

OCTUBRE 2025 N°21

BOLETÍN DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOPATÓLOGOS

ISSN: 2618-1932

IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Alternaria* spp., AGENTE CAUSAL
DE LA MANCHA NEGRA DEL PECÁN



IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Alternaria* spp., AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA NEGRA DEL PECÁN

Coronel V.^{1,2}, Carrasco F.^{1,2}, Herrera, V.¹, Kaen R.¹, Bernardi Lima, N.¹
Capítulo NOA

¹Cátedra de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCA. Avda. Belgrano y Maestro Quiroga (4700), Catamarca.

²EEA Catamarca. Ruta provincial 33, km 4.5 (4705) Sumalao, Valle Viejo, Catamarca.

Contacto: nbernardi@agrarias.unca.edu.ar

RESUMEN

El cultivo de pecán (*Carya illinoensis* Koch) constituye un sistema de producción frutícola en crecimiento en el país. No obstante, las enfermedades fúngicas afectan significativamente la productividad. En el Valle Central de Catamarca, se detectaron plantas enfermas, en las que se observaron pequeñas áreas de color marrón oscuro a negro, en hojas y frutos, las cuales se unen, formando extensas manchas necróticas irregulares. Los métodos de diagnóstico utilizados permitieron identificar la enfermedad como “la mancha negra del pecan”, causada por especies del género *Alternaria*. Los síntomas de esta enfermedad pueden ser fácilmente confundidos con aquellos ocasionados por la deficiencia de zinc, cuando el observador carece de experiencia en el reconocimiento. El diagnóstico fitopatológico es clave para la correcta identificación de la enfermedad y la implementación de estrategias de manejo eficaces que contribuyan a la sustentabilidad del agroecosistema.

EL GÉNERO *Alternaria*

Alternaria es un género fúngico perteneciente a la familia Pleosporaceae (Pleosporales, Dothideomycetes, Ascomycota) (Mycobank, 2023) y comprende aproximadamente 368 especies aceptadas con 29 secciones (Wijayawardene et al., 2020; Li et al., 2023). Este género es muy común en la naturaleza y diverso ecológicamente. Incluye especies endófitas, saprófitas y patógenas de plantas y animales en todo el mundo (Thomma, 2003; Woudenberg et al., 2013; Woudenberg et al., 2015; Lawrence et al., 2013; 2016). Aunque diversas especies actúan como agentes ubicuos de descomposición de sustratos naturales y artificiales (Lawrence et al., 2016), un número significativo resultan importantes fitopatógenos que causan enfermedades durante el ciclo del cultivo y podredumbres en poscosecha ocasionando grandes pérdidas en una amplia gama de cultivos agrícolas (Nagrle et al., 2016). Asimismo, muchas de estas especies son productoras de micotoxinas que contaminan los alimentos (Alexander et

al., 2011; Fernández-Cruz et al., 2010; Meena and Samal, 2019). Algunas de las enfermedades más comunes incluyen: el tizón temprano de la papa y del tomate, la mancha púrpura de la cebolla, la pudrición de limones y naranjas, entre otras (Agrios, 2005).

En el cultivo de pecán, la enfermedad conocida como mancha negra, causada por especies del género *Alternaria*, ha cobrado relevancia en los últimos años (Yan et al., 2022; Achilonu et al., 2023; Fan et al. 2024; Coronel et al., 2024; Coronel et al., 2025). Esta patología se ha reportado en países productores, como China y Sudáfrica, donde afecta principalmente hojas y frutos. En estos órganos se observan pequeños puntos de color marrón oscuro a negro, que, al confluir, forman extensas manchas necróticas irregulares. Recientemente *Alternaria tenuissima* fue reportada como agente causal de la mancha negra del pecán, mediante el uso de marcadores morfológicos y moleculares (Yan et al.,



2022). En la caracterización morfológica se evaluó la coloración de las colonias y el tamaño y forma de conidios, lo que facilitó una identificación provisional de los aislados. Para la identificación molecular se emplearon las regiones ITS del ADN ribosómico, histona 3 (H3), factor de elongación 1-a (TEF) y el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con los cebadores ITS1/ITS4, H3-1a/H3-1b, EF1-728f/EF1-986r y Gpd1/Gpd2 respectivamente. El análisis filogenético multilocus confirmó la identidad de los aislados, donde particularmente para pecán, Yan et al. (2022) determinaron que los aislados corresponden a *A. tenuissima*. Achilonu et al. (2023) y Fan et al. (2024) confirmaron la asociación con *A. alternata* por medio de las caracterizaciones morfológicas (coloración de colonias y tamaño de conidios) y análisis molecular. En la identificación molecular Achilonu et al. (2023) analizaron cuatro regiones génicas (ALT 1, GAPDH, RPB2 Y TEF1) utilizando los cebadores Alt-F/Alt-R,

Gpd1/Gpd2, Rpb2-5F/Rpb2-7cR, EF1/EF2. Por su parte, Fan et al. (2024), para aislados obtenidos desde *Polygonatum cyrtonema*, amplificaron cinco regiones génicas (ITS, SSU, LSU, GAPDH, TEF1 y OPA10-2) con los cebadores descritos por Woundenberg et al. (2015). Ambos autores, confirmaron mediante estudios filogénicos la ubicación taxonómica mencionada.

La complejidad y diversidad del género *Alternaria*, explica la ineficiencia de los métodos morfológicos empleados en la identificación. Sin embargo, permiten una identificación rápida y de gran utilidad en el diagnóstico. Por su parte, la identificación molecular, con las secciones génicas adecuadas, permite confirmar la identidad taxonómica, dotando de precisión a la identificación morfológica. En este contexto, para el género *Alternaria* el análisis multigénico es el adecuado, ya que permite una resolución taxonómica a nivel de especie (Yan et al. 2022; Achilonu et al. 2023; Fan et al. 2024).

LA IMPORTANCIA DEL CORRECTO DIAGNÓSTICO

En el manejo de las enfermedades de las plantas, el diagnóstico constituye una etapa clave. Reconocer una planta enferma y determinar su agente causal es imprescindible para definir estrategias de manejo adecuadas y eficaces que permitan prevenir o detener el desarrollo de la enfermedad, o bien minimizar los daños. En campo, el diagnóstico inicial suele ser sintomatológico o presuntivo, basado en la observación de síntomas y signos. No obstante, en muchos casos este enfoque no es suficiente para identificar con certeza al agente causal. Además, si el observador carece de

experiencia en el reconocimiento, pueden cometerse errores tanto en la interpretación de los síntomas como en la recolección de muestras. Un ejemplo frecuente en nuestra zona es la confusión entre la enfermedad de origen parasitario “mancha negra” y la alteración abiótica por “deficiencia de zinc”. Diferenciarlos constituye un paso fundamental para alcanzar un diagnóstico etiológico confiable, el cual debe confirmarse en laboratorio mediante técnicas de aislamiento y métodos moleculares.

EL ROL DEL ZINC EN EL CULTIVO DE PECÁN

El zinc es un micronutriente requerido por el cultivo de pecán en altas concentraciones. Su insuficiencia es frecuente en suelos con pH superior a 7. El zinc desempeña un papel vital en el crecimiento y desarrollo del cultivo, ya que es imprescindible para la síntesis de numerosas proteínas vegetales, algunas involucradas en la síntesis de ADN, fotosíntesis y tolerancia radicular a suelos inundados (Heerema, 2013). Asimismo, interviene en el metabolismo normal del ácido indolacético (AIA), auxina que regula los patrones de

crecimiento de los brotes y las hojas, en reacciones enzimáticas, en la formación estructural de las enzimas, en las reacciones de oxidación-reducción, en el metabolismo del nitrógeno y de los carbohidratos y, en la integridad celular. (Ojeda et al., 2012; Heerema, 2013; Pokhrel, 2025). En el campo, su intervención se traduce en promoción del desarrollo foliar y floral, polinización exitosa, aumento de cuaje y llenado del embrión, así como en la retención del fruto hasta su madurez.

LA MANCHA NEGRA DEL PECAN y LA DEFICIENCIA DE ZINC

Los primeros síntomas de la mancha negra del pecán se

visualizan en las hojas como pequeñas manchas



amarillas de 2 a 4 mm de diámetro, estas indican el inicio de colonización de los tejidos. Gradualmente, estas manchas aumentan de tamaño alcanzando entre 5 a 7 mm de diámetro. Dichas lesiones pueden confluir y formar extensas áreas necróticas de color marrón oscuro a negro (Figura 1 A). En el fruto, la aparición de las manchas y su posterior avance es similar a lo ocurrido en las hojas. Adicionalmente, la enfermedad puede inducir una defoliación prematura, el aborto de nueces, retrasos en el crecimiento y la disminución del vigor de la planta (Yan et al., 2022; Achilonu et al., 2023; Fan et al., 2024). En Argentina, Madero et al. (2017) mencionan que *Alternaria* spp. es el causante de gran parte de las manchas foliares observadas en distintas zonas de cultivo de pecán. Larrea et al. (2019) detectaron la presencia de *Alternaria* en nueces de pecán almacenadas, asociando el deterioro del fruto con la

presencia de este hongo. Coronel et al. (2025) reportaron la elevada ocurrencia de síntomas asociados a esta enfermedad, en plantaciones comerciales de la provincia de Catamarca. No obstante, en el país los estudios que refieren a *Alternaria* como agente causal de la mancha negra del pecán son escasos y, no hay registros de las especies intervinientes identificadas mediante métodos moleculares.

Por su parte, la deficiencia de zinc, enfermedad del tipo fisiogénica, tiende a afectar con un patrón regular/simétrico a las hojas jóvenes y los brotes en crecimiento, manifiestan una clorosis internerval uniforme y, relativamente simétrica, que evoluciona a necrosis de forma más generalizada, con hojas de menor tamaño y márgenes ondulados (Figuras 1 B y C) (Ojeda et al., 2012; Heerema, 2013; Castillo-Gonzalez et al., 2019; Pokhrel et al., 2025).



Figura 1. Hojas con síntomas de mancha negra por *Alternaria* spp. (A) y asociados a la deficiencia de zinc, con clorosis foliar, amarillamiento internerval, necrosis y menor tamaño de hojas (B y C).

INFORME FITOPATOLOGICO

MUESTREO EN CAMPO

El muestreo se efectuó de forma dirigida, durante las etapas de desarrollo vegetativo y reproductivo del cultivo (meses de septiembre a abril), en plantaciones de pecan del Valle Central de Catamarca. El procedimiento

consistió en la recolección de hojas y frutos con síntomas de la enfermedad: lesiones necróticas irregulares de color marrón oscuro a negro, de tamaño variable (media = 3 a 7 mm de diámetro) y patrón disperso (Figura 2).



Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno y se rotularon con los datos correspondientes: finca, lote, fecha, variedad, síntoma y alguna característica sobresaliente observada. El material recolectado fue

conservado en condiciones de baja temperatura (4°C) para evitar la deshidratación y el desarrollo de saprófitos, hasta su procesamiento en el Laboratorio de Fitopatología



Figura 2. Hojas y frutos con síntomas de la mancha negra del pecán.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN LABORATORIO

1° Lavado y desinfección

El lavado y la desinfección tuvieron como objetivo eliminar o reducir la microbiota superficial de hojas y frutos, que pudieran interferir con el aislamiento del patógeno de interés.

La desinfección consistió en tratar las muestras con (i) alcohol etílico al 70 % durante 30 segundos; (ii)

hipoclorito de sodio al 1 %, por 30 segundos y (iii) doble enjuague con agua destilada estéril (ADE). Se procuró no exceder el tiempo de exposición a los agentes desinfectantes, ya que los tejidos se necrosan con facilidad e imposibilitan continuar con la técnica.

