

Estudio de parcelas de
AGUACATE
afectadas por hongos
de la familia
Botryosphaeriaceae
en la isla de Tenerife



PUBLICACIÓN ELABORADA POR:

Omar García Pérez – Biólogo

Santiago Perera González – Ingeniero Agrónomo. Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural del Cabildo Insular de Tenerife

Ana Rodríguez Pérez – Profesora del Área de Microbiología. Universidad de La Laguna (ULL)

Felipe Siverio de la Rosa – Investigador. Unidad de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA)

PUBLICACIÓN FINANCIADA POR:

Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca. Gobierno de Canarias

Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (Proyecto CAIA 2017-2020-0001)

© del texto: Los autores

© de las imágenes: Autores de la publicación

Mayo 2021

ÍNDICE:

Resumen [pg 3] · Introducción [pg 3] · Materiales y métodos [pg 5] · Resultados y discusión [pg 11] ·

Conclusiones [pg 22] · Agradecimientos [pg 23] · Bibliografía [pg 24]

Estudio de parcelas de aguacate afectadas por hongos de la familia Botryosphaeriaceae en la isla de Tenerife

Resumen

Los hongos de la familia Botryosphaeriaceae causan diversos síntomas en los aguacateros como: necrosis descendentes en ramas e inflorescencias, chancros en tronco y ramas, y pudriciones en el fruto. Estos daños son cada vez más frecuentes en las plantaciones de Canarias. En este informe se recogen los resultados de los estudios realizados en cultivos afectados en Tenerife en 2018 para determinar las especies de hongos implicadas en esta enfermedad. Se preparó un cuestionario con 30 preguntas sobre el cultivo y la enfermedad que se utilizó para encuestar a 27 productores de aguacates que se consideraban afectados. Se recogieron 123 muestras en 42 muestreos de las que se obtuvieron 153 aislados fúngicos. Se seleccionaron 63 de ellos en base a sus caracteres morfológicos en placa para su identificación mediante técnicas moleculares. Se realizaron extracciones de ADN de estos aislados, se amplificó la región de ADN_r de ITS-5.8S mediante PCR, se secuenciaron los amplificados obtenidos y se editaron las secuencias que se utilizaron para buscar similitudes con la aplicación BLAST de la NCBI. La especie más frecuentemente encontrada fue *Neofusicoccum luteum*, y en menor proporción, *N. parvum*, *N. australe*, *N. cryptoaustrale*, *Lasiodiplodia theobromae*, y una especie no identificada de *Neofusicoccum* sp. También se obtuvieron puntualmente aislados de endófitos, y de especies como *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. y *Botrytis cinerea*, entre otras.

Introducción

Las especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae son patógenos de un amplio número de hospedadores de leñosas y tienen una distribución mundial. Se encuentran en la naturaleza como endófitos, y se comportan como patógenos latentes y oportunistas que desarrollan su patogenicidad cuando sus hospedadores se encuentran bajo alguna forma de estrés (Denman y col., 2000). Estos hongos causan daños en los aguacateros como: necrosis descendentes en ramas e inflorescencias, chancros en tronco y ramas, y pudriciones en el fruto (figura 1), que son cada vez más frecuentes en las plantaciones de Canarias. Varios organismos públicos dedicados a la agricultura en Canarias publicaron a finales de 2017 la hoja divulgadora



Figura 1. Síntomas causados por hongos de la familia Botryosphaeriaceae en aguacate. A, chancro en tronco con exudados blancuecinos; B, cortes superficiales de chancros en tronco; C, necrosis descendente en ramas; D y E, necrosis en inflorescencias; F, necrosis en ramas y peciolas, y seca de hojas; G y H, necrosis en fruto.



titulada: “Enfermedades del aguacate causadas por hongos de la familia Botryosphaeriaceae”, en la que se describe detalladamente esta enfermedad (García-Pérez y col., 2017).

El Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA), dentro del proyecto “Optimización de los sistemas de producción de aguacate en Canarias” (CAIA 2017-2020-0001), financiado por la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias, lleva a cabo estudios relacionadas con diferentes aspectos epidemiológicos relacionados con esta enfermedad en colaboración con el Servicio de Agricultura del Cabildo Insular de Tenerife. En este informe se recogen los resultados de los estudios realizados en 2018 en Tenerife, y cuyos objetivos fueron: obtener información de los cultivos afectados por hongos de la familia Botryosphaeriaceae en campo o en poscosecha, y llevar a cabo análisis de laboratorio de plantas y frutos de aguacate con síntomas para determinar los organismos que los causan. También se estudió la capacidad inhibidora *in vitro* de *Bacillus subtilis* sobre aislados de la familia Botryosphaeriaceae. *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas de resistencia, y con actividad fungicida. Algunas cepas de esta bacteria son utilizadas en agricultura para el control biológico de hongos fitopatógenos.

Materiales y métodos

Encuesta. Se preparó una encuesta para recoger información general de los cultivos de aguacate que incluía los siguientes datos: fecha, nombre de la finca, dirección, municipio, datos catastrales y del propietario o encargado, edad de la plantación, superficie de cultivo, número de árboles, marco de plantación, producción aproximada, origen de las plantas, variedades y portainjertos utilizados, comercialización, procedencia del agua y tipo de riego, cultivos asociados, fertilización, labores, presencia de plagas y enfermedades, y factores que limitan el cultivo. También en la encuesta se incluyeron apartados dedicados a esta enfermedad como presencia/ausencia de síntomas en campo o en poscosecha, tipo de síntomas asociados, número de árboles afectados, distribución de la enfermedad en la parcela, gravedad de los daños y medidas adoptadas para su control.

Se han realizado un total de 27 encuestas dirigidas a explotaciones presuntamente afectadas por la enfermedad, 18 de ellas localizadas en fincas del norte de la isla y el resto en el sur. La tabla 1 y la figura 2 muestran el número y la localización de las encuestas por municipio.

Tabla 1. Número de encuestas realizadas, muestreos y muestras recogidas por municipio

Municipio	Nº de encuestas	Nº de muestreos	Nº de muestras
Adeje	1	0	0
Arafo	2	2	9
Arona	2	3	12
Buenavista de Norte	6	9	13
El Sauzal	1	1	7
Guía de Isora	2	2	6
Güímar	2	2	7
La Laguna	1	6	14
La Matanza	2	1	4
La Orotava	1	2	4
Los Realejos	4	4	14
Tacoronte	2	3	6
Tegueste	1	3	5
No determinado (poscosecha)	-	4	22
TOTAL	27	42	123




Figura 2. Distribución de las parcelas objeto de estudio. Ver tabla 1.

Muestreo. La selección de muestras en campo se realizó en base a los síntomas descritos para esta enfermedad como: necrosis descendentes en ramas, necrosis en inflorescencias y chancros en el tallo, por lo que la mayor parte de las muestras recibidas presentaban estos síntomas. En menor medida se recogieron frutos con daños en poscosecha y muestras de plántulas de vivero. Se recogió un número variable de muestras de cada uno de los 42 muestreos (campo y poscosecha) de Tenerife. En la tabla 1 se detalla el origen de los muestreos y de las muestras recogidas.

Preparación de las muestras y aislamiento de hongos. Se seleccionaron porciones de las muestras ($< 1 \text{ cm}^3$) en las que se observaba el avance de las necrosis entre zonas sanas y con daños. Estas porciones se trataron con una solución de hipoclorito sódico en agua (0,5%) durante 30 s, posteriormente se introdujeron en etanol al 70% otros 30 s, se aclararon con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel de filtro estéril en una cabina de flujo laminar. Con un bisturí estéril se cortaron porciones de unos 5 mm^3 de las zonas de avance de la enfermedad y se sembraron (unos seis fragmentos por placa) en placas de Petri con el medio de cultivo papa dextrosa agar con estreptomycin (PDAS: extracto de papa, 4 g/l; dextrosa, 20 g/l; agar, 15 g/l; y estreptomycin, 50 mg/l). Las placas sembradas se mantuvieron en incubadora a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se observó crecimiento. Para la purificación de los aislados de los hongos obtenidos se tomaron porciones del avance de las colonias que se transfirieron a una placa del mismo medio de cultivo (un aislado por placa). Para el almacenamiento y conservación de los aislados, se realizaron repicados en tubos de agar inclinado de medio PDA y CMA (agar de harina de maíz). Cuando el micelio en crecimiento cubrió toda la superficie del medio de cultivo, se añadió aceite de parafina estéril. Los tubos se almacenaron en una incubadora refrigerada a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Observación morfológica. En base a las características morfológicas de las colonias en crecimiento y con el apoyo de la lupa binocular (Leica Wild M10) y del microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i), se separaron los aislados fúngicos representativos de los distintos aislamientos realizados durante todo el trabajo. Entre estos, se seleccionaron a su vez los aislados que se utilizaron para su identificación mediante técnicas moleculares.

Extracción de ADN de los aislados. Se utilizó el método de extracción de ADN mediante NaOH (Collado-Romero y col., 2006), también denominado *hotshot*. Se tomaron porciones de micelio del hongo de la superficie del medio de cultivo, se depositaron en un tubo Eppendorf de 0,2 ml y se añadieron



20 μl de NaOH 25mM (pH 12) a cada tubo. A continuación, se introdujeron los tubos en una placa calefactora refrigerada a 95°C durante 15 minutos y se bajó la temperatura seguidamente a 4°C durante 5 min. Una vez fríos, se añadieron 20 μl de 40 mM de Tris-HCl (pH 5) para neutralizar el pH. Los extractos de ADN así obtenidos se agitaron y se centrifugaron. Estos extractos se utilizaron inmediatamente o se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Identificación de los aislados. Para la identificación de los aislados de hongos seleccionados se amplificaron secuencias específicas de su ADN mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se valoraron cinco regiones del ADN utilizadas habitualmente para la identificación de especies de esta familia: ITS, EF1- α ; β -tubulina, SSU y LSU, y se seleccionó finalmente la región ITS con los iniciadores ITS-1 (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White y col., 1990). Cada mezcla de 25 μl para la PCR incluía: tampón NH₄ (10X), 2,5 μl ; MgCl₂ (50 mM), 1,5 μl ; dNTPs (100 mM), 0,25 μl ; iniciadores (20 μM), 0,15 μl ; Taq polimerasa, 0,2 μl ; y extracto de ADN, 2 μl . Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) utilizando el siguiente programa: precalentamiento inicial a 94-95 °C durante 5 min; seguido de 30 ciclos: desnaturalización a 94-95 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 min; y finalmente, 72 °C durante 10 min. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel en de agarosa (1X TAE (40 mM Tris, 40 mM acetate, 2 mM EDTA, pH 8.0), 100 ml; agarosa, 1 g; RealSafe Nucleic Acid Staining (20.000X), 4,0 μl) y se fotografiaron bajo luz UV. Los amplificados obtenidos se enviaron al Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna donde se purificaron y se secuenciaron.

Se estudiaron, alinearon y trataron las secuencias de ADN con la aplicación MEGA 7.0 y se compararon con las de especies existentes en bases de datos (GenBank) mediante el programa **BLAST** del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para conseguir la identificación de los aislados.

Ensayos de patogenicidad. Para estudiar la capacidad patogénica de los aislados y cumplir con los postulados de Koch se llevaron a cabo dos ensayos bajo cubierta y a temperatura ambiente. En el primer ensayo se utilizó un aislado de *Lasiodiplodia theobromae* y en el segundo se seleccionaron cinco aislados en representación de las distintas especies de hongos obtenidas, que se inocularon sobre el tallo de plántulas de aguacate, con el fin de evaluar los daños producidos en ellas. Se utilizaron plántulas de la variedad Topa-topa de



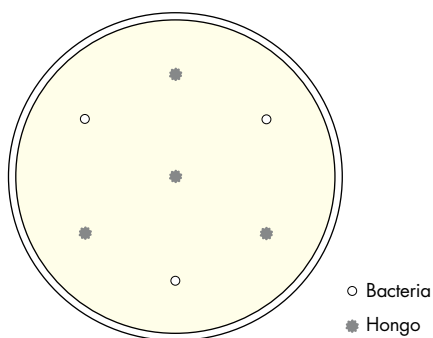
Figura 3. Ensayos de patogenicidad. A, aguacateros de la variedad Topa-topa en los invernaderos del ICIA; B, tallo de aguacate dañado con un sacabocado y preparado para su inoculación; C, tallo de aguacate inoculado cubierto con Parafilm M® con emisión de exudados; D, plantas del primer ensayo de patogenicidad.

3-6 meses (figura 3). Para obtener el inóculo se sembraron placas de PDA con los aislados seleccionados que se mantuvieron en una incubadora durante 7 d a 25 °C en la oscuridad. Para la inoculación de las plantas, se realizó una herida de 0,5 cm de diámetro con un sacabocado estéril en el tallo de cada una de ellas, a una distancia de 5 cm del cuello, en la que se insertó un fragmento de PDA del mismo diámetro con micelio del hongo. La herida inoculada se selló con Parafilm M®, que fue retirado después de 15 d. Como control negativo, se utilizaron plantas con fragmentos de medio de cultivo sin micelio. Se inocularon ocho y seis plantas de aguacate por cada aislado del

hongo en el primer y el segundo ensayo, respectivamente. La mitad de las plantas inoculadas de cada aislado se embolsaron con plástico transparente para aumentar la humedad relativa (figura 3D). El plástico se retiró diez días después de efectuada la inoculación. Las plantas se regaron a demanda y transcurridos tres meses desde la inoculación se evaluaron sus síntomas externos (primer ensayo) e internos (primer y segundo ensayo). Por último, se realizaron aislamientos de las plantas inoculadas. Para ello, se cortó una porción de tallo a 1-2 cm por encima y por debajo del punto de inoculación. Esta porción se desinfectó utilizando el protocolo descrito anteriormente en el apartado de preparación de las muestras y aislamiento de hongos. Se sembraron pequeños fragmentos de la zona de avance de la lesión en los medios de cultivo PDAS y PDA, tras dejar secar la porción desinfectada en una cabina de flujo laminar.

Ensayos de inhibición en placa. Se estudió la capacidad inhibidora en placa de la bacteria *Bacillus subtilis* sobre algunos de los aislados obtenidos de la familia Botryosphaeriaceae. La bacteria se obtuvo a partir del producto SERENADE® MAX de Bayer Crop Science (cepa QST 713), que se preparó a una concentración del 1% p/v en agua destilada estéril. Para los ensayos se utilizó inóculo de aislados de las especies *Neofusicoccum luteum*, *N. parvum*, *N. australe*, *N. cryptoaustrale* y *Lasiodiplodia theobromae* obtenidos con un sacabocado del frente de avance de una placa de medio de cultivo PDA incubado 7 d a 25°C. La distribución en la placa de estudio se realizó como se indica en la figura 4, situando cuatro fragmentos de 0,5 cm de diámetro de un mismo aislado fúngico y 5 µl de la suspensión de la bacteria en tres localizaciones. Se realizaron dos placas por cada aislado del hongo que se incubaron a 25°C durante 7 d y se observaron para determinar la inhibición del crecimiento del hongo por parte de la bacteria.

Figura 4. Ensayo de inhibición en placa de medio de cultivo PDA. Localización del aislado fúngico y de la bacteria *Bacillus subtilis* (suspensión en agua del producto SERENADE® MAX).



Resultados y discusión

Encuesta. La mayoría de las explotaciones encuestadas (68%) contaban con menos de 1 ha de superficie, el 24% entre 1 y 2 ha y el 8% más de 2 ha. Los marcos de plantación más frecuentes eran de 5 x 5 m y 5 x 4 m. Otros marcos observados fueron de 6 x 5 m, 4 x 4 m, 6 x 6 m, 6 x 4 m y 3,5 x 3,5 m. La distribución por edades de las explotaciones encuestadas se muestra en la figura 5.

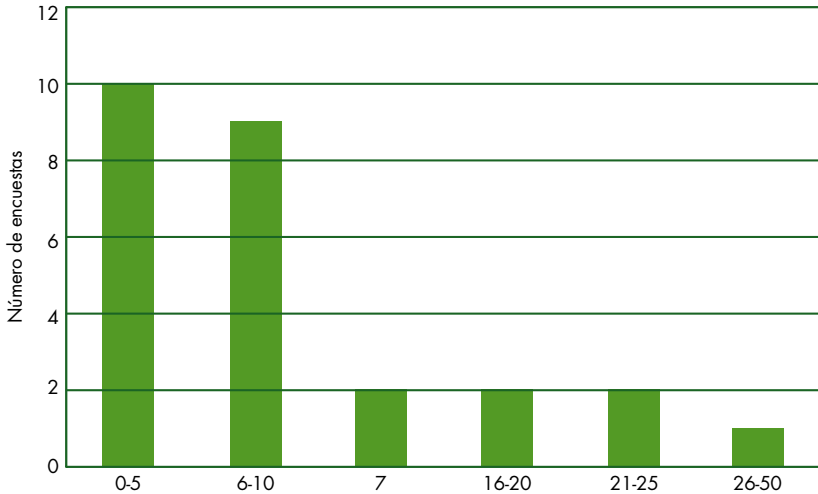


Figura 5. Distribución por edades en años de las plantaciones de aguacate en las encuestas.

El 100% de los encuestados poseían aguacates del cultivar Hass, un 92,7% empleaban Fuerte como polinizador, y el resto (7,3%) utilizaban Bacon. Un 22% de los encuestados, además de la variedad principal y el polinizador, contaba con otros cultivares en su explotación como Orotava, Pinkerton, Reed y Antillano. En cuanto a los patrones, el 54,2% tenía exclusivamente como portainjerto plantas de raza Antillana, el 8,3% utilizaba Orotava, el 16,7% tenía en su explotación árboles con portainjerto Antillano y Orotava y, cabe destacar, que el 20,8% de los encuestados desconocía la naturaleza del patrón en su explotación (ver figura 6).

La procedencia del agua de riego era mayoritariamente de galería (59%) seguida de mezclas (30%) y por último un 11% de pozo. En relación al sistema de riego, el 67,8% contaba con riego por goteo, seguido del 25% con microaspersión y del 7,2% con aspersión.

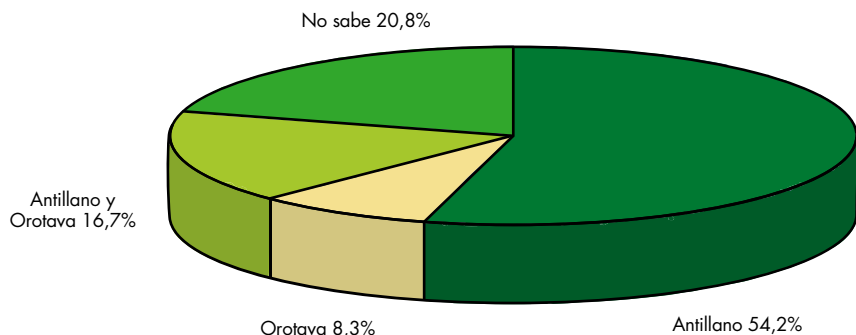


Figura 6. Diagrama circular de los portainjertos utilizados por los agricultores en las explotaciones.

El 62,9% de las fincas de aguacate sondeadas no poseía cultivos asociados, el 29,6% de los aguacates se acompañaban de frutales de los que un 50% eran de una única especie (mango, platanera, naranjo o parchita) y el resto, de un conjunto de especies entre las que se encontraban guayabos, naranjos, limoneros, mandarinos, perales, manzanos, higueras, parchitas, nispereros y macadamias. Un 7,4% de las encuestas indican que realizan asociaciones con hortalizas, principalmente papas y calabazas.

En cuanto a las labores realizadas en el cultivo, las fundamentales eran poda (77,7%) y desbrozado (40,7%), seguidas de laboreo mecánico (7,4%) y la realización de la práctica del anillado en el 18,5% de las encuestas.

