

ARTÍCULO ORIGINAL

***Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. f. sp. *spathodense* (nueva especialización): agente causal de la marchitez en *Spathodea campanulata* Beauv. en Cuba**

Lidcay Herrera Isla^{1,*}, Horacio Grillo Ravelo¹, Thomas Harrington^{II}, Alejandro Díaz Medina^{III},
Reinaldo Alvarez Puente^{III}

^IUniversidad Central de Las Villas. Villa Clara. Cuba. Carretera a Camajuani Km 5,5 Santa Clara VC, Cuba.

^{II}Iowa State University, USA. ^{III}Facultad de Montana del Escambray, Universidad de Sancti Spiritus. Cuba.

RESUMEN: El informe de *Ceratocystis fimbriata* Hell. & Halst. afectando la especie exótica invasora *Spathodea campanulata* Beauv. en la localidad de Tope de Collantes, macizo montañoso Guamuhaya en la región central de Cuba, conllevó a estudios posteriores con el fin de definir la ubicación taxonómica de esta posible nueva cepa especializada, así como demostrar su especificidad sobre *S. campanulata* como especie hospedante. Para ello se analizaron y describieron aislados obtenidos a partir de tejidos afectados de estas plantas. Se realizaron inoculaciones artificiales de este hongo en *S. campanulata* y en otras especies de plantas de importancia económica y ecológica que son comunes en estos ecosistemas montañosos. Los resultados de los análisis sugieren la presencia de una nueva forma especial de este hongo, lo que se confirmó al evaluar las inoculaciones realizadas en los hospedantes, donde solo se produjo afectación en *S. campanulata*. Se propone la clasificación del agente causal de la marchitez de *S. campanulata* en Cuba como *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *spathodense*.

Palabras clave: hongos fitopatógenos, *Ceratocystis*, *Spathodea campanulata*, planta invasora.

***Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. f. sp. *spathodense* (new specialization): causal agent of wilt in *Spathodea campanulata* Beauv. in Cuba**

ABSTRACT: The report of *Ceratocystis fimbriata* Hell & Halst. affecting the exotic invader plant *Spathodea campanulata* Beauv. at the locality of Topes de Collantes in the mountain region of Guamuhaya, in the central zone of Cuba, led to further studies to define the taxonomic position of this possible new specialized fungus species. *S. campanulata* and other economically important plant species commonly occurring in this mountain ecosystem were artificially inoculated with the fungus. Only *S. campanulata* resulted infected suggesting the presence of a new highly specialized isolate of *C. fimbriata*, and a new classification for this causal agent was proposed: *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *spathodense*.

Key words: phytopathogenic fungi; *Ceratocystis*; *Spathodea campanulata*, invasive plant.

INTRODUCCIÓN

El hongo fitopatógeno *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst. afecta una amplia variedad de plantas en el mundo (1); sin embargo, varios autores plantearon que este hongo presenta varias cepas especializadas, las denominan indistintamente «tipos», «formas» o «razas» y sostienen la hipótesis de que cada una de es-

tas cepas tiene un hospedante específico y, al parecer, distinta distribución geográfica (2,3,4,5).

Los análisis filogenéticos sugieren que *C. fimbriata* es un complejo de especies crípticas, que poseen hospedantes específicos, clasificados en tres grupos geográficos principales con sus centros en Asia, América del Norte y América Latina, respectivamente; con

*Autor para Correspondencia: Lidcay Herrera Isla. E-mail: lidcayhi@uclv.edu.cu.

el último grupo se incluyen especies del Caribe y el sudeste de los Estados Unidos (2, 4).

Numerosas evidencias demostraron la especificidad de hospedantes de varias cepas de *C. fimbriata*, aunque el número y los límites no han sido determinados totalmente (1); en el caso específico de afectación a *Spathodea campanulata* Beauv., sólo fue informada en Cuba (6).

Herrera y Grillo (6) reportaron a *S. campanulata* como nueva planta hospedante de *C. fimbriata*, cuando hallaron y analizaron algunos árboles muertos o en diferentes estados de decadencia en los numerosos rodales de esta especie que se desarrollan espontáneamente en la localidad de Tope de Collantes, macizo montañoso Guamuha, Cuba.

