

Comunicación corta

***Colletotrichum gloesporioides*. PRIMERA NOTIFICACIÓN COMO AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE REGRESIVA DE *Rosmarinum officinalis* L EN BUENOS AIRES, ARGENTINA**

María C. Sandoval¹⁻², María C.I. Noelting² y Eva H. Cristobal¹⁻²

¹Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Ruta 4 Km 2 (1836) Llavallol. Buenos Aires. Argentina. Correo electrónico: msand@ciudad.com.ar. ²Instituto Fitotécnico Santa Catalina. FCAYF. Universidad Nacional de la Plata. C.C.4 (1836). Llavallol. Buenos Aires. Argentina

RESUMEN: El cultivo del romero, *Rosmarinum officinalis* L. es de gran interés por sus múltiples usos como aromática y medicinal. En el año 2004, en el sur de la provincia de Buenos Aires (Argentina) se observaron plantas de romero, crecidas en campo e invernáculo, con lesiones necróticas progresivas en hojas, tallos y ramas. El presente trabajo se enfocó en la identificación del agente causal. Se escogieron 10 plantas, de un total de cuarenta examinadas y se obtuvieron segmentos de tejidos sintomáticos, estos fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, enjuagados con agua destilada estéril y colocados en placas Petri con agar papa glucosado al 2% (APG). Sobre todos los segmentos sembrados creció una colonia blanco-grisácea, y acérvulos con conidios en masa de color naranja y setas oscuras. Los conidios de forma cilíndrica germinaron formando apresorios o micelio. El aislamiento fue identificado como *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Para confirmar su patogenicidad, hojas y ramas, obtenidas de diez plantas sanas, se inocularon con una suspensión del hongo utilizando una jeringa hipodérmica; el testigo fue inoculado con agua destilada estéril. Este material se sembró en placas Petri con APG. Esta prueba reprodujo los síntomas observados en el campo e invernáculo. Entre las 24 – 48 h después de la inoculación todos los tejidos desarrollaron necrosis. El patógeno se reaisló de hojas y ramas siguiendo los postulados de Koch. Los testigos permanecieron asintomáticos. Este es el primer informe de *C. gloesporioides* como agente causal de muerte regresiva en *R. officinalis* en Argentina.

(Palabras clave: romero; *Colletotrichum gloesporioides*; muerte regresiva; aromática medicinal; Lamiaceae)

FIRST REPORT OF *Colletotrichum gloesporioides* CAUSING DIE BACK IN *Rosmarinum officinalis* L. IN BUENOS AIRES, ARGENTINA

ABSTRACT: Cultivation of the shrub *Rosmarinum officinalis* L. is of great interest due to its aromatic and medicinal properties. In 2004, in the south of Buenos Aires province (Argentina), rosemary plants showing wilt and necrotic lesions in leaves, stems and twigs (die back) were observed in the field and the greenhouse. This work has focused on the identification of the causal agent of the above mentioned pathology. Forty plants were examined and segments of the symptomatic tissues from ten of them were disinfected with a 2% sodium hypochlorite solution, rinsed in sterile water and plated into Petri dishes with potato dextrose agar (PDA, 2%). The plates were incubated at 22°C for eight days. Grayish white colonies and acervuli with conidia in orange masses and dark setae were observed on the all tissue segments. The cylindrical shaped conidia germinated developing mycelium or apressoria. The isolate was identified as *Colletotrichum gloesporioides* (Penz) Penz & Sacc. To confirm its pathogenicity, leaves and twigs taken from ten healthy plants were inoculated with a suspension of the fungus using a hypodermic syringe, the control was inoculated with sterile distilled water. This material was cultured in Petri dishes with PGA. This test reproduced the symptoms observed in the field and greenhouse. Between 24–48 h after inoculation, all the tissues developed necrosis. The pathogen was then reisolated from leaves and twigs fulfilling Koch's postulates. The controls remained symptomless. This is the first report of *Colletotrichum gloesporioides* as the causal agent of die back in *Rosmarinum officinalis* in Argentina.

