

## Aislamiento, caracterización y patogenicidad de hongos causantes de muerte descendente del nogal negro americano

Mario Raya-Pérez<sup>1</sup>  
Abiel Sánchez-Arizpe<sup>1§</sup>  
Oswaldo García-Martínez<sup>1</sup>  
Ma. Elizabeth Galindo-Cepeda<sup>1</sup>  
Raúl Rodríguez-Guerra<sup>2</sup>  
Kenzy Ivveth Peña-Carrillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. Tel. 01(844) 4158138. <sup>2</sup>Campo Experimental General Terán-INIFAP. Carretera Montemorelos-China km 31, Nuevo León, México. CP. 67400.

§Autor para correspondencia: abielsanchez@hotmail.com.

### Resumen

El nogal negro americano (*Juglans nigra* L.) es afectado por problemas fitosanitarios, destacando hongos causantes de canchros en ramas, reduciendo la producción de fruto hasta 60% del rendimiento promedio que es 1.9 t ha<sup>-1</sup>. Los objetivos de esta investigación fueron identificar los hongos asociados a canchros presentes en ramas de árboles de *J. nigra* con síntomas de muerte descendente y evaluar su patogenicidad. Se aislaron hongos de canchros de ramas con síntomas de muerte descendente colectadas en dos huertas del estado de Coahuila. Cuatro morfotipos de hongos fueron obtenidos y una cepa de cada uno se utilizó para su identificación morfológica a nivel de género, y mediante la secuenciación de la región ITS1 a ITS2 de los genes ribosomales (rDNA) para su identificación a nivel de especie. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en plántulas de *J. nigra* de cuatro meses de edad, realizando una fisura en el tallo de 3 mm de largo e inoculando con cada especie identificada. Los hongos asociados a los canchros de *J. nigra* fueron identificados morfológicamente como miembros de los géneros *Trichothecium*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria* y *Rhizoctonia*. Mediante el análisis BLAST en el GenBank de las secuencias de la región ITS1 a ITS2 fue posible determinar que las cepas se encontraron relacionadas a las especies *Trichothecium roseum*, *Pestalotiopsis steyaertii*, *Alternaria alternata* y a una especie binucleada no determinada de *Rhizoctonia*. La inoculación de las cuatro cepas a plántulas demostró que éstas son patogénicas a *J. nigra*.

Palabras clave: *Alternaria alternata*, *Pestalotiopsis steyaertii*, *Rhizoctonia binucleada*, *Trichothecium roseum*, hongos en canchros.

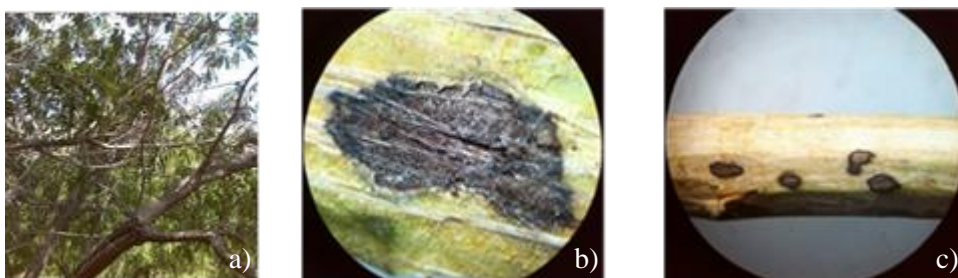
Recibido: abril de 2018

Aceptado: julio de 2018

El nogal negro americano (*Juglans nigra* L.; Juglandaceae), nativo de Norteamérica (Michler *et al.*, 2007) se cultiva ampliamente en Europa (Šálek y Hejčmanová, 2011), Sudamérica y Asia oriental (Fisher *et al.*, 2013), y es valorado por las características nutritivas y contenido de antioxidantes de su nuez, y por su madera (Gilman y Watson, 1993; Shifley, 2004). Entre 1990 y 2001 se observó mortalidad del nogal en varias entidades de los Estados Unidos de América (EE. UU.) y la muerte de árboles se asoció a la presencia del escarabajo *Pityophthorus juglandis* (Coleoptera: Scolitidae) sobre ramas y troncos y el posterior desarrollo de canchros alrededor de las galerías causadas por una asociación entre éste y el hongo *Geosmithia morbida* Blackman (Fisher *et al.*, 2013). A partir de 2008 la enfermedad obtuvo el nombre común de enfermedad de miles de canchros (TCD por sus siglas en inglés), debido a la enorme cantidad de canchros que se forman en la corteza de los árboles afectados. Para 2013, TCD se encontró ampliamente distribuida en EE. UU. (Fisher *et al.*, 2013; Wiggins *et al.*, 2014), y llegó a causar con una severidad de hasta 60% del total de la población y una remoción debido a la muerte descendente de 300 ejemplares en los estados de Washington e Idaho (Tiserrat *et al.*, 2011).

