

NUEVOS REGISTROS DE HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A ENFERMEDADES POSTCOSECHA EN RAMBUTÁN (*Nephelium lappaceum* L.)

NEW RECORDS OF FUNGAL ENDOPHYTES ASSOCIATED TO DISEASES POSTHARVEST IN RAMBUTAN (*Nephelium lappaceum* L.)

Marianguadalupe Hernández-Arenas^{1*}, Cristian Nava-Díaz², Daniel Nieto-Angel²,
Daniel Teliz-Ortiz², María Teresa Martínez-Damián³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Zacatepec, Apartado postal 12, Carr. Zacatepec-Galeana, km. 0.5, 62780, Zacatepec, Morelos, México. Tel. 01 800 088 2222 ext. 86611. Correo-e: hernandez.marian@inifap.gob.mx.

²Fitopatología y ³Entomología y Acarología. Instituto de Fitosanidad. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Carr. México-Texcoco, km. 36.5, 56230, Montecillo, Estado de México, México. Correo-e: cnava@colpos.mx, dnieta@colpos.mx, dteliz@colpos.mx

³Fitotecnía. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. México- Texcoco, km 38.5, CP 56230, Chapingo, Estado de México, México. Correo-e: teremd@gmail.com

*Autor para correspondencia.

RESUMEN

El rambután (*Nephelium lappaceum* L.) es un frutal tropical de alto valor económico afectado por enfermedades en postcosecha. Para identificar el agente causal de enfermedades en postcosecha de frutos provenientes de Chiapas, México, se colectaron inflorescencias y frutos aparentemente sanos durante 2007 y 2008. Las inflorescencias fueron separadas en flores y pedúnculos; se lavaron con hipoclorito de sodio 2% y se colocaron en papa dextrosa agar. Secciones de pericarpio de frutos con presencia de manchas oscuras, fueron

cortadas, lavadas y sembradas en PDA. Se obtuvieron cultivos monospóricos de los hongos obtenidos y se realizaron los postulados de Koch con frutos maduros. Con base en las características morfológicas, se identificó a *Pestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaert y *Lasiodiplodia theobromae*, con una incidencia de 56 y 37 %. La confirmación taxonómica se realizó mediante la amplificación de las regiones intergénicas ITS1 e ITS2. Los productos de PCR fueron secuenciados con el kit Wizard (Promega®) y se compararon en el GenBank obteniendo una semejanza del 99% en ambos casos. A partir de la identificación morfológica y molecular se

registra por primera vez para México, como agentes causales de la pudrición de frutos en postcosecha de rambután, a los hongos *Lasiodiplodia theobromae* y *Pestalotiopsis theae*.

Palabras clave: *Pestalotiopsis theae*, *Lasiodiplodia theobromae*, patógenos, endófitos, caracterización molecular.

ABSTRACT

The rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) is a tropical fruit of high economic value affected by post-harvest diseases. To identify the causal agent of post-harvest diseases of fruits from Chiapas, Mexico, inflorescences and apparently healthy fruits were collected during 2007 and 2008. The inflorescences were separated in flowers and peduncles; washed with 2% sodium hypochlorite and placed on potato dextrose agar. Sections of fruit pericarp with dark spots were cut, washed and planted in PDA. Monosporic cultures were obtained from the fungi growed and the Koch postulates were performed with mature fruits. Based on the morphological characteristics, *Pestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaert and *Lasiodiplodia theobromae* were identified with an incidence of 56 and 37%. Taxonomic confirmation was performed by amplification of the ITS1 and ITS2 intergenic regions. The PCR products were sequenced with the Wizard kit (Promega®) and compared in the GenBank obtaining a similarity of 99% in both cases. From the morphological and molecular identification, the fungi *Lasiodiplodia theobromae* and *Pestalotiopsis theae* are registered for the first time for Mexico, as causal agents of rambutan post-harvest fruit rot.

Key words: *Pestalotiopsis theae*, *Lasiodiplodia theobromae*, pathogens, endophytes, molecular characterization.

