

MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA MUERTE DESCENDENTE DEL MARAÑÓN¹

**Rito Herrera²; José Luis Causadías³; Melvin Jaén⁴; Carmen Bieberach⁵;
Sandra Sopalda⁶; Zanya Aguilar⁷**

RESUMEN

En Panamá, el marañón (*Anacardium occidentale* L.) se desarrolla principalmente en las tierras bajas de la vertiente del Océano Pacífico. Las cifras del Instituto de Estadística (Gobierno de Panamá) señalan la existencia de 963 253 plantas distribuidas en 406 ha comerciales y huertos de traspatio. El objetivo de esta investigación fue la identificación de los principales agentes microbianos asociados a la llamada “muerte descendente del marañón”, entre cuyos síntomas se pueden mencionar: manchas foliares de diferentes formas, colores, tamaño, y sitios de desarrollo en la hoja, presencia o no de halo clorótico alrededor de las manchas foliares, manchas foliares en los espacios intervenales o al lado de las nervaduras, manchado oscuro de la corteza, oscurecimiento, muerte de los haces vasculares en dirección descendente, secamiento de la ramilla en forma descendente, presencia de zonas con corteza oscura (ennegrecidas) y secamiento del racimo floral. Para ello se colectaron muestras de hojas, ramas, flores y segmentos de tallos con síntomas asociados al problema sanitario, seguido de una fase de aislamiento y caracterización morfológica de los microorganismos y pruebas de patogenicidad (postulados de Koch). De acuerdo con los resultados, se aislaron los hongos *Colletotrichum gloesporioides*, *Pestalotia heterocornis* y *Lasidioploidia theobromae*, con una prevalencia del 60%, 30% y 3%, respectivamente; afectando hojas, ramas, flores y frutos e identificados molecularmente mediante los genes ITS (ADN espaciador).

Palabras claves: *Colletotrichum gloesporioides*, hongos, *Lasidioploidia theobromae*, marañón, muerte descendente, *Pestalotia heterocornis*.

¹Recepción: 13 de febrero de 2023. Aceptación: 20 de septiembre de 2023.

²IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria en Recursos Genéticos (CIARG). Ph.D. Microbiología. e-mail: rhhv76@yahoo.es; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2509-0391>

³IDIAP. CIARG. Ing. Agr. e-mail: jcausadias04@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-8249-5497>

⁴IDIAP. CIARG. M.Sc. Fruticultura. e-mail: mjaen_31@yahoo.es; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6006-3463>

⁵IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria Divisa (CIA-Divisa). M.Sc. Biotecnología. e-mail: cybieberach@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0002-6607-9332>

⁶IDIAP. CIA-Divisa. M.Sc. Ciencias Agropecuarias. e-mail: sandra.sopalda@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0006-7712-3369>

⁷IDIAP. CIA-Divisa. M.Sc. Biotecnología. e-mail: zanyaaguilarreyes@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0002-4458-9833>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH CASHEW DIEBACK

ABSTRACT

In Panama, the cashew (*Anacardium occidentale* L.) grows mainly in the lowlands of the Pacific Ocean slope. Data from the Statistics Institute (Government of Panama) indicate the existence of 963 253, distributed over 406 commercial hectares and backyards. The objective of this research was to identify the main microbial agents associated with the so-called "cashew dieback", with symptoms like: leaf spots of different shapes, colors, size, and sites of development on the leaf, presence or absence of a chlorotic halo around the leaf spots, leaf spots in the interveinal spaces or next to the veins, dark staining of the bark, darkening, death of the vascular bundles in a downward direction, drying of the twig in a downward direction, presence of areas with dark bark (blackened) and drying of the floral cluster. For this, samples of leaves, branches, flowers and stem segments with symptoms associated with the health problem were collected, followed by a phase of isolation and morphological characterization of the microorganisms and pathogenicity tests (Koch's postulates). According to the results, fungi *Colletotrichum gloesporioides*, *Pestalotia heterocornis* and *Lasidioploidia theobromae*, with a prevalence of 60%, 30% and 3%, respectively; affecting leaves, branches, flowers and fruits and molecularly identifying them through ITS genes (spacer DNA).