Las principales limitaciones que encontraban los agricultores para la producción de aguacates se muestran en la figura 7. La mayoría de los encuestados indicaban que la calidad del agua era uno de los principales factores limitantes del cultivo, seguidos de problemas de suelo y drenaje, vientos, plagas, robos y enfermedades. El clima limitaba el cultivo para un 3% de los encuestados.

A la pregunta de si sufre su cultivo alguna plaga o enfermedad, el 81,5% indicó araña cristalina (*Oligonychus perseae* Tuttle, Baker y Abbatiello, 1976), el 25,9% cochinilla del aguacate, (*Nipaecoccus nipae* Maskell, 1893), el 14,8% trips (*Heliothrips haemorrhoidalis* Bouché, 1833) y el 7,4% no sufría de daños por plagas. El 29,6% habían sufrido daños debidos a *Phytophthora* (*Phytophthora cinnamomi* Rands), sólo una parcela se había visto afectada por verticilosis (*Verticillium dahliae* Kleb, 1913) y ninguna por roña (*Sphaceloma perseae* Jenkins, 1934) ni armillaria (*Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm, 1871).



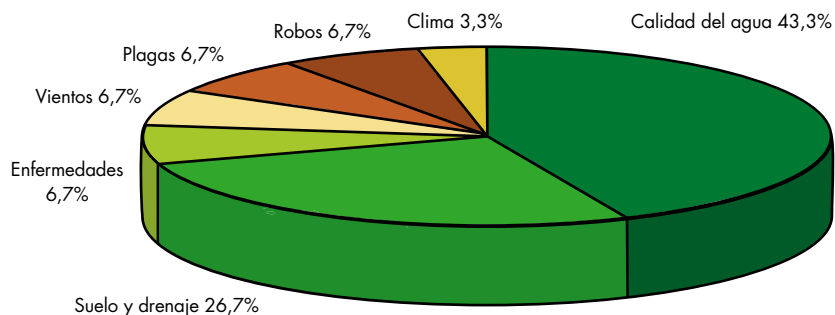


Figura 7. Principales limitaciones para la producción de aguacates según los agricultores encuestados.

En la comercialización, el 56,5% de los encuestados canalizaba su producción a través de las cooperativas, mientras que el 4,3% la realizaba a través de Mercatenerife y el mismo porcentaje a través de gangocheros. El resto de encuestados (30,4%) contestó que distribuye su producción mediante otros canales de comercialización.

En los aspectos relacionados con la familia Botryosphaeriaceae, el 18,5% de los encuestados confirmaron haber estado afectados por esta enfermedad diagnosticada por Laboratorio. Los síntomas relacionados con la enfermedad observados en las parcelas encuestadas se recogen en la figura 8. El daño más frecuente fue la seca de ramas (77,8%), seguido de ennegrecimiento de las ramas (40,7%), y chancros en el tronco principal y en ramas (18,5 y 14,8%, respectivamente). En un 11,1% de los casos también se observaron manchas en frutos, manchas en puntas de las hojas y marchitez o tristeza en las hojas. Por último, en muy pocos casos (7,4%) se detectaron frutos pequeños que no se desarrollaban.

El 54,5% de las fincas encuestadas tenían entre un 1 y un 15% de los árboles afectados por síntomas asociados a esta enfermedad, y en un 22,7% de ellas superaba el 75% (ver figura 9). La intensidad del daño de esta enfermedad en los árboles era de carácter leve en un 62,5%, moderado en un 20,8% y grave en un 16,7% de los encuestados. Un 13,6% del total de las fincas encuestadas tuvo daños en poscosecha en frutos provocados por esta enfermedad principalmente en la variedad Fuerte, el resto de encuestados o no había observado daños o no lo sabía. En cuanto a la distribución de los árboles afectados, el 85,7% de los encuestados presentaban árboles enfermos de forma aislada, mientras que en el resto (14,3%) se localizaban en focos.

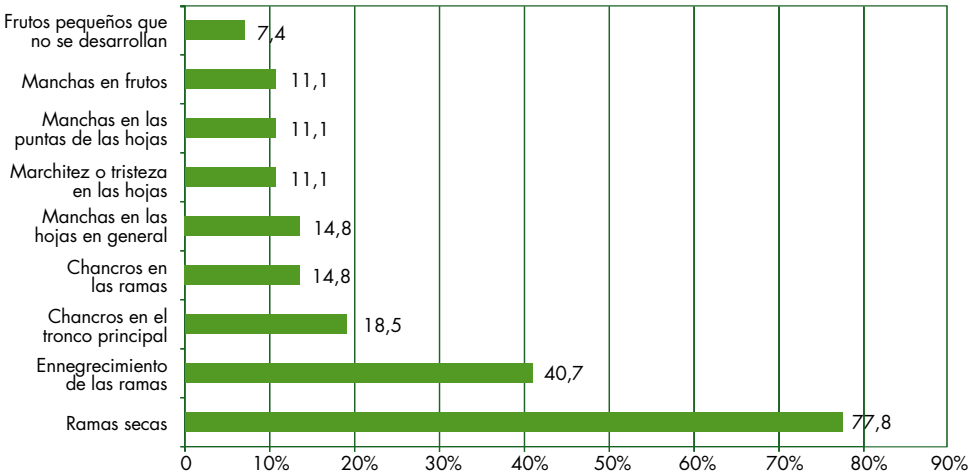


Figura 8. Principales daños atribuibles a hongos de la familia Botryosphaeriaceae observados en las plantaciones de aguacate.

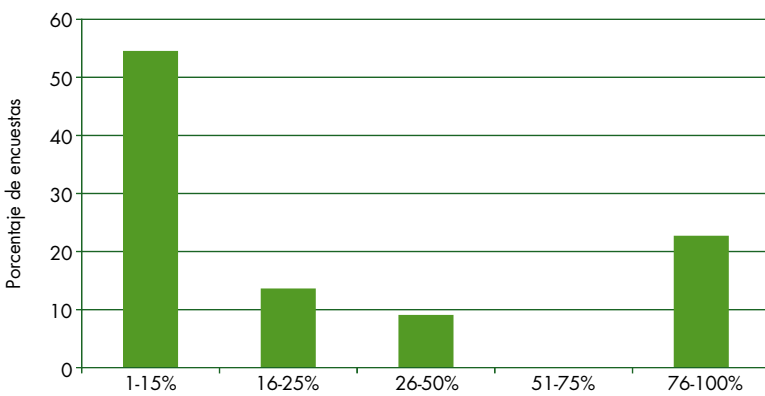


Figura 9. Porcentaje de árboles en las plantaciones afectados por daños atribuibles a hongos de la familia Botryosphaeriaceae.

