

Colletotrichum gloeosporioides, patógeno de orquídeas en el noreste de Argentina

Cabrera, María G.¹
Galmarini, María R.¹
Flachsland, Eduardo²

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue identificar el agente causal de manchas foliares detectadas en plantas Orchidaceae del noreste (NE) de Argentina. Desde el 2001, se recolectaron muestras con síntomas de enfermedad en invernaderos de las ciudades de Corrientes, Resistencia (Chaco) y Formosa, y muestras procedentes de Esteros de Iberá (Corrientes). Los cultivos sobre agar-papa-glucosa produjeron abundantes colonias de micelio aéreo gris y conidios unicelulares, oblongos, hialinos, con extremos redondeados de 16,0 a 24,0 μm x 4,0 a 6,0 μm . Las setas fueron rectas y oscuras. Sobre la base de características morfológicas, el hongo se identificó como *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc. Se manifestó el teleomorfo *Glomerella cingulata*. Se determinó la patogenicidad de un aislamiento sobre hojas de *Cattleya intermedia* x *C. walkeriana*, *Dendrobium nobile* Lind. y *Miltonia flavescens* Lind. en inoculaciones con heridas, y se observaron síntomas una semana después de la inoculación. Se aisló a *C. gloeosporioides* como patógeno. Este es el primer informe de *C. gloeosporioides* afectando diversas especies de orquídeas en el NE de Argentina.

Palabras clave: Orquídeas, antracnosis, *Colletotrichum*, *Glomerella*.

ABSTRACT. *Colletotrichum gloeosporioides*, pathogen of orchids in the northeast of Argentina. The aim of this study was to identify the causal agent of leaf spots detected in Orchidaceae plants from the Argentinian northeast (NE). Since 2001, samples with symptoms were collected in greenhouses from the cities of Corrientes, Resistencia (Chaco) and Formosa, and from Esteros del Iberá (Corrientes). Cultures on potato-glucose-agar yielded abundant, gray aerial mycelium and unicellular, hyaline, oblong conidia, with rounded ends. Conidial size ranged from 16.0 to 24.0 μm x 4.0 to 6.0 μm . Setae were straight and dark. Based on morphological characteristics, the fungus was identified as *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc. The teleomorph *Glomerella cingulata* was developed. Pathogenicity of the fungus was determined on leaves of *Cattleya intermedia* x *C. walkeriana*, *Dendrobium nobile* Lind. and *Miltonia flavescens* Lind. Seven days after inoculation, symptoms appeared that were similar to those originally observed on the orchid leaves. *C. gloeosporioides* was isolated again from infected leaves, confirming it as the pathogen. The fungus was reported as a pathogen on 19 genera and species of orchids. This is the first report of *C. gloeosporioides* as a pathogen of several orchid species in the Argentinian NE.

Key words: Orchids, anthracnose, *Colletotrichum*, *Glomerella*.

Introducción

Las orquídeas (Orchidaceae) componen un grupo numeroso de géneros y especies botánicas adaptadas a distintos tipos de hábitats de climas tropicales y subtropicales. La región NE de Argentina posee una abundante población nativa de orquídeas, las cuales incluyen plantas epifitas y terrestres y hasta lacustres, como *Habenaria* sp., y se enriquece día tras día con la introducción de especies exóticas.

Desde el 2000, se observaron diversas especies de orquídeas con síntomas de enfermedad, pero durante el 2001, en reconocimientos realizados en orquidarios e invernaderos de Corrientes, Chaco y Formosa, se detectaron con frecuencia plantas de este tipo con lesiones necróticas y manchas foliares agresivamente destructoras.

Debido al daño observado en ejemplares valiosos, se inició este trabajo con el objeto de identificar el

¹ Cátedra de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del NE (UNNE), Sargento Cabral 2131. C.P. 3400, Corrientes, Argentina. cabrera@agr.unne.edu.ar

² Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del NE (UNNE). Sargento Cabral 2131, C.P. 3400. Corrientes, Argentina.

agente causal de las manchas observadas en diversas especies de orquídeas en la región.

Las observaciones preliminares de los materiales enfermos revelaron la presencia de un hongo con características de *Colletotrichum* Cda. (Barnet y Hunter 1972). Los aislamientos obtenidos resultaron siempre en un hongo del género *Colletotrichum*.