Keywords: *Colletotrichum gloesporioides*, fungi, *Lasidioploidia theobromae*, cashew, dieback, *Pestalotia heterocornis*.

INTRODUCCIÓN

En la República de Panamá, el marañón (*Anacardium occidentale* L.) se desarrolla principalmente en las tierras bajas del pacífico. Se suelen utilizar materiales genéticos criollos, sin manejo de copa, sanitario y nutrición, sólo se realiza la cosecha del pseudofruto para elaboración de jugos y dulces y la recolecta del fruto (nuez) para el consumo de su almendra (Ministerio de Desarrollo Agropecuario [MIDA], 2017).

El marañón se creía una especie con muy pocos problemas sanitarios, con excepción de tipos endémicos como la antracnosis en la etapa de floración. Aproximadamente, desde hace unos cuatro años en la vertiente del Pacífico de Panamá, se observa en los árboles de marañón dispersos a orilla de caminos, cercas y en huertos caseros, la presencia de un creciente problema fitosanitario caracterizado por el manchado de las hojas, flores, ramas, en algunos casos debilitando a la planta al limitar su área



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

fotosintética con el manchado del haz, causando necrosis de la lámina y abscisión foliar (MIDA, 2017).

En otros casos, es visible la movilización de la enfermedad en forma descendente hacia ramas y tallo, ocasionando serios daños en el desarrollo vegetativo y productivo, y en ocasiones, causando el colapso de la planta (Pérez Miranda et al., 2005).

Es determinante identificar el o los agentes patogénicos causantes de este problema sanitario de muerte descendente; ya que a nivel de producción ha provocado una reducción anual en la recolección de nueces, con la consecuente falta de materia prima para la industria local dirigida al procesamiento de la nuez. Lo que constituye en una seria amenaza para la sostenibilidad del cultivo a nivel de los sistemas de huerto familiar y de parcela comercial.

En otros países se ha reportado este fenómeno involucrando a diversos agentes causales:

En Cuba se observaron sobre las hojas de *Anacardium occidentale* L., manchas necróticas aisladas marrón claro en el borde de la hoja que posteriormente, formaron lesiones necróticas en diferentes secciones de la superficie foliar, así como lesiones en las inflorescencias, coincidiendo con las reportadas para *Phomopsis anacardii*, siendo la primera descripción de la especie realizada en el país, como agente causal de necrosis en los brotes, hojas y quemaduras de las inflorescencias de *Anacardium occidentale* L. (Pérez Miranda et al., 2005).

En León (Nicaragua) se identificaron y describieron los síntomas de *Pestalotia* sp, y *Cephaleuros* sp, que resultaron ser, los principales agentes causales de daño foliar en marañón (Jiménez y Gómez, 2010).

En Brasil, *Pseudoidium anacardii* ha surgido como una seria amenaza para el cultivo de marañón, atribuyéndole una considerable disminución de la producción (Pinto et al., 2016). *Lasiodiplodia theobromae*, es otro patógeno reportado en Brasil asociado a daños en el marañón, presentando como síntoma una gomosis en la planta (Munis et al., 2012).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Este estudio se desarrolló con el objetivo de identificar los principales agentes patogénicos asociados a problemas sanitarios emergentes en Marañón (*Anacardium occidentale* L.) en fincas de producción comercial, huertos de traspatio y árboles localizados a orillas de carreteras ubicadas en la provincia de Coclé (Panamá).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron muestreos aleatorios en fincas de producción comercial, huertos de traspatio y árboles localizados a orillas de carreteras ubicadas en la provincia de Coclé (Panamá), que presentaron hojas, ramas, flores y segmentos de tallos síntomas asociados al problema sanitario.

Test de patogenicidad: Se utilizó como herramienta los postulados de Koch. Se realizó la inoculación de plantas sanas con cada uno de los aislados obtenidos a partir de lesiones, para inducir la replicación de los síntomas observados en plantas afectadas, dentro de un ambiente semi controlado en casa de vegetación con techo y paredes de malla anti-insectos creando un aislamiento físico parcial.