Para el control de la enfermedad en las parcelas afectadas, el 51% realizaba la poda de ramas que retiraba de las parcelas, el 19% efectuaba la poda sin retirada de ramas y el 30% no realizaba ninguna de ellas. Además, un 22,2% de los encuestados había aplicado tratamientos químicos con productos a base de cobre.



Para establecer objetivamente la prevalencia de la enfermedad en Tenerife y en toda Canarias es necesario llevar a cabo nuevas prospecciones de parcelas seleccionadas al azar en todas las zonas productoras. Esto permitiría, además, estudiar posibles relaciones entre factores ambientales y enfermedad. Los factores ambientales adversos pueden causar el debilitamiento de los árboles y favorecer el desarrollo de la enfermedad en las parcelas afectadas en comparación con las parcelas que no lo están. Esta circunstancia es especialmente importante en una enfermedad como ésta, con un marcado carácter oportunista y tan dependiente de las condiciones medioambientales.

Preparación de las muestras y aislamiento de hongos. Observación morfológica. Extracción de ADN de los aislados. Identificación de los aislados. Se obtuvieron hongos en las siembras en placas de PDA, que se purificaron después de su observación a la lupa binocular y al microscopio, hasta conseguir aislados en cultivo puro. Se obtuvieron un total de 153 aislados de las 123 muestras que se recogieron de los 42 muestreos. Estos aislados se agruparon según sus características morfológicas en placa, y se seleccionaron 63 de ellos para su caracterización mediante técnicas moleculares, que permitieron determinar la especie en 56 casos.

En 39 de los 42 muestreos se encontraron síntomas similares a los descritos para esta enfermedad. En 27 de éstos se detectó alguna especie de la familia Botryosphaeriaceae que pudo confirmarse en 25 de los casos mediante técnicas moleculares: 24 muestreos con especies de *Neofusicoccum* (14, *N. luteum* (Figura 10); 6, *N. cryptoaustrale*; 3, *N. australe*; 3, *N. parvum*; 3,



Figura 10. Placas de Petri con medio de cultivo agar de papa dextrosa (PDA) con dos aislados de *Neofusicoccum luteum*, la especie que se detectó con más frecuencia en la prospección.

Neofusicoccum sp.) y 1 con *Lasiodiplodia theobromae*. Además, en 5 de las parcelas se aislaron e identificaron 2 especies distintas de *Neofusicoccum* simultáneamente y en 3 de ellas *Colletotrichum* sp. además de una o dos especies de *Neofusicoccum*. En 4 muestreos se detectó exclusivamente *Alternaria* sp. y en 2, *Botrytis cinerea*. En las restantes no se obtuvieron resultados o aislamientos de hongos a los que atribuir los daños observados. En algunas ocasiones, las secuencias obtenidas coincidían con las de endófitos fúngicos no identificados cuando se compararon con las de especies existentes en bases de datos de GenBank mediante la aplicación BLAST. Mencionar que también se detectó *N. parvum* en una muestra de mango con síntomas de necrosis descendente recogida en una de las parcelas visitadas. En la tabla 2 se muestran las especies identificadas y su distribución por municipios.

Tabla 2. Resultados de las identificaciones de los hongos analizados mediante identificación molecular por secuenciación y distribución por municipios

Resultado	Municipio
<i>Alternaria alternata</i>	Arona
<i>Alternaria chenopodiicola</i>	Buenavista del Norte
<i>Alternaria</i> sp.	Buenavista del Norte
<i>Botrytis cinerea</i>	La Laguna, Buenavista del Norte
<i>Cladosporium</i> sp.	La Laguna
<i>Colletotrichum</i> sp.	Buenavista del Norte, Los Realejos, La Orotava
Endofito fúngico	La Orotava, El Sauzal, Los Realejos
Hongo no identificado	El Sauzal
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	La Laguna
<i>Leptosphaeria</i> sp.	La Orotava
<i>Neofusicoccum australe</i>	Buenavista del Norte, La Matanza
<i>Neofusicoccum cryptoaustrale</i>	Guía de Isora, La Matanza
<i>Neofusicoccum luteum</i>	Buenavista del Norte, El Sauzal, La Laguna, La Orotava, Los Realejos, Tacoronte, Tegueste
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Guía de Isora, Los Realejos, Tegueste
<i>Neofusicoccum</i> sp.	Arona
<i>Nigrospora oryzae</i>	La Matanza
<i>Stemphylium</i> sp.	El Sauzal

Estas especies coinciden con las encontradas en otros países productores de aguacates en los que se ha citado también esta enfermedad (tabla 3), salvo para *N. cryptoaustrale* que no había sido citada hasta ahora para este cultivo. En muestras de aguacate remitidas en 2015 al Laboratorio Nacional de Referencia de Hongos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Valencia) también se detectó esta especie junto con *N. luteum* y *Colletotrichum alienum* (Armengol, 2015). En el informe de resultados de dichas muestras se indicaba que la detección de las especies *C. alienum* y *N. cryptoaustrale* en aguacate en las Islas Canarias suponía la primera cita de estos hongos en España. Y que, además, *C. alienum* había sido descrito en Australia y Nueva Zelanda en diversos frutales y, entre ellos, el aguacate. Por último, se mencionaba que *N. cryptoaustrale* sólo había sido citada en eucalipto en Sudáfrica (Armengol, 2015). *Colletotrichum gloeosporioides* es el agente etiológico de la antracnosis del aguacate. En este trabajo no se identificaron los aislados de *Colletotrichum* encontrados en las muestras analizadas de Tenerife, por lo que no es posible confirmar si se trata de *C. gloeosporioides*, *C. alienum* o si se trataba de alguna otra especie. Todos los aislados obtenidos de *Colletotrichum* sp. se obtuvieron de ramas y ninguno de manchas del fruto. En cualquier caso, en futuros trabajos es necesario confirmar las especies presentes de este género de patógenos y definir las particularidades de los síntomas que producen.

