

## HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A CHANCROS Y DESECACIONES DE RAMAS DE *QUERCUS* EN ANDALUCÍA.

J. VENEGAS, A. ROMERO, E. SÁNCHEZ, A. TRAPERO.

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

### RESUMEN

En 1998 se inició el Proyecto Coordinado 1FD97-0911, sobre las causas de la "seca" de los *Quercus* mediterráneos, cuyo objetivo último es la propuesta de actuaciones para paliar su incidencia en el arbolado afectado. Dentro del subproyecto Andalucía, de un total de más de 500 focos de seca localizados en esta Comunidad, se seleccionaron 8 para establecer parcelas de ensayo, localizados en las 4 provincias más afectadas por la seca (Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla). Además de las principales enfermedades asociadas con la seca de *Quercus* (podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomy* el chancro carbonosocausado por *Biscogniauxia mediterranea*) se ha podido observar un síndrome de desecación y marchitez foliar que lleva a la muerte de las ramillas. A partir del tejido cortical necrótico de las ramas se obtuvieron una serie de aislados fúngicos identificados provisionalmente como *Diplodia* sp. A, *Diplodia* sp. B, y *Fusicoccum* sp., todos ellos correspondientes a estados asexuales del género *Botryosphaeria* de los loculoascomicetos. Los experimentos de inoculación artificial de ramas de encina, tanto en condiciones naturales de campo como en condiciones controladas han mostrado la patogenicidad de los aislados y su importancia como agentes contribuyentes de la seca de *Quercus*.

**P.C.:** *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, seca de *Quercus*

### SUMMARY

A coordinated research project on causal factors associated with the decline of Mediterranean *Quercus* spp. was initiated in 1998 in Spain. Part of this project is being developed in Andalucía, southern Spain, where more than 500 *Quercus* decline areas have been located. Eight trial plots were selected representing these areas, including two plots in each of the four provinces more severely affected by decline: Cádiz, Córdoba, Huelva and Sevilla. Besides the two major diseases associated with *Quercus* decline in the Mediterranean basin (root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* and charcoal canker caused by *Biscogniauxia mediterranea*), we observed branch cankers and die-back in most of the plots. Three fungal species were consistently isolated from the affected branches. They were tentatively identified as *Diplodia* sp. A, *Diplodia* sp. B, and *Fusicoccum* sp., all anamorphs of the loculoascomycetous genus *Botryosphaeria*. Isolates of the three species were pathogenic to holm oak causing canker of branches under controlled conditions and in the field. The wide distribution of these pathogens suggests that they may act as contributing factors in the *Quercus* decline in Andalucía.

**K.W.:** *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Quercus* decline

### INTRODUCCIÓN

En los años 80 surgió la alarma en España y Portugal por la incidencia y rápida expansión de un síndrome de decaimiento y muerte del arbolado denominado "seca de encinas y alcornoques" o "seca de los *Quercus*". Este síndrome afecta principalmente a *Quercus suber* (alcornoque) y *Q. ilex* (encina), aunque también se ha observado en otras especies del género y en leñosas asociadas a los *Quercus* (MONTROYA, 1994).

Actualmente la seca de los *Quercus* es un problema fitosanitario de gran envergadura en España, puesto que por su gravedad amenaza seriamente la persistencia de ecosistemas forestales tan frágiles y de tanto potencial productivo como son las dehesas y alcornoques. La preocupación por el problema de la seca llevó a que en 1995 la Unión Europea patrocinara un Proyecto de Investigación (PHYODE) que tenía por objeto esclarecer su etiología. Los resultados obtenidos muestran que se trata de un síndrome de etiología compleja en el que se han identificado toda una serie de factores asociados, si bien la podredumbre radical asociada al hongo *P. cinnamomi* aparece como el principal componente (TUSET *et al.*, 1996). En 1999 se inició el Proyecto Coordinado 1FD97-0911, cuyo objetivo último es la propuesta de actuaciones para paliar la incidencia de la seca en el arbolado

afectado. Dentro del subproyecto Andalucía, de un total de más de 500 focos de seca localizados en esta Comunidad, se seleccionaron 8 para establecer parcelas de ensayo. Los focos se localizan en las 4 provincias más afectadas por la seca (Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla), y representan la multiplicidad de situaciones climáticas, edáficas, culturales y de aprovechamiento que se dan en Andalucía.

