadas en "La Sabanota".

REFERENCIAS

- Cedeño L, Carrero C (1997) Antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* en frutos de fresa en Mérida, Venezuela. *Interciencia* 22: 315-319.
- Cedeño L, Carrero C, Castro Y, Calderón J, Quintero K (1999) Primer reporte en Venezuela de la pudrición marrón amarillenta causada por *Hainesia lythri* en frutos de fresa. *Fitopatol. Venez.* 12: 47.
- Lundquist JE, Foreman TE (1986) A leaf blight of *Eucalyptus* seedlings in South African nurseries caused by *Hainesia lythri*. *S. African Forest. J.* 136: 22-25.
- Maas JL (Ed) (1987) Tan-brown rot. En: *Compendium of strawberry diseases*. APS, St Paul, Minnesota. pp. 63-64.
- Palm ME (1991) Taxonomy and morphology of the synanamorphs *Pitidium concavum* and *Hainesia lythri* (Coelomycetes). *Mycologia* 83: 787-796.
- Phatak HC, Payak MM (1965) *Hainesia lythri* on strawberry. A new disease record for India. *Indian Phytopathol.* 18: 237-239.
- Shear CL, Dodge BO (1921) The life history and identity of "*Patellina fragariae*", "*Lepothyrium macrothecium*", and "*Peziza oenotherae*". *Mycologia* 13: 135-170.
- Stevens FL, Peterson A (1916). Some new strawberry fungi. *Phytopathology* 6: 258-267.
- Sutton BC (1980) *Hainesia* Ell. & Sacc. En: *The Coelomycetes, fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England. p. 552.
- Viljoen A, Wingfield MJ, Crous PW (1992) Fungal pathogens in *Pinus* and *Eucalyptus* seedlings nurseries in South Africa: A review. *S. African Forest. J.* 161: 45-51.

INTERCIENCIA

COMPLETE
SU COLECCIÓN DE
INTERCIENCIA

COMPLETE YOUR
INTERCIENCIA
COLLECTION

Apreciado suscriptor,

Ofrecemos la oportunidad de completar su colección de INTERCIENCIA a precios reducidos. Escribanos indicando los ejemplares (volumen y número) faltantes en su colección a

Dear subscriber,

We are offering the opportunity to complete your INTERCIENCIA collection at discount price. Just inform us of your missing issues (volume and number) by writing to

INTERCIENCIA

Fax: (58-212) 992 32 24

Correo /Mail: Apartado 51842
Caracas 1050 A
Venezuela

e-mail: interciencia@ivic.ve
[www:interciencia.org](http://www.interciencia.org)

Usted recibirá confirmación de disponibilidad y una cotización de precios

You will receive availability confirmation and a price quotation