INTRODUCCIÓN

El rambután (*Nephelium lappaceum* L.) es un frutal tropical (Familia: Sapindaceae) nativo de Malasia e Indonesia

y ampliamente cultivado en la mayoría de los países asiáticos. Tailandia es el principal productor y exportador de este fruto (Farungsang et al., 1992), sin embargo, también es común en Australia, Sur y Centroamérica, el Caribe, India, Sri Lanka, Florida y Hawaii (McQuate et al., 2000).

En México, el rambután fue introducido en la década de 1950, sin embargo, aún es poco conocido, a excepción de Chiapas, donde en el 2004 se reportaron más de 200 hectáreas de plantaciones comerciales con este fruto (Pérez y Pholan, 2004).

La característica más atractiva y distintiva del rambután es el color rojo o amarillo brillante del pericarpio, presencia de tricomas de uno a tres centímetros de largo y un translúcido, dulce y jugoso arilo (Landrigan et al., 1996). Sin embargo, es fácilmente percedero debido al rápido oscurecimiento del pericarpio y senescencia, además de susceptible a la presencia de enfermedades que pueden causar pérdidas económicas hasta del 100% (Paul y Chen, 1987; Morris y Jobling, 2002).

La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc.), pudrición del pedúnculo (*Botryodiplodia theobromae* Pat.) y mancha café (*Gliocephalotrichum microchlamydosporum*) han sido reportadas como las principales enfermedades del rambután en precosecha y postcosecha (Sivakumar et al., 2002; Kader, 2009).

Actualmente la producción de rambután en México es afectada por diversos problemas fitosanitarios, especialmente por hongos en postcosecha, los cuales pueden ocasionar pérdidas totales. Además de esto, en México aún no existen trabajos o reportes que indiquen la presencia de enfermedades ni de los patógenos que las ocasionan, por lo que se realizó la presente investigación para identificar el o los agentes causales de la mancha negra del rambután en postcosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se visitaron cuatro huertos comerciales de rambután en Tuxtla Chico (14° 56' N y 92° 10' W y altitud de 320 msnm) en el estado de Chiapas, México, en junio, julio y agosto del 2007 y 2008. En cada fecha y huerto, se colectaron 12 inflorescencias aparentemente sanas y 100 frutos en madurez comercial, determinada visualmente por la coloración roja uniforme del pericarpio. Las flores y los frutos se colocaron por separado en bolsas de polietileno previamente etiquetadas y en hielera para su transporte al laboratorio de Fitopatología en el Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

Aislamiento e identificación de hongos en flores

Las inflorescencias de rambután fueron separadas en 100 flores individuales y pedúnculos. Posteriormente, fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio 2%, se enjuagaron por triplicado con agua destilada estéril y se sembraron en cajas Petri (5 flores o 5 pedúnculos por caja) con papa dextrosa agar (PDA). Las cajas fueron incubadas durante 7 días. Se evaluó la incidencia de los hongos desarrollados y se expresó en porcentaje respecto al total de flores y pedúnculos. Tres hongos se aislaron y purificaron mediante la técnica de cultivos monospóricos en PDA, posteriormente se identificaron a nivel de género mediante claves taxonómicas.

Aislamiento e identificación de hongos en frutos

En el laboratorio, los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio 2%, posteriormente se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se secaron con papel sanitas. Fueron colocados en cámara húmeda (80% de humedad relativa y 22 ±2 °C) hasta la aparición de síntomas. Se consideró el número de frutos con pudriciones fungosas en el pericarpio (ennegrecimiento y presencia de micelio

gris) y se expresó en porcentaje (%) respecto al total de los frutos. Trozos de pericarpio de cinco milímetros de diámetro fueron sembrados en cajas de Petri de plástico con medio de cultivo papa zanahoria agar (PCA: 20 g de papa, 20 g de zanahoria, 18 g de agar y 1 L de agua destilada) y se incubaron en luz negra continua con una lámpara de 40 W, a temperatura de 25±1 °C durante el día. De los aislamientos purificados se realizaron cultivos monospóricos en agar-agua (AA: 18 g de agar en 1000 mL de agua destilada), y se incrementaron en PCA.

