

ENSAYOS SOBRE RESISTENCIA DE CASTAÑOS FRENTE A LA TINTA¹

R.A. VAZQUEZ RUIZ DE OCENDA*, S. PEREIRA LORENZO** & J. FERNANDEZ LOPEZ***

* DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL. ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR, UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA. CAMPUS DE LUGO, 27002 LUGO

** DEPARTAMENTO DE PRODUCCION VEGETAL. ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR. UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA. CAMPUS DE LUGO, 27002 LUGO.

*** CENTRO DE INVESTIGACIONES FORESTALES. APDO. 127. 36080 LOURIZAN (PONTEVEDRA)

RESUMEN

La tinta, producida por *Phytophthora cinnamomi* Rands y *P. cambivora* (Petri) Buisman, es una de las enfermedades más importantes que afectan al castaño y constituye uno de los principales problemas en los cultivos de castaño del NW de la Península Ibérica.

En este trabajo se presentan los primeros resultados obtenidos utilizando distintos métodos de selección por resistencia a *Phytophthora* spp. en material clonal de castaños, realizados sobre planta entera, estaquillas y hojas.

P.C.: Fitopatología, *Castanea*, Tinta, *Phytophthora*, Mejora Genética

SUMMARY

Ink disease is caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands and *P. cambivora* (Petri) Buisman and it is one of the most important chesnut diseases at the NW of Spain.

This work deals with the methodology of selection for ink disease resistance from several *Castanea* clones. Used material was developed plant, cuttings and leaves.

K.W.: Plant Pathology, *Castanea*, Ink disease, *Phytophthora*, Plant breeding

INTRODUCCION

El castaño europeo (*Castanea sativa* Mill) es altamente sensible a la enfermedad producida por los hongos *Phytophthora cinnamomi* Rands y *P. cambivora* (Petri) Buisman. Desde que en 1940 D. Pedro Urquijo iniciara en la Estación de Fitopatología Agrícola de La Coruña el estudio de los hongos causantes de la tinta, numerosos han sido los trabajos realizados en este país con el fin de encontrar castaños resistentes (URQUIJO, 1943; VIEITEZ, 1966; VIEITEZ *et al.*, 1986). Sin dejar de lado la búsqueda de clones de castaño autóctono (*C. sativa*) resistentes a la enfermedad de la tinta (ABREU *et al.*, 1993), esta resistencia se ha buscado preferentemente mediante la obtención de castaños híbridos procedentes de cruces con

¹ Este trabajo ha sido financiado por el INIA dentro del Proyecto SC95-013-C2-1.

especies orientales (*C. crenata* Sleb & Zucc. y *C. mollissima* Blume). Sin embargo, dichas especies poseen algunas características poco deseables con respecto a las variedades autóctonas, por lo que la búsqueda de híbridos va encaminada a seleccionar aquellos que reúnan a la vez que los mejores caracteres para su uso forestal o frutal, o bien para su utilización como portainjerto, una elevada resistencia frente a la tinta (FERNANDEZ-LOPEZ, 1996).

A lo largo de los años se han ensayado diversas técnicas de inoculación sobre raíces y tallos para determinar la resistencia de las variedades e híbridos de castaño. La inoculación sobre raíces y cuello de las plantas, a pesar de su alta fiabilidad, puede presentar problemas de manejo cuando se trabaja con gran cantidad de material, además de precisarse en período relativamente largo de tiempo para obtener resultados (SCHAD *et al.*, 1952). Sin embargo, la inoculación sobre fragmentos vegetales (hojas o estaquillas) permite trabajar con un mayor volumen de material y se consigue una alta fiabilidad si tenemos en cuenta el estado fisiológico del vástago y la posición que ocupa en la planta el fragmento a utilizar (SALESES *et al.*, 1993a).

En este trabajo se presentan los primeros resultados obtenidos aplicando distintos métodos de selección por resistencia a *Phytophthora* en material clonal de castaños, a partir de planta entera, estaquillas y hojas.

MATERIAL Y METODOS

1) Test sobre planta entera en vivero. Se utilizaron 41 clones: dos de *C. sativa* (CHR159 y CHR76); tres de *C. crenata* (B9, B32 y B33); 18 híbridos interespecíficos F1 y 18 F2. Además se utilizaron 4 plantas de semilla de *C. sativa* de polinización abierta (CS-LU-1, GARRID39, LOURO10, LOURO11 y NEGRAL-5).

Todas las plantas se situaron en bloques al azar sobre una parcela experimental de un vivero que presenta el suelo infestado por *Phytophthora* (P-Lou) de forma natural y con un largo historial de problemas ocasionados por la tinta. La plantación se efectuó a mediados del mes de Marzo de 1996. Se realizaron siete lecturas a partir del mes de Julio hasta finales de Noviembre. En las observaciones se tuvieron en cuenta la frecuencia de marras acumuladas en cada fecha (FAi).

2) Test sobre fragmentos de planta. Como material vegetal de partida se tomaron una serie de híbridos interespecíficos (*C. sativa* x *C. crenata*), teniendo como testigo resistente un clon de *C. crenata* (HLR-2) y como testigos sensibles dos clones de *C. sativa* (25 y 41). En total se estudiaron 16 clones.

Estos clones han sido sometidos a diferentes métodos de evaluación de su resistencia a la tinta diseñados por Saleses *et al.* (1993a) y puestos a punto por nosotros:

a.- Inoculación sobre estaquillas.

b.- Inoculación sobre hojas.

* *El inóculo.* Tras un ensayo previo realizado con cepas de distintos orígenes, se seleccionaron por su virulencia 2 cepas de *Phytophthora*: una procedente de un aislamiento propio (P-Lou) y otra de la CentraalBureau voor Schimmelcultures (*P. cinnamomi* CBS 34272). Estos hongos se mantuvieron sobre medio sintético (Agar extracto de Malta alternando con Corn Meal Agar) en estufa a 20 °C. El inóculo lo constituyeron "pastillas" tomadas, con un sacabocados de 5 mm de diámetro, de la periferia de un cultivo del patógeno de unos 8 ó 10 días de crecimiento. Como testigo se utilizaron pastillas del medio de cultivo estéril.

a.- *Inoculación sobre hojas.* Se tomaron las muestras entre la 6ª y la 10ª hojas contada a partir de la yema apical de los tallos jóvenes en crecimiento (<1 m). De las hojas se cortaron discos de 40 mm de diámetro, dejando en la parte central el nervio principal. Estos fragmentos

se colocaron sobre papel de filtro humedecido en placas petri de 9 mm de diámetro. El inóculo se aplicó sobre el limbo previamente herido con un bisturí. Se dispusieron 12 hojas por clon.

b.- *Inoculación sobre estaquillas*. Los fragmentos, de unos 30 cm de longitud, se tomaron por debajo de la 6ª hoja de tallos en crecimiento. Las estaquillas se dejaron con 3 ó 4 hojas recortadas y se situaron en bandejas con perlita. El inóculo se dispuso sobre la parte superior de la estaquilla y se tapó con papel de aluminio para evitar una rápida deshidratación. Se utilizaron 15 estaquillas por clon, repartidas en 5 bloques al azar.

Todas las inoculaciones se realizaron en la misma época (finales de Junio - principios de Julio de 1996). Después de las inoculaciones tanto hojas como estaquillas se pusieron en condiciones de alta humedad relativa (>90 %) y temperaturas inferiores a 30° C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Las observaciones en el caso de las hojas se realizaron a los 4 días, midiéndose la longitud de la necrosis (en mm) alcanzada a lo largo y a lo ancho del nervio principal.

En el caso de las estaquillas, la evaluación se efectuó a los 14 días y los resultados se expresaron como longitud media (en mm) de las necrosis.

* *Análisis estadístico*. A partir de los resultados obtenidos con los ensayos sobre planta entera en vivero se realizó un análisis de la varianza ANOVA para determinar el porcentaje de la varianza debida a Taxon, a Clon (Taxon) y al error.. Con los resultados obtenidos a partir de las inoculaciones en hojas y estaquillas se realizó otro análisis de la varianza.

Finalmente, se calcularon las correlaciones entre los resultados obtenidos en el ensayo en hojas y los obtenidos en el ensayo en estaquillas utilizando el PROC CORR del paquete estadístico SAS (1988). Asimismo se establecieron correlaciones con los resultados obtenidos en planta entera.

RESULTADOS

- *Inoculaciones en planta entera*. En la Tabla 1 se presenta el análisis de la varianza ANOVA. En ella se observa una mayor variabilidad inicial entre clones que dentro de taxon.

En la Tabla 2 se muestra el Test de comparación de medias entre táxones (SNK= Student-Newman-Keuls, $P= 0.05$) y, excepto para la primera observación (FA1), se observan diferencias significativas entre los taxones (CS, Cc, CcxCs). Sin embargo, las diferencias entre clones son muy variables como se puede observar en la Tabla 3.