La especie *S. campanulata*, de la familia *Bignoniaceae*, representa una de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas en el mundo (7). En Cuba, Álvarez (8) la informó como especie ornamental escapada de cultivo en el macizo montañoso Guamuha, donde se encuentra muy difundida, formando rodales compactos con numerosos ejemplares de distintas edades y alta capacidad de producción y diseminación de semillas (9).

En dichos rodales se encontraron plantas con síntomas que sugerían la presencia de patógenos. El estudio tuvo como objetivos: I) Describir los síntomas

presentes en *S. campanulata*, II) Determinar el agente causal de la marchitez en *S. campanulata*, III) Evaluar la gama de hospedantes de dicho agente en condiciones semicontroladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se desarrolló en los bosques naturales de la localidad de Tope de Collantes en el Macizo Montañoso Guamuha, en la zona central de Cuba (Fig. 1). Los trabajos de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), perteneciente a la Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas (UCLV), Cuba, y en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Iowa, USA. En ambos laboratorios se depositó el material genético original utilizado en estos estudios y la documentación que avalan los resultados que se describen en el trabajo.

Descripción de las sintomatologías observadas en plantas de *S. campanulata*, afectadas por marchitez

Se describieron los síntomas presentes en plantas afectadas que se muestran de forma natural en diversos árboles, dentro del rodal de esta especie en Tope de Collantes. Se realizaron cortes transversales en las plantas afectadas y se tomaron imágenes.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA MACIZO GUAMUHAYA

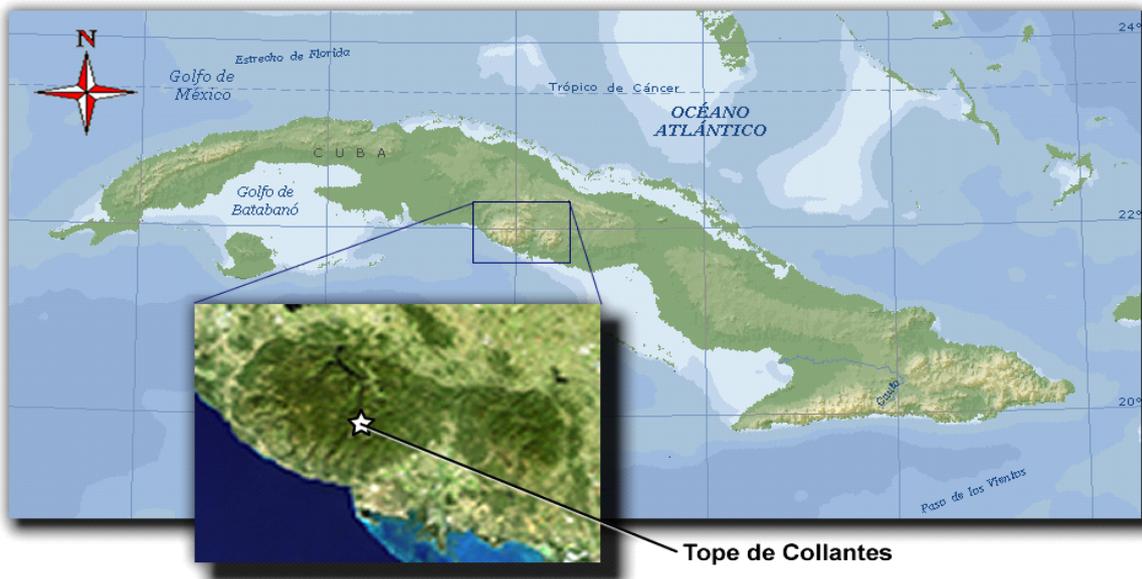


FIGURA 1. Ubicación geográfica del macizo montañoso Guamuha y de la localidad Tope de Collantes./ *Geographical localization of the Guamuha Mountain area and Tope de Collantes locality.*

Aislamiento, identificación y descripción del agente causal

Como muestras pequeñas, se tomaron porciones de tejido del leño, de plantas que presentaban síntomas de necrosis y se enviaron al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) perteneciente a la Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas (UCLV), donde se realizó el aislamiento, utilizando la técnica de la cámara húmeda, descrita por Herrera y Mayea (10).

Se sembraron pequeñas porciones del tejido afectado de la zona limítrofe del daño, o sea, tejido necrosado y aparentemente sano, en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA (Oxoid, pH 5,7) y se incubaron a temperatura constante de 28°C por siete días.