Se identificó a los hongos predominantes o con mayor incidencia encontrada. Las claves usadas para la identificación de *Pestalotiopsis* fueron de Sutton (1980) para género y Wei *et al* (2005) para la especie. Para *Lasiodiplodia* se utilizaron las claves de Punithalingam (1976), Sutton (1980) y Burgess *et al.* (2006).

Para la replicación de síntomas, se inocularon 60 frutos por cada patógeno, haciendo una herida con aguja y depositando una gota de la solución de esporas (1x10³ esporas/mL), en los frutos testigo se utilizó agua destilada estéril. Una vez inoculados, todos los frutos fueron colocados en cámara húmeda por 7 días.

Caracterización molecular de los aislamientos

De los cultivos monospóricos de *Pestalotiopsis* y *Lasiodiplodia* se extrajo ADN con la técnica de Ahrens y Seemüller (1992). Las regiones internas ITS1 e ITS2 fueron amplificadas por PCR con la combinación de iniciadores ITS4 TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC y el ITS5 GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG de acuerdo con los protocolos de Ahrens y Seemüller (1992), con la siguiente modificación: agua para PCR, buffer de reacción (10x), MgCl₂ (25 mM), dNTPs (10 mM), iniciadores ITS4 e ITS5 a 10 mM cada uno y Taq polimerasa (5µL) y ADN muestra a 1 µL. Para secuenciar los productos amplificados se utilizó el kit comercial Wizard (Promega®) y fue enviado para su secuenciación a la facultad de Biología

Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias se analizaron con el software Lasergene® 2001, V5 (DNASTAR, Inc.) y se alinearon con la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Las secuencias con el valor más alto de similitud se consideraron para su comparación con las obtenidas en este estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia e identificación de hongos en flores y frutos

Se observaron flores en tres etapas fenológicas: botón floral, flor polinizada y flor con formación de fruto, las cuales presentaron diferente grado de oscurecimiento, principalmente en el pistilo y en los tricomas de los frutitos en crecimiento (Figura 1).

El oscurecimiento en el pistilo de las flores puede obedecer a que una vez polinizadas las flores, diferentes órganos se atrofian para permitir y favorecer el desarrollo de los frutos, sin embargo, en nuestras observaciones, fue a partir de estos puntos oscuros donde inició el crecimiento de micelio, por lo que podría ser considerado como un síntoma causado por patógenos. *Colletotrichum gloeosporioides*, *L. theobromae* y *Pestalotiopsis* sp, han sido reportados como patógenos involucrados en los síntomas de oscurecimiento causados en hojas, brotes, flores y frutos en litchi (Liu et al., 2005).

En ambas colectas, realizadas en el 2007 y 2008, hubo incidencia de tres hongos, *Colletotrichum* sp, *Lasiodiplodia* sp y *Pestalotiopsis* sp, los cuales fueron aislados de flores, pedúnculos y frutos, sin embargo, *Colletotrichum* presentó la menor incidencia (8-10% en flores y pedúnculos; 0-3% en frutos) y en el 2008 no fue detectado en frutos. *Lasiodiplodia* sp presentó mayor

incidencia en flores (32-35%) y frutos (54-58%), seguido de *Pestalotiopsis* con 26 – 39% en flores y 33-34% en frutos, en ambos años. También se observaron otros hongos, los cuales fueron considerados como oportunistas o contaminantes ya que su incidencia no fue representativa (Cuadro 1). De manera generalizada, se obtuvieron mayor número de aislamientos de hongos en muestras de pericarpio que de flores, debido probablemente al manejo en huerto.

