BIOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EN EL SUELO DE RODALES AFECTADOS POR LA SECA DE *QUERCUS*.

R. HERMOSO, E. SÁNCHEZ, A. TRAPERO.
Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

RESUMEN

El aislamiento de *Phytophthora* spp. a partir de muestras de suelo ofrece dificultades, incluso cuando se emplea el aislamiento indirecto por medio de "cebos biológicos" y medios de cultivo selectivos. Para el aislamiento de *P. cinnamomi* del suelo donde crecían pies de *Quercus ilex* y *Q. suber* afectados de podredumbre radical los cebos comúnmente utilizados han sido pétalos de clavel, manzana y aguacate, originando problemas de contaminación por otros hongos y bacterias. El objetivo de nuestro trabajo ha sido la puesta a punto de un método de aislamiento efectivo para el patosistema *P. cinnamomi* / *Quercus* spp. Para ello, se han realizado experimentos con suelo estéril infestado con *P. cinnamomi*, ensayado factores como el tiempo de incubación, la proporción agua:suelo y distintos tipos de cebo: hojas nuevas y viejas de diferentes especies vegetales, frutos, cotiledones y radículas. Los cebos más efectivos han sido los filodios de eucalipto (*Eucalyptus globulus* y en menor medida *E. camaldulensis*) incubados durante 4 días con una proporción suelo:agua de 1:6. Se ha corroborado la eficacia del método de detección con muestras de suelo de fincas donde previamente se había diagnosticado la podredumbre radical de *Quercus* asociada a *P. cinnamomi*.

P.C.: Detección en suelo, *Phytophthora cinnamomi*, Seca de *Quercus*

SUMMARY

The isolation of *Phytophthora* spp. from soil samples is often difficult, even using indirect methods which combine baiting techniques and selective media. Apple or avocado fruits or carnation petals are some of the most common baits used for the isolation of P. cinnamomi from infested soils where *Quercus ilex* and *Q. suber* have been affected by root rot and decline. However, the use of these baits has serious limitations because of the contamination by several fungi and bacteria. The aim of this work was to improve the baiting technique for the pathosystem *P. cinnamomi* / *Quercus* spp. The effect of different factors, including several baits (leaves, fruits, cotyledons, radicles), the soil:water dilution, and the incubation time, was checked using a soil mixture artificially infested with several isolates of *P. cinnamomi*. The most effective baiting method included baits of eucalyptus phyllodium pieces (*Eucalyptus globulus* and less effective *E. camaldulensis*), 1:6 soil:water relation, and 4 days incubation period. The efficiency of this method has been tested for the detection of *P. cinnamomi* in naturally infested soil samples from fields where the root rot caused by this pathogen had been previously diagnosed.

K.W.: *Phytophthora cinnamomi*, *Quercus* decline, soil detection

INTRODUCCIÓN

La “seca" de los *Quercus* es una enfermedad de etiología compleja que da lugar a una pérdida de vigor y un deterioro progresivo que lleva a la muerte del árbol afectado al cabo de pocos años (muerte lenta), o en pocas semanas (muerte súbita) desde la aparición de los primeros síntomas (BRASIER, 1996). Se han identificado una serie de factores bióticos y abióticos asociados a esta enfermedad, entre los que destaca como agente contribuyente, la podredumbre radical causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi* (BRASIER, 1993; TUSET *et al*., 1996; GALLEGO *et al*., 1999).

El aislamiento de especies de *Phytophthora* a partir de muestras de suelo ofrece muchas dificultades por el bajo nivel de propágulos del hongo en el suelo y por la presencia de antagonistas y de microflora asociada de crecimiento más rápido, incluso cuando se utilizan medios de cultivo selectivos para este género fúngico. Por este motivo, tradicionalmente se vienen utilizando métodos de aislamiento indirecto mediante el uso de “cebos biológicos” (ERWIN & RIBEIRO, 1996). Los cebos más comúnmente utilizados para el aislamiento de *P. cinnamomi* (pétalos de clavel, frutos de manzana y aguacate) no han resultado demasiado efectivos en el aislamiento de este hongo a partir de muestras de suelo de la rizosfera de *Quercus ilex* y *Q. suber* afectados de seca. Por ello, se planteó

este trabajo con el objeto de poner a punto un método sencillo y eficaz para la detección y aislamiento de *P. cinnamomi* del suelo en el patosistema *P. cinnamomi* / *Quercus* spp.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayos de detección con suelo artificialmente infestado: Se utilizó un suelo estéril, mezcla de arena, limo y turba en igual proporción, que se infestó separadamente con micelio de distintos aislados de *P. cinnamomi* en suspensión acuosa.

Experimento 1: influencia de la relación agua:suelo y del tiempo de incubación: El ensayo se realizó en dos tipos de recipientes: vasos de plástico de 220 cm^3 en los que se depositaron 20 g del suelo artificialmente infestado y 120 ml de agua desionizada (relación agua:suelo 6:1), y placas de Petri de 9 cm de diámetro con la misma cantidad de suelo infestado y con 20 ml de agua desionizada (relación agua:suelo 1:1). Se ensayaron dos suelos infestados con dos aislados de *P. cinnamomi* (PA1 y PE8). Como cebos biológicos se utilizaron trozos de hojas jóvenes de olivo y trozos de pétalos inmaduros de clavel. El experimento se realizó en tres bloques al azar, con seis repeticiones de cada relación agua:suelo para cada combinación de cebo y suelo infestado. Los tiempos de incubación ensayados fueron de 1, 2 y 4 días. Tras estos tiempos, los cebos se sembraron en placas de Petri con el medio de cultivo selectivo PARPH (JEFFERS & MARTIN, 1985) y se incubaron en oscuridad a 22º C durante seis días. Se contabilizaron las colonias obtenidas y se hizo la transformación $x=(\text{nº colonias}+0.5)^{0.5}$. A estos datos se les aplicó el análisis de la varianza y los valores medios fueron comparados entre sí mediante el test LSD (mínima diferencia significativa) protegido de Fisher al nivel de significación P=0.05 (STEEL & TORRIE, 1985).

Experimento 2: eficacia de distintos tipos de cebos biológicos: Se utilizaron los mismos suelos infestados, con la relación agua:suelo y el tiempo de incubación que resultaron más efectivos en el ensayo anterior. Los cebos ensayados fueron: hojas del año y hojas del año anterior de encina, alcornoque y olivo, hojas del año y filodios del año anterior de eucalipto rojo (*Eucalyptus globulus*) y de eucalipto blanco (*E. camaldulensis*), pétalos inmaduros de clavel, acículas del año de pino (*Pinus halepensis*), discos de manzana, discos de aguacate, cotiledones de eucalipto rojo y radículas de altramuz. Este ensayo se realizó en dos bloques, cada uno con seis repeticiones para las distintas combinaciones de cebo y suelo infestado. Tras el tiempo de incubación, se procedió de igual manera que en el ensayo anterior.

Experimento 3: eficacia de los cebos seleccionados para la detección de distintos aislados de P. cinnamomi: Se ensayaron los cebos que habían resultado más efectivos en el experimento anterior, además de hojas del año anterior de aguacate, en 6 suelos infestados separadamente con 6 aislados de *P. cinnamomi*. El ensayo se realizó en dos bloques, con seis repeticiones para cada combinación de cebo y suelo infestado, procediéndose de igual manera que en los ensayos anteriores tras el tiempo de incubación.

Detección de *P. cinnamomi* en muestras de suelo de fincas afectadas de seca: Se realizó este ensayo con el fin de comprobar la eficacia del método puesto a punto en suelos naturalmente infestados. El medio de cultivo para los cebos fue PARPH con 50 mg/l de Benomilo (PARPHB). Se utilizaron 8 muestras de suelo de 2 fincas donde previamente se había diagnosticado la enfermedad radical en *Quercus*, una muestra de suelo procedente del Vivero Forestal de la ETSIAM, otra muestra de suelo artificialmente infestado y una última muestra de suelo estéril. Todas las muestras se conservaron en bolsas de plástico cerradas en cámara a 5º C. Los ensayos se realizaron tras 1 y 2 meses de almacenamiento en frío de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación agua:suelo y tiempo de incubación: El número medio de colonias obtenido para cada una de las combinaciones experimentales ensayadas aparece en la Tabla 1. El análisis global de la varianza, realizado sobre los datos transformados, mostró diferencias significativas entre tipos de cebo, relación agua:suelo y tiempo de incubación. No hubo diferencias significativas entre aislados, por lo que los datos corresponden para el total de los dos aislados ensayados. Los dos cebos evaluados fueron eficaces en la detección de *P. cinnamomi*, aunque con el pétalo inmaduro de clavel el número de colonias obtenido resultó significativamente mayor. La relación suelo:agua 1:6 resultó más eficaz tanto para el pétalo inmaduro de clavel como para la hoja de olivo. Con respecto al tiempo de incubación, para los dos cebos utilizados, 4 días resultó el tiempo más eficaz, aunque en el caso del

pétalo inmaduro de clavel no difirió significativamente de los 2 días. En ambos casos, la detección de *P. cinnamomi* tras un día de incubación fue menor, pero en este tiempo resultó ligeramente superior la recuperación con la relación suelo:agua 1:1 que con la relación 1:6.

Tabla 1. Colonias de *Phytophthora cinnamomi* obtenidas en función del tipo de cebo biológico, de la dilución suelo:agua y del tiempo de incubación

Tiempo de incubación	Cebo biológico[1] y dilución (suelo:agua)[2]					
	Clavel			Olivo		
	1:1	1:6	Media	1:1	1:6	Media
1 día	1.8[3]	1.6	**1.7 b**	1.5	1.4	**1.4 c**
2 días	3.3	4.9	**4.1 a**	2.7	3.8	**3.3 b**
4 días	4.1	5.9	**5.0 a**	3.9	4.9	**4.4 a**
Media	**3.1 b**	**4.2 a**		**2.7 a**	**3.3 a**	

[1] Trozos de pétalos inmaduros de clavel y de hojas del año de olivo.

[2] Dilución suelo:agua 1:1 (20 g de suelo y 20 ml de agua) y 1:6 (20 g de suelo y 120 ml de agua).

[3] Número medio de colonias obtenidas por placa (0-6) de PARPH. En las filas y columnas de medias, los valores con una letra común no difieren significativamente, según el test LSD protegido de Fisher para P=0.05. Para el análisis de los datos se aplicó la transformación raíz cuadrada: $x=(\text{nº colonias/placa} + 0.5)^{0.5}$ (STEEL & TORRIE, 1985).

Eficacia de distintos tipos de cebos biológicos: se utilizó la relación suelo:agua 1:6 y 4 días de incubación de los cebos, por ser éstas las condiciones más favorables para el aislamiento de *P. cinnamomi*, según los resultados del ensayo anterior. El número medio de colonias obtenido con los distintos cebos ensayados aparece en la Tabla 2. El análisis global de la varianza realizado sobre los datos transformados mostró diferencias significativas en la recuperación de *P. cinnamomi* en función del aislado y del cebo biológico pero no para la interacción de ambas variables. El aislado PA1 se recuperó en un alto porcentaje con la mayoría de los cebos, sobre todo con las hojas, siendo el cotiledón de eucalipto, los discos de aguacate y la radícula de altramuz, los únicos cebos que dieron lugar a una recuperación significativamente menor que los demás. El aislado PE8 se recuperó con mayor dificultad, siendo los valores medios de colonias obtenidas más bajos que en el caso del aislado PA1. En este caso, las diferencias en recuperación con los distintos cebos fueron más acusadas, resultando el filodio del año anterior de eucalipto rojo el cebo más efectivo. En general, los cebos de hoja resultaron más efectivos que el resto de los tejidos vegetales, y las hojas del año anterior más que las del año.