La realización del trabajo se vio obstaculizada, pues la bibliografía disponible sobre patologías causadas por *Colletotrichum* sp. en orquídeas es escasa, (Agricultural Researches Service 1960, Adaskaveg y Hartin 1997, Freeman *et al.* 2000), más aún cuando se intentó encontrar trabajos sobre las enfermedades que afectan este tipo de plantas. No se hallaron referencias en la literatura nacional sobre esta relación hospedante-patógeno. Por este motivo, se iniciaron los estudios con el objetivo de identificar el agente causal de la enfermedad detectada afectando Orchidaceae en el NE de Argentina.

Materiales y métodos

Se recolectaron 60 muestras de plantas de la familia Orchidaceae, con síntomas de enfermedad, en orquídeas de los siguientes géneros y especies: *Cattleya* sp., *Cattleya* var. *Joan Antonio Nicoli* (híbrido), *Colmanara* Wild. Cats., *Cymbidium* sp., *Dendrobium* sp., *D. nobile* Lindl., *Epidendrum pseudoepidendrum* Reichb., *Habenaria gourlieana* Gillies ex Lindl., *Laelia purpurata* Lindley, *Miltonia* sp., *M. flavescens* Lindl., *Odontoglossum* sp., *Oncidium bifolium* Sims, *O. lanceanum* Lindley, *O. ornithorhynchum* (H.B.K.), *Paphiopedilum spicerianum* (Pfitz.), *Phalaenopsis* sp., *Phaius thankervillae* (Banks ex L'Her) Blume, *Trigonidium obtusum* Lindl y *Vanilla* sp.

Para recolectar las muestras, se hicieron reconocimientos tanto en invernaderos comerciales como en orquidarios particulares de las ciudades de Corrientes, Resistencia (Chaco) y Formosa (Capital), y también se recibieron para su estudio muestras procedentes de los Esteros del Iberá (Corrientes).

Las muestras recolectadas consistieron en algunos casos de una planta completa y en otros de hojas enfermas, exceptuando siempre los órganos florales. Se registraron los datos sobre las características de los materiales observados.

Se emplearon métodos y técnicas comunes en el estudio de enfermedades de plantas causadas por microorganismos parásitos patógenos, como los postulados de Koch (Commonwealth Mycological Institute 1986).

Para precisar los síntomas y signos asociados con la enfermedad en estudio se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas de muestras frescas, con infección natural. En todos los casos se prepararon también cámaras húmedas y se hicieron cortes histológicos de los tejidos enfermos.

Se llevaron a cabo aislamientos en placas Petri, sobre un medio agarizado (agar-papa-glucosado (APG) al 1,5%, pH=7). Se registró gráficamente la sintomatología en distintas muestras.

En cuanto a la etiología, los tejidos con síntomas de la enfermedad se examinaron microscópicamente, suspendiendo los cortes histológicos y material de raspados con aguja histológica en agua destilada estéril.

Las muestras de cámaras húmedas se examinaron a las 24, 48 y 72 horas, en busca de la manifestación de los diferentes estadios de formación de signos sobre o dentro de los tejidos de los hospedantes. Desde allí también se realizaron los preparados microscópicos para establecer las características morfológicas de las estructuras vegetativas y de fructificación de los microorganismos que se desarrollaron sobre esos tejidos necrosados. De igual modo, se analizó el material obtenido del cultivo en placas de Petri con medio APG (von Arx 1970).

Se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad con individuos de *Cattleya intermedia* x *C. walkeriana*, *D. nobile* Lindl. y *M. flavescens* Lindl. La metodología empleada para las inoculaciones consistió en aplicar, sobre hojas sanas de las plantas de orquídeas, discos de agar con cultivos del hongo con 7 días de desarrollo, cubriéndolos con apósitos de algodón embebidos en agua.

Se hicieron dos tipos de tratamientos: en un caso se practicaron ligeras heridas con una aguja histológica sobre las hojas a las que adosaron los discos agarizados con el desarrollo fúngico; en el otro, solo se aplicaron los discos de inóculo sobre la superficie foliar sana. Se llevaron los testigos correspondientes.

Las plantas se embolsaron por 72 horas y se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente durante todo el experimento. El riego aplicado a las plantas del experimento fue por aspersión diaria de agua con aspersor multiuso manual. Asimismo, se expusieron conidios en cámara húmeda para que germinaran y se desarrollaran los apresorios. Se realizaron estudios microscópicos para determinar las características morfológicas del microorganismo patógeno.

En la determinación etiológica se consultó toda la bibliografía disponible, atendiendo especialmente los trabajos de Mordue (1971), Sutton (1980), von Arx (1981), Adaskaveg y Hartin (1997), Freeman *et al.* (2000) y López (2001).

Resultados y discusión

De las 60 muestras de orquídeas examinadas, procedentes de distintas localidades del NE argentino, se manifestaron síntomas similares a los de las enfermedades conocidas como antracnosis en 32 oportunidades.

Los síntomas de enfermedad observados en las diversas especies estudiadas se manifestaron como lesiones oscuras, que variaron solo en el tamaño y la tonalidad, según el género y el lugar donde se localizaron. Estas lesiones necróticas fueron observadas en distintos órganos de las orquídeas. Las hojas carnosas pueden presentar daños tanto en el limbo foliar como en la base y el ápice, o como lesiones extensivas que se originan en los márgenes, llegando a cubrir la superficie o causando canchales en el pseudobulbo.

La necrosis en hojas generalmente comienza como "motas" o áreas de color pardo uniforme, sin margen marcado, y al envejecer se bordean de una zona clorótica. Este síntoma se observa tanto en el haz como en el envés de las hojas (Fig.1). Otras veces, las hojas aparecen afectadas longitudinalmente sobre la nervadura central y alrededor de ella.



Figura 1. Síntomas de la enfermedad en el envés de hojas de *Cattleya* sp.

Cuando las lesiones envejecen, el centro de las lesiones se torna grisáceo y seco sobre las hojas carnosas, y fructificaciones negruzcas, subepidérmicas, de apariencia globosa y errumpentes se forman en la zona necrosada. En algunos casos, las lesiones oscuras se

presentan con halos de tonalidad parda rojiza, como se manifestó en uno de los ensayos de patogenicidad, donde la clorosis se extendió con rapidez (Fig. 2).



Figura 2. *C. intermedia* con síntomas de infección por inoculación con *C. gloeosporioides*.

En las escamas y hojas de parénquimas delgados, las lesiones aparecen avanzando desde el ápice, desde donde avanzan también las fructificaciones. Algunas de estas últimas se disponen sin orden y presentan setas negras; otras aparecen alineadas, formando circunferencias concéntricas sin setas.

En los pseudobulbos se observaron tejidos oscurecidos que abarcaban grandes sectores del órgano, o lo invadían por completo, ennegreciéndolo completamente. Al llegar a este estado, se los observó contraídos, mustios y secos.

Las hojas carnosas presentaron daños en la base, con lesiones que ascendían por los márgenes, llegando a cubrir toda la superficie. La lesión necrótica fue siempre de color pardo, castaño oscuro o negro, uniforme, inicialmente sin margen marcado y bordeada por una zona clorótica. Este daño se observó tanto en haz de las hojas como en el envés.

En cortes histológicos, el tejido afectado se encontró necrosado, oxidado y surcado por hifas del patógeno. Otras hojas aparecían afectadas longitudinalmente en la zona central, presentando en uno de los márgenes una tonalidad parda rojiza. Sobre las lesiones más avanzadas de las hojas carnosas aparecieron, en todas las muestras, fructificaciones negruzcas de aspecto globoso, generalmente en el centro de la zona enferma (Fig.3).

En las brácteas que recubren los tallos y pseudobulbos, las fructificaciones fueron más evidentes, por ser estos órganos de textura más seca. Las lesiones necróticas aparecían avanzando desde el ápice, desde donde también avanzaba la necrosis. Las fructificaciones se

disponían en el tejido enfermo, unas sin orden, presentando setas negras, y otras alineadas, formando círculos concéntricos, sin setas. Los pseudobulbos recién afectados se tornaron amarillentos, de color pardo-crema y consistencia blanda. En los casos en que fueron afectados, los más jóvenes quedaron sin engrosar y de menor tamaño. El tallo en desarrollo quedó necrosado y presentó también fructificaciones subepidérmicas globosas, oscuras, observables solo con microscopio estereoscópico (40x).



Figura 3. Síntomas de infección por *C. gloeosporioides* en hojas de *Oncidium* sp.

En algunos casos de infecciones severas, se pudieron ver lesiones oscuras extensivas en las raíces donde, con la ayuda del microscopio, se observaron las fructificaciones del patógeno. La raíz principal aparecía con la mitad del tejido vascular necrosado longitudinalmente y con aspecto parduzco. Las raíces secundarias se observaban necrosadas, pardas y la corteza se desprendía con facilidad.

Las fructificaciones oscuras observadas en los tejidos enfermos correspondieron a órganos fructíferos de hongos, del tipo acérvulos (Fig. 4).

Algunas cepas del hongo, en sustrato natural, presentaron cortas setas pardas oscuras, con extremos más claros, mezcladas con setas más largas, también oscuras y en número variable, según el hospedante. Por ejemplo, de la cepa aislada de *Dendrobium* sp. se produjeron en promedio 20 setas; en *Cymbidium* sp., 24 setas; y en *L. purpurata*, 17 setas. El largo promedio de las setas fue de 30 μm . Los aislamientos correspondientes mostraron el mismo comportamiento.

En algunos casos, en el mismo hospedante (*Cattleya* sp., *Epidendrum* sp.), el hongo no presentó setas o, si se formaron, fueron escasas, lo cual corresponde con una característica del género *Gloeosporium*, cuya diferencia con *Colletotrichum* es la ausencia de setas en los soros. Sin embargo, autores como Sutton (1980), Hawksworth *et al.* (1995) y López (2001) consideran esta característica como insuficiente para separar géneros, puesto que el número de setas también varía cuando se cultivan en medios artificiales (Arx 1981).

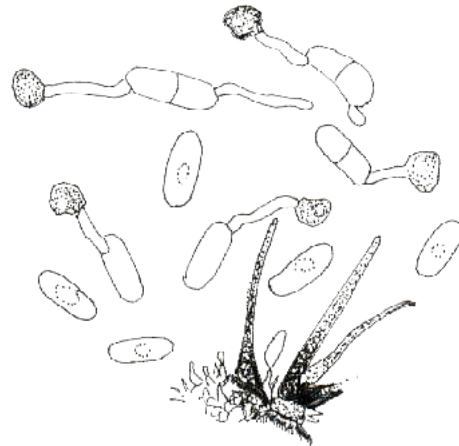


Figura 4. Acérvulo con setas, conidióforos, conidios y apresorios de *C. gloeosporioides*.

Las dimensiones de los conidios del primer tipo en sustrato natural oscilaron entre 16-24 μm x 4-6 μm . Los conidios de ambos tipos de acérvulos son hialinos, oblongos o cilíndricos, unicelulares, de extremos redondeados. Los conidios depositados en cámaras húmedas formaron una proporción variable de apresorios coloreados, globosos a irregulares. El tamaño de los apresorios fue de 8,25(12,7)13,50 μm x 8(7,5)11 μm . Los conidios del segundo tipo fueron algo menores y las dimensiones de sus apresorios también (8-10 μm x 6-8,5 μm). En sustrato artificial, el largo de los conidios osciló entre 16,30(17,41)18,52 μm x 4,62(4,82)5,02 μm .

Los dos tipos del hongo patógeno de orquídeas estudiados en esta oportunidad se identificaron como Coelomycetes del orden Melanconiales, de acuerdo con Hawksworth *et al.* (1995) quienes, al igual que Sutton (1980), consideran insuficientes las características analizadas para separarlos en géneros o especies diferentes, por lo que se los mantuvo como *Colletotrichum*.

Las variaciones sectoriales presentes en las colonias desarrolladas en medio de cultivo y la presencia o no de setas de acuerdo con la información de Arx (1970), referida a los cambios que este tipo de hongos manifiesta en cultivos artificiales, nos inducen a considerar que se trataría de cepas o formas especiales del mismo agente.

