

AISLAMIENTO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDS EN VIVEROS FORESTALES DE *PINUS RADIATA*

J. PEDRO MANSILLA VÁZQUEZ & CRISTINA PINTOS VARELA

EXCMA. DIPUTACIÓN PROVINCIAL DE PONTEVEDRA. SERVICIO AGRARIO. