



INFORME BREVE

Primera descripción de *Sclerotium coffeicola* en caoba africana en México



Omar A. Pérez-Vera^{a,*}, David Cibrián-Tovar^a y Richard T-Hanlin^b

^a División de Ciencias Forestales, Departamento de Ecología y Silvicultura, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, México

^b University of Georgia, Museum of Natural History, Bogart, Georgia, EE. UU.

Recibido el 13 de octubre de 2016; aceptado el 5 de junio de 2017

Disponible en Internet el 18 de octubre de 2017

PALABRAS CLAVE

Esclerocios;
Khaya senegalensis;
Sclerotium
coffeicola;
Plantación forestal
comercial

KEYWORDS

Sclerotia;
Khaya senegalensis;
Sclerotium
coffeicola;
Commercial forest
plantation

Resumen Una enfermedad foliar fue detectada en la plantación comercial de *Khaya senegalensis* con 3 años de edad, en la localidad de Huimanguillo (Tabasco, México). Mediante la caracterización morfológica y molecular, y por el cumplimiento de los postulados de Koch, se determinó que el agente causal corresponde al hongo *Sclerotium coffeicola*. Este es el primer reporte de *S. coffeicola* causando mancha foliar en caoba africana en México.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

First description of *Sclerotium coffeicola* on African mahogany in Mexico

Abstract A foliar disease was detected in the commercial plantation of *Khaya senegalensis* with three years of age in Huimanguillo, Tabasco, Mexico. Through the morphological and molecular characterization and the compliance of the Koch's postulates, it was concluded that the causal agent corresponds to the fungus *Sclerotium coffeicola*. This is the first report of *S. coffeicola* causing leaf spot on African mahogany in Mexico.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: olejandrovers@gmail.com
(O.A. Pérez-Vera).

La especie *Khaya senegalensis*, cuyo nombre vulgar es caoba africana, se utiliza en el trópico mexicano como una alternativa al uso de la caoba mexicana (*Swietenia macrophylla*) y el cedro (*Cedrela odorata*), para evitar el daño causado por el barrenador de brotes (*Hypsipyla grandella*), en los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo,

Tabasco, Veracruz y Yucatán³. En 2010 se estableció una plantación de caoba africana en Huimanguillo, Tabasco, ubicada a los 17°45'20,7" N/93°39'43,10" W, a 20 m de altitud, sujeta a un clima cálido húmedo con lluvias todo el año (Af).

En 2013 se observaron manchas foliares con un diámetro de 12 a 30 mm, de color café rojizo, con anillos concéntricos bien definidos y bordes de color café oscuro, en hojas jóvenes y adultas de la caoba africana (fig. 1A). En el envés de la hoja crecieron abanicos miceliales de color blanco; en las hojas caídas se formaron paquetes columnares de hifas (espículas) de color blanco, de 2 mm de longitud (fig. 1B); las lesiones foliares de mayor edad se tornaron plateadas en el centro. En la época de lluvias se desarrollaron cordones miceliales (rizomorfos) sobre el envés de las hojas, que a su vez infectaron hojas sanas e indujeron nuevas infecciones. Estas hojas infectadas y necrosadas se desprendieron con facilidad y causaron una defoliación en la caoba africana.

El hongo se aisló a partir de secciones de tejido de hoja de 4 mm² de la zona de avance de la necrosis. Estas secciones se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, se lavaron con agua destilada estéril, se secaron y colocaron en papa dextrosa agar (PDA), y se incubaron a 26 °C durante 25 días para permitir el crecimiento micelial y la aparición y maduración de los esclerocios. Pasado este tiempo, se seleccionó un aislamiento, que se procedió a purificar por punta de hifa en agar agua y crecimiento en PDA. Dicho aislamiento fúngico se identificó a nivel especie como *Sclerotium coffeicola* (SC1) sobre la base de sus características morfológicas y culturales⁶⁻⁸.

S. coffeicola creció radialmente hasta alcanzar 80 mm de diámetro a los 6 días, con un micelio de color blanco, poco ramificado, con hifas septadas (fig. 1C). Se midieron 25 esclerocios y los datos obtenidos de la muestra fueron analizados a través de la media y la desviación estándar (DE) con el paquete estadístico SAS⁹. Los esclerocios de *S. coffeicola* son de forma esférica, de apariencia algodonosa y con un diámetro medio de 1,99 mm (DE a los 4 días: 0,179 mm) (fig. 1D). A los 10 a 15 días, los esclerocios tuvieron un diámetro promedio de 4,43 mm (DE: 0,749 mm), su color cambió del amarillo cremoso al anaranjado y se observaron gotitas de un líquido transparente sobre áreas circulares del esclerocio, que desaparecieron al madurar (fig. 1E). Finalmente, a los 21 días, el esclerocio fue de forma globosa a subglobosa y alcanzó un diámetro de 5,9 mm (DES: 0,209 mm).

En PDA se formaron de 11 a 25 esclerocios aproximadamente (fig. 1C). El hongo en este estudio se depositó en el Herbario Micológico de Fitopatología del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, estado de México, con número de registro CP-HS037.

Para confirmar la identificación del hongo se amplificó la región espaciadora interna transcrita (ITS) del ARNr. El ADN de *S. coffeicola* con 10 días de crecimiento en medio líquido de extracto de malta se extrajo usando el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación fue por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la combinación de los iniciadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3')¹⁰. La PCR se realizó en un termociclador Multigene Gradient (modelo TC9600-9, New Jersey, EE. UU.) con el siguiente programa

térmico: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 35 ciclos a 95 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, y 1 ciclo a 72 °C, 8 min. El producto amplificado se corrió en un gel de agarosa al 1% (Promega, EE. UU.) y la banda se observó en un sistema de fotodocumentación (Gel Logic 200, Kodak, Rochester, EE. UU.). Finalmente el producto se purificó con el kit Wizard SV Gel & PCR Clean Up System (Promega, EE. UU.) y se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo scientific, Delaware, EE. UU.).

