

## Detección de *Phoma exigua* var. *heteromorpha* en viveros de adelfa (*Nerium oleander* L.) en España

L. A. ÁLVAREZ, J. ARMENGOL, A. PÉREZ-SIERRA, M. LEÓN, P. ABAD-CAMPOS, A. VICENT, C. BELTRÁN, J. GARCÍA-JIMÉNEZ

La adelfa (*Nerium oleander* L.) es un arbusto que se cultiva como especie ornamental. A finales del otoño de 2003, una nueva afección fue detectada causando daños severos en viveros de adelfa en la Comunidad Valenciana y Región de Murcia. Los síntomas observados fueron manchas foliares concéntricas, ovoides o elipsoides, defoliación en diferentes grados y necrosis de brotes. Dada la importancia del problema, el objetivo fue determinar la etiología de esta enfermedad. Se realizaron aislamientos en medio de cultivo PDAS y las colonias obtenidas se hicieron crecer en medio PCA. Los cultivos formaron picnidios a los 8 días de la siembra que fueron esféricos, a veces ostiolados, de unas 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las picnidiosporas eran cilíndricas, unicelulares y, en menor frecuencia, bicelulares, de 6,2 x 2,8  $\mu\text{m}$  de media. La siembra de los cultivos en PDA+NaOH dio positivo en la detección del antibiótico E al virar el medio a un color verdoso que evoluciona posteriormente a rojo-marrón. La secuenciación de la región ITS del ADNr permitió la identificación de los aislados como *Phoma exigua* Desmaz. Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron plantas de adelfa cv. Splendens Gigantium de 9 meses de edad. Se usaron dos metodologías de inoculación: mediante la pulverización de una suspensión de  $1,5 \times 10^5$  conidias por mililitro sobre el follaje, y mediante la inoculación por herida de un fragmento de agar+micelio de 0,5 cm de diámetro del hongo sobre los brotes de las plantas. Las plantas fueron embolsadas por 3 días y los síntomas de la enfermedad se manifestaron a partir de los 5 días de la inoculación. El hongo fue reaislado de las lesiones completando de esta forma los postulados de Koch-Pasteur. Por las características morfológicas y culturales, y la especificidad al hospedante, los cultivos se identificaron finalmente como *P. exigua* var. *heteromorpha* (Sch. et Sacc.) Noordeloos et Boerema.

L. A. ÁLVAREZ, J. ARMENGOL, A. PÉREZ-SIERRA, M. LEÓN, P. ABAD-CAMPOS, A. VICENT, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.  
C. BELTRÁN. Sanidad Vegetal, La Alberca, C/ Mayor s/n, 30150-Murcia.

**Palabras clave:** *Nerium oleander*, *Phoma exigua*, ornamentales, defoliación, mancha foliar.

### INTRODUCCIÓN

La adelfa (*Nerium oleander* L.) es un arbusto leñoso y perenne nativo de la zona Mediterránea que se cultiva en todo el mundo como planta ornamental. Produce inflorescencias muy vistosas en forma de corimbos terminales y se estima que hay alrededor de 400 cultivares con una amplia

variedad de colores (LÓPEZ y SÁNCHEZ DE LORENZO, 2001). Esta planta se usa ampliamente en regiones templadas y subtropicales donde se cultiva como ornamental al aire libre en parques y jardines, a lo largo de paseos marítimos, autopistas, y como barreras cortavientos dado su follaje perenne y su vistosa floración (LUISI e MANICONE, 1992). El amplio uso de esta especie radica en su



Figura 1. Manchas necróticas concéntricas en hojas.



Figura 2. Manchas foliares y avance de las lesiones por la nervadura.

adaptación a diversos tipos de medio, su tolerancia a la sequía, suelos salinos y contaminación ambiental, siendo una de las especies de propagación más importante en los viveros del Mediterráneo español.

A finales del otoño de 2003, una nueva afección atacó severamente viveros productores de adelfa en la Comunidad Valenciana y Región de Murcia. Los síntomas observados en plantas afectadas en vivero fueron grandes manchas concéntricas, coalescentes, de forma ovoide o elipsoide (Figuras 1 y 2). Sobre tallos, ramas y brotes se formaban pequeñas manchas necróticas que evolucionaban a extensas lesiones provocando un decaimiento progresivo en estos órganos y finalmente su muerte (Figura 3). A partir de estas áreas necrosadas se formaban a los

pocos días pequeños cuerpos fructíferos de color oscuro y agrupados (Figura 4). La afección descrita alcanzaba rápidamente grados de severidad muy altos, caracterizados por una fuerte defoliación y finalmente la muerte de las plantas (Figura 5).

Dado lo inusual de la sintomatología, la amplia incidencia de la enfermedad y la importancia del cultivo, el objetivo del presente estudio fue determinar su etiología.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento del patógeno

Se seleccionaron hojas y tallos de plantas afectadas que fueron lavados con agua del grifo y esterilizados superficialmente durante 30 segundos en una solución de hipoclori-



Figura 3. Necrosis de ramas y brotes.



Figura 4. Coloraciones oscuras en tallos causadas por la formación de cuerpos fructíferos.

to sódico al 2 %. Fragmentos de 3 mm del frente de avance de las lesiones se transfirieron a medio de cultivo Patata Dextrosa Agar con 0,5 g litro<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina (PDAS) y fueron incubados en oscuridad a 25 °C durante 5 días. Al cabo de ese tiempo las colonias obtenidas se hicieron crecer en medio de cultivo Potato Carrot Agar (PCA) para su identificación.

**Caracterización morfológica y cultural de los aislados**

Se seleccionaron seis aislados procedentes de las provincias de Murcia y Valencia (Cuadro 1). Los cultivos fueron mantenidos en tubos con OMA (Oat Meal Agar) e incubados a 7°C para ser utilizados posteriormente en el estudio de las características morfológicas y culturales, y para los ensayos de patogenicidad.

Para el estudio de las características morfológicas y culturales de los aislados, éstos fueron cultivados en medio de cultivo PCA e incubados con fotoperíodo de 12 horas de oscuridad y 12 de luz para estimular la esporulación. La intensidad de luz fue de 689 lux proveniente de fluorescentes de luz blanca fría. Una vez obtenidas las estructuras fúngicas se hicieron micropreparaciones teñidas con lactofucsina para su observación bajo el microscopio óptico.

Asimismo, los aislados se hicieron crecer en placas de medio de cultivo PDA. Después de 8 días de incubación en oscuridad a 25 °C

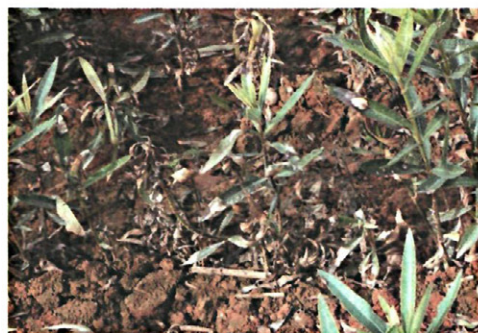


Figura 5. Detalle de defoliación y mortandad de plantas en viveros.

se les aplicaron unas gotas de NaOH 1N y se observó su reacción. Paralelamente, se preparó medio de cultivo PDA al que se le agregaron unas gotas de NaOH 1N en el momento del volcado en las placas. En este medio se sembraron los aislados y se incubaron en oscuridad a 25°C durante 8 días observándose en este momento el cambio de coloración del medio de cultivo comparándolo con el aspecto que presentaban en medio PDA sin NaOH.

**Extracción de DNA y secuenciación**

Se recogió micelio de los aislados Pho 3 y Pho 6 crecidos en PDA para la extracción del DNA. El micelio fue triturado en un mortero con nitrógeno líquido y el DNA se extrajo utilizando el Kit comercial E.Z.N.A Plant

Cuadro 1. Procedencia y características de los aislados de *P. exigua* var. *heteromorpha*.

Aislamiento	Procedencia	Diámetro de picnidios (µm)		Longitud de conidios (µm)		Anchura de conidios (µm)	
		Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango
Pho 1	Valencia	192	100 - 263	8,3	7,9 - 8,5	2,9	2,2 - 3,0
Pho 2	Valencia	198	145 - 325	9,1	8,6 - 9,6	2,6	2,4 - 3,0
Pho 3	Valencia	164	108 - 270	7,8	7,6 - 7,9	2,6	2,2 - 2,8
Pho 4	Valencia	201	163 - 245	9	8,3 - 9,5	2,9	2,6 - 3,2
Pho 5	Murcia	237	120 - 350	8,4	8,0 - 9,1	2,7	2,5 - 2,9
Pho 6	Murcia	202	160 - 210	6,4	5,5 - 7,6	2,4	2,2 - 2,5
<i>P. exigua</i> (Sutton, 1980)		Variable		5,5 - 10		2,5 - 3,5	

Miniprep Kit (Omega Bio-tek, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua Milli-Q estéril.

Se utilizaron aproximadamente 50 ng de DNA de cada aislado como molde para amplificar por PCR el gen que codifica para el RNA 5,8S y las dos regiones intergénicas ITS. Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos universales ITS4 e ITS5 (WHITE *et al.*, 1990).

La amplificación del DNA se llevó a cabo en una reacción de 25  $\mu$ l de volumen que contenía 2.5  $\mu$ l de tampón 10 x PCR, 0,5  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de la pareja de iniciadores (ITS4 e ITS5) y 2U de DNA polimerasa (Netzyme, Molecular Netline Bioproducts, N.E.E.D, SL, Valencia, España). La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (MJ Research Minicycler) con un ciclo de 94 °C durante 3 min. seguido de 35 ciclos de amplificación con los siguientes parámetros: 30 seg de desnaturalización a 94 °C, 30 seg de hibridación a 55°C y 1 min a 72°C (10 min en el último ciclo) para la extensión de los iniciadores.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TBE (1x) con una alícuota de 5  $\mu$ l de las muestras y se visualizó una única banda de DNA de casi 600 pb tras tinción con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) e iluminación UV.

El producto de PCR se purificó siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit High Pure PCR Product Purification (Roche) y se llevó a cabo la secuenciación en un secuenciador automático (Applied Biosystems, Modelo 373 A). Se utilizaron también los oligonucleótidos ITS4 e ITS5 para la secuenciación de ambas cadenas. El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa DNAMAN versión 4.03 (Lynnon BioSoft).

### Ensayo de patogenicidad

Se llevó a cabo con los aislados Pho 2, Pho 5 y Pho 6. Cada una de las cepas se hizo crecer en cinco placas de medio PCA con fotoperíodo de 12 horas de luz/oscuridad

durante 15 días. Se utilizaron plantas de 9 meses de edad de la variedad "Splendens Gigantium" crecidas en macetas de 15 cm de diámetro que se sometieron a dos metodologías de inoculación:

**1. Inoculación por heridas.** Mediante un bisturí estéril se realizaron dos cortes transversales y uno horizontal de 5 x 5 mm a modo de ventana sobre ramas de 16 - 18 mm de diámetro. Se separó la corteza y en su interior se colocó un disco de agar + micelio del patógeno de 5 mm de diámetro. La herida se cubrió con un algodón húmedo, se sujetó con parafilm y finalmente fue envuelta con papel de aluminio. Se inocularon 5 plantas por tratamiento y para los controles se utilizaron discos de PCA estéril.

**2. Aplicación foliar.** Para cada aislado, las placas con el medio y las colonias fúngicas se trituraron en una batidora conteniendo 100 cc de agua estéril. La suspensión resultante fue filtrada a través de un tamiz de 50  $\mu$ m de diámetro, recogiendo-se una suspensión de conidios cuya concentración se determinó mediante el uso de un hematocitómetro ajustándose posteriormente a  $1,5 \times 10^5$  conidios mL<sup>-1</sup>.

Esta suspensión se pulverizó sobre el follaje utilizando un pulverizador manual Wagner W 90 (Barcelona - España). En este ensayo se utilizaron 5 plantas por aislado con un gasto de 20 cc de suspensión por planta. El grupo de plantas control fue inoculado con agua destilada estéril.

Todas las plantas inoculadas fueron cubiertas con bolsas de plástico transparente con pequeños agujeros durante 3 días. El ensayo se llevó a cabo en invernadero a  $25 \pm 3$  °C.

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica y cultural del patógeno

En PDA los cultivos presentaron un micelio de color grisáceo, aspecto algodonoso, compacto y de crecimiento lento, lle-



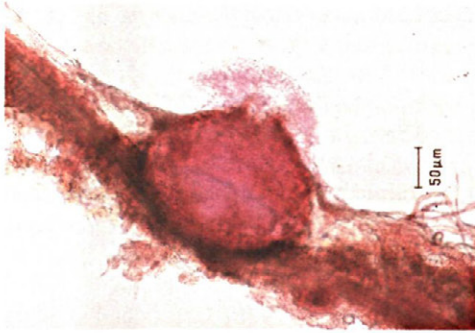


Figura 6. Picnidio sobre tejido senescente.

gando a ocupar la totalidad de la placa a los 15 días de la siembra. Sobre PCA, los aislados cubrieron totalmente la placa a los 8 días de la siembra; las colonias presentaban un color verde-oliva con micelio ralo y el reverso de igual coloración. Los aislados produjeron abundantes picnidios a los 5 - 6 días de la siembra sobre PCA, similares a los encontrados en las lesiones de hojas y ramas de las plantas enfermas analizadas. Los picnidios eran glabros, de forma esférica, globosa o subglobosa, a veces ostiolados, solitarios o en grupos, de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las picnidiosporas eran cilíndricas, rectas o ligeramente curvadas en uno de sus ápices, hialinas, uni-

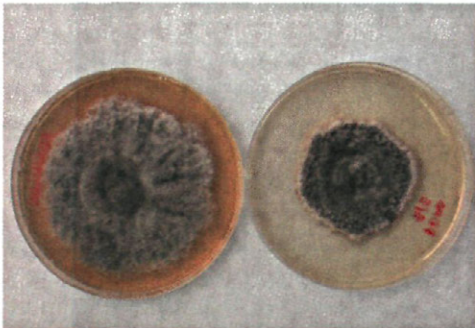


Figura 7. Reacción de los aislados frente a la aplicación de NaOH. a) Derecha: Placa Testigo. b) Izquierda: Viraje de color (reacción positiva al antibiótico E).

celulares, con un tamaño promedio de 6,2 x 2,8  $\mu\text{m}$  (Figura 6).

En la prueba de reacción de los cultivos en PDA tras la adición de unas gotas de una solución de NaOH 1N, se obtuvo un viraje a un color verdoso del medio que se observó a partir de los 10 minutos después de la aplicación del producto. La siembra de los aislados en PDA + NaOH 1N permitió también observar un color verdoso del PDA al inicio del crecimiento de las colonias que cambió a un color rojizo conforme se producía el crecimiento de los aislados (Figura 7).

Las características morfológicas, culturales y fisiológicas de los aislados estudiados corresponden a las descritas para *Phoma exigua* Desmaz. (SUTTON, 1980).

#### Extracción de DNA y secuenciación

La comparación de la secuencia de bases de los aislados Pho 3 y Pho 6 (GenBank Accesion N° AY899262) fue idéntica a las secuencias contenidas en la base de datos del GenBank de cepas bien caracterizadas de *P. exigua* (ABELN *et al.* 2002).