En cultivos de más de 25 días en medio agarizado, se observó la formación de cuerpos oscuros, globosos a obpiriformes, ostiolados, esparcidos en el substrato y bajo el micelio. En las preparaciones microscópicas se revelaron peritecios castaños, de 85-95 x 130-200 µm. También se observaron los ascos hialinos con 8 ascosporas elipsoidales, hialinas, unicelulares, de 17 x 4,5 µm en promedio.

En el material de hojas puestas en cámaras húmedas, luego de dos semanas también se observaron peritecios, con las características ya señaladas, sobre el material en vías de descomposición. Estas características del agente coinciden con las de *Glomerella cingulata* (Ston.) Spauld y Schrenk, estado teleomórfico de *C. gloeosporioides*, de acuerdo con Arx (1981) y Mordue (1971).

De las observaciones y exámenes morfométricos de los aislamientos del patógeno, de acuerdo con las descripciones de Mordue (1971) y Sutton (1980) para *C. gloeosporioides* sobre forma y tamaño de conidios, y con la variabilidad en medios artificiales estudiadas por Arx (1981), se interpreta que el hongo estudiado es el mismo hongo melanconíaceo.

Debido a las exigencias de temperatura y luz de las especies de Orchidaceae, y al tipo de manejo delicado necesario para su cultivo, es frecuente observar patologías que devienen por el manejo inadecuado, especialmente por el riego excesivo, pues modifican la susceptibilidad de dichas especies ante los microorganismos del ambiente. Muchas infecciones por *Colletotrichum* spp. son consecuencia de ello. Las plantas debilitadas son el asentamiento predilecto de hongos parásitos facultativos como los del género *Colletotrichum*.

Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas a los 7 días de la inoculación en el tratamiento con heridas, con manifestación de síntomas similares a los originales, y los reaislamientos y estudios de laboratorio demostraron la patogenicidad de las cepas, confirmando así los postulados de Koch. Los testigos y las plantas inoculadas sin heridas no manifestaron síntomas durante ese lapso.

Las inoculaciones sin heridas continuaron sin presentar síntomas transcurridos 25 días de la inoculación. Esto indica la importancia de las heridas en las infecciones. Asimismo, el estrés al que se someten las plantas en los invernaderos genera a menudo las condiciones necesarias para que se produzcan infecciones parasitarias.

Los estudios morfométricos y el uso de claves señalaron a *C. gloeosporioides* como el agente etiológico de la antracnosis en orquídeas de diversos géneros y especies que se cultivan en la región NE de Argentina.

Los resultados del trabajo y el análisis de la información bibliográfica permiten concluir que el agente etiológico de la enfermedad observada en las plantas de diversos géneros de orquídeas en la región NE del país es *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

Se concluye también que, bajo las circunstancias en las que se realizó el trabajo, el desarrollo de la enfermedad está considerablemente influenciado por la elevada humedad del ambiente donde crecieron las plantas, debido al manejo del riego al que estuvieron sujetos los individuos enfermos, predisponiendo en alguna forma la penetración del patógeno en los tejidos del hospedante. Este es el primer informe de *C. gloeosporioides* afectando orquídeas en el país.

Literatura citada

- Adaskaveg, JE; Hartin, RJ. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87(9): 979-987.
- Agricultural Researches Service. 1960. Index of Plant Diseases in the United States. Agriculture Handbook N° 165. Washington, US, Agricultural Research Services. 531 p.
- Arx, JA von. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. Cramer, Lehre. 315 p.
- Barnet, HL; Hunter, BB. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Minneapolis, US. Burgess Publishing Company. 241 p.
- Commonwealth Mycological Institute. 1986. Manual para patólogos vegetales. Trad. de la 2a. ed. inglesa, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Santiago, Chile. Pedro G. Aguilar. 438 p.
- Freeman, S; Minz, D; Jurkevich, E; Marymon, M; Shabi, E. 2000. Molecular Analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90(6):608-614.
- Hawksworth, DL; Kirk, PM; Sutton, BC; Pegler, DN. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8 ed. International Mycological Institute, UK. CAB International. 616 p.
- López, AMQ. 2001. Taxonomía, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. In Ed. Luz, WC. Revisão Anual de Patologia de Plantas RAPP Passo Fundo, Brasil. 9 :291-318.
- Mordue, JEM. 1971. *Glomerella cingulata*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 315.
- Sutton, BC. 1980. The Coelomycetes. Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute. 696 p.