

# ETIOLOGÍA DE LAS PODREDUMBRES RADICALES DE PLÁNTULAS DE *QUERCUS* SPP. Y *PINUS HALEPENSIS* EN VIVEROS FORESTALES DE ANDALUCÍA

S. ANDICOBERRY, F. LORA, E. SÁNCHEZ, A. TRAPERO.

Dpto. de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

## RESUMEN

Durante 1998-99, asociado al encharcamiento de los sustratos de cultivo, se produjo la muerte de plántulas de encina y pino carrasco en tres viveros forestales andaluces. En el año 2000 se ha detectado muerte de plántulas de encina, alcornoque, quejigo y coscoja en un cuarto vivero. En todos los casos se constató la presencia de podredumbres extensas de las raicillas absorbentes. En las muestras de 1998-99, a partir del tejido necrótico de las raicillas de encina se obtuvieron una serie de aislados identificados como *Phytophthora cinnamomi*, *P. cryptogea* y *P. drechsleri*. Esta última especie también se aisló en pino carrasco. Sin embargo, de las muestras del año 2000 se ha aislado *Cylindrocarpon didymum*, además de *C. destructans* en quejigo. Se evaluó la patogenicidad de las especies de *Phytophthora* mediante la inoculación de plántulas sanas de encina, alcornoque y pino carrasco. En todos los casos se reprodujeron los síntomas de la enfermedad, resultando la encina la especie más susceptible y *P. cinnamomi* el hongo más patogénico. Las inoculaciones de *Cylindrocarpon* spp. en plántulas de encina y alcornoque también han mostrado la patogenicidad de estos hongos para el género *Quercus*, causando podredumbre radical, defoliación y muerte de plántulas.

**P.C.:** *Cylindrocarpon*, *Phytophthora*, *Quercus coccinea*, *Quercus faginea*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*

## SUMMARY

A disease survey carried out during 1998-99 showed that holm oak (*Quercus ilex*) and Aleppo pine (*Pinus halepensis*) seedlings were affected by damping-off and root rot in three forest nurseries in Andalucía, southern Spain. A similar problem was detected affecting four species of *Quercus* (*Q. coccinea*, *Q. faginea*, *Q. ilex*, and *Q. suber*) in a forest nursery in 2000. Three species of *Phytophthora* (*P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, and *P. drechsleri*) were isolated from holm oak feeder roots, and *P. drechsleri* was isolated from feeder roots of Aleppo pine in the first survey in 1998-99. In the second survey, *Cylindrocarpon didymum* was isolated from the feeder roots of the four *Quercus* spp. assayed, and *C. destructans* was isolated only from *Q. faginea*. Pathogenicity tests were conducted using 1 year-old healthy plants of cork oak, holm oak and Aleppo pine. Isolates of the three *Phytophthora* species were pathogenic to the three host species, inducing root rot and plant death. Holm oak was the most susceptible host and *P. cinnamomi* was the most virulent species. Isolates of *Cylindrocarpon* were pathogenic to cork oak and holm oak causing root rot, yellowing, defoliation, and plant death.

**K.W.:** *Cylindrocarpon*, *Phytophthora*, *Quercus coccinea*, *Quercus faginea*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*

## INTRODUCCIÓN

Desde 1993 hasta 1997 han sido forestadas en Andalucía cerca de 120.000 ha dentro del Programa de Forestación de Tierras Agrarias de 1993 (GÓMEZ-JOVER & JIMÉNEZ, 1997). La calidad de la planta forestal producida por el viverista y su estado fitosanitario van a determinar en gran medida el éxito de la plantación, en cuanto al crecimiento y supervivencia de las especies empleadas (NAVARRO *et al.*, 1998). El desconocimiento existente sobre las principales enfermedades de vivero en este contexto específico, hace necesario un estudio en profundidad sobre su etiología, como primer paso necesario para establecer un control efectivo de las mismas. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido esclarecer la etiología de las micosis que afectan a las plantas de *Quercus* spp. y *Pinus* spp. en los viveros andaluces, así como la caracterización de la sintomatología asociada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Durante 1998-99, asociado al encharcamiento de los sustratos de cultivo, se produjo la muerte de plántulas de encina y pino carrasco en tres viveros forestales andaluces situados en las provincias de Córdoba (un vivero comercial y otro de producción propia para reforestación de una finca particular) y Granada. En el año 2000 se detectó la muerte de plántulas de encina, alcornoque, quejigo y coscoja en un cuarto vivero de la provincia de Almería. Las muestras consistieron en pequeños trocitos de raíz con síntomas de podredumbre que, bajo condiciones asépticas, se sembraron en placas con los medios PDA acidificado (genérico), PARP (específico para hongos pitiáceos) y PARPH (específico para el género *Phytophthora*) (JEFFERS &

MARTIN, 1986; DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Los aislados fúngicos obtenidos fueron identificados según las características macroscópicas de sus colonias y a las características microscópicas de sus estructuras vegetativas y reproductivas. Para la identificación de los aislados obtenidos en los medios selectivos se estimuló la producción de esporangios en el medio de extracto de suelo (RIBEIRO, 1978) a 20° C. Para la producción de gametangios se realizaron cultivos dobles en el medio zanahoria-agar (CA) (DHINGRA & SINCLAIR, 1995) con aislados de referencia de tipo de apareamiento A1 y A2.

**Inoculación de plántones sanos de encina, alcornoque y pino carrasco con aislados de *Phytophthora* spp.:** Los plántones se inocularon añadiendo a los cepellones 100 ml de suspensión acuosa de micelio al tiempo de su trasplante a macetas de plástico. Las plantas se colocaron en umbráculo y se sometieron a saturación hídrica durante 2 días por semana. Se ensayaron 5 aislados procedentes de encina y 1 procedente de pino carrasco. También se realizó un ensayo de inoculación de plántulas sanas de pino carrasco en las mismas condiciones.

**Inoculación de plántones sanos de encina y alcornoque con aislados de *Cylindrocarpon* spp.:** El inóculo se preparó batiendo en agua el contenido de placas de PDA en las que crecían los aislados. Los plántones se inocularon añadiendo a los cepellones 125 ml de inóculo al tiempo de su trasplante a macetas de plástico. Las plantas se colocaron en invernadero y se regaron 2-3 veces por semana, según fuese necesario. Se ensayaron 2 aislados procedentes de encina, 2 de alcornoque, 2 de quejigo, 2 de coscoja y una mezcla de aislados de las cuatro procedencias.

Para todos los experimentos de inoculación se realizaron 6 repeticiones por combinación experimental. Todos los ensayos se dieron por finalizados cuando las plantas inoculadas mostraron la sintomatología de la enfermedad. Se utilizó la escala 0-4 (0=sin síntomas, 1=1-33%, 2=34-66%, 3=67-99%, 4=100% de la parte aérea o raíz muerta) para la evaluación de la severidad de las infecciones (SÁNCHEZ HERNÁNDEZ *et al.*, 1998). A los datos así obtenidos se les aplicó el análisis de la varianza y los valores medios fueron comparados mediante el test LSD (mínima diferencia significativa) protegido de Fisher al nivel de significación P=0,05 (STEEL & TORRIE, 1985).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Sintomatología e identificación de los hongos asociados:** Los síntomas observados en las plántulas de *Quercus* fueron similares en los tres viveros afectados: clorosis y desecación foliar que comenzaba por los márgenes de las hojas, e iba avanzando hasta su completa marchitez. Las plántulas de pino carrasco presentaban una intensa clorosis en las acículas, que evolucionaba hacia un atabacado y total desecación de la parte aérea. En ambos casos los sistemas radicales presentaban necrosis extensas en las raicillas absorbentes. De las muestras de 1997-98 se obtuvieron tres tipos de colonias fúngicas en los medios selectivos PARP y PARPH asociadas a la podredumbre radical en condiciones de encharcamiento (Tabla 1). Todos los aislados pertenecían al género de oomicetos *Phytophthora*. La caracterización de sus estructuras vegetativas y de reproducción sexual y asexual (Tabla 2), ha permitido su adscripción a diferentes especies morfológicas: PV-1 y PV-2, *Phytophthora cinnamomi*; PV-3, PV-4 y PV-6, *P. drechsleri* y PV-5, *P. cryptogea* (ERWIN & RIBEIRO, 1996)(Tabla 1). En las muestras del año 2000, en ausencia de condiciones de encharcamiento de los plántones, sólo se obtuvieron colonias en el medio PDA (Tabla 1). Las características de sus estructuras vegetativas y reproductivas (Tabla 3) se corresponden con las del deuteromiceto *Cylindrocarpon didymum* (BOOTH, 1966), aunque también se han obtenido aislados de *C. destructans* (BOOTH, 1966) a partir de las muestras de quejigo.

Tabla 1. Porcentajes de aislamiento de *Phytophthora* y *Cylindrocarpon* spp. a partir de las raíces necróticas de los plántones de vivero afectados de podredumbre radical

Vivero	Especie afectada	Aislamiento (%)	Aislados purificados <sup>c</sup>	Especie fúngica
V. de producción propia. Córdoba (1998-99)	<i>Quercus ilex</i>	28 <sup>a</sup>	PV1, PV2	<i>Phytophthora cinnamomi</i> A2
Vivero comercial. Córdoba (1998-99)	<i>Quercus ilex</i>	17 <sup>a</sup>	PV3, PV4	<i>Phytophthora drechsleri</i> A2
		34 <sup>a</sup>	PV5	<i>Phytophthora cryptogea</i> A1
Vivero comercial. Granada (1998-99)	<i>Pinus halepensis</i>	12 <sup>a</sup>	PV6	<i>Phytophthora drechsleri</i> A2
Vivero comercial.	<i>Quercus coccinea</i>	53 <sup>b</sup>	CC1, CC2, CC5	<i>Cylindrocarpon didymum</i>
	<i>Quercus faginea</i>	80 <sup>b</sup>	CQ1, CQ3	<i>Cylindrocarpon didymum</i>
		5 <sup>b</sup>	CQ10	<i>Cylindrocarpon destructans</i>

Almería (2000)	<i>Quercus ilex</i>	88 <sup>b</sup>	CE11, CE13, CE14	<i>Cylindrocarpon didymum</i>
	<i>Quercus suber</i>	55 <sup>b</sup>	CA3, CA11, CA12	<i>Cylindrocarpon didymum</i>

<sup>a</sup> Porcentaje de aislamiento en los medios de cultivo específicos PARP y PARPH.

<sup>b</sup> Porcentaje de aislamiento en el medio de cultivo genérico PDA acidificado.

<sup>c</sup> Aislados utilizados para los experimentos de inoculación.

**Patogenicidad:** Las inoculaciones con aislados de *Phytophthora* dieron lugar a la reproducción de los síntomas de la enfermedad observados en vivero. En ningún caso se observó esta sintomatología en las plantas testigo, poniendo de manifiesto el carácter patogénico de todos los aislados ensayados en encina y alcornoque. A partir de las raíces necróticas de las plantas sintomáticas se recuperó el hongo inoculado, mientras que de las raíces de las plantas testigo la recuperación fue nula. Las Figuras 1a y 1b muestran las diferencias de patogenicidad entre los distintos aislados ensayados. Los aislados PV-1 y PV-2 (*P. cinnamomi*) resultaron los más patogénicos, tanto en encina como en alcornoque.

**Tabla 2. Características de las estructuras reproductivas producidas por los aislados de *Phytophthora***

Aislado	Estructuras de reproducción asexual (esporangios) <sup>a</sup>				
	Longitud (L) <sup>b</sup>	Anchura (A) <sup>b a</sup>	(L/A)	Ápices truncados (%)	Tamaño del poro <sup>c</sup>
PV-1	40.2 ± 10.4	31.5 ± 7.1	1.2	80.0	9.5 ± 0.6
PV-2	40.4 ± 10.0	30.7 ± 7.7	1.3	43.3	8.9 ± 1.0
PV-3	34.7 ± 5.8	27.9 ± 3.0	1.2	10.0	9.3 ± 1.1
PV-4	39.9 ± 4.3	30.0 ± 3.5	1.3	73.3	10.0 ± 0.6
PV-5	35.8 ± 3.4	23.5 ± 3.2	1.5	100.0	10.0 ± 0.3
PV-6	41.4 ± 4.4	29.3 ± 2.5	1.4	96.6	10.3 ± 0.7
Aislado	Estructuras de reproducción sexual (gametangios) <sup>d</sup>				
	Diámetro del oogonio (Do) <sup>b</sup>	Grosor de la pared de la oospora <sup>b</sup>	Longitud del anteridio (La) <sup>b</sup>	Do/La	Anteridios bicelulares (%)
PV-1	41.6 ± 4.8	3.8 ± 0.5	18.1 ± 4.4	2.4	23.3
PV-2	39.7 ± 3.3	3.9 ± 0.3	16.3 ± 2.8	2.5	23.3
PV-3	30.1 ± 2.5	4.5 ± 0.8	13.1 ± 1.8	2.3	0
PV-4	30.3 ± 2.1	2.5 ± 0.6	11.7 ± 1.7	2.6	0
PV-5	23.4 ± 2.4	2.2 ± 0.4	19.2 ± 3.1	1.2	0
PV-6	32.8 ± 2.0	2.9 ± 0.8	13.8 ± 0.8	2.4	0

<sup>a</sup> Esporangios producidos en el medio líquido de extracto de suelo a 20° C.

<sup>b</sup> Valores expresados en µm. Cada valor es la media de 30 observaciones ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Media del tamaño de los poros (µm) medidos en los esporangios con ápice truncado.

<sup>d</sup> Gametangios producidos en medio de zanahoria-agar en cultivos dobles con aislados de referencia de *P. cinnamomi* A1 y A2.

**Tabla 3. Características de las estructuras reproductivas producidas por los aislados de *Cylindrocarpon***

Origen de los aislados <sup>a</sup>	Macroconidias				Microconidias			Clamidosporas
	Longitud (L) <sup>b</sup>	Anchura (A) <sup>b</sup>	(L/A)	Nº de septas	Longitud (L) <sup>b</sup>	Anchura (A) <sup>b</sup>	(L/A)	Diámetro <sup>b</sup>
Coscoja ( <i>C. didymum</i> )	30.1 ± 5.2	4.6 ± 0.8	6.6	0-1-2	11.6 ± 3.1	3.1 ± 0.9	3.8	9.1 ± 2.2
Quejigo ( <i>C. didymum</i> )	25.2 ± 6.4	3.7 ± 0.9	7.0	0-1-2	10.8 ± 2.8	2.7 ± 0.6	4.0	9.5 ± 2.9
Encina ( <i>C. didymum</i> )	25.0 ± 6.7	3.8 ± 1.2	6.8	0-1-2	13.2 ± 3.6	3.2 ± 1.1	4.3	10.7 ± 2.4
Alcornoque ( <i>C. didymum</i> )	22.6 ± 5.6	3.4 ± 1.0	6.9	0-1-2	10.6 ± 2.4	2.7 ± 0.5	4.0	10.0 ± 2.4
Quejigo <sup>c</sup> ( <i>C. destructans</i> )	36.2 ± 3.8	6.0 ± 1.2	6.2	1-2-3	9.8 ± 3.3	2.6 ± 0.4	3.8	9.0 ± 2.0

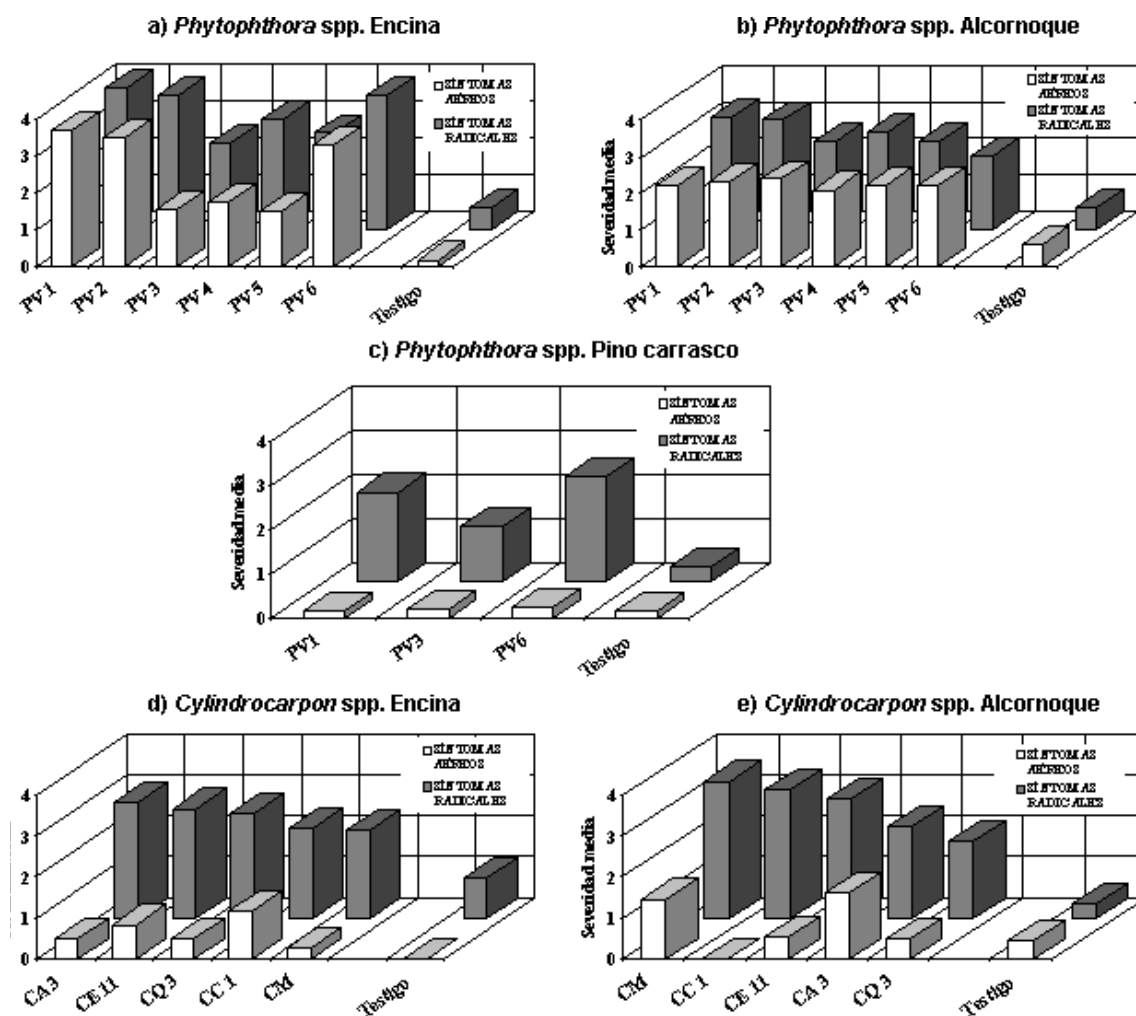
<sup>a</sup> Estructuras reproductivas de 3 aislados de cada origen producidas en el medio PDA a 20° C.

<sup>b</sup> Valores expresados en µm. Cada valor es la media de 50 observaciones por aislado ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Estructuras reproductivas del aislado CQ10 de *C. destructans*.

PV-6 (*P. drechsleri*) también resultó muy patogénico en encina. Las plantas de pino carrasco inoculadas con *P. cinnamomi* (PV1) y con el aislado PV6 de *P. drechsleri* mostraron síntomas más severos que los mostrados por las plantas inoculadas con el aislado PV3 de *P. drechsleri* (Figura 1c). Las

inoculaciones con *Cylindrocarpon* también reprodujeron los síntomas aéreos y radicales de la enfermedad, con porcentajes elevados de recuperación del hongo inoculado a partir de las raicillas necrosadas. Las Figuras 1d y 1e muestran los resultados obtenidos. No se apreció ninguna especificidad en función del origen del aislado inoculado. Así, en encina el aislado más patogénico resultó ser el procedente de alcornoque (CA3), mientras que en este último huésped fue la mezcla de aislados la que produjo una mayor severidad de síntomas radicales. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la susceptibilidad de las dos especies de *Quercus* ensayadas.



**Figura 1.** Ensayos de patogenicidad. Patogenicidad de aislados de *Phytophthora* spp. en encina (a) alcornoque (b) y pino carrasco (c): PV1, PV2: *P. cinnamomi*, PV3, PV4, PV6: *P. drechsleri*, PV5: *P. cryptogea*. Patogenicidad de aislados de *Cylindrocarpon didymum* en encina (d) y alcornoque (e): CA3: aislado de alcornoque, CE11: aislado de encina, CQ3: aislado de quejigo, CC1: aislado de coscoja, CM: mezcla de aislados de los 4 orígenes CC2, CC5, CQ1, CQ10 (*C. destructans*), CE13, CE14, CA11, CA12. La escala utilizada para evaluar la severidad de los síntomas fue 0=sin síntomas, 1=1-33%, 2=34-66%, 3=67-99%, 4=100% del tejido afectado. En todos los casos, los valores de severidad corresponden a la media de 6 repeticiones.

## CONCLUSIONES

Hasta el momento, sólo una especie de *Phytophthora* (*P. cinnamomi*) ha sido descrita como causante de podredumbres radicales en encinas y alcornoques, aunque no en plantones de vivero. En el presente trabajo, además de *P. cinnamomi*, se describe a *P. drechsleri* y *P. cryptogea* como agentes de podredumbre radical tardía de la encina en vivero en condiciones de encharcamiento de los sustratos de cultivo. Además, constituye la primera descripción de *P. drechsleri* como patógeno radical de pino carrasco y de *C. didymum* como agente patógeno de *Quercus* spp. en vivero. También se ha demostrado la patogenicidad potencial de

las tres especies de *Phytophthora* en alcornoque y de *P. cinnamomi* en pino carrasco.

### **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo ha sido financiado por los Proyectos de investigación FO96-006 y 1FD97-0911-CO3-03.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- BOOTH, C. (1966). *The genus Cylandrocarpon*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 56 pp.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. (1995). *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 434 pp.
- ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, MN. 562 pp.
- GÓMEZ-JOVER, F.; JIMÉNEZ, F.J. (1997). *Forestación de tierras agrícolas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 383 pp.
- JEFFERS, N.S.; MARTIN, J.B. (1986). *Comparison of two media selective for Phytophthora and Pythium species*. Plant Dis. 70:1038-1043.
- NAVARRO, R.M.; CAMPO, A.D. DEL; ALEJANO, R.; ÁLVAREZ L. (1998). *Caracterización de calidad final de planta de encina, alcornoque, algarrobo y acebuche en cinco viveros en Andalucía*. Informaciones Técnicas 53/98. Junta de Andalucía, Sevilla. 60 pp.
- RIBEIRO, O. K. (1978). *A source book of the genus Phytophthora*. J Cramer, Vaduz. 417 pp.
- SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, M. E.; RUIZ DÁVILA, A.; PÉREZ DE ALGABA, A.; BLANCO LÓPEZ, M. A.; TRAPERO CASAS, A. (1998). *Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain*. Eur. J. Plant Pathol. 104:347-357.
- STEEL, G.D.; TORRIE, J.H. (1985). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Mc Graw-Hill, Bogotá. 622 pp.