Los marañones se sembraron en recipientes (potes) de plástico que contenían suelo esterilizado y se colocaron bajo un invernadero con un fotoperiodo promedio de 12 h con riego suplementario cada 2 días. Después de 28 días, las plántulas se inocularon con una suspensión de conidias cuando alcanzaron la etapa de 6-8 hojas. El inóculo se preparó a partir de cultivos de 25 días añadiendo a las placas Petri 10 ml de agua destilada estéril. Los conidios se recolectaron con micropipeta y se contaron en una cámara Neubauer. La concentración de conidios se ajustó a $1,0 \times 10^6$ conidios por ml y se le añadió un ml de una solución de agar y glucosa (1%). La suspensión de conidios (12,5 ml por planta) se aplicó en la superficie inferior de las hojas con un frasco atomizador. Las plantas de control se rociaron con agar y solución de glucosa. Antes y después de la inoculación, las plantas fueron cubiertas con bolsas de plástico para mantener una humedad superior al 90%. Se utilizaron aislamientos (entre 5 y 7) de *C. gloesporioides*, *P. heterocornis* y *L. theobromae*. Se utilizaron cinco plantas por aislamiento.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Análisis estadístico: El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones para cada tratamiento. Los datos recopilados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA 1) de una vía, $P \leq 0,05$ y test de rangos múltiples de Tukey.

Caracterización de morfotipos (Microcultivo)

Se utilizó el método de microcultivo que es el más preciso, ya que permite observar las estructuras *in situ* (Arenas, 1993).

Los hongos que presentaron actividad fitopatológica fueron cortados con una hoja de bisturí de la placa, con medio de agar papa dextrosa (PDA), en cuadrados de agar de 0,5 cm. Con la hoja de bisturí se colocó un cuadrado en el portaobjetos. Luego se sembró el hongo con la espátula en las cuatro esquinas y en el centro del bloque de agar, colocando el cubreobjeto sobre el bloque de agar PDA. Se generó una cámara húmeda dentro del plato Petri con el objetivo de favorecer el crecimiento del hongo y se incubó a 28° C. Después de siete días se desprendió el portaobjetos, se le colocó una gota de azul de lactofenol y se observó al microscopio (40X y 100X) buscando estructuras reproductivas (Casa, 1989; Arenas, 1993).

Para su identificación molecular se amplificaron por PCR convencional los genes ribosomales asociados al espaciador transcrito interno conocido en inglés como internal transcribed spacer (its) y se secuenciaron con el fin de determinar la especie de hongos (Figura 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislamientos fúngicos asociados a las lesiones encontradas en las hojas, inflorescencias, ramas y frutos del marañón se asociaron en su mayoría a las especies *C. gloeosporioides* (Figura 2), *P. heterocornis* (Figura 3), *L. theobromae* (Figura 4). La especie *C. gloeosporioides* se aisló de hojas, inflorescencias (Figura 5), nueces y pseudofrutos (Figura 6), mientras que *P. heterocornis* se aisló de ramas y hojas infectadas (clorosis), y *L. theobromae* se encontró en tejido vascular de ramas.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



Figura 1. Flujograma experimental desarrollado en esta investigación para la caracterización de microorganismos asociados a la muerte descendente del marañón.