2° Aislamiento

La obtención de los aislados del hongo se realizó de las siguientes maneras:

a. Método directo

Para la observación de las estructuras del patógeno, se utilizó la técnica de cámara húmeda, la cual proporciona las condiciones de temperatura y humedad que inducen el crecimiento y la aparición de estructuras vegetativas y reproductivas del patógeno presente en la muestra.

El material vegetal, correctamente desinfectado, se colocó en recipientes de plástico transparente con tapa

hermética, conteniendo cajas de Petri con algodón estéril embebido en ADE, para evitar el contacto directo del agua con el tejido vegetal (Figura 3). El recipiente permaneció cerrado a una temperatura de 25°C, bajo un fotoperiodo de 12 h de luz/oscuridad, durante 5 a 7 días, aproximadamente. Ante la observación de crecimiento fúngico (signos del patógeno) sobre las hojas y frutos, se procedió al aislamiento; con ayuda de una aguja estéril,



se extrajo una muestra del material fúngico, y se depositó en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo agar papa

glucosa (APG). Posteriormente, se llevaron a incubación a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y 12 h de luz/oscuridad, durante 5 días.



Figura 3. Cámara húmeda de hojas de pecán.

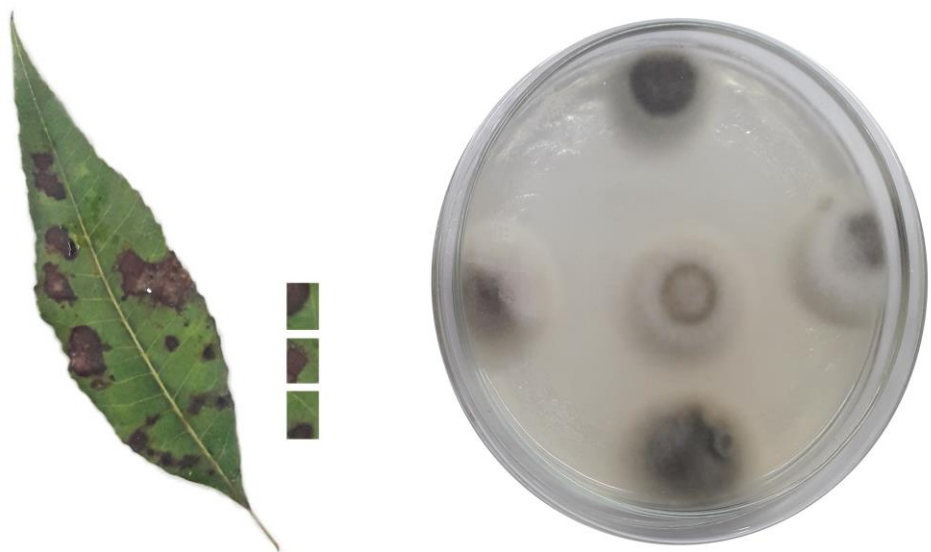
b. Método indirecto

A partir de una muestra sintomática, se cortaron pequeños trozos de tejido de la zona avance de la lesión; luego, se realizó desinfección superficial, según el procedimiento descrito previamente. Las porciones de tejido desinfectadas se dejaron secar en papel estéril y se transfirieron a cajas de Petri conteniendo APG, equidistantes unas de otras para no dificultar el desarrollo posterior del patógeno (Figura 4). Las placas se incubaron en las condiciones de temperatura y

fotoperiodo mencionadas anteriormente.

Una vez que se observaron colonias fúngicas con morfología característica del género *Alternaria* (Figura 5), se localizó el margen de crecimiento de la colonia y mediante el uso de un sacabocado estéril, se extrajo un trozo de medio de cultivo conteniendo estructuras (micelio) del hongo y se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo APG. Posteriormente se incubó a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y 12 h de luz/oscuridad.

Figura 4. Proceso de aislamiento indirecto a partir de hojas (izq.) y crecimiento fúngico con morfología característica del género *Alternaria* (der.).