Tabla 2. Colonias de dos aislados de *Phytophthora cinnamomi* obtenidas con distintos cebos biológicos

CEBO BIOLÓGICO		AISLADO			
		PA1		PE8	
		nº col [1]	X [2]	nº col	X
Hoja / Filodio del año anterior	eucalipto rojo	6.0	2.55	4.4	2.18
	eucalipto blanco	5.9	2.53	1.6	1.33
	encina	3.9	2.02	2.7	1.70
	alcornoque	6.0	2.55	2.2	1.53
	olivo	4.4	2.19	1.1	1.20
Hoja / Filodio del año	eucalipto rojo	4.7	2.26	1.0	1.12
	eucalipto blanco	4.6	2.23	0.2	0.79
	encina	5.8	2.51	1.9	1.50
	alcornoque	5.3	2.40	1.4	1.31
	olivo	4.1	2.09	1.3	1.28
Pétalo inmaduro de clavel		5.0	2.31	2.9	1.64
Acícula de pino		3.1	1.84	0.1	0.75

Cotiledón de eucalipto	1.4	1.33	0.4	0.91
Discos de aguacate	0.2	0.79	0.2	0.78
Discos de manzana	3.3	1.83	2.5	1.64
Radícula de altramuz	0.0	0.71	0.2	0.79
LSD [3]		0.73		0.76

[1] Número medio de colonias obtenidas por placa en el medio PARPH (0-6).

[2] Valores transformados:X=(nº medio de colonias + 0.5)$^{0.5}$.

[3] Valor mínimo de comparación para el nivel de significación P=0.05, según el test LSD protegido de Fisher (STEEL & TORRIE, 1985).

Eficacia de los cebos seleccionados para la detección de distintos aislados de *P. cinnamomi*: se utilizaron los cinco cebos seleccionados según los resultados del experimento anterior, además de hoja del año anterior de aguacate, en las condiciones que resultaron más favorables en el primer experimento: relación suelo:agua 1:6 y 4 días de incubación de los cebos. El número medio de colonias obtenido para cada combinación ensayada de cebo y aislado de *P. cinnamomi* aparece en la Tabla 3. En el análisis de la varianza, realizado sobre los datos transformados, se observaron diferencias significativas en la recuperación de los distintos aislados de *P. cinnamomi*, así como en la recuperación en función del cebo utilizado y en la interacción entre ambas variables. En general, hubo aislados más difíciles de recuperar del suelo que otros. Los que se obtuvieron con porcentajes mayores fueron los aislados PE56, PE55 y PA5. Los niveles de recuperación de los aislados PA11 y PA8 resultaron significativamente menores a los anteriores, quedando la recuperación del aislado PE66 en un nivel intermedio, aunque difiriendo significativamente de los dos grupos anteriores. No obstante, esta ordenación de los aislados dependió del tipo de cebo biológico, ya que la interacción cebo*aislado resultó muy significativa. El filodio del año anterior de eucalipto rojo resultó el cebo más efectivo, aunque no difirió significativamente del filodio del año anterior de eucalipto blanco para cinco de los seis aislados evaluados, con la excepción del PA11. La hoja del año anterior de aguacate dio los peores resultados en la detección de *P. cinnamomi* en todos los casos.

Tabla 3. Colonias de diferentes aislados de *Phytophthora cinnamomi* obtenidas con cebos biológicos seleccionados

CEBO BIOLÓGICO[1]	AISLADO					
	PE55	**PE56**	**PE66**	**PA5**	**PA8**	**PA11**
Eucalipto rojo	5.9[2] a	6.0 a	5.0 a	6.0 a	5.2 a	5.5 a
Eucalipto blanco	5.8 a	5.6 a	5.2 a	5.5 a	4.6 a	3.9 b
Encina	5.9 a	5.8 a	4.7 a	5.9 a	3.2 b	4.1 b
Alcornoque	5.7 a	5.8 a	4.2 ab	5.6 a	2.4 bc	3.4 b
Olivo	4.5 b	4.9 a	2.4 c	4.2 b	1.6 c	1.7 c
Aguacate	1.7 c	1.7 b	3.2 bc	1.8 c	0.2 d	0.2 d

[1]Trozos de fiodios/hojas del año anterior.

[2] Número medio de colonias obtenidas por placa en el medio PARPH (0-6). Para cada aislado, medias seguidas de una letra común no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P=0.05. Para el análisis de los datos se aplicó la transformación raíz cuadrada: X=(nº colonias/placa + 0.5)$^{0.5}$ (STEEL & TORRIE, 1985).