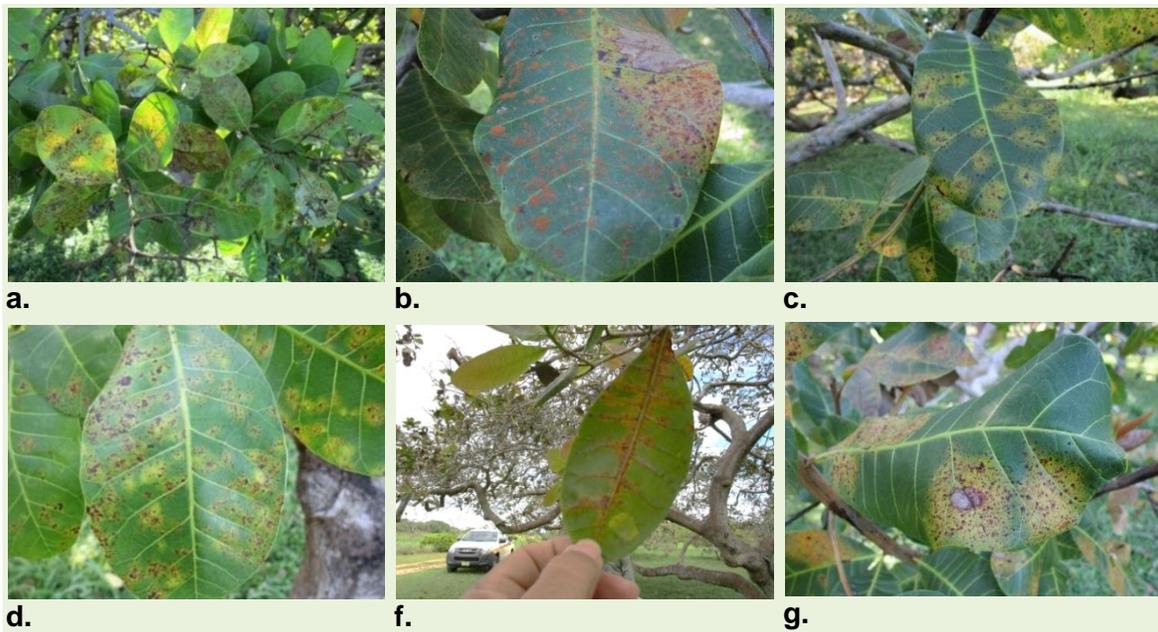


Figura 2. Sintomatología en hojas de *Anacardium occidentale* L., provocadas por *Colletotrichum gloeosporioides*: a. manchas foliares de diferentes formas, colores, tamaño, b. sitio de desarrollo en la hoja, c. presencia o no de halo clorótico alrededor de las manchas foliares y d. f. g. manchas foliares en los espacios intervenales o al lado de las nervaduras.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



Figura 3. Sintomatología en ramas de *Anacardium occidentale* L., provocadas por *Pestalotia heterocornis*: a. manchado oscuro de la corteza, oscurecimiento y muerte de los haces vasculares en dirección descendente y b. desecación de ramilla en forma descendente.



Figura 4. Sintomatología en ramas de *Anacardium occidentale* L., provocadas por *Lasiodiplodia theobromae*: a. presencia de zonas con corteza oscura (ennegrecidas), b. haces vasculares de color oscuro debajo de la zona con corteza oscura, y c. secamiento de la rama o tallo y pudrición de la madera.

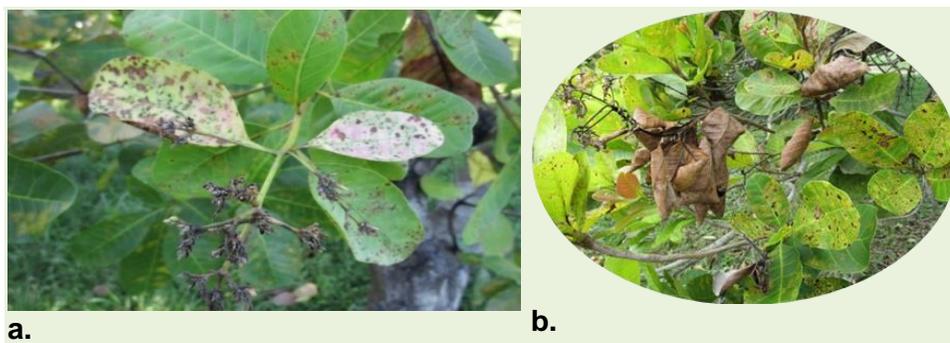


Figura 5. Sintomatología en flores de *Anacardium occidentale* L., provocadas por *Colletotrichum gloeosporioides*: a. cambio de color a oscuro y b. desecamiento del racimo floral.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



Figura 6. Sintomatología en fruto de *Anacardium occidentale* L., provocadas por *Colletotrichum gloeosporioides*: a. enrojecimiento de haces vasculares, b. desecación de frutos y c. pseudofrutos tiernos (momificación).

En esta investigación se observó que todas las partes del árbol de marañón son susceptibles al ataque de patógenos. Particularmente, el género *Colletotrichum* es el patógeno con mayor grado de incidencia (60%) y que afecta a muchas partes de la planta. Un aspecto importante para resaltar es que las especies de *Colletotrichum* se consideran uno de los patógenos de plantas más importantes desde el punto de vista económico que afectan a una amplia gama de especies de plantas como el banano, el jengibre, la soja y mango (Photita et al., 2005). Las especies de *Pestalotia* (incidencia 30%) se aislaron fundamentalmente de hojas y ramas, mientras que las especies de *Lasiodiplodia* principalmente se hallaron en ramas (Figura 7). Las lesiones necróticas observadas pseudofrutos y nueces fueron atribuibles a *C. gloeosporioides*; este hongo también se aisló de áreas necróticas de color rojizo en hojas de árboles adultos y plántones de marañón. La desecación de las inflorescencias también se atribuyó a *C. gloeosporioides*. En este sentido, *C. gloeosporioides* y *P. heterocornis* se aislaron principalmente de hojas que presentaban síntomas similares. Sin embargo, las manchas negras necróticas en hojas provocadas por *P. heterocornis* fueron más pequeñas que las causadas por *C. gloeosporioides*. Se logró aislar un complejo formado por *L. theobromae* (incidencia 3%) en asociación con *P. heterocornis* que provocaron lesiones ennegrecidas por fisuras en ramas. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Freire et al. (2002), y López y Lucas (2010), para la prevalencia de estos géneros fúngicos.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

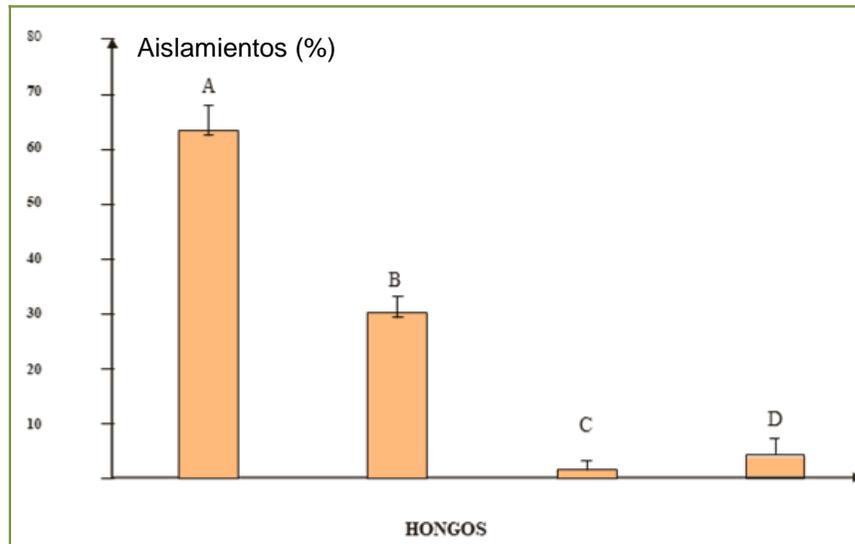


Figura 7. Tasa media porcentual de aislamientos de hongos en árboles de marañón. A) *C. gloesporioides*, B) *P. heterocornis*, y C) *L. theobromae*, D) micelio esterilia (hongos no identificados). Las barras verticales representan el error estándar (SE).

En cuanto los rasgos morfológicos (morfortipos), los cuales incluyen características de los conidios tales como longitud, ancho, forma y tamaño del micelio se observó lo siguiente (medias): para *C. gloesporioides* las conidias fueron cilíndricas presentando un largo de 14 μm ; ancho de 4,69 μm ; tamaño de micelio 76,1 mm. *P. heterocornis* presentó conidias elipsoidales de 16 μm de largo, 6 μm de ancho y un micelio de 82,2 mm. Por otra parte, *L. theobromae*. presentó conidias cilíndricas de 21 μm de largo, 11,5 μm de ancho y un micelio de 84,2 mm (Figura 8).



Figura 8. Características morfológicas de los conidios: a. *Colletotrichum gloesporioides*, b. *Pestalotia heterocornis* y c. *Lasiodiplodia theobromae*.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

En relación con los ensayos de patogenicidad, luego de 21 días, los plantones de marañón inoculados con $1,0 \times 10^6$ esporas (conidias) de suspensión de aislamientos fúngicos seleccionados, desarrollaron pequeñas manchas negruzcas en las hojas. Posteriormente, (2-3 meses después), se observó un área amarillenta alrededor de la mancha necrótica negra. Todos los aislamientos fueron patógenos para los plantones de marañón. En la condición control, no se desarrolló ningún síntoma durante este ensayo. El patógeno se volvió a aislar consistentemente de hojas de marañón infectadas en agar papa dextrosa, cumpliendo con los postulados de Koch.

La identificación molecular de los hongos se realizó mediante la extracción de ADN según Chen et al., 2010 con modificaciones menores. Seguidamente se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa el gen ITS (espacio transcrito interno de DNA ribosomal), con un tamaño de aproximadamente de 550 a 600 pares de bases (bp). La secuenciación se realizó mediante next generation sequence (NGS) de Illumina®. La naturaleza de multicopia del rDNA permite que la región ITS sea fácil de amplificar con pequeñas cantidades de DNA y obtener un producto cuya variabilidad típicamente refleja sinapomorfías a nivel de especie. Esta región muestra un alto grado de polimorfismo entre especies, pero se cree que está altamente conservada dentro de las especies, por lo tanto, es un valioso marcador genético para la identificación de especies (Karen et al., 1997).

CONCLUSIONES

- Se identificaron como hongos asociados a la muerte descendente del marañón los patógenos *Colletotrichum gloesporioides*, *Pestalotia heterocornis* y *Lasidioploidia theobromae*, con una prevalencia del 60%, 30% y 3%, respectivamente; afectando hojas, ramas, flores y frutos en los árboles de marañón.

REFERENCIAS

Arenas, R. (1993). *Micología Médica ilustrada*. Segunda edición. McGraw Hill. México D.F. 352 pp.

Casa, G. (1989). *Micología General*. Edición I. Caracas, Venezuela. 448 pp.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S., Wang, H., y Siegfried, B. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE*, 5 (8), e11963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- Freire, F. C. O., Cardoso, J. E., dos Santos, A. A., y Viana, F. M. P. (2002). Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. *Crop Protect.*, 21(6), 489-494. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00138-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00138-7)
- Karen, O., Högberg, N., Dahlberg, A., Jonsson, L., y Nylund, J. E. (1997). Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in *Fennoscandia* as detected by endonuclease analysis. *New Phytol.* 136(2), 313- 325. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1469-8137.1997.00742.x>
- Jiménez, M., y Gómez, M. (2012). Identificación y descripción de síntomas de los principales patógenos asociados al cultivo de marañón (*Anacardium occidentale* L.) orgánico y convencional, en León, Nicaragua; *Revista Científica La Calera*, 12(18), 01-08. <https://repositorio.una.edu.ni/2378/>
- López, A. y Lucas, J. (2010). Colletotrichum isolates related to anthracnose of cashew trees in Brazil: Morphological and molecular description using LSU rDNA sequences. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53(4) 741-752. <https://www.scielo.br/j/babt/a/VzCGsL6GYbSJtCvKHnn5dwF/abstract/?lang=en>
- Ministerio de Desarrollo Agropecuario. (2017). Dirección Nacional de Agricultura. Panamá.
- Pérez Miranda, M., Pérez Vicente, L. F., y Pueyo Figueroa, M. (2005). Manchas de las hojas de marañón (*Anacardium occidentale* L.) provocadas por *Phomopsis anacardii* early & punith, *Fitosanidad*, 9(2), 21-24. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116161003.pdf>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

- Muniz, C., Freire, F., Viana, F., Cardozo, J., Cooke, P., Wood, D., y Guedes, M. (2011). Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: microscopical features. *Microm*, 42(5), 419-428. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.12.003>
- Photita, W., Taylor, P., Ford, R., Hyde, K., y Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*, 18, 117-133. [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453ed%20snp55rrgict55\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1664369](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453ed%20snp55rrgict55))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1664369)
- Pinto, O. R. O., Muniz, C. R., Cardoso, J. E., Oliveira, F. S. A., y Lima, J. S. (2016). Morphological analyses of *Pseudoidium anacardii* infecting brazilian cashew plants. *Summa Phytopathologica*, 42(3), 257-260. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2101> https://www.researchgate.net/publication/308169078_Morphological_analyses_of_Pseudoidium_anacardii_infecting_brazilian_cashew_plants



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)