En México, *J. nigra* se cultiva en los estados de Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Oaxaca y Querétaro. En el estado de Coahuila de Zaragoza, los municipios productores de este cultivo son Parras, Zaragoza, Múzquiz, Ramos Arizpe y Saltillo, con una superficie de 1 446 hectáreas y rendimiento promedio de 1.9 t ha<sup>-1</sup>. Se ha estimado que las pérdidas del fruto en este estado llegan a ser de hasta 60%, en donde incluso la pérdida de árboles ocurre debido a la muerte descendente provocada posiblemente a canchros presentes en ramas. El objetivo de esta investigación fue aislar, identificar y determinar la patogenicidad de los hongos presentes en canchros asociados a la muerte descendente de *J. nigra* en dos municipios de Coahuila de Zaragoza, México.

En abril y agosto de 2015 se colectaron ramas de 16 árboles de *J. nigra* con síntomas de muerte descendente (Figura 1) en dos huertos de 15 años de edad localizados en los municipios de Arteaga y Saltillo. El aislamiento de hongos se basó en procedimientos previamente descritos (Alvidrez-Villarreal *et al.*, 2012; Fisher *et al.*, 2013) con algunas modificaciones. Se extrajeron canchros del tejido interno de ramas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), colocando cinco trozos por caja. A partir de las 24 h se transfirieron crecimientos fúngicos a nuevas cajas y de las colonias obtenidas se desarrollaron cepas monospóricas o a partir de puntas de hifa. Las cepas se mantuvieron en activo en PDA y fueron conservadas en agua. Cuatro morfotipos fueron obtenidos y una cepa de cada uno fue seleccionada y utilizada en análisis posteriores. Las cepas se identificaron morfológicamente a nivel de género como *Trichothecium*, *Pestalotia* y *Alternaria* y *Rhizoctonia* utilizando claves para hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 2006).



**Figura 1.** Síntomas de muerte descendente en *Juglans nigra*; a) árbol con muerte parcial de ramas; b) vista de lesión superficial en rama verde; y c) canchros internos.

La identidad a nivel de especie se basó en el análisis de la secuencia de la región ITS-1 a ITS-2 del ADN ribosomal utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Se obtuvo una secuencia consenso de cada hongo para realizar un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). La cepa de *Pestalotia* mostró relación con seis especies y para determinar su identidad se realizó un análisis filogenético con el método Neighbor-Joining basado en el modelo de dos parámetros de Kimura y la prueba Bootstrap con 1 000 repeticiones.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron utilizando plántulas sanas de cuatro meses de edad, desarrolladas a partir de semilla sembrada en suelo estéril contenido en vasos de unicel de medio litro. Cada cepa fue inoculada a cinco plántulas a las que previamente se les realizó una herida en el tallo de 3 mm de longitud con una navaja para bisturí estéril. Sobre la herida se inoculó 1 ml de la suspensión de  $1 \times 10^8$  esporas de *Trichothecium*, *Pestalotia* y *Alternaria*, mientras que para *Rhizoctonia* el inoculó consistió de un explante de 5 mm de diámetro colocado directamente sobre la herida en el tallo.

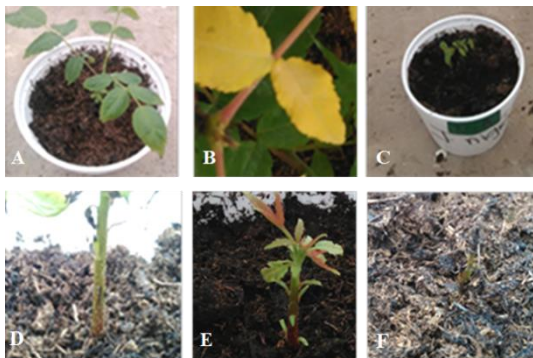
Las plántulas testigo se inocularon con agua destilada estéril sobre la herida. Realizada la inoculación, la herida se cubrió con plástico para evitar el secado rápido del inóculo y el marchitamiento de las plántulas. El plástico se retiró después de una semana. Los tratamientos fueron distribuidos bajo un diseño completamente al azar en un invernadero. Cada siete días durante los 45 días después de la inoculación (ddi) las plántulas fueron observadas y se describió los síntomas que mostraron. La incidencia se registró como el porcentaje de plantas (considerando la planta establecida en cada repetición) con algún tipo de síntoma en relación al testigo. La severidad se determinó con base a una escala visual de cinco valores (1= 0-20%; 2= 21-30%; 3= 31-50%; 4= 51-80% y 5= más de 80% del tallo con lesión) y los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