3° Identificación

Se llevó a cabo la identificación clásica a través de las características morfológicas del cultivo obtenido in vitro. El género se caracterizó por presentar colonias, generalmente grises, verdosas, oliváceas oscuras, marrón claro, marrón oscuro a negras; micelio inmerso y parcialmente superficial e hifas de color marrón oliváceo o marrón. Los conidióforos fueron simples o irregularmente ramificados y laxos, de color marrón pálido a marrón, solitarios o en fascículos y las células

conidiógenas integradas, terminales. Los conidios se observaron solitarios o en cadenas, ovoides, obovoides, cilíndricos, estrechamente elipsoides u obclavados, con células apicales afiladas o no, de color marrón oliváceo pálido a marrón, lisos o verrugosos, con septos transversales, oblicuos o longitudinales, o sin ellos (Figura 5), coincidente con lo descrito por Woundenberg et al., (2013) y Lawrence et al., (2016).

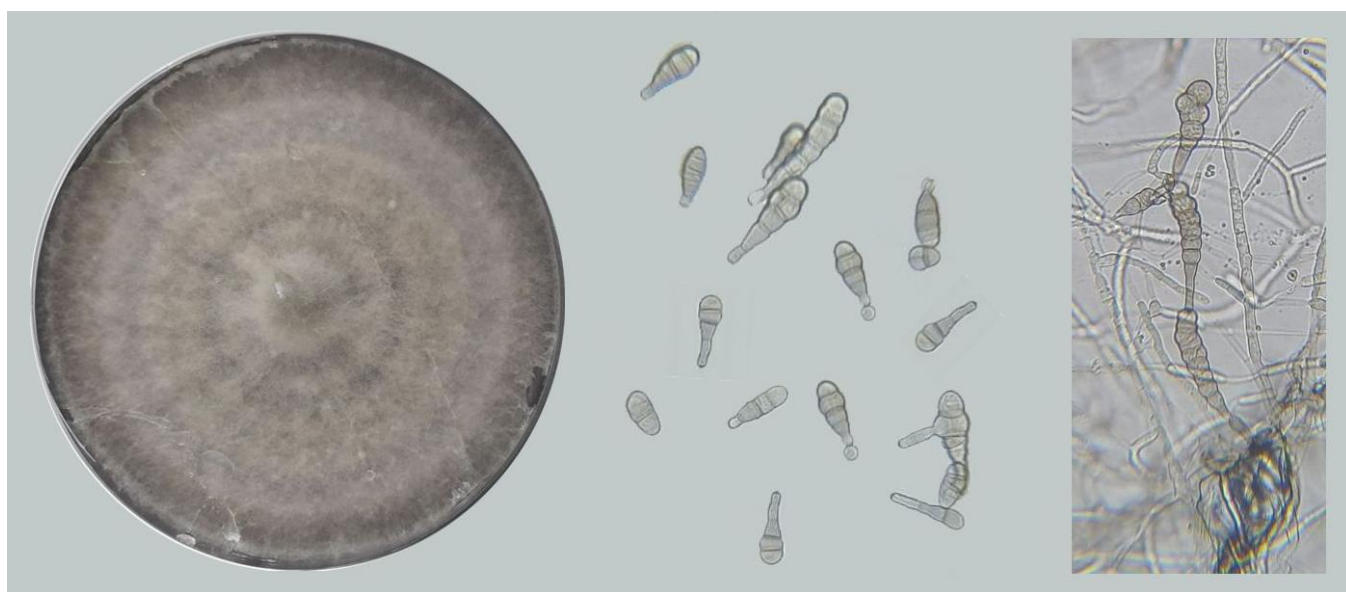


Figura 5. Características macro y microscópicas típicas del género *Alternaria* cultivados en APG, con alternancia lumínica (12 luz/oscuridad). Colonia de coloración gris con micelio superficial (izq.). Conidios en cadenas, de formas variables: ovoides, obovoides, elipsoides u obclavados de color marrón pálido, lisos, con septos transversales, longitudinales y algunos con septos oblicuos (der.).