El fragmento amplificado por PCR con los oligos ITS4 e ITS5 se secuenció en ambas direcciones en un secuenciador automatizado 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, EE. UU.) en la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur), y la secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con las reportadas en la base de datos del banco de genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nih.gov) por medio del programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El fragmento amplificado de la región ITS del ARNr fue de un tamaño de 506 pb y el resultado del Blastn confirmó que el aislamiento SC1 (número de acceso GenBank KP176676) correspondía a *S. coffeicola* y mostró un 99% de identidad con la secuencia AB075319 depositada en la base de datos del GenBank.

La patogenicidad de *S. coffeicola* se verificó en hojas sanas en 2 plantas de caoba africana de 16 meses de edad y un testigo sin inoculación. Se seleccionaron 10 hojas por planta, que se desinfectaron superficialmente con alcohol al 70%, se lavaron con agua destilada estéril y se secaron posteriormente con papel estéril. En la superficie del haz de cada hoja se colocó un esclerocio joven (4 días) de 1 a 2 mm de diámetro. Todos los árboles inoculados se cubrieron con bolsas de polipapel para mantener la humedad. Después de 72 h, las bolsas se retiraron y las plantas se mantuvieron a 26 ± 1 °C y 90 a 95% de humedad relativa durante 20 días en el invernadero. En todas las hojas inoculadas se observaron pequeñas lesiones necróticas, con un diámetro promedio de 1,99 mm y una DE de 0,179 mm a los 3 días. Dichas lesiones crecieron hasta transformarse en manchas foliares con un diámetro promedio de 7,95 mm y una DE de 0,285 mm a los 6 días, y presentaron un color café claro en el centro y un borde más oscuro. En el 100% de las hojas inoculadas con el hongo se observó en el envés el desarrollo de abanicos miceliales de color blanco que, conforme creció, necrosó el tejido de la hoja. Las hojas infectadas comenzaron a desprenderse de la planta a los 5 días; en el área necrosada aparecieron anillos concéntricos; hubo formación de esclerocios de color blanco de 2 mm de diámetro a los 14 días y no hubo formación de espículas en el envés de las hojas. El hongo se reaisló del tejido infectado y se completaron así los postulados de Koch.

El género *Sclerotium* es un fitopatógeno habitante del suelo con una amplia distribución en regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo, que afecta a cultivos agrícolas, malezas y árboles forestales¹. En Brasil, se ha reportado la presencia de *S. coffeicola* causando la mancha anillada en el café (*Coffea*), la caoba (*Swietenia macrophylla*), la guanábana (*Annona muricata*), la jaca (*Artocarpus heterophyllus*) y el mango (*Mangifera indica*)^{2,7,8}. Además, se ha informado la presencia de este hongo en Venezuela,



Figura 1 A) Mancha foliar causada por *Sclerotium coffeicola* en caoba africana. B) Espículas de color blanco en el envés de la hoja. C) Colonia con 20 días de crecimiento en papa-dextrosa-agar (PDA). D) Esclerocios jóvenes de color blanco con exudado líquido transparente. E) Esclerocios maduros de color naranja.

donde causó lesiones foliares en *Vismia* sp. y *Coffea canephora* var. *robusta*⁴.

En México, únicamente se ha documentado la presencia de *S. cepivorum* afectando al género *Allium*, y la de *Sclerotium rolfsii*, organismo que ataca alrededor del mundo a unos 250 géneros de plantas, entre las que se encuentran reportadas en México *Allium cepa*, *Apium graveolens*, *Arachis hypogaea*, *Capsicum annuum*, *Cucurbita pepo*, *Glycine max*, *Lens culinaris*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Parthenium hysterophorus*, *Petroselinum crispum*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Raphanus sativus* y *Taraxacum officinale*^{4,5}. Este es el primer reporte de *S. coffeicola* como agente causal de manchas foliares en una plantación de caoba africana en México.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Fondo Sectorial para la Investigación y Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, CONAFOR-CONACYT 148206.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Aycock R. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. NC Agric Exp Sta Tech Bull. 1966:202.
2. Bastos C. Mancha foliar em mogno (*Swietenia macrophylla*) causada por *Sclerotium coffeicolum* Stahel. Agrotrópica. 1998;10:41-2.
3. Cibrián T, Méndez M, Campos B, Yates III H, Flores L. Insectos forestales de México. Universidad Autónoma Chapingo. SFFS-SARH, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCA Forest

- Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO., Chapingo, México. 1995, p. 112-5.
4. Farr D, Bills G, Chamuris G, Rossman A. Fungi on plants and plant products in the United States. Minnesota: APS Press; 1989.
 5. Flores M, Montes B, Jiménez P, Nava J. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. Crop Prot. 2006;25:195–201.
 6. Hanlin R, Tortolero O. Morphology of *Sclerotium coffeicola*, a tropical foliar pathogen. Can J Bot. 1989;67:1852–60.
 7. Lourd M, Alves M. A mancha zonada da gravioleira (*Annona muricata*) causada por *Sclerotium coffeicolum* nova doeng na região de Manaus. Fitopatol Bras. 1986;11:1015–7.
 8. Punja Z, Damiani A. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. Mycologia. 1996;88:694–706.
 9. SAS, Statistical Analysis System. Versión 9.1.3. SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU., 2003.
 10. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, White T, editores. PCR protocols. A guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press; 1990. p. 315–22.