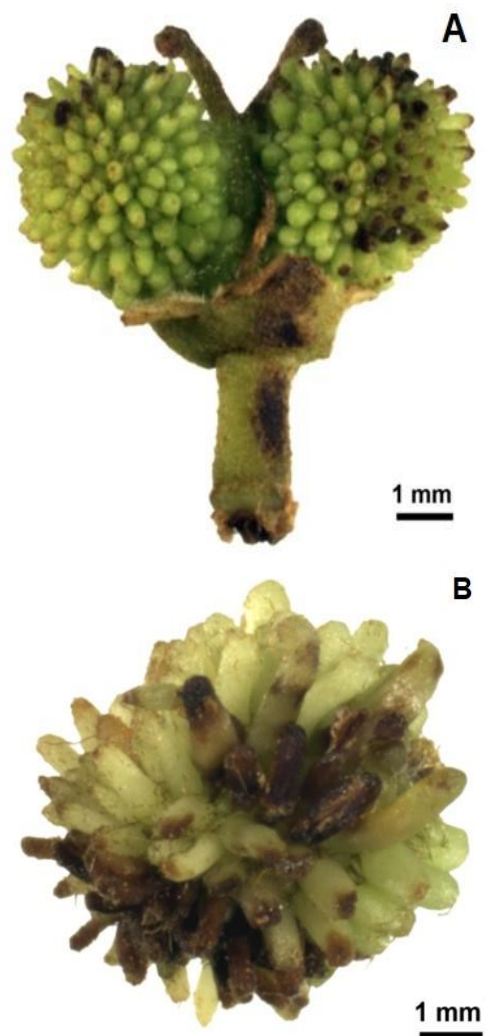


Figura 1. Flor polinizada (A) y fruto en formación (B) de rambután, con signos de oscurecimiento causado por hongos patógenos.

Cuadro 1. Frecuencia de aislamientos (%) de hongos en flores, pedúnculos y frutos de rambután de Chiapas, México, colectados en el 2007 y 2008.

Hongos	2007			2008		
	Flores	Pedúnculos	Frutos	Flores	Pedúnculos	Frutos
<i>Colletotrichum</i> sp	10	0	3	8	0	0
<i>Lasiodiplodia</i> sp	52	49	54	55	50	58
<i>Pestalotiopsis</i> sp	46	38	39	43	39	34
Otros	0	0	2	0	0	3

De manera general, el crecimiento de micelio blanco inició a las 48 horas después de la siembra en PDA. Cuatro días después de la siembra (DDS), el micelio adquirió diferente coloración e inició la formación de estructuras y esporas. Se identificó a *Lasiodiplodia* spp y *Pestalotiopsis* spp, en ambos años de colecta, mientras que *Colletotrichum* spp, solo fue aislado de flores y no de frutos en los dos años de colecta. *Lasiodiplodia theobromae*, desarrolló abundante micelio superficial de color gris oscuro a negro, septado y ramificado. Los conidios fueron inicialmente unicelulares hialinos, granulados, subovoides a elipsoides oblongos con pared delgada y base truncada; al madurar desarrollaron una pared gruesa y septa a la mitad, color café oscuro de 20.5-26.8 x 12.4-15.0 μm (Figura 2). Estas observaciones coincidieron con las descripciones de Punithalingam (1976), Sutton (1980) y Burgess et al. (2006).

Pestalotiopsis theae presentó micelio blanco, superficial, septado y ramificado. Acérvulos con masas de esporas negras conspicuas y errumpentes de forma oval o irregular. Los conidios largos fusiformes, erectos, con cuatro septos, contraídos por los septos (23-30 x 7-8 μm). Las tres células intermedias de 16.5-19 μm , color oliváceo oscuro; tres apéndices hialinos 4-6 μm , células basales cónicas; tres apéndices apicales cilíndricos 25-48 μm ; pedicelos filiformes 5-9 μm rígidos o curvados (Figura 2). Tales medidas y observaciones coincidieron con las de Guba (1961) y Guang et al. (2007).