El primer paso ha consistido en el diagnóstico de las enfermedades presentes en cada una de las parcelas. En este sentido, además de las principales enfermedades asociadas con la seca de *Quercus* (la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* y el chancro carbonoso debido a *Hypoxyton mediterraneum*) se ha podido observar otro tipo de chancro que lleva a la muerte de las ramillas. En ocasiones también se observó la presencia de cóccidos en las ramillas afectadas. El objetivo del presente trabajo ha sido identificar las especies fúngicas aisladas consistentemente de estos chancros, así como determinar su patogenicidad y su papel como agentes contribuyentes de la seca de *Quercus*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las prospecciones de campo se llevaron a cabo en 8 fincas de encina y alcornoque afectadas de seca y situadas en las provincias de Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla. En cada finca se seleccionó una parcela de muestreo de 4 ha. en un foco de seca representativo de la zona. Tras consignar la sintomatología asociada a la desecación de ramas, en abril-mayo de 2000 se realizó una primera toma de muestras en un total de 4 árboles sintomáticos por parcela. En noviembre-diciembre de 2000 se realizó un segundo muestreo en las mismas fincas, excepto en las situadas en la provincia de Cádiz, eligiendo otros 12 árboles sintomáticos por parcela. Las muestras consistieron en segmentos de ramas afectadas de chancro de 20-25 cm de longitud (3 ramas por árbol en la 1ª prospección y 4 ramas por árbol en la 2ª). Estas muestras se lavaron cuidadosamente y, tras retirar la corteza externa con un escalpelo estéril, se tomaron cuñas de tejido cortical en condiciones asépticas y se sembraron en el medio PDA acidificado con ácido láctico (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Las placas se incubaron a 22° C bajo luz/oscuridad. También se incluyeron en el estudio una serie de muestras de chancros del tronco procedentes de alcornoques descorchados en los años 1999 y 2000 en una finca de Cádiz (Ojén). Los trozos de corteza necrótica se incubaron en cámara húmeda a 22° C bajo luz/oscuridad durante una semana.

**Caracterización de los aislados:** Las colonias fúngicas consistentemente aisladas de los chancros de ramas fueron agrupadas en función de la morfología de sus colonias en PDA e identificadas en base a las características de sus estructuras de reproducción asexuales. La especie fúngica asociada a los chancros del tronco se identificó a partir de los ascomas maduros presentes en las muestras tras su incubación en cámara húmeda. Posteriormente se prepararon cultivos monoascospóricos en PDA, que fueron incubados igualmente a 22° C bajo luz/oscuridad. La identificación del estado anamórfico así obtenido se realizó en base a la morfología de las estructuras de reproducción asexual presentes en las placas.

**Ensayos de patogenicidad:** De los aislados consistentemente asociados a la necrosis cortical de ramas de *Quercus*, se eligieron dos de cada grupo morfológico para realizar experimentos de inoculación.

*Experimento 1.* Se llevó a cabo en condiciones controladas sobre ramas (entrenudos) de 16 a 32 cm de longitud y diámetro entre 6 y 15 mm, procedentes de encinas sanas situadas en la finca Viñuela Alta (Córdoba). Inmediatamente después de cortar las ramas se sellaron ambos extremos para evitar su desecación. El inóculo consistió en discos de agar en los que los aislados crecían activamente. La inoculación tuvo lugar mediante la aplicación del disco de agar sobre una herida de igual diámetro que el disco, previamente practicada con un sacabocados estéril. Los puntos de inoculación, situados hacia la mitad de la rama, se sellaron para evitar la desecación de los discos de agar. Los testigos se trataron de igual manera que las ramas inoculadas, excepto por la ausencia de micelio en los discos de agar. Tanto las ramas inoculadas como las ramas testigo, se incubaron en cámaras de crecimiento a distintas temperaturas (15, 20, 25 y 30° C) en luz/oscuridad (12 h / 12 h) en el interior de cámaras húmedas. Se prepararon 6 repeticiones por cada aislado y temperatura de incubación, siendo la unidad experimental la rama inoculada.