(Key words: rosemary; *Colletotrichum gloesporioides*; die back; aromatic-medicinal; Lamiaceae)

El romero (*Rosmarinum officinalis* L.) es un arbusto perteneciente a la familia Lamiaceae, utilizada como: condimento y aromatizante de comidas, así como insumo para la obtención de aceites esenciales, estimulantes y tónicos medicinales, con aplicaciones en perfumería y otros usos industriales (10). La demanda mundial por estos productos es alta, motivo por el cual la producción del romero como aromática, condimentaria y esencia constituye una actividad promisorio (1).

La expansión de este cultivo está relacionado con el desarrollo de tecnologías adecuadas, el logro de precios competitivos, y en especial con la obtención de altos niveles de calidad y sanidad que permitan acceder a canales eficientes de comercialización. Uno de los problemas que dificultan la obtención de calidad y sanidad, y por consiguiente de inocuidad es la presencia de patologías fúngicas durante la producción primaria (cultivo/cosecha) de romero (7).

En este contexto, a fines del año 2004 se observó en plantas de romero, cultivadas en el campo experimental y en invernáculo, lesiones necróticas en hojas, tallos y ramas apicales que terminaban por afectar en forma descendente a la totalidad de la parte aérea, exhibiendo los ejemplares afectados un aspecto de marchitez general seguido de la muerte de las plantas. Los exámenes preliminares efectuados en muestras de plantas enfermas permitieron identificar a un hongo del género *Colletotrichum* Corda (5,13). En la revisión de la bibliografía nacional y extranjera se encontraron datos acerca de este patógeno sobre un amplio rango de hospedantes pero, no sobre *R. officinalis* (2, 6, 8, 9, 11, 12,14).

El objetivo de este trabajo consistió en la determinación del agente causal del cuadro sintomatológico que produce la muerte de plantas de romero en Buenos Aires, Argentina.

El hospedante estudiado consistió en 40 plantas de romero cultivadas en macetas y procedentes de viveros comerciales de la zona sur de la provincia de Buenos Aires. La descripción y caracterización de la sintomatología fue realizada a partir de observaciones macroscópicas y con microscopio óptico (45 y 100 X) de muestras de hojas, tallos y ramas apicales de plantas de romero sintomáticas, efectuándose cortes histológicos y también preparaciones de estructuras fungosas en solución de azul de algodón y lactofenol.

Para la determinación del agente causal de la enfermedad se emplearon muestras consistentes en secciones de hojas y tallos procedentes de diez plantas enfermas. Estas muestras se desinfectaron con

hipoclorito de sodio (2%) durante 5 minutos, se enjuaga con agua destilada estéril, el exceso de humedad fue eliminado colocando el material sobre hojas de papel de filtro estéril. A continuación se procedió a la siembra en placas Petri con APG al 2%. Se utilizaron cinco secciones de hojas y/o tallos por placa y tres repeticiones por muestra. Las placas Petri se colocaron en una estufa (Isotemp) a 22° C durante ocho días, al término de los cuales se analizaron los caracteres macro y microscópicos de las colonias desarrolladas, utilizándose claves taxonómicas y descriptivas para la identificación (5,13). Para la caracterización morfológica de las estructuras del patógeno se utilizaron 50 preparaciones en solución de algodón y lactofenol. La medición de la longitud y diámetro (mm) de 100 conidios se realizó con un ocular micrométrico (Carl Zeiss Jena). El procedimiento se realizó dos veces. Después de la identificación se obtuvo un cultivo puro, por siembra de punta de hifa en APG (2%), que fue depositado en el cepario de la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Lomas de Zamora.

En las pruebas de patogenicidad, un cultivo puro del hongo en APG aislado en la etapa anterior se empleó como inóculo, mediante la preparación de una suspensión en 100 mL de agua destilada estéril con una concentración de 2×10^8 UFC. Con 0,3 mL de esta suspensión se inocularon, previa desinfección con hipoclorito de sodio 2%, hojas y ramas terminales (de 2 cm de longitud) separadas de diez plantas sanas de romero, utilizándose una jeringa hipodérmica de 5 mL con aguja fina. Las hojas y ramas testigo fueron inoculadas sólo con agua destilada estéril. El material tratado y el testigo fueron sembrados en placas Petri con APG, utilizándose seis hojas o ramas por placa y tres placas por repetición. Las placas sembradas se llevaron a una estufa de cultivo a 22°C de temperatura. Las observaciones se efectuaron cada 24 horas durante dos semanas luego de la inoculación.