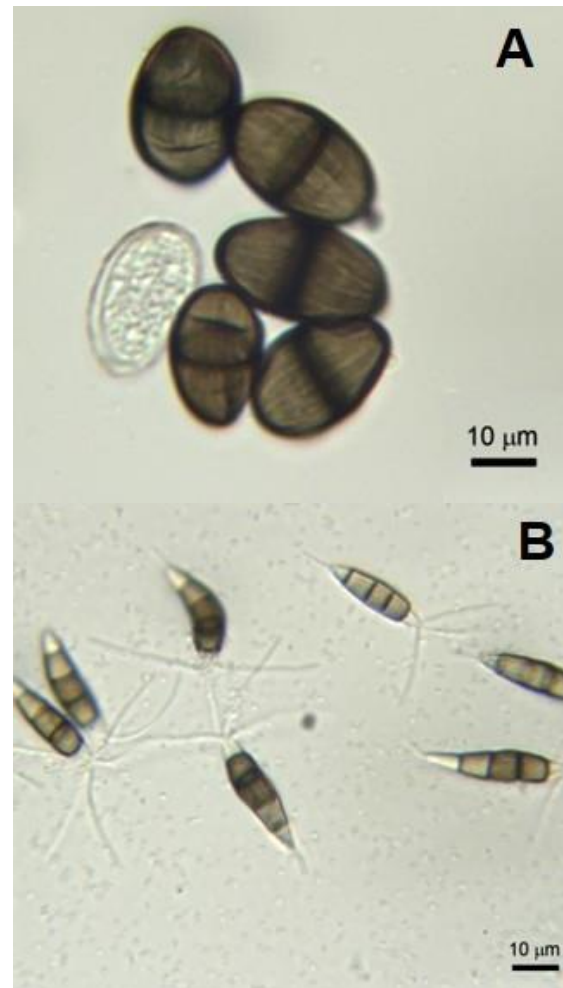


Figura 2. Conidios hialinos inmaduros y maduros de color oscuro de (A) *Lasiodiplodia theobromae* y (B) *Pestalotiopsis theae*

La identificación fue confirmada por análisis molecular. Los hongos fueron depositados en el banco de genes (NCBI)

para su homologación; *Pestalotiopsis* spp, con número de acceso AY681477.1 presentó 99% de similitud con *P. theae* y *Lasiodiplodia* sp con número de acceso FJ478102.1 tuvo 99% de similitud con *L. theobromae*.

Los tres patógenos identificados han sido reportados como endófitos en árboles tropicales, capaces de atacar hospedantes débiles o deteriorados (Burgess et al., 2006; Arnold, 2007; Wei et al., 2007). El término endófito es aplicado a los organismos que viven dentro de los tejidos de la planta en donde se desarrollan sin aparente infección o síntomas. Los hongos endófitos pueden estar presentes en parte o en todo el ciclo de vida del hospedante (Arnold, 2007). Estos hongos posiblemente están latentes en el árbol, sus órganos y diferentes etapas de desarrollo, pues su presencia fue constante en los años evaluados. Se ha encontrado que *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae*, establecen infecciones latentes en rambután, durante la maduración de frutos y almacenamiento postcosecha causan graves pérdidas, asociadas con antracnosis, mancha café, así como pudriciones de ramas y frutos, además ya han sido mencionados en otras especies de árboles frutales como endófitos.

Colletotrichum sp, *Lasiodiplodia* sp y *Pestalotiopsis* sp, han sido reportados en guayaba, mamey, litchi y rambután, además de que se consideran endófitos de plantas tropicales y subtropicales (Farungsang et al., 1992; Johnson et al., 2002; Liu et al., 2005; Keith et al., 2006; Guang et al., 2007).

Postulados de Koch e incidencia en frutos

Un síntoma asociado a cada patógeno pudo ser observado (Figura 3). Un 75% de los frutos inoculados con *L. theobromae*, presentaron lesiones oscuras y con apariencia húmeda que comenzaron a los dos días después de la inoculación (DDI), al cuarto día se observó crecimiento micelial y secreciones acuosas sobre las lesiones. Al quinto DDI, la mancha negra cubrió la