También se analizó la altura de la planta a los 28 ddi debido a que en la evaluación de los 35 ddi las plantas de algunos tratamientos inoculados con hongos ya se encontraban muertas. Las plantas fueron extraídas a los 45 días y se les determinó la longitud, peso fresco y peso seco de raíz, además de aislar hongos a partir de tejido alrededor de las heridas inoculadas para confirmar los postulados de Koch. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza completamente al azar y las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los análisis se realizaron con el paquete estadístico Rdata, versión 3.2.3 (Ihaka y Gentleman, 1996).

Las cepas de los morfotipos aislados de canchales fueron identificadas morfológicamente como miembros de los géneros *Trichothecium*, *Pestalotia*, *Alternaria* y *Rhizoctonia*; mientras que con base al análisis BLAST la identidad de las cepas de *Trichothecium* y *Alternaria* corresponden a las especies *T. roseum* y *A. alternata*, respectivamente. La cepa de *Rhizoctonia* mostró elevada relación con *R. solani*; sin embargo, al verificar el número de núcleos en la cepa analizada se determinó que corresponde a una especie binucleada no determinada del género *Rhizoctonia* (Sneh *et al.*, 1991). El análisis filogenético de la cepa de *Pestalotia* mostró más relación con *Pestalotiopsis steyaertii* (= *Neopestalotiopsis steyaertii* según Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

Los primeros síntomas aparecieron a los 7 ddi en plántulas inoculadas con *T. roseum*, *P. steyaertii* y *Rhizoctonia* sp., y causaron síntomas al 100% de las plantas a los 7, 14 y 21 ddi, respectivamente. Mientras que *A. alternata* causó los primeros síntomas a los 14 ddi y a los 28 ddi sólo causó

síntomas al 60% de plantas. Las plantas inoculadas con agua se mostraron aparentemente sanas (Figura 2A) durante el experimento, mientras que los hongos inoculados causaron clorosis (Figura 2B), achaparramiento (Figura 2C) y defoliación (Figura 2D) en los primeros 35 ddi. Plántulas inoculadas con *T. roseum*, *P. steyaertii* y *Rhizoctonia* sp. mostraron una pigmentación rojiza en el ápice (Figura 2E). A los 45 días todas las plantas inoculadas con hongos murieron (Figura 2F), siendo *T. roseum*, *P. steyaertii* y *Rhizoctonia* sp., los que causaron la muerte de todas las plantas a los 35 ddi y sólo sobrevivieron las del testigo hasta el final del experimento.



**Figura 3.** Síntomas en plántulas inoculadas con cepas de hongos aislados de canchales de ramas de *J. nigra*. A) planta sana (testigo) a 45 días de inoculación; B) amarillamiento a 7 ddi en plántula inoculada con *T. roseum*; C) reducción en el crecimiento de la plántula inoculada; D) defoliación en plántula inoculada; E) parte apical de plántula con coloración rojiza; y F) plántula muerta inoculada.

En los tratamientos inoculados con hongos la severidad fue mayor mientras que la altura, longitud, peso fresco y peso seco de la raíz fueron menores, respecto al testigo (Cuadro 1). Los hongos aislados de plantas inoculadas con hongos correspondieron a aquellos inoculados, mientras que de las plantas testigo no fue posible aislar a ninguno de éstos.

**Cuadro 1.** Promedios obtenidos de cinco variables evaluadas después de la inoculación de plantas de *J. nigra* con cuatro especies de hongos.

Tratamiento	Severidad	Altura <i>p</i> = 0.001	Longitud de raíz <i>p</i> = 0.001	Peso fresco de raíz	Peso seco de raíz
Testigo	18 a	6.18 a	5.14 a	1.1 a	0.44 a
<i>Alternaria alternata</i>	103.35 b	2.84 b	3.12 b	0.66 bc	0.21 ab
<i>Pestalotiopsis steyaertii</i>	106.21 b	3 b	2.16 bc	0.82 ab	0.21 ab
<i>Trichothecium roseum</i>	106.21 b	1.82 c	0.52 d	0.33 c	0.06 b
<i>Rhizoctonia</i> sp.	106.21 b	2.6 b	1.65 c	0.4 c	0.04 b

Se ha reportado que *A. alternata* es capaz de causar canchales en manzano (Abou Al Fadil *et al.*, 2010), *T. roseum* en rosas (Sweets *et al.*, 1982), y especies de *Pestalotiopsis* en diversas especies de plantas (Espinoza *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2013), pero no se encontró reportes de alguna especie binucleada de *Rhizoctonia* asociada a canchales en plantas. Los resultados obtenidos sugieren que estas especies son agentes asociados responsables de la muerte descendente de *J. nigra*, debido a la capacidad patogénica que causó la presencia de diversos síntomas.