El cuadro sintomatológico observado consistió en: lesiones necróticas lenticulares (0,20 – 0,30 cm) en las hojas ubicadas en el extremo distal de las ramas situadas en el tercio superior de las plantas. En las ramas ubicadas por debajo de estos brotes, además de las lesiones ya descritas, se observaron bandas de color verde normal y marrón oscuro, adquiriendo las plantas un aspecto de marchitez. Este cuadro fue de tipo progresivo, en sentido descendente, hasta causar la muerte de las plantas (Fig.1A y B). Esta sintomatología se observó en el 85% de las plantas examinadas. Existen citas acerca de cuadros severos atribuidos a la infección por *Colletotrichum* en especies leñosas (12), en especial sobre árboles fruta-

les donde la enfermedad recibe la denominación de muerte regresiva (die back) (2,14). Sin embargo, no existen referencias de este tipo de daño causado por este hongo en especies arbustivas como el romero y otras plantas incluidas en la familia Lamiaceae. En estos hospedantes *Colletotrichum* causa lesiones necróticas limitadas (antracnosis) en hojas y tallos (11), y se comporta frecuentemente como un patógeno de tipo secundario (2, 6).

Sobre todas las muestras, secciones de hojas y ramas, procedentes de ejemplares sintomáticos y sembradas en APG se desarrolló una colonia fúngica con las siguientes características: micelio de color blanco grisáceo, levemente plumoso, con puntuaciones de base oscura y extremo distal de color salmón intenso y aspecto cremoso. Las preparaciones microscópicas de estas puntuaciones revelaron cuerpos irregulares (acérvulos) con setas escasas rectas y septadas, en los cuales se apreciaban cirros cremosos de color naranja (Fig 2 A). En estos cirros pudieron observarse conidios hialinos, unicelulares, cilíndricos de extremos redondeados, las dimensiones de estos conidios fueron de 9,82 x 4,6 mm (valores promedio

de 100 conidios.). Los conidios se originaron en el extremo de conidioforos simples hialinos, dispuestos en empalizada sobre el estroma de los acérvulos. Los conidios germinaron por tubos simples formando apresorios globosos hialinos, o dieron origen a micelio (Fig 2 B). Sobre la base de las características antes mencionadas puede identificarse este hongo como *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. (5,13). Se aislaron además, microorganismos saprófitos como *Physarum cinereum* (Batsch) Pers., *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) de Vries, y *Epicoccum nigrum* Link.

Como resultado de la prueba de patogenicidad: entre las 24 -48 h luego de la inoculación, se observaron en las hojas y ramas terminales lesiones lenticulares de color castaño claro levemente ampolladas, seguidas de una necrosis completa de los tejidos de estos órganos después del quinto día de la prueba. *C. gloesporioides* fue reaislado de la totalidad de hojas y ramas inoculadas (Fig 3), mientras que, no pudo aislarse ningún microorganismo de las siembras correspondientes al testigo. La progresión del fenómeno necrótico en distintos hospedantes



FIGURA 1. (A) Marchitez y muerte de tejidos (Nc) de ramas y hojas de romero infectadas con *Colletotrichum gloesporioides* en viveros comerciales (B) Plantas sanas./ (A) Wilt and death of tissues of twigs and leaves of rosemary infected with *Colletotrichum gloesporioides* in commercial nurseries. (B) Healthy plants.