- *Inoculaciones en hojas y estaquillas*. La Tabla 3 muestra la diferente sensibilidad de algunos de los clones estudiados según los diferentes ensayos. En la Tabla 4 encontramos la variabilidad entre los distintos clones, mostrando claramente la susceptibilidad de los Cs. Sin embargo, el clon de Cc (HLR-2), teóricamente resistente, se comportó también con una elevada sensibilidad a *Phytophthora* spp. En lo que respecta a los tratamientos, la cepa propia (P-Lou) se ha mostrado significativamente ($p= 0.0001$) más virulenta que la procedente de la colección de cultivos (CBS 34272) en las inoculaciones sobre estaquillas, mientras que no se han observado diferencias en los ensayos sobre hojas. En ningún caso se han observado necrosis en las inoculaciones realizadas con el medio de cultivo estéril (testigo).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados en planta entera (Tabla 1) nos indican que en la mortalidad observada en la primera evaluación (29Jul) la influencia del taxon es menor que la que recoge el clon. La elevada mortalidad inicial (FA1) probablemente sea debida no sólo al ataque de *Phytophthora* (P-Lou) sino también a las marras ocasionadas por el trasplante, de ahí que no se observen diferencias significativas entre los distintos taxones. Una evaluación anterior (finales de

marzo/abril) hubiera permitido separar este efecto. En las siguientes observaciones (FA2-FA3) la variación entre taxon aumenta ligeramente y esta tendencia se observa mejor en la Tabla 2 de comparación de medias. Las diferencias significativas entre los distintos taxones: *Castanea sativa* (Cs) y *Castanea crenata* (Cc) y los híbridos interespecíficos (Cc x Cs), quedan marcadas a partir de la tercera observación (FA3). Posteriormente (FA4= 3Oct) se observa como un estancamiento de la mortalidad que podría estar relacionado con el descenso de temperaturas y la parada vegetativa.

En general, los resultados obtenidos hasta el momento en el trabajo de vivero (Tabla 3) han sido coherentes con el comportamiento predefinido para el taxon Cc (resistente a la tinta). Los híbridos interespecíficos (Cc xCs) muestran una mayor variabilidad debido seguramente a la existencia de clones desde muy sensibles a muy resistentes. El hecho de que el taxon Cs presente una mayor varianza parece indicar que existen ciertas posibilidades de selección. Así, este taxon presentó en general una elevada susceptibilidad, con excepción del clon CHR76 que hasta el momento se ha mostrado resistente.

Por el contrario, en las inoculaciones sobre estaquilla y hojas, el testigo resistente HLR-2 (Cc) no se comportó como tal, mostrando una sensibilidad similar a la observada por los clones de Cs (Tabla 4). Esto podría interpretarse como respuesta hipersensible (SALESES *et al.*, 1993b) aunque, en nuestro caso, tal extremo no se ha demostrado.

En cuanto a los análisis de correlaciones, se ha obtenido un valor de correlación relativamente bajo (datos no representados) entre los ensayos de estaquillas y hojas pero, teniendo en cuenta el número de clones estudiados (bajo), se trata de un valor interesante. Finalmente, no se ha obtenido correlación entre los resultados obtenidos sobre fragmentos de plantas y los de vivero. Una de las causas hay que buscarla en el número bajo de repeticiones (bloques y plantas) situados en el vivero.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos indican la necesidad de:

a) incrementar el número de plantas por clon en los ensayos de vivero para que estos sean representativos;

b) efectuar una primera evaluación de la mortalidad a los 15 días de realizar la plantación en vivero para evitar el efecto de las marras de plantación; asimismo, deberían realizarse más evaluaciones con anterioridad al verano, finalizando las mismas en el mes de Septiembre o inicios de Octubre;

c) realizar más ensayos en condiciones controladas con el fin de conocer la diferente sensibilidad de las estaquillas y hojas por clon a las inoculaciones con *Phytophthora* spp.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABREU, C.A.; COLAÇO, J.A.; LOPES GOMES, A.; CARDOSO, A.O. & GOUVEIA, E.M. (1993). Clones Autoctones de Castanheiro Resistentes a Doença da Tinta. *Cadernos da Área de Ciências Agrárias*. 13, 91-97.

FERNANDEZ LOPEZ, J. (1996). *Variabilidad isoenzimática, morfológica y selección clonal en C. sativa Miller, C. crenata, C. mollissima e híbridos interespecíficos*. Tesis doctoral (inéd.). Universidad Politécnica de Madrid. ETSIM. 212 pp.

SALESSES, G.; RONCO, L.; CHAUVIN, J-E. & CHAPA, J. (1993a). Amélioration Génétique du Chataignier. Mise au point de tests d'évaluation du comportement vis-à-vis de la maladie de l'encre. *L'Arboriculture Fruitière* 458: 23-31.

SALESSES, G; CHAPA, J & CHAZERANS, P. (1993b). Screening and breeding for ink disease resistance. *Proceedings of the International Congress of Chestnut*. Spoleto, October 20-23., 545-549.

SCHAD, C.; GREENTE, J. & SOLIGNAT, G. (1952). Recherches sur le châtaigner à la station de Brive. *Annales de L'INRA* n°3: 369-458.