#### Ensayo de patogenicidad

Las plantas de adelfa inoculadas mediante pulverización foliar mostraron los primeros síntomas de la enfermedad a los 5 días después de la inoculación en forma de defoliación y pequeñas necrosis circulares sobre



Figura 8. Síntomas en hojas inoculadas mediante pulverización foliar a los 7 días de la inoculación.



Figura 9. Síntomas en ramas y brotes en la prueba de inoculación por heridas a los 8 días de la inoculación (Izquierda). Planta control (Derecha).

las hojas. A los 7 días de la inoculación se observaron las características manchas concéntricas sobre las hojas y una fuerte defoliación (Figura 8).

En las plantas inoculadas mediante heridas, los primeros síntomas se observaron también a los 5 días de la inoculación, presentando el decaimiento de las ramas inoculadas. Los resultados de este ensayo fueron más claros a los 10 días de la inoculación observándose la formación de extensas lesiones a partir del punto de inoculación y la muerte de las ramas (Figura 9).

De las plantas sintomáticas, tanto de hojas como de ramas, se reisoló el patógeno completándose de este modo los postulados de Koch.

## DISCUSION

Los aislados fueron identificados como *Phoma exigua* sobre la base del análisis de sus características culturales, fisiológicas y morfológicas (SUTTON, 1980). Estos resultados coincidieron con el análisis de la región ITS del ADNr de los aislados. El análisis de las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 no permite la diferenciación entre las diferentes variedades de *P. exigua*, por lo que es

necesario hacer observaciones de sus características fenotípicas y especificidad al hospedante (ABELN *et al.*, 2002).

La prueba de reacción de los cultivos con la adición de NaOH mostró una reacción positiva al cambio de color, lo que indica que el hongo produce una sustancia llamada metabolito E formado por el proceso de oxidación con el álcali. El cambio de color puede aparecer en unos minutos o varias horas (BOEREMA, 1976). LOGAN and O'NEILL (1970), demostraron que el metabolito E posee propiedades bactericidas y fungicidas, por lo que lo llamaron antibiótico E, siendo éste producido por diversas especies de *Phoma* (SUTTON, 1980).

Las pruebas de patogenicidad fueron positivas en la reproducción de los síntomas observados en las plantas en los viveros con las dos metodologías de inoculación. Todos los aislados resultaron patógenos a *N. oleander*.

Este patógeno fue descrito como *Phoma heteromorpha* (Sch. et Sacc.) en 1884, posteriormente fue reclasificado como *Phoma oleandri* Delacr. (1905), y como *Ascochyta heteromorpha* (Sch. et Sacc.) Curzi (1933). KEIM (1979) se refirió a este hongo como *Phoma exigua*. Finalmente NOORDELOOS y BOEREMA (1987) propusieron, sobre la base de la especificidad al hospedante y su extrema variabilidad morfológica, una nueva combinación, *P. exigua* var. *heteromorpha* (Schulzer & Sacc.) Noordeloos *et* Boerema que es la nomenclatura actualmente utilizada (LUISI e MANICONE, 1992, VAN DER AA *et al.*, 2000 y ABELN *et al.*, 2002) y la que adoptamos en este trabajo.

*P. exigua* var. *heteromorpha* ha sido descrita anteriormente ocasionando graves pérdidas en adelfa en otros países tales como Francia (MERCIER *et al.*, 1979), Estados Unidos (KEIM, 1979), Holanda (NOORDELOOS *et* BOEREMA, 1987) e Italia (LUISI e MANICONE, 1992). Este trabajo es la primera cita de *P. exigua* var. *heteromorpha* en adelfa en España.

## ABSTRACT

ÁLVAREZ L. A., J. ARMENGOL, A. PÉREZ-SIERRA, M. LEÓN, P. ABAD-CAMPOS, A. VICENT, C. BELTRÁN, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. 2005. Isolation of *Phoma exigua* var. *heteromorpha* in nurseries of oleander plants (*Nerium oleander*) in Spain. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 417-423.