totalidad del pericarpio del fruto, así como micelio de color gris desarrollándose en los tricomas (Figura 3A). De los frutos inoculados con *Pestalotiopsis theae*, un 83% presentaron lesiones color marrón claro al tercer DDI. Al quinto DDI la mancha café se extendió en un 85% de la superficie del fruto, pero a diferencia de *L. theobromae*, no se desarrolló micelio visible (Figura 3B). En contraste, en frutos inoculados con *C. gloeosporioides*, un 80% desarrollaron síntomas y micelio idénticos a los observados con los hongos anteriores. Al realizar los aislamientos correspondientes, se identificó únicamente a *L. theobromae* y *P. theae*, pero no así a *C. gloeosporioides*. En los frutos tratados con agua estéril, se observó una incidencia de pudriciones semejante a los otros tratamientos (76%).

Debido a que en los frutos testigo y los inoculados con *C. gloeosporioides* fueron observados síntomas y aislamientos de *L. theobromae* y *P. theae*, suponemos que existen infecciones latentes y endófitas de estos hongos en frutales tropicales como rambután. Por el contrario, en litchi se ha encontrado que la principal enfermedad postcosecha es causada por la infección quiescente por *C. gloeosporioides* (Li et al., 2005). Diversas especies de *Pestalotiopsis* han sido reportadas como patógenos endófitos de frutales tropicales y subtropicales, como litchi, mamey, guayaba y rambután (Farungsang et al., 1992; Guang et al., 2007; Keith, 2008). Estos resultados son similares a lo reportado por Keith (2008) y Farungsang et al. (1992) quienes encontraron que la infección se da en los frutos jóvenes y permanece latente hasta la etapa de madurez y almacenamiento del rambután. Finalmente, Farungsang et al. (1992), Johnson et al. (2002) y Sivakumar et al. (2002) mencionan que en frutos de litchi y rambután almacenados a baja temperatura (5-13 °C) y atmósferas modificadas, se controló la pudrición de frutos causada por patógenos quiescentes (*Phomopsis* sp, *Colletotrichum* sp, *Lasiodiplodia* sp, y *Gliocephalotrichum* sp).

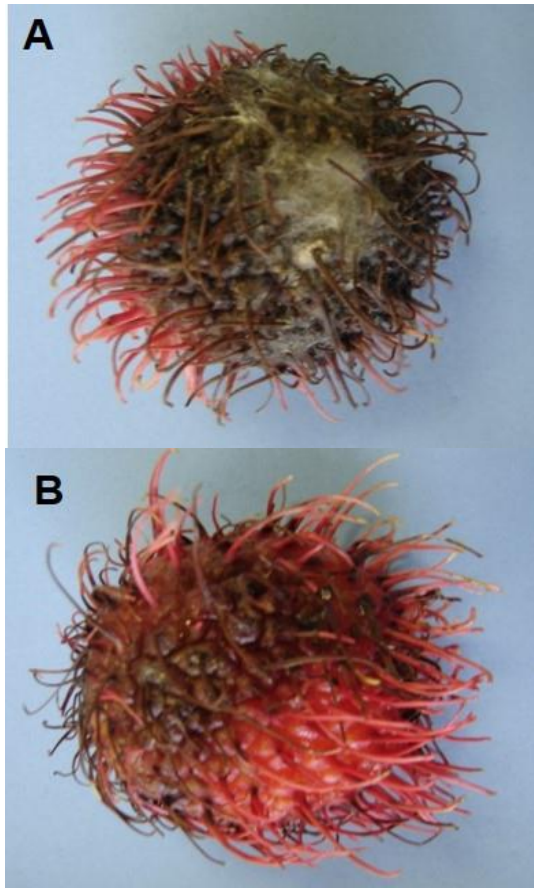


Figura 3. Síntomas de manchado de fruto causado por *Lasiodiplodia theobromae* (A) y *Pestalotiopsis theae* (B) en frutos de rambután a los cinco días después de la inoculación.

La producción de rambután en México está incrementándose y cobrando importancia económica para los productores de Chiapas principalmente, sin embargo, existen pocos estudios relacionados con la producción de rambután en el país. Este es el primer reporte en México de enfermedades en rambután causadas por hongos, por lo que deben realizarse estudios para su control, considerando la aplicación práctica con beneficio a los productores.