URQUIJO, P. (1943): *Memoria de la Estación de Fitopatología agrícola de La Coruña del año 1942*, n°23, 13-43.

VIEITEZ, E. (1966). Resistencia a la *Phytophthora cambivora* y *P. cinnamomi* de algunas variedades de castaño. *ANALES del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias* I: 61-74.

VIEITEZ, J.; BALLESTER, A.; MANTILLA, J.L.G. & VIEITEZ, E. (1984). Sobre la resistencia del castaño a *Phytophthora cinnamomi* y *Ph. cambivora*. *Congreso Internacional sobre el Castaño* (Lourizán, 1984): 217-226.

	FA1 29Jul	FA2 2Sept	FA3 17Sept	FA4 30Octu	FA5 21Octu	FA6 7Novi	FA7 25Novi
Taxon (T)	3.8 (.19)	4.4 (.18)	6.5 (.1)	8.1 (.07)	8.3 (.07)	8.3 (.07)	8.3 (.07)
Clon (C)	19.0(.08)	27.7(.03)	21.5(.06)	21.3(.06)	21.1(.06)	21.1(.06)	21.1(.06)
error	77.2	70.4	71.9	71.3	70.6	70.6	70.6

Tabla 1. Frecuencia de la varianza del tratamiento marras por *Phytophthora* (P-Lou) en vivero para los orígenes de variación Taxon y Clon (Taxon).

Taxon	n	FA1	FA2	FA3	FA4	FA5	FA6	FA7
Cs	13	0.30a	0.34a	0.38a	0.42a	0.42a	0.42a	0.42a
CcxCs (F ₂)	34	0.23a	0.23ab	0.23ab	0.23ab	0.23ab	0.23ab	0.23ab
CcxCs	39	0.11a	0.13ab	0.13b	0.14b	0.14b	0.14b	0.14b
Cc	6	0.08a	0.08b	0.08b	0.08b	0.08b	0.08b	0.08b

Tabla 2. Frecuencia de marras acumuladas por taxon en el ensayo de plantas en vivero. Las medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de comparación de medias de Student-Newman-Keuls (SNK), $P= 0.05$.

CLON	ESTAQUILLA	HOJA	VIVERO ¹
CA-07 (Cc xCs)	86	70	50
CA-15 (Cc xCs)	41	57	0
CHR149 (Cc xCs)	76	87	0
CHR168 (Cc xCs)	71	78	25
CHR177 (Cc xCs)	60	65	0
CHR22 (Cc xCs)	51	0	50
CHR27 (Cc xCs)	38	91	50
CHR33 (Cc xCs)F ₂	24	-	25
CHR34 (Cc xCs)	-	100	0
B32 (Cc)	-	-	0
HLR-2 (Cc)	88	57	-
CS-LU-1 (Cs)	-	-	75
25 (Cs)	100	65	-

Tabla 3. Resultados (%) de la sensibilidad a *Phytophthora* spp. de distintos clones y especies según los tres tipos de ensayo efectuados.¹Datos correspondientes a la última evaluación (FA7)

Clon	Valor medio de la necrosis (mm)		
	Longitud estaquillas	Long. hoja	Ancho hoja
25 (Cs)	192.2a	15.3ab	6.7ab
19 (CcxCs)	180.8a	14.7ab	5.0ab
41 (Cs)	179.0a	19.4a	2.8b
HLR-2 (Cc)	168.9ab	12.8ab	12.8ab
CA-07 (CcxCs)	166.1ab	16.2ab	9.3ab
RH-13 (CcxCs)	162.3ab	10.0ab	10.0ab
125 (CcxCs) (F ₂)	156.5ab	22.4a	18.5a
CHR149 (CcxCs)	145.4abc	19.7a	11.6ab
CHR168 (CcxCs)	136.5abc	17.5ab	2.8b
CHR177 (CcxCs)	114.7bcd	15.3ab	7.6ab
CHR32 (CcxCs)	97.8cde	0.0b	0.0b
HS (CcxCs) (F ₂)	80.8de	5.3ab	5.3ab
CA-15 (CcxCs)	78.8de	13.2ab	10.3ab
CHR27 (CcxCs)	71.8de	21.4a	9.7ab
CHR33 (CcxCs)F ₂	46.8e	-	-
CHR34 (CcxCs)	-	23.3a	18.6a
P-Lou	217.4a	17.6a	9.4a
<i>P. cinnamomi</i> (CBS)	150.8b	19.6a	11.1a
Testigo	21.9c	3.1b	2.6b
Clon	***	*	*
Tratamiento	***	***	**
Clon x Tratamiento	***	ns	ns

Tabla 4. Variabilidad entre los diferentes Clones en los ensayos de inoculación con *Phytophthora* spp. sobre estaquillas y hojas. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de SNK, para $P=0.05$.