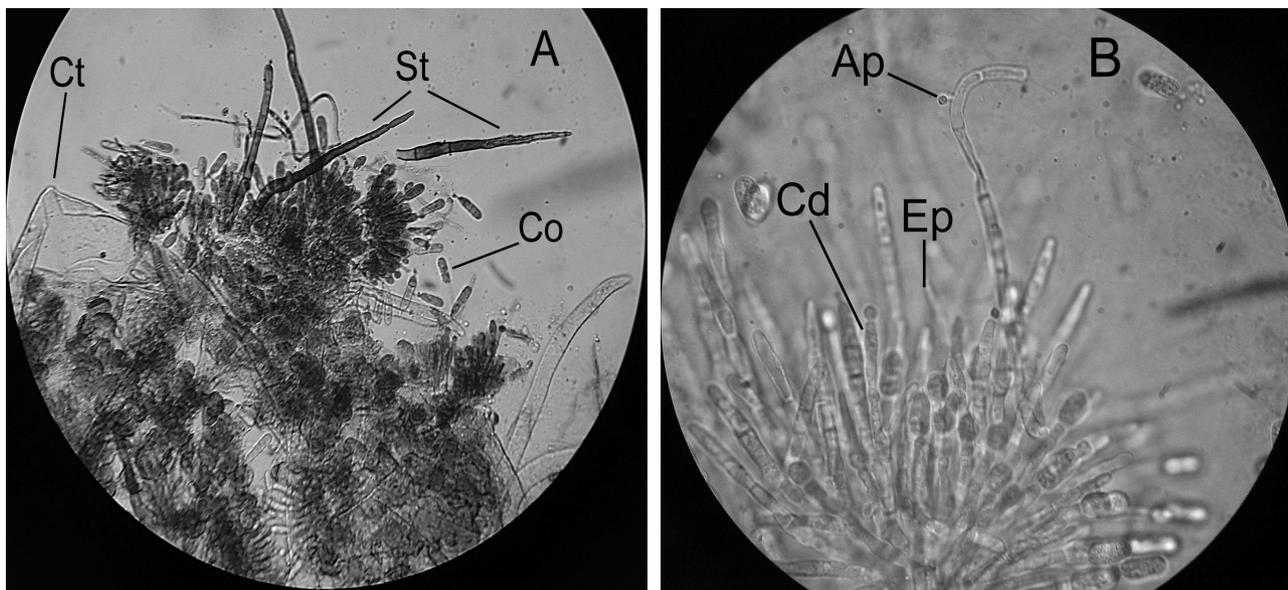


FIGURA 2. (A) Acérvulo subepidermal presente en lesiones típicas: conidios (Co), y setas fértiles (St) con un conidio apical; al microscopio compuesto a 45X. Cutícula (Ct). (B) Conidióforos hialinos (Cd) agrupados en esporodocio (Ep) y apresorio (Ap) de *C. gloesporioides* producidos en medio APG; al microscopio compuesto a 100 X. / *Subepidermal acervuli immersed in typical lesions: conidia (Co), and fertile setae (St) with apical conidium, under light microscope (45X). Cuticle (Ct). (B). Hyaline conidiophores (Cd) grouped in sporodochia (Ep) and appressoria (Ap) of C. gloesporioides produced on GPA medium; under light microscope (100X).*

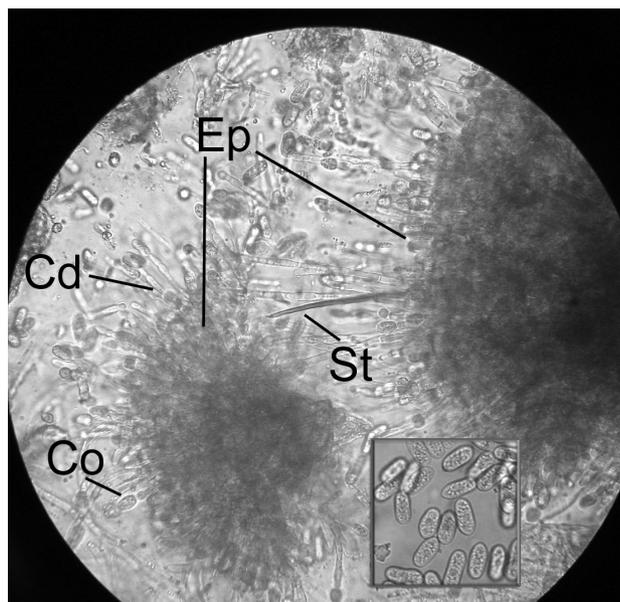


FIGURA 3. Conidióforos (Cd) agrupados en esporodocios (Ep), conidios unicelulares (Co) y setas (St), al microscopio compuesto a 45X, producidos en medio APG y reaislados de los tejidos inoculados con *C. gloesporioides*. / *Conidiophores (Cd) grouped in sporodochia (Ep), single-cell conidia (Co) and setae under light microscope (45X); produced on PGA medium and reisolated from tissues inoculated with C. gloesporioides.*

infectados con *C. gloesporioides*, está frecuentemente asociada a la producción de metabolitos con efectos fitotóxicos (3, 4).