CONCLUSIONES

Los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Pestalotiopsis theae* fueron aislados de

flores y frutos de rambután, e identificados en base a sus características morfológicas y moleculares. Las especies con mayor incidencia en el 2007 y 2008, fueron *Lasiodiplodia theobromae* (32-35 % en flor y 54-54% en fruto) y *Pestalotiopsis theae* (26-33% en flor y 34-39% en fruto), los cuales fueron asociados a la mancha negra y mancha café del rambután respectivamente.

Este es el primer reporte de *P. theae* y *L. theobromae* en rambután en México.

LITERATURA CITADA

Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.

Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21: 51-66.

Burgess, I. T., A. P. Barber, S. Mohali, W. Beer, and J.M. Wingfield. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycology* 98: 423-435.

Farungsang, U., S. Sangchote, and N. Farungsang. 1992. Appearance of quiescent fruit rot fungi on rambutan stored at 13°C and 25°C. *Acta Horticulturae* 321: 903-907.

Guang, W. J., X. Tong, L. D. Guo, A. R. Liu, Y. Zhang, and X. H. Pan. 2007. Endophytic *Pestalotiopsis* species with plants of *Podocarpaceae*, *Theaceae* and *Taxaceae* in southern China. *Fungal Diversity* 24: 55-74.

Guba, E. F. 1961. Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 342 p.

- Johnson, G. I., A. W. Cooke and U. Sardud. 2002. Postharvest disease control in Lychee. *Acta Horticulturae* 575: 705-715.
- Kader, A. 2009. Rambutan: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. Postharvest Technology Research Information Center Home Page. Available in: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Fruit/rambutan.html>. Access in: 18 Feb. 2009.
- Keith, L. M. 2008. First report of *Pestalotiopsis virgatula* on rambutan in Hawaii. *Plant Disease* 92(5):835.
- Keith, L. M., M. E. Velásquez, and F. T. Zee. 2006. Identification and Characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Disease* 90: 16-23.
- Landrigan, M., S. Morris, and W. McGlasson. 1996. Postharvest browning of rambutan a consequence of water loss. *J. American Society of Horticulture Science* 121(4):730-734.
- Li, X., A. Liu and W. Chen. 2005. Studies on Development and Control of Anthracnose of Lychee Fruit before and after Harvest. *Acta Horticulturae* 665: 409-413.
- Liu, A., W. Chen and X. Li. 2005. Changes in the Postharvest Physiology and Lychee Fruits Latently Infected by Anthracnose Fungus and the Biological Characteristic of the Pathogenic Fungus of the Disease. *Acta Horticulturae* 665: 365-371.
- McQuate, G., P. Follet and J. Yoshimoto. 2000. Field infestation of rambutan fruits by internal-feeding pests in Hawaii. *Journal of Economy Entomological*. 93(3): 846-851.
- Morris, S., and J. Jobling. 2002. Recent advances in the postharvest packaging and handling of tropical fruit. *Acta Horticulturae* 575: 529-533.
- Pérez R, A. y A. Pohlan. 2004. Prácticas de cosecha y postcosecha del rambután en el Soconusco, Chiapas, México. *LEISA Revista de Agroecología* 20(3):1-5.
- Paul, R. E., and N. Chen. 1987. Changes in longan and rambutan during postharvest storage. *Hortscience* 22(6):1303-1304.
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 519. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Sivakumar, D., R.S. Wilson W., R.L.C. Wijesunderab, and M. Abeyesekerea. 2002. Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. *Crop Protection* 21: 847-852.
- Sutton, B. C. 1980. *The Coleomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 700 pp.
- Wei, J. G., T. Xu, L. D. Guo, and X. H. Pan. 2005. Endophytic *Pestalotiopsis* species from Southern China. *Mycosystema* 24:481-493.
- Wei, J.G., T. Xu, L.D. Guo, A.R. Liu, Y. Zhang, and X.H. Pan. 2007. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. *Fungal Diversity* 24: 55-74.