Para la identificación del agente causal se hicieron preparaciones microscópicas, tanto de las colonias que crecieron en medio de cultivo, como de aquellas estructuras que crecieron sobre la superficie de las porciones de tejidos.

Se realizaron mediciones de las estructuras vegetativas y reproductoras del hongo y, en particular, de las esporas de origen sexual y asexual. Como criterios comparativos para la identificación de los aislados del hongo, se empleó la Monografía Clásica sobre Taxonomía del Género *Ceratocystis* de Hunt (11), CMI Número 141 (12) y el compendio sobre *Ceratocystis fimbriata* publicado originalmente por CABI (13).

Evaluación de la gama de hospedantes en condiciones semi controladas

En las pruebas de especificidad para determinar la gama de plantas hospedantes, se utilizó como fuente de inóculo, porciones de propágulos de *C. fimbriata* reproducido *in vitro*, como se describe antes, y que fueron previamente aislados de tejido afectado de plantas de *S. campanulata*.

Para desarrollar estas pruebas se siguió el método de centrifugación filogenético propuesto por Wapshere (14).

En total, se seleccionaron 20 individuos jóvenes sanos, de cada una de las especies vegetales que se refieren en la Tabla 1. Para la evaluación de las especies de malanga se inocularon 20 cormelos de cada una.

Las plantas de tallos leñosos recibieron una abertura de sus tallos a una altura de 10 cm del cuello de la raíz, utilizando una barrena de 2 mm de diámetro, que en todos los casos sobrepasó la corteza y penetró el leño. Posteriormente, la barrena fue impregnada de propágulos del agente patógeno, contenido en la placa Petri, y se introdujo otra vez en el orificio realizado previamente. Las perforaciones fueron cubiertas con una cinta de polietileno para evitar la desecación excesiva y la penetración de otros organismos.

TABLA 1. Especies evaluadas en las pruebas de especificidad del patógeno causante de la marchitez en *S. campanulata*. / *Plant species tested for specificity to the causal agent of wilt in S. campanulata*

Especie	Nombre vulgar	Familia
<i>S. campanulata</i>	Tulipán africano, Espatodea	<i>Bignoniaceae</i>
<i>Jacaranda coerulea</i> (L.) Griseb.	Abey macho	
<i>Tabebuia</i> sp.	Roble blanco	
<i>Tecomastans</i> (L.) HBK	Sauco amarillo	
<i>Crescentia cujete</i> L.	Güira	
<i>Coffea arabica</i> L.	Cafeto	<i>Rubiaceae</i>
<i>Mangifera indica</i> L.	Mango	<i>Anacardiaceae</i>
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbek.	Naranja dulce	<i>Rutaceae</i>
<i>Swietenia macrophylla</i> King.	Caoba hondureña	<i>Meliaceae</i>
<i>Khaya anthotheca</i> (Welw.) C.D.C	Caoba africana	
<i>Taliparitis elatum</i> (Sw.) Frixell.	Majagua	<i>Malvaceae</i>
<i>Pinus caribaea</i> Morelet var. <i>caribaea</i> .	Pino macho	<i>Pinaceae</i>
<i>Persea americana</i> Mill.	Aguacate	<i>Lauraceae</i>
<i>Xanthosoma saggitifolium</i> Schott	Malanga	<i>Araceae</i>
<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott.		

En *X. saggitifolium* y *C. esculenta* el inóculo fue introducido directamente en la base del pedúnculo de cormelos completamente desarrollados.

En todas las especies vegetales evaluadas se inocularon 10 plantas y las otras 10 se emplearon como testigos, sin inocular el agente patógeno.

Se realizaron evaluaciones sistemáticas de las plantas inoculadas por un período de 120 días. Luego de este período, se hicieron cortes histológicos (0,3 µm) utilizando un escalpelo o bisturí alrededor de la lesión producida durante la inoculación del hongo. Los cortes se tiñeron con rojo anilina y cristal violeta y se observaron por el microscopio Olympus® con 400 aumentos, y en algunos casos se realizaron siembras de porciones de este tejido afectado en medio PDA para identificar el agente patógeno presente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de las sintomatologías observadas en plantas de *S. campanulata*, afectadas por marchitez

Las plantas de *S. campanulata* mostraron, como síntomas iniciales, una amarillez del follaje, que posteriormente se necrosa, provocando marchitez generalizada y caída paulatina de las hojas, queda el árbol completamente desnudo y se produce su muerte irremisiblemente (Fig. 2A).

En algunas partes del tallo se formaron bandas longitudinales y en esas zonas la corteza presenta aspecto rugoso y deprimido, de color oscuro, donde se nota la desecación de la misma (Fig. 2B). Al levantar esta corteza se apreciaron zonas de color oscuro y de forma irregular, tanto en la corteza como en el leño del árbol. De igual modo, se pudieron observar claramente las perforaciones provocadas por insectos de la familia *Scolytidae*.

En los cortes transversales de las zonas afectadas del tallo de los árboles se observaron áreas de color negro azulado, en sectores radiales o cuñas, cuyo vértice se dirigía hacia la región de la médula, provocando fuerte necrosis del sistema vascular de la planta (Fig.2C).

Aislamiento, identificación y descripción del agente causal

En la superficie de los tejidos afectados se encontró gran cantidad de cuerpos fructíferos del hongo (peritecas), de color castaño oscuro o negro, con una base globosa y un cuello largo y delgado (Fig. 3A). Las observaciones microscópicas evidenciaron la presencia de gran cantidad de ascosporas emergiendo de las peritecas con forma de sombrero.

En los cultivos *in vitro*, se obtuvieron varias colonias con micelio de color blanco, luego tomó una coloración negro oliváceo con una textura algodonosa y, por el reverso, la colonia se tornó negro intenso.

En las preparaciones microscópicas provenientes de esas colonias se apreció abundante micelio oscuro, gran número de conidióforos, con abundantes cadenas de endoconidias (Fig.3B); se observaron algunas clamidosporas (Fig. 3C); de paredes gruesas y de color más oscuro a las endoconidias.

Las estructuras observadas coinciden con las informadas para el hongo fitopatógeno *Ceratocystis fimbriata* (11, 12, 13).

Las dimensiones de las estructuras del aislado del patógeno obtenido de *S. campanulata* de la localidad de Tope de Collantes, se encuentran entre los intervalos informados para otros aislamientos de este fitopatógeno (Tabla 2).



FIGURA 2. Síntomas provocados en el follaje y tronco de *S. campanulata* por *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *spathodense*. / Symptoms caused in leaves and stems of *S. campanulata* by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *spathodense*.



FIGURA 3. Estructuras vegetativas y reproductivas del agente causal de la marchitez en *S. campanulata*./ *Vegetative and reproductive structures of the causal agent of wilt in S. campanulata.*

TABLA 2. Dimensiones de las estructuras de aislados de *C. fimbriata*./ *Structure dimensions of C. fimbriata isolates (dimensiones expresadas en micrones (µm))* (valores entre paréntesis representan medias)

Peritecas (largo x ancho)	Ascosporas (largo x ancho)	Conidioforos (largo)	Endoconidias µm	Aleuroconidia (largo x ancho)	Referencia
140-220 x 900	4,5-8 x 2,5-5,5	180	11-25 (15) x 4-4.5	9-18 x 8-13	12
130-200 x 800	4,5-8 x 2,5-5,5	-	11-16 x 4-5	9-16 x 6-13	13
110-250 x 440-770	5,0-7,5 x 3,5-5,0	55-120	9-33 x 3-5	11-16 x 6,5-12,0	5
148-198 x 440	4-8 x 3-6	162	13-26 (15,5) x 4 - 6	13-18 x 10-12	Aislado cubano de este estudio

Teniendo en cuenta estos resultados, se considera que las diferencias podrían estar relacionadas con la fisiología de la patogénesis, y esta cepa resultaría una nueva forma especial del hongo fitopatógeno, con un hospedante específico: *S. campanulata*.

Evaluación del rango de hospedantes en condiciones semi controladas

De las 15 especies vegetales evaluadas, solo *S. campanulata* presentó los síntomas característicos de afectación por el hongo *C. fimbriata* en el 100% de las plantas inoculadas. En el resto de las plantas no se encontró crecimiento del patógeno inoculado, lo que muestra diferentes reacciones a la inoculación, principalmente el crecimiento de tejido subcortical para cubrir la lesión y la emisión de resinas que impidieron el crecimiento del hongo.

En los cortes histológicos realizados no se encontró crecimiento secundario del hongo inoculado, por lo que se asume que en ninguno de los casos evaluados se presentó susceptibilidad al ataque.

En las plantas de *S. campanulata* se observaron amplias zonas de color pardo rojizo alrededor de las paredes del orificio realizado por el barreno, que se extendían por los vasos xilemáticos, y una simple observación de pequeñas porciones de estos tejidos afectados reveló gran cantidad de hifas oscuras y gruesas creciendo entre los vasos del xilema y también en los radios medulares.

En todos los casos, cuando se tomaron pequeñas porciones de estos tejidos afectados y se sembraron en medio de cultivo PDA, creció invariablemente *Ceratocystis fimbriata*, lo que denotó alta susceptibilidad de esta especie vegetal al ataque de este hongo fitopatógeno.

Los resultados obtenidos en los estudios taxonómicos de la cepa de *C. fimbriata*, que se encontró afectando de forma natural a *S. campanulata* en Cuba, y las pruebas de especificidad con varios posibles hospedantes, indicaron la presencia de una nueva especialización de este hongo fitopatógeno, que

afecta específicamente a esta especie exótica invasora, para la cual se propuso la siguiente clasificación: *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *spathodense*.

Estos resultados presentan plena correspondencia con informes previos de varios investigadores (2, 3,4), los que consideran que *C. fimbriata* se compone de muchas poblaciones que poseen hospedantes específicos.

La capacidad de *C. fimbriata* f. sp. *spathodense* de afectar única y severamente a *S. campanulata*, especie exótica con un comportamiento invasor en Cuba y en otras regiones tropicales del planeta, sugieren la posibilidad de su uso como posible agente de control biológico (micoherbicida) en el manejo de esta peligrosa especie, lo que debe ser objeto de investigaciones futuras.

REFERENCIAS

1. CAB International. *Ceratocystis fimbriata*. (Original text prepared by TC Harrington & C. Baker), In Crop Protection Compendium 2004. Wallingford, UK: CAB International. (Revised CD version). Disponible en: http://www.public.iastate.edu/tcharrin/CABI_info.html.
2. Harrington TC. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. Fitopatología Brasileira. 2000; 25(Suppl.):262-263.
3. Baker CJ, Harrington TC, Krauss U, Alfenas A. Genetic variability and host specialization within the Latin American clade *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology. 2003;93:1274-1284.
4. Johnson JA, Harrington TC, Engelbrecht CJB. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. Mycologia. 2005;97:1067-1092.
5. Engelbrecht CJB, Harrington TC. Intersterility, morphology, taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* from sweet potato, cacao and sycamore. Mycologia. 2005;97:9757-9769.
6. Herrera L, Grillo H. *Spathodea campanulata* Beauv, nueva planta hospedante de *Ceratocystis fimbriata* Hell y Halst y *Xyleborus* spp. Revista Centro Agrícola. 1989;2:91-93.
7. UICN. 100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo. Convención de supervivencia de Especies. The Global Invasive Species Database. 2005. Disponible en: <http://www.invasivespecies.net/database>; <http://www.issg.org/database> (Acceso: mayo/15/2005).
8. Álvarez R. Estudio de la flora arvense, sus diásporas y agentes patógenos en las principales zonas cafetaleras de Cuba. [Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Facultad Agropecuaria de Montaña del Escambray. Universidad Central de las Villas. Cuba. 2000.
9. Díaz A, Herrera L, Grillo H, Álvarez R. *Spathodea campanulata* Beauv. Especie invasora en el macizo montañoso Guamuhaya. Ecología y distribución. Malezas: Taxonomía, alelopatía y manejo. Rev Protección Veg. 2004;9(3):177.
10. Herrera L, Mayea S (Eds.) Fitopatología general. Ed. Felix Varela. Ciudad de La Habana. Cuba. 1994.
11. Hunt J. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. Lloydia. 1956;19(1):1-58.
12. CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No.141.1967.
13. CAB International (2001). *Ceratocystis fimbriata*. In Crop Protection Compendium. Wallingford, UK.
14. Wapshere AJ. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. Ann Appl Boil. 1974;77:201-211.

Recibido: 12-10-2014.

Aceptado: 5-2-2015.