Tabla 4. Colonias de *Phytophthora cinnamomi* obtenidas en función de la muestra de suelo y del momento de ensayo

SUELO	Bloque 1 (1 mes)		Bloque 2 (2 meses)	
	TI[1] = 2días	**TI = 4 días**	**TI = 2días**	**TI = 4 días**
Finca 1, Muestra 1	2.8[2]	3.3	1.8	2.5
Finca 1, Muestra 2	3.0	3.7	2.3	2.8
Finca 1, Muestra 3	-	p	p	p

Finca 1, Muestra 4	p	p	p	p
Finca 2, Muestra 1	p	p	p	p
Finca 2, Muestra 2	p	p	p	p
Finca 2, Muestra 3	p	p	p	p
Finca 2, Muestra 4	p	p	p	p
Suelo vivero	p	p	p	p
Infestado artificialmente (PE66)	3.7	4.0	2.3	2.8
Suelo estéril	-	-	-	-

[1] TI = Tiempo de incubación de los cebos.

[2] Número medio de colonias obtenidas por placa en el medio PARPH (0-6). La letra "p" indica no detección de *P. cinnamomi*, aunque se obtuvieron colonias de *Pythium* spp.

Detección de *P. cinnamomi* en muestras de suelo de fincas afectadas de seca: En la Tabla 4 se presenta el nivel de aislamiento medio de *P. cinnamomi* en los suelos en los que se detectó. De los ocho suelos procedentes de fincas afectadas de seca de *Quercus* se obtuvieron resultados positivos (se aisló *P. cinnamomi*) en dos de ellos, tal y como se comprobó por la observación al microscopio invertido de abundantes hinchazones hifales en las colonias obtenidas. En los otros seis suelos y en el suelo procedente del Vivero Forestal de la ETSIAM se aislaron colonias de diversa morfología, pertenecientes al género *Pythium*. En lo que respecta al suelo infestado artificialmente con el aislado PE66, el aislamiento resultó positivo, aunque la recuperación fue algo menor que en el ensayo anterior en el que se había utilizado este mismo suelo. En el suelo estéril no se aisló ninguna especie fúngica. En todos los casos, la obtención de *P. cinnamomi* fue mayor tras el tiempo de incubación de los cebos de 4 días, aunque las diferencias con respecto a los 2 días no resultaron significativas. La contaminación bacteriana en ese tiempo no fue superior a la que hubo a los dos días de incubación, aunque en ningún caso esta contaminación resultó un problema para el aislamiento del hongo. También se observó una disminución significativa en la obtención de *P. cinnamomi* en el ensayo realizado tras dos meses de almacenamiento en frío con respecto al realizado tras un mes.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto de investigación 1FD97-0911-CO3-03.

BIBLIOGRAFÍA

BRASIER, C.M. (1993). *Phytophthora cinnamomi as a contributory factor in European oak declines*. In: *Recent advances in studies on oak decline*. (N. Luisi, P. Lerario, A. Vannini, eds.), Brindisi. pp. 49-57.

BRASIER, C.M. (1996). *Phytophthora cinnamomi and oak decline in southern Europe*. Environmental constraints including climate change. An. Sci. For. 53:347-358.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, MN. 562 pp.

GALLEGO, F.J.; DE ALGABA, A.P.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. (1999). *Etiology of Oak Decline in Spain.* Eur. J. For. Path. 29: 17-27.

JEFFERS, N.S.; MARTIN, J.B. (1986). *Comparison of two media selective for Phytophthora and Pythium species*. Plant Dis. 70: 1038-1043.

STEEL, G.D.; TORRIE, J.H. (1985). *Bioestadística: Principios y procedimientos.* Mc Graw-Hill, Bogotá. 622 pp.

TUSET, J.J.; HINAREJOS, C.; MIRA, J.L.; COBOS, J.M. (1996). *Implicación de Phytophthora cinnamomi Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques.* Bol. San. Veg. Plagas 22: 491-499.