Las observaciones realizadas y los resultados alcanzados en las pruebas de patogenicidad permiten concluir que *C. gloesporioides* es el agente causal de la muerte regresiva en plantas de romero, un cuadro severo que causa la muerte de las plantas afectadas cultivadas en campo e invernáculo.

REFERENCIAS

1. Acerbi, M. y Ruesta, M. (2005): Hierbas aromáticas y especias. Análisis de cadena alimentaria. *Revista Alimentos Argentinos*. 30: 5-9.
2. Agrios, G.N. (2005): *Plant Pathology*. 5^{ta}. Ed. San Diego, Elsevier Academic Press. pág: 487-494.
3. Amusa, N.A.; Ikotun, T. y Asiedu, R. (1993): Extraction of a phytotoxic substance from *Colletotrichum gloesporioides* infected yam leaves. *Int. J. Trop. Plant. Dis.* 11: 207-211.
4. Ballio, A.; Bottalicao, A.; Buonocuore, V.; Carilli, A.; Di Vittorio, V. y Graniti, A. (1969): Production and isolation of aspergillomarasin B (Lycomarasmic acid) from cultures of

- Colletotrichum gloesporioides* Penz (*Gloesporium olivarum*). *Phytopathol. Medditen.* 8:187-196.
5. Barnett, H.L. (1967): *Illustrated genera of imperfecti fungi*. 2^{da} Ed. Minnesota. Burgess Publishing Company. 225 pág.
 6. Cabrera, M.G.; Sosa, N.T.; Alvarez, R.E. y Sosa López, A. (2004): Identificación de patógenos fúngicos causantes del atizonamiento en lluvia de oro (*Cassia fistula* L.) en Corrientes, Argentina. *Agric. Tec.* 64: 213-217.
 7. Carrillo, L. (2003): *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Pub. Universidad Nacional de Salta Argentina. pág: 81-86.
 8. Denoyes-Rothan, B.; Guérin, G.; Délye, C.; Smith, B.; Minz, D.; Maymon, M. y Freeman, S. (2003): Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytopathol.* 93: 219-228.
 9. Farr, D.F.; Aime, M.C.; Rossman, A.Y. y Palm, M. E. (2006): Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. *Mycol. Res.* 110: 1395-1408.
 10. Muñoz, F. (2002): *Plantas medicinales. Estudio cultivo y procesado*. 4^{ta}. Ed. Madrid. Editorial Mundi Prensa. 365 pág.
 11. Perelló, A. y Dal Bello, G.M. (1995): Nota sobre las necrosis foliares ocasionadas por *Alternaria alternata* en romero y *Colletotrichum* spp. en lavanda, salvia y orégano. *Investigación Agraria*. 10: 275-281.
 12. Silva, K.S.; Rebouças, T.N.H.; Lemos, O.L.; Bomfim, M.P.; Bomfim, A.A.; Esquivel, G.L.; Barreto, A.P.P.; José, A.R.S.; Dias, N.O. y Tavares, G.M. (2006): Patogenicidad causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) em diferentes espécies frutíferas. *Rev. Bras. Frutic.* 28(1): 131-133.
 13. Sutton, B.C. (1980): *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervula and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 696 pág.
 14. Villanueva, R.; Hernández, A.; Yáñez, M.; Teliz, D.; Mora, A.; Cárdenas, E. y Castañeda, A. (2005): Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. *Agrociencia*. 39: 93-106.

(Recibido 22-10-2007; Aceptado 5-2-2008)



MISIÓN
**Contribuir a preservar
 y elevar la sanidad
 animal, vegetal
 y humana.**

Objetivos Generales

- Desarrollo de investigación en la salud animal, vegetal y humana.
- Prestación de servicios altamente especializados principalmente en enfermedades exóticas y cuarentenarias en animales y plantas.
- Tecnologías de manejo integrado de plagas en los principales cultivos agrícolas.
- Producción de medios diagnósticos y medicamentos para uso veterinario, agrícola y humano.
- Formación especializada.

39 Años al Servicio de las Ciencias Agropecuarias