Oleander (*Nerium oleander*) is an ornamental shrub commonly used in Mediterranean gardens. At the end of 2003 a new disease was detected in oleander nurseries in Valencia and Murcia (eastern Spain). Affected plants showed ovoid or ellipsoid necrotic leaf spots, resulting in severe blight and defoliation. Due to the economic importance of this disease, the aim was to determine its etiology. Isolations from affected areas were made onto potato dextrose agar supplemented with 0.5 g liter<sup>-1</sup> of streptomycin sulfate (PDAS) and later transferred to potato carrot agar (PCA). After 8 days of incubation abundant pycnidia (200 µm in diam) developed superficially or immersed into the culture medium. Conidia were hyaline, cylindrical, one cell and, occasionally, 1 septate (6.2 x 2.8 µm). The addition of a drop of concentrated NaOH to the cultures gave a blue-green pigmentation to the agar changing to brown-red. The fungus was identified as *Phoma exigua* Desmaz. This was also confirmed by sequencing the ITS region of the ribosomal rDNA of the isolates. Pathogenicity tests were conducted on nine-month-old oleander plants cv. Splendens Gigantium. Two methods of inoculation were used. Leaves were spray inoculated with an aqueous suspension (1.5 x 10<sup>5</sup> conidia per ml) or, a 5 mm diameter agar disc was inserted in a stem wound made with a sterile scalpel and sealed with parafilm. Controls were respectively inoculated with sterile distilled water or sterile PCA discs. After inoculation, all plants were covered separately with plastic bags for 72 h to maintain high humidity. Symptoms appeared 5 days after inoculation. The fungus was reisolated from the stems and leaves of all inoculated plants, completing Koch's postulates. The fungus was identified as *P. exigua* var. *heteromorpha* (Sch. et Sacc.) Noordeloos et Boerema according to host specificity, morphology, cultural and molecular characterization.

**Key words:** *Nerium oleander*, *Phoma exigua*, ornamental shrub, defoliation, leaf spot.

## REFERENCIAS

- ABELN, E.C.A., ANNELEIN, M.S., DE GRUYTER, J., and VAN DER AA, H.A. 2002. Genetic differentiation of *Phoma* varieties by means of AFLP fingerprints. *Mycological Research*, **106**: 419-427.
- BOEREMA, G.H. 1976. The *Phoma* species studied in culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **67**: 289-319.
- KEIM, R. 1979. Pruning wound dieback of Oleander. *Plant. Dis. Repr.*, **63**: 499-501.
- LOGAN, C. and O'NEILL, R. 1970. Production of an antibiotic by *Phoma exigua*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **55**: 67-75.
- LÓPEZ, A., y SÁNCHEZ DE LORENZO, J.M. 2001. Árboles en España. Segunda edición. Mundi-Prensa libros S.A. 654 p.
- LUISI, N. e MANICONE, R.P. 1992. Gravi attacchi di *Phoma exigua* var. *heteromorpha* su oleandro in vivaio. *Petria*, **2**: 107-118.
- MERCIER, S. et MONTREAL, H. 1979. Le dépérissement du laurier-rose. *Horticultura Française*, **86**: 9-14.
- NOORDELOOS, M.E. et BOEREMA, G.H. 1987. Veroorzakers van bladvlekken, bladnecroses en scheutinsterving bij oleander (*Nerium oleander*). In: Jaarboek plantenziektenkundige dienst, Wageningen, 108-109.
- SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. 696 p.
- VAN DER AA, H.A., BOEREMA, H.G., and DE GRUYTER, J. 2000. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) VI – 1. *Persoonia* **17**:435-456.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for Phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White TJ (eds). PCR protocols. A guide to methods and applications (pp 315-322) Academic Press. San Diego.

(Recepción: 9 febrero 2005)  
(Aceptación: 21 marzo 2005)