*Experimento 2.* Se realizó en condiciones de campo. Para ello se seleccionó una parcela experimental constituida por matas de encina sanas en la finca Viñuela Alta (Córdoba). Se inocularon

ramas al azar con los mismos aislados, tipo de inóculo y técnica de inoculación que en el experimento anterior. También se realizaron 6 repeticiones por aislado inoculado, siendo la unidad la rama inoculada.

Los experimentos de inoculación se dieron por terminados cuando las ramas inoculadas mostraron los síntomas de la enfermedad. Como medida de la severidad de síntomas se eligió el cociente entre la longitud de la lesión cortical producida por el aislado (mm) y el tiempo transcurrido hasta alcanzar esa longitud (semanas). 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). Tras la evaluación de los síntomas, se tomaron muestras de los chancros y se sembraron en placas con el medio PDA acidificado para verificar el reaislamiento del hongo inoculado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 8 parcelas muestreadas, en la 1ª prospección se detectó la muerte de ramas asociada a la presencia de chancros en 4 de ellas. Sin embargo, en la 2ª prospección las 6 fincas prospectadas mostraron los síntomas de la enfermedad. Además, en la finca "La Pizarra" (Huelva) se observó la asociación entre la presencia de cóccidos parasitando las ramas y la aparición de chancros. Estas mismas encinas no mostraron ningún tipo de chancro ni de insecto asociado en la 1ª prospección.

**Descripción del síndrome:** En las 8 parcelas muestreadas, la sintomatología de la enfermedad resultó similar: desecación y marchitez foliar desde el extremo distal de la rama hacia su base, por lo que se puede hablar de un síndrome de muerte regresiva. Las hojas marchitas quedan unidas durante algún tiempo a la rama. En los casos en los que la sintomatología foliar descrita estuvo asociada a la presencia de chancros en las ramas, éstos no dieron lugar a un cambio de color evidente con respecto al tejido cortical sano. Sin embargo, la retirada de la corteza externa permite apreciar al chancro como una zona necrótica, de color oscuro y aspecto seco, claramente delimitado del tejido sano, de color amarillo verdoso. Los chancros pueden llegar a anillar la rama y producir su muerte. En los chancros más viejos la corteza necrótica aparece agrietada, y en estas zonas es donde se localizan los picnidios, que aparecen como pústulas oscuras de las que emergen masas conidiales blanquecinas u oscuras en condiciones de elevada humedad ambiental. Estos chancros sólo se han observado en ramas de diámetro inferior a 3 cm.

**Aislamiento e identificación de *Botryosphaeria* spp.:** Las muestras de tejido cortical necrótico dieron lugar a colonias fúngicas en PDA con altos porcentajes de aislamiento (Tabla 1). Estas colonias resultaron morfológicamente similares, de color verde oliva, en ocasiones muy oscuro, de aspecto compacto y con bordes bien delimitados, aunque el color y la abundancia de micelio aéreo a los 15 días de crecimiento las dividía claramente en 3 grupos, colonias oscuras con micelio aéreo escaso (54 aislados), colonias claras y micelio aéreo muy abundante (47 aislados) y colonias oscuras y micelio aéreo abundante (11 aislados). En las dos fincas de Córdoba y en una de Sevilla se han podido aislar los tres tipos morfológicos a partir de las ramas afectadas. Sin embargo, en otros casos únicamente se han aislado dos tipos morfológicos o solamente uno (Tabla 1). La caracterización morfológica de 6 aislados elegidos entre los conservados de cada uno de los tres grupos, permitieron la identificación de los hongos como *Diplodia* sp. A (= *Dothiorella* sp.), *Diplodia* sp. B (posiblemente *D. mutila*) (SUTTON, 1980) y *Fusicoccum* sp., anamorfos del género de loculoascomicetos

Tabla 1. Aislamiento de hongos a partir de chancros en ramas de *Quercus*

FINCA	sp <sup>a</sup>	Hongos aislados											
		<i>Diplodia</i> sp. A				<i>Diplodia</i> sp. B				<i>Fusicoccum</i> sp.			
		1°		2°		1°		2°		1°		2°	
		Prospección		Prospección		Prospección		Prospección		Prospección		Prospección	
Inc <sup>b</sup>	Ais <sup>c</sup>	Inc	Ais	Inc	Ais	Inc	Ais	Inc	Ais	Inc	Ais		
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
La Rozuela (CO)	E	0	0	12.5	83.3	75	73.8	16.6	54.1	8.3	45	4.2	49.9
Viñuela Alta (CO)	E	0	0	27.7	65	0	0	16.6	52.7	100	28	0	0

<b>Los Labrados (SE)</b>	A	- <sup>d</sup>	-	4.2	58.3	- <sup>c</sup>	-	6.3	66.6	-	-	2.1	100
<b>Las Navas (SE)</b>	E	-	-	0	0	-	-	8.3	41.6	-	-	4.2	66.6
<b>La Pizarra (HU)</b>	E	-	-	50	75	-	-	0	0	-	-	0	0
<b>Encarnación (HU)</b>	E	33.3	81.5	20	37.5	41.6	28.3	10	33.3	0	0	0	0
<b>Mogea Luenga (CA)</b>	A	100	63.5	( ) <sup>e</sup>	( )	0	0	( )	( )	0	0	( )	( )
<b>San Carlos (CA)</b>	A	-	-	( )	( )	-	-	( )	( )	-	-	( )	( )

<sup>a</sup>sp = especie dominante: A, alcornoque; E, encina.

<sup>b</sup>Inc = incidencia, porcentaje de ramas afectadas de chancro de las que se aisló el hongo correspondiente.

<sup>c</sup>Ais = porcentaje de aislamiento en PDA acidificado de cada uno de los hongos a partir del tejido necrótico de las ramas afectadas.

<sup>d</sup> = no se observaron ramas con chancro.

( )<sup>e</sup> = no se tomaron muestras.

*Botryosphaeria*. La identificación se basó en la correspondencia entre la morfología de la colonia y las características de sus picnidios y conidias (Tabla 2) con las descripciones de VON ARX & MÜLLER (1975), PUNITHALINGAN & HOLLIDAY (1978), SUTTON (1980), SIVANESAN (1984) y JACOBS & REHNER (1998). Por el momento, no se ha observado la producción de estructuras de reproducción sexual en cultivo artificial ni en ramas naturalmente infectadas.

**Tabla 2. Caracterización de las conidias de los hongos aislados de chancros de ramas**

Hongo		Longitud (µm)	Anchura (µm)	Long/anch	Nº septas
<i>Diplodia</i> sp. A	Conidias septadas	27.3 ± 2.2 <sup>a</sup>	14.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.2	1
	Conidias aseptadas	27.9 ± 2.7	13.2 ± 1.5	2.1 ± 0.3	0
<i>Diplodia</i> sp. B		23.9 ± 2.1	9.4 ± 1.1	2.6 ± 0.3	1
<i>Fusicoccum</i> sp.		22.6 ± 3.4	4.5 ± 0.8	5.2 ± 1.1	0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Los valores, en µm, corresponden a la media de 6 aislados de cada hongo (50 conidias por aislado) ± desviación estándar.

De las muestras de chancro del tronco de la finca Ojén (Cádiz), sólo se obtuvieron ascomas maduros en las correspondientes a los alcornocues descorchados en 1999. Estos cuerpos oscuros (pseudotecas) contenían ascas alargadas, bitunicadas, con 8 ascosporas hialinas y aseptadas, aunque también se observaron ascosporas oscuras y con una septa. Todas las características observadas se corresponden con la especie *Botryosphaeria quercuum* (SIVANESAN, 1984). Las colonias obtenidas de los cultivos monoascospóricos (26 en total) presentaban idéntica morfología que las de los aislados de *Diplodia* sp. A procedentes de ramillas. Igualmente, las características de picnidios y conidias no difirieron de las ya descritas para esta especie.

**Patogenicidad:** Los dos aislados de *Diplodia* sp. A, *Diplodia* sp. B y *Fusicoccum* sp. ensayados reprodujeron los síntomas de la enfermedad en todos los casos, dando lugar a la aparición de chancros en las ramas inoculadas. Los resultados aparecen en la Tabla 3. En ningún caso se apreció síntoma alguno en las ramas testigo. El análisis global de la varianza mostró diferencias significativas en la severidad de síntomas, expresada como el cociente entre la longitud del chancro (mm) y el tiempo de incubación tras la inoculación (4 semanas), en función del aislado inoculado y de

la temperatura de incubación, así como para la interacción de ambas variables. Los aislados DOA-1 y DOE-1 (*Diplodia* sp. A) produjeron

**Tabla 3. Severidad de síntomas en ramas de *Quercus ilex* inoculadas con *Diplodia* sp. A, *Diplodia* sp. B y**

***Fusicoccum* sp.<sup>a</sup> e incubadas a distintas temperaturas**

Temperatura de incubación	Aislados inoculados <sup>b</sup>					
	DOE-1	DOA-1	DE-14	DE-27	FE-2	FE-5
15° C	47 <sup>a</sup>	51	23	33	15	4
20° C	45	46	25	39	20	12
25° C	48	45	37	50	31	50
30° C	45	44	40	36	42	33

<sup>a</sup>La severidad de síntomas viene expresada como el cociente entre la longitud del chancro (mm) y el tiempo de incubación tras la inoculación (4 semanas)

<sup>b</sup>DOE-1, DOA-1 = Aislados de *Diplodia* sp. A; DE-14, DE-27 = Aislados de *Diplodia* sp. B; FE-2, FE-5 = Aislados de *Fusicoccum* sp.

una mayor severidad de síntomas que el resto de aislados; mientras que los dos aislados de *Fusicoccum* junto con el aislado DE-14 de *Diplodia* sp. B, dieron lugar a una severidad significativamente menor que los demás. Las temperaturas más altas (25 y 30° C) resultaron las más favorables para el desarrollo del chancro para todos los aislados ensayados. Los análisis de la varianza individualizados por temperaturas mostraron que las diferencias de patogenicidad entre aislados sólo son significativas a 15 y 20° C, mientras que a 25 y 30° C todos los aislados resultan igualmente agresivos. La recuperación del hongo inoculado a partir del tejido necrótico de los chancros fue muy elevada, pudiéndose obtener a lo largo de toda la longitud del chancro.

Previamente se había descrito la asociación de especies de *Diplodia* con la muerte de ramas de encina en Andalucía (RUPÉREZ & MUÑOZ, 1980) y de *D. mutila* causando muerte de ramas de alcornoque en Cataluña (LUQUE & GIRBAL, 1989). Nuestros resultados muestran la patogenicidad de las 3 especies obtenidas a partir de los chancros de ramillas de *Quercus* afectados de seca, por lo que pueden ser considerados como agentes contribuyentes del decaimiento en Andalucía.

### AGRADECIMIENTOS

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

### BIBLIOGRAFÍA

- ARX, J.A. VON; MÜLLER, E. (1975). *A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera*. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, Baarn. 159 pp.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. (1987). *Illustrated genera of imperfect fungi*. MacMillan Publishing Company, New York. 218 pp.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. (1995). *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 434 pp.
- JACOBS, K.A.; REHNER, S.A. (1998). *Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of Botryosphaeria and related taxa*. Mycologia 90:601-610.
- LUQUE, J.; GIRBAL, J. (1989). *Dieback of cork oak (Quercus suber) in Catalonia (NE Spain) caused by Botryosphaeria stevensii*. Eur. J. For. Path. 19:7-13.
- MONTOYA, J.M. (1994). *¿Qué es la “seca de los Quercus”?* Actas de la X Reunión Anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parque y Jardines, Madrid. 4 pp.
- PUNITHALINGAM, E.; HOLLIDAY, P. (1973). *Botryosphaeria ribis*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. 395. 2 pp
- RUPÉREZ, A.; MUÑOZ, M. (1980). *Grave enfermedad de las encinas*. Bol. San. Veg. Plagas 6:107.
- SIVANESAN, A. (1984). *The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs*. J.Cramer, Vaduz. 701 pp.
- STEEL, G.D.; TORRIE, J.H. (1985). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Mac Graw-Hill,

Bogotá. 622 pp.

SUTTON, B.C. (1980). *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 696 pp.

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