El número de muestras de los tres tipos principales de síntomas que causan estos hongos (necrosis en ramas, chancros en tronco o ramas y pudriciones en el fruto) estuvo muy desequilibrada en favor de las necrosis en ramas (91 muestras de 32 orígenes), con baja representación de muestras de frutos (22 muestras de cuatro orígenes) y muy baja de chancros en troncos o ramas (dos muestras de dos orígenes). En estas condiciones no se encontró ninguna relación entre estos tipos de síntomas, la localización geográfica o cualquier otro factor de los estudiados y la presencia de una especie u otra de los hongos identificados. En otros países (ver tabla 3) los diversos tipos de síntomas (necrosis descendentes en ramas y pedicelos, chancros en tronco y ramas y diversas pudriciones en el fruto) parecen estar causados de manera general por diferentes especies de la familia Botryosphaeriaceae, junto con otras especies de hongos, con la prevalencia de unos u otros según países o regiones (tabla 3). Incluso en algunas publicaciones se menciona que la incidencia y la distribución de las especies varía entre zonas prospectadas (McDonald y Eskalen, 2011; Arjona-Girona y col., 2019). La mayor frecuencia

Tabla 3. Países o estados en los que se han detectado síntomas similares a los causados por hongos

País/Estado	Referencia	Síntomas				Especie de hongo		
		Planta		Fruto		Neofusicoccum parvum	Neofusicoccum luteum	
		Chancro en ramas	Necrosis descendente	Podredumbre apical	Manchas negras			
Australia	Hartill, 1991			x	x			
Australia	Peterson, 1978			x	x			
Brasil	Firmino y col., 2006			x	x	x		
California	Twizeyimana y col., 2013	x	x	x			x	
California	McDonald y col., 2009	x				x	x	
California	McDonald y Eskalen, 2011	x				x	x	
Chile	Auger y col., 2013		x					
Chile	Tapia y col., 2020			x	x		x	
Chile	Montealegre y col., 2016			x				
Chile	Valencia y col., 2019	x	x	x		x		
China	Qiu y col., 2019			x				
Colombia	Ramírez-Gil y col., 2019			x	x			
Colombia	Ramírez-Gil, 2018	x						
España	Arjona-Girona y col., 2019		x			x	x	
España	Zea-Bonilla y col., 2007		x			x		
Etiopía	Kebede y Belay, 2019			x	x			
Italia	Guarnaccia y col., 2016			x		x		
México	Molina-Gayosso y col., 2011				x	x		
Nueva Zelanda	Hartill, 1991			x		x	x	
Nueva Zelanda	Hartill y Evertt, 2002		x			x	x	
Perú	Alama y col., 2006	x	x	x				
Sudáfrica	Darvas y Koitze, 1987			x	x			
Tailandia	Trakunyingcharoen y col., 2015	x		x	x			
Taiwan	Ni y col., 2011			x	x	x		
Taiwan	Ni y col., 2009				x			

* Abreviaturas: Nm, *Neofusicoccum mediterraneum*; Nma, *N. mangiferae*; Nn, *N. nonquaesitum*; Lpt, *Lasiodiplodiapseudotheobromae*; Dd, *Dothiorella dominicana*; Da, *D. aromatica*; Di, *D. iberica*; Cg, *Colletotrichum gloeosporioides*; Cf, *C. fruticola*; Ca, *C. acutatum*.

de la familia Botryosphaeriaceae en aguacate

que causa los síntomas*

<i>Neofusicoccum australe</i>	<i>Neofusicoccum</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Dothiorella</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.
			x	Dd	
			x	Da	Cg
					Cg
x	x		x	Di	
x			x	Di	
x					
x					
x	Nn	x		Di	
		x	x		Cg
		x			
x	Nm	x			Cg
					x
					Cg,Cf
			x		
			x		Cg,Ca
			x		Cg,Ca
		x			x
		Lpt			
	Nma	x	x		
	Nma				

de aparición de *N. luteum* no se corresponde con lo descrito en las plantaciones del sur de la península donde predomina *N. parvum* (Arjona-Girona y col., 2019).

Con respecto a los daños producidos por hongos en los frutos (en campo y en poscosecha), se ha descrito que los debidos a especies de *Colletotrichum* se caracterizan por la aparición de oscurecimientos en la piel del fruto (antracnosis), mientras que los causados por especies de la familia Botryosphaeriaceae se localizan en la zona de inserción del pedúnculo en el fruto (*stem end rot*) (Hartill, 1991; Menge and Ploetz, 2003; Ramírez-Gil y col., 2020). De las muestras analizadas en nuestro trabajo, tanto las que presentaban síntomas tipo *stem end rot*, como las que mostraban manchas en otras localizaciones del fruto, sólo se obtuvieron especies de *Neofusicoccum* (*N. luteum*, *N. australe* y *N. cryptoaustrale*) y ninguna de *Colletotrichum* sp. De este modo, los hongos detectados en las ramas e inflorescencias de los aguacateros en campo pueden también ser los que causan daños directamente en el fruto en poscosecha. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo un mayor número de aislamientos con caracterizaciones detalladas de los síntomas y de otras cuestiones ambientales, con el fin de aclarar si realmente puede haber algún tipo de asociación entre síntomas y especies en Canarias, tanto en campo como en frutos de poscosecha.

En Costa Rica, se detectaron síntomas de manchas cloróticas, quemaduras marginales, deformación de hojas, defoliación, acortamiento de entrenudos y muerte regresiva de ramas en árboles de aguacate en las que se detectó por primera vez para este cultivo la bacteria de cuarentena *Xylella fastidiosa* (Montero-Astúa y col., 2008). Con el fin de descartar la posibilidad de que esta bacteria fuera la causante de los síntomas observados en esta prospección realizada en Tenerife, se analizaron 25 muestras (una muestra representativa por localización de 25 de las localizaciones prospectadas) utilizando un protocolo de PCR en tiempo real basado en Harper y col. (2019) y descritos en el documento PM7/024(4) de la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO, 2019). No se detectó esta bacteria en ninguna de las muestras analizadas.

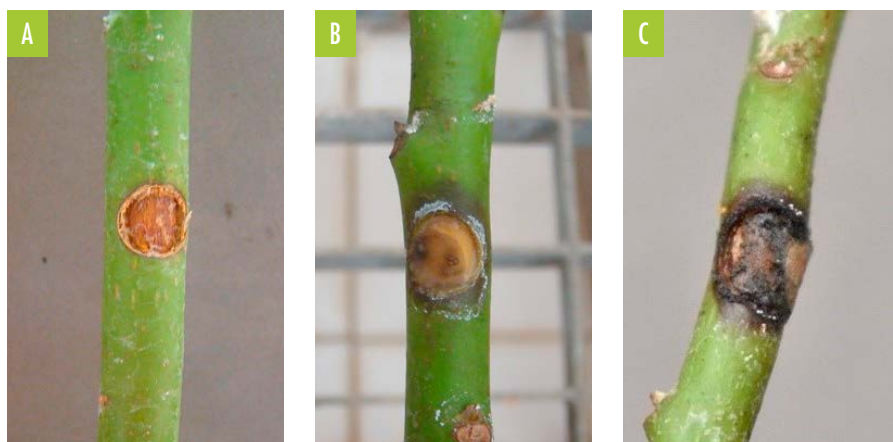


Figura 11. Síntomas externos resultado de las inoculaciones en planta de aguacate de la variedad Topa-topa. A, síntomas externos en planta control; B y C, daños producidos por un aislado de *Lasiodiplodia theobromae*.

Ensayos de patogenicidad. Las figuras 11 y 12 muestran síntomas externos representativos de patogenicidad del primer y del segundo ensayo, respectivamente. Con frecuencia se observaron los exudados de azúcares blanquecinos característicos del aguacate (manocetoheptulosa, Schaffer y col., 2013) en los puntos de inoculación (figura 11B y 12C) o en las partes del tallo en las que se aplicó Parafilm M® para fijar el fragmento de inóculo en el tallo (figura 3C). Las necrosis en los tallos inoculados en el primer ensayo avanzaron pocos milímetros desde el punto de inoculación tal y como se observa en la figura 11B y 11C. En el segundo ensayo no se observaron diferencias en los síntomas externos entre el control y las plantas inoculadas, aunque en este caso se estudiaron los síntomas internos, y se observó el avance de la necrosis por el interior de las plantas inoculadas, tal y como se



Figura 12. Síntomas externos y síntomas internos resultado de las inoculaciones en planta de aguacate de la variedad Topa-topa. Todas las plantas que se muestran en la figura, salvo E, se embolsaron durante 10 d después de su inoculación. A y B, control negativo (plantas inoculadas con un fragmento de agar libre de hongos), síntomas externos (A) y síntomas internos (B); C y D, plantas inoculadas con un aislado de *Neofusicoccum luteum* (la especie que se encontró con más frecuencia en la prospección), síntomas externos (C) y síntomas internos (D); E y F, síntomas internos en plantas inoculadas con un aislado de *Lasiodiplodia theobromae*, plantas sin embolsar (E) y plantas embolsadas (F).

muestra en la figura 12. No se observaron diferencias en los síntomas internos entre plantas embolsadas y no embolsadas, salvo en el caso de *L. theobromae* (figura 12E y 12F), aunque dicha diferencia podría ser consecuencia del escaso número de plantas inoculadas, ya que esporádicamente algunas de ellas no mostraron ningún síntoma interno (tercera planta desde la izquierda en la figura 12D). Estos síntomas están descritos en la literatura consultada (McDonald y Eskalen, 2011; Arjona-Girona y col., 2019). Los hongos inoculados se volvieron a aislar de las lesiones de las plantas al final del ensayo, cumpliendo así con los postulados de Koch.

Ensayos de inhibición en placa. Aislados de las especies identificadas como *L. theobromae*, *N. cryptoaustrale*, *N. australe*, *N. cryptoaustrale* y *N. luteum* fueron inhibidos en placa por la cepa QST 713 de *B. subtilis* (SERENADE® MAX, Bayer Crop Science) (Figura 13).



Figura 13. Inhibición del aislado 1A (*Lasiodiplodia theobromae*) por una dilución del producto SERENADE® MAX (*Bacillus subtilis* cepa QST 713, Bayer Crop Science) al 1% p/v (5 μ l por localización).

Conclusiones

En las prospecciones realizadas en Tenerife en parcelas supuestamente afectadas por hongos de la familia Botryosphaeriaceae, algo más de la mitad de las fincas presentaban daños en menos del 15% de los árboles, mientras que en el 22,7% de las explotaciones se superaba el 75%. La intensidad de

los daños era mayoritariamente leve (62,5% de los casos) y grave para un 16,7% de los encuestados. Los árboles enfermos se encontraban distribuidos de forma dispersa en el 85,7% de los casos y solo se agrupaban en focos en el 14,3%. Los agricultores o técnicos manifestaron haber tenido daños en frutos en poscosecha en un 13,6% de las encuestas, principalmente de la variedad Fuerte. El resto de encuestados no había observado daños en fruto o lo desconocía.

El síntoma más frecuentemente encontrado fue la seca de ramas, seguido de ennegrecimiento de las ramas y chancros en el tronco principal y en ramas, y en pocos casos se observaron manchas en frutos, manchas en las puntas de las hojas, y marchitez o tristeza en las hojas.

En los aislamientos de hongos, la especie más frecuentemente encontrada entre las seleccionadas para su caracterización fue *Neofusicoccum luteum*, y en menor proporción, *N. parvum*, *N. australe*, *N. cryptoaustrale*, *Lasiodiplodia theobromae*, y una especie no identificada de *Neofusicoccum* sp. No se encontró relación entre la presencia de una especie u otra de hongos y los tipos de síntomas asociados a esta enfermedad o su distribución por municipios.


Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Proyecto CAIA 2017-0001 "Optimización de los sistemas de producción de aguacate" de la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del Gobierno de Canarias. Los autores agradecen la participación de los Agentes de Extensión Agraria del Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural del Cabildo Insular de Tenerife que colaboraron en la recogida de muestras y en la realización de las encuestas a los agricultores y/o técnicos: Zoilo García Acosta (Tacoronte), Osvaldo Renz González (La Orotava), Miguel Rodríguez Serrano (Valle San Lorenzo), Tomás Suárez Encinoso y Eduardo Pérez Álvarez (Buenavista), Águeda Coello Torres (Güímar), Victoria Calzadilla Hernández (Guía de Isora); así como a Yeray Díaz González, Moneyba Parrilla González, Aquilina Linares Quintero y Eduardo Torres Luis. A todos los agricultores que participaron en la encuesta y que permitieron la recogida de muestras en sus cultivos. También queremos agradecer a Moisés Botella Guillén por la realización de los análisis para la detección de *Xylella fastidiosa* y al Servicio de Sanidad Vegetal de la Dirección General de Agricultura del Gobierno de Canarias por permitir el uso de sus instalaciones y equipos.

Bibliografía

- Alama I., Maldonado E., Rodríguez-Gálvez E., 2006. *Lasiodiplodia theobromae* affect the cultivation of Palto (*Persea americana*) under the conditions of Piura, Peru. *Universalía* 11: 4–13.
- Arjona-Girona I., Ruano-Rosa D., López-Herrera C.J., 2019. Identification, pathogenicity and distribution of the causal agents of dieback in avocado orchards in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 17: e1003. DOI: 10.5424/sjar/2019171-13561.
- Armengol J., 2015. Informe de resultados de muestras de aguacate remitidas en 2015 del Laboratorio Nacional de Referencia de Hongos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Valencia. Pp. 6.
- Auger J., Palma F., Pérez I., Esterio M., 2013. First Report of *Neofusicoccum australe* (*Botryosphaeria australis*), as a branch dieback pathogen of avocado trees in Chile. *Plant Disease, Scientific Societies* 97: 842–842. DOI: 10.1094/PDIS-10-12-0980-PDN.
- Collado-Romero M., Mercado-Blanco J., Olivares-García C., Valverde-Corredor A., Jiménez-Díaz R.M., 2006. Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology* 96: 485–495. DOI: 10.1094/PHYTO-96-0485.
- Darvas J., Kotze J., 1987. Fungi associated with pre-and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. *Phytophylactica* 19: 83–85.
- Denman S., Crous P.W., Taylor J.E., Kang J.C., Pascoe I., Wingfield M.J., 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 2000: 129–140.
- EPPO, 2019. PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. EPPO Bulletin 49: 175–227. DOI: 10.1111/epp.12575.
- Firmino A.C., Fischer I.H., Tozze Júnior H.J., Dias Rosa D., Luiz Furtado E., 2006. Identificação de espécies de *Fusicoccum* causadoras de podridão em frutos de abacate. *Summa Phytopathologica* 2217–2220. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2051>.

- García Pérez O., Perera González S., Rodríguez Pérez A., Siverio de la Rosa F., 2017. Enfermedades del aguacate causadas por especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Dirección General de Agricultura. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias, 13 pp.
- Guarnaccia V., Aiello D., Cirvilleri G., Polizzi G., Susca A., ... Perrone G., 2016. Characterisation of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado fruit in Italy. *Acta Horticulturae* 1144: 133–139. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1144.19.
- Harper S.J., Ward L.I., Clover G.R.G., 2010. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 100: 1282–1288. DOI: 10.1094/PHYTO-06-10-0168.
- Hartill W.F.T., 1991. Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 19: 297–304. DOI: 10.1080/01140671.1991.10421814.
- Hartill W.F.T., Everett K.R., 2002. Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots of 'Hass' avocado (*Persea americana*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 30: 249–260. DOI: 10.1080/01140671.2002.9514221.
- Kebede M., Belay A., 2019. Plant pathology & microbiology fungi associated with post-harvest avocado fruit rot at Jimma Town, Southwestern Ethiopia. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 0–7. DOI: 10.4172/2157-7471.1000476.
- McDonald V., Eskalen A., 2011. Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Dis* 95: 1465–1473. DOI: Doi 10.1094/Pdis-02-11-0136.
- McDonald V., Lynch S., Eskalen A., 2009. First report of *Neofusicoccum australe*, *N. luteum*, and *N. parvum* associated with avocado branch canker in California. *Plant Disease* 93: 967. DOI: 10.1094/PDIS-93-9-0967B.
- Menge J.A., Ploetz R.C., 2003. Diseases of avocado. In: *Diseases of tropical fruit crops*, Wallingford, CABI, 35–71.
- Molina-Gayosso E., Silva-Rojas H. V, García-Morales S., Ávila-Quezada G., 2011. First Report of Black Spots on Avocado Fruit Caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. *Plant Disease, Scientific Societies* 96: 287. DOI: 10.1094/PDIS-08-11-0699.

- 
- Montealegre J.R., Ramírez M., Riquelme D., Armengol J., León M., Pérez L.M., 2016. First report of *Neofusicoccum australe* in Chile causing avocado stem-end rot. *Plant Disease* 100: 2532–2532. DOI: 10.1094/PDIS-05-16-0738-PDN.
- Montero-Astúa M., Saborio-R G., Chacón-Díaz C., Garita L., Villalobos W., ... Rivera C., 2008. First report of *Xylella fastidiosa* in avocado in Costa Rica. *Plant Disease* 92: 175. DOI: Doi 10.1094/Pdis-92-1-0175c.
- Ni H.F., Liou R.F., Hung T.H., Chen R.S., Yang H.R., 2009. First report of a fruit rot disease of avocado caused by *Neofusicoccum mangiferae*. *Plant Disease, Scientific Societies* 93: 760. DOI: 10.1094/PDIS-93-7-0760B.
- Ni H. F., Chuang M., Hsu S., Lai S., Yang H., 2011. Survey of *Botryosphaeria* spp., causal agents of postharvest disease of avocado, in Taiwan. *Journal of Taiwan Agricultural Research, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture* 60: 157–166.
- Peterson R.A., 1978. Susceptibility of Fuerte avocado fruit at various stages of growth, to infection by anthracnose and stem end rot fungi. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 18: 158–160.
- Qiu F., Xu G., Zhou J., Zheng F.Q., Zheng L., ... Xie C.P., 2019. First Report of *Botryosphaeria dothidea* Causing Stem-End Rot in Avocado (*Persea americana*) in China. *Plant Disease, Scientific Societies* 104: 286. DOI: 10.1094/PDIS-07-19-1439-PDN.
- Ramírez-Gil J.G., 2018. Avocado wilt complex disease, implications and management in Colombia. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Colombia* 71: 8525–8541. DOI: 10.15446/rfna.v71n2.66465.
- Ramírez-Gil J.G., López J.H., Henao-Rojas J.C., 2020. Causes of hass avocado fruit rejection in preharvest, harvest, and packinghouse: Economic losses and associated variables. *Agronomy* 10. DOI: 10.3390/agronomy10010008.
- Schaffer B.A., Wolstenholme B.N., Whiley A.W., 2013. The avocado: botany, production and uses. (B. Schaffer, B.N. Wolstenholme and A.W. Whiley, eds.), Wallingford, CABI, 560 pp.
- Tapia L., Larach A., Riquelme N., Guajardo J., Besoain X., 2020. First report of *Neofusicoccum luteum* Causing stem-end rot disease on avocado fruits in Chile. *Plant Disease* 104: 2027–2027. DOI: 10.1094/PDIS-11-19-2299-PDN.
- Trakunyingcharoen T., Cheewangkoon R., To-anun C., 2015. Phylogenetic study of the Botryosphaeriaceae species associated with avocado and para rubber in Thailand. *Chiang Mai Journal of Science* 42: 104–116.

- Twizeyimana M., Forster H., McDonald V., Wang D.H., Adaskaveg J.E., Eskalen A., 2013. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease* 97: 1580–1584. DOI: 10.1094/PDIS-03-13-0230-RE.
- Valencia A.L., Gil P.M., Latorre B.A., Rosales I.M., 2019. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species obtained from avocado trees with branch canker and dieback and from avocado fruit with stem end rot in Chile. *Plant Disease* 103: 996–1005. DOI: 10.1094/PDIS-07-18-1131-RE.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322.
- Zea-Bonilla T., González-Sánchez M.A., Martín-Sánchez P.M., Pérez-Jiménez R.M., 2007. Avocado dieback caused by *Neofusicoccum parvum* in the Andalucía region, Spain. *Plant Disease* 91: 1052–1052. DOI: 10.1094/PDIS-91-8-1052B.





Estudio de parcelas de
AGUACATE
afectadas por hongos
de la familia
Botryosphaeriaceae
en la isla de Tenerife