## Conclusiones

En ninguna de las muestras obtenidas de *J. nigra* en Coahuila, México, fue posible identificar al hongo *G. mórbida*, principal causante de la muerte descendente en este árbol en otros países. La identificación y pruebas de patogenicidad realizadas con *T. roseum*, *P. steyaertii*, *A. alternata* y una especie binucleada de *Rhizoctonia*, muestran que estos hongos ocurren en canchros asociados a la muerte descendente de *J. nigra* y son patogénicas a esta planta. Se considera que este es el primer reporte de *T. roseum*., *P. steyaertii*., *A. alternata* y *Rhizoctonia* sp. como patógenos de *J. nigra*.

## Literatura citada

- Abou Al Fadil, T.; Naffaa, W.; Abou Fakher, T.; Muzher, B. and Amer, H. 2010. Apple stem canker disease in Sweida: the causal fungus and the susceptibility of some apple varieties to the disease. Arab J. Plant Protec. 28:16-19.
- Alvidrez-Villarreal, R.; Hernández-Castillo, F. D.; García-Martínez, O.; Mendoza-Villarreal, R.; Rodríguez-Herrera, R. and Aguilar, C. N. 2012. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. Agric. Sci. 3:405-416. DOI: 10.4236/as.2012.33048.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. The Am. Phytopatol. Soc. 218 p.
- Espinoza, J. G.; Briceno, E. X.; Keith, L. M. and Latorre, B. A. 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* in Chile. Plant Dis. 92:1407-1414.
- Fisher, J. R.; McCann, D. P. and Taylor, N. J. 2013. *Geosmithia morbida*, Thousand Cankers Disease of Black Walnut Pathogen, Was Found for the First Time in Southwestern Ohio. Plant Health Progress. 12 p.
- Gilman, E. F. and Watson, D. G. 1993. *Juglans nigra*: Black Walnut. Fact Sheet ST-320. Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. 85 p.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. J. Comp. Graphical Statistics 5: 299-314.
- Maharachchikumbura, S. S. N.; Hyde, K. D.; Groenewald, J. Z.; Xu, J. and Crous, P. W. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. Stud. Mycol. 79:121-186. Doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.005.
- Michler, C. H.; Woeste, K. E. and Pijut, P. M. 2007. Black walnut (*Juglans nigra* L.). In: Kole, C. (Ed.). Genome mapping and molecular breeding in plants. Forest trees. Springer Berlin Heidelberg New York. Vol. 7. 189-198 pp.
- Patel, J. S.; Norman, D.; Brennan, M. and Ali, G. S. 2013. First report of elm canker caused by *Pestalotiopsis mangiferae* in the United States. Plant. Dis. 97:426.
- Šálek, L. and Hejčmanová, P. 2011. Comparison of the growth pattern of black walnut (*Juglans nigra* L.) in two riparian forests in the region of South Moravia, Czech Republic. J. For. Sci. 57:107-113.
- Shifley, S. R. 2004. Black walnut in a new century. In: Proceedings of the 6<sup>th</sup> Walnut Council research symposium. St. Paul, Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station. Lafayette, 25-28. 188 p.
- Sneh, B.; Burper, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 133 p.

- Sweets, L. E.; Pflieger, F. L.; Morgan, F. C. and Mizicko, J. R. 1982. Control of fungi associated with cankers of greenhouse roses. *Plant Dis.* 66:491-494.
- Tisserat, N.; Cranshaw, W.; Putnam, M. L.; Pscheidt, J.; Leslie, C. A.; Murray, M.; Hoffman, J.; Barkley, Y.; Alexander, K. and Seybold, S. J. 2011. Thousand cankers disease is widespread in black walnut in the western United States. *Plant Health Progress*. Doi: 10.1094/PHP-2011-0630-01-BR.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. y Taylor, J. 1990. Sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J. and White, T. J. (Eds.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*: Academic Press, Inc. 315-322 pp.
- Wiggins, G. J.; Grant, J. F.; Lambdin, P. L.; Merten, P.; Nix, K. A.; Hadziabdic, D. and Windham, M. T. 2014. Discovery of walnut twig beetle, *Pityophthorus juglandis*. Associated with forested black walnut, *Juglans nigra*, in the Eastern USA. *Forests.* 5:1185-1193.