4° Pruebas de patogenicidad

Con el objetivo de comprobar el establecimiento de la relación causal entre la enfermedad y el agente etiológico aislado fue imprescindible recurrir a los postulados de Koch.

Las pruebas de patogenicidad en hojas desprendidas se realizaron según el método descrito por Giri et al. (2013). Se obtuvieron hojas compuestas de plantas sanas y se desinfectaron superficialmente siguiendo el protocolo descrito anteriormente (lavado y desinfección). Cada hoja compuesta se colocó en recipientes herméticos, introduciendo el extremo del pecíolo en una botella con ADE para evitar la desecación. Se establecieron seis repeticiones por tratamiento (inoculado/ sin inocular), considerando cada foliolo como una repetición. La inoculación se realizó según Achilonu et al. (2023) y Fan

et al. (2024), colocando un disco de APG (Ø5mm) con crecimiento activo de *Alternaria* spp. sobre el foliolo; como control se colocó un disco de APG sin crecimiento fúngico. Para mantener una alta humedad relativa (~90%) se colocó un vaso de precipitados con ADE dentro de cada recipiente. Los mismos se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ con alternancia lumínica (12 h luz/12 h oscuridad). Los síntomas de mancha negra se observaron en los folíolos inoculados a los 6 días después de la inoculación (Figura 6). Se realizó el re-aislamiento a partir de las hojas con síntomas y se confirmó la presencia del patógeno mediante la observación de las características morfológicas descritas anteriormente, cumpliéndose así los postulados de Koch.





Figura 6. Síntomas de mancha negra observados a los seis días después de la inoculación (der.); control a los 6 días después de la inoculación (izq.).

CONSIDERACIONES FINALES

El informe ofrece fundamentos claros para un diagnóstico preciso de la mancha negra del pecán. Esta herramienta, junto a los estudios de identificación molecular llevados a cabo por el equipo de trabajo, contribuirán a generar conocimiento científico sobre esta enfermedad emergente y a fundamentar estrategias de manejo adaptadas al contexto local y transferibles al sector pecanero nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achilonu, C.C.; Marais, G.J.; Ghosh, S.; Gryzenhout, M. (2023). Multigene Phylogeny and Pathogenicity Trials Revealed *Alternaria alternata* as the Causal Agent of Black Spot Disease and Seedling Wilt of Pecan (*Carya illinoensis*) in South Africa. *Pathogens*. 12: 672. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050672>
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. (5th ed.). Elsevier Academic Press. 952 p.
- Alexander, J.; Benford, D.; Boobis, A.; Ceccatelli, S.; Cottrill, B.; Cravedi, J.; Di Domenico, A.; Doerge, D.; Dogliotti, E.; Edler, L. (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J.* 9: 2407-2504.
- Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergman Filho, A. (2018). *Manual de fitopatología: Principios y conceptos* (5a edición., Vol.1).
- Castillo-Gonzalez, J.; Ojeda-Barrios, D.; Hernandez-Rodriguez, A.; Abadia, J.; Sanchez, E.; Parra-Quezada, R.; Valles-Aragon, M.C.; Sida-Arreola, J.P. (2019) Zinc Nutritional status of pecan trees influences physiological and nutritional indicators, the metabolism of oxidative stress, and yield and fruit quality. *Notu. Bot. Horti. Agrobo.* 47: 531–537.
- Coronel, M.V.; Monguillot, J.; Flamarique, S.; Carrasco, F.; Kaen, R.; Conforto, C.; Lima, N.B. (2024). Sensibilidad in vitro de *Alternaria* spp., agente causal de mancha negra del pecan, a Azoxystrobina. Libro de Resúmenes del 6° Congreso Argentino de Fitopatología. Accedido el 26 de sept 2024.
- Coronel M.V.; Carrasco F.D.; Kaen R.M.; Paredes J.A.; Michereff S.J.; Conforto, C.; Bernardi Lima N.; Cazon L.I. (2025). Development and validation of a standard area diagram (SAD) set for assessing *Alternaria* black spot severity in pecan leaves, 27 May 2025, PREPRINT (Version 1).



- Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6655217/v1>
- Fan, Q.J.; Zhou, Q.Y.; Zhang, S.; Li, Y.; Li, J.; Chen, X.; Sun, L. (2024). First Report of Leaf Spot Disease Caused by *Alternaria alternata* on *Polygonatum cyrtoneura* in Hunan Province of China. *Plant Disease* 108(2):530.
- Fernández-Cruz, M.L.; Mansilla, M.L.; Tadeo, J.L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: analysis, occurrence and health implications. *J Adv Res* (1):113–122.
- Giri, P.; Taj, G.; Kumar, A. (2013). Comparison of Artificial Inoculation Methods for Studying Pathogenesis of *Alternaria brassicae* (Berk.)
- Sacc on *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian Mustard). *Afr. J. Biotechnol.* 2013, 12, 2422–2426.
- Heerema, R.J. (2013). Diagnosing nutrient disorders of New Mexico pecan trees. *New Mexico State Univ. Ext. Serv. Guide H-65*.
- Larrea, M.A.; Comerio, R.M.; Romero, S.M., Vaamonde, G. (2019). Contaminación fúngica de nueces de pecán. Editorial Académica Española. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/116148>
- Lawrence D.P., Gannibal, P.B., Peever, T.L., Pryor, B.M. (2013). The sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105: 530–546.
- Lawrence, D.P.; Rotondo, F.G.; Philipp, B. (2016). Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress* 15, 3: 72–98.
- Li, J.F., Jiang, H.B., Jeewon, R., Hongsan, S., Bhat, D.J., Tang, S.M., Lumyong, S., Mortimer, P.E., Xu, J.C., Camporesi, E., Bulgakov, T.S., Zhao, G.J., Suwannarach, N., & Phookamsak, R. (2023). *Alternaria*: update on species limits, evolution, multi-locus phylogeny, and classification. *Studies in Fungi*, 8, 1–61. <https://doi.org/10.48130/SIF-2023-0001>
- Madero, E.R., Trabichet, F.C., Wright, E. (2016) Manual de manejo del huerto de nogal pecán. INTA Ediciones, 96. Available at https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_manual_de_manejo_de_huerto_de_nogal_pecan.pdf.
- Meena, M.; Samal, S. (2019). *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. *Toxicology Reports* 6: 745–758.
- Mycobank Database (2023). Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. Recuperado de: <https://www.mycobank.org/>
- Nagrale, D.T., Sharma, L., Kumar, S., & Gawande, S.P. (2016). Recent diagnostics and detection tools: implications for plant pathogenic *Alternaria* and their disease management. In *Current trends in plant disease diagnostics and management practices* (pp. 111–163). Cham: Springer International Publishing.
- Ojeda-Barrios, J.; Abadía, J.; Lombardini, L.; Abadía, A.; Vázquez, S. (2012). Zinc deficiency in field-grown pecan trees: Changes in leaf nutrient concentrations and structure. *J. Sci. Food Agr.* 92:1672–1678.
- Pokhrel, N.; Ferguson, L.; Zhang, L. (2025) Importance of Nitrogen and Zinc Fertility in Pecan Production. *Horticulturae* 11, 82. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11010082>
- Thomma B.P. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4:225–36
- Yan, L.; Yang, X.; Wang, Z.; Zhu, H.; Qian, Y.; Wu, W. (2022). First report of *Alternaria tenuissima* causing leaf black spot on pecan in China. *Plant Disease* 106 (6):1748.
- Wijayawardene, N.N.; Hyde, K.D.; Al-Ani, L.K. T.; Tedersoo, L.; Haelewaters, D.; Rajeshkumar, K.C.; ... & Castañeda-Ruiz, R.F. (2020). Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere Online: Journal of Fungal Biology*, 11(1), 1060–1456.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75: 171–212.
- Woudenberg J.H.C., Seidl M.F., Groenewald J.Z., de Vries M., Stielow J.B., et al. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae specialis or pathotypes. *Studies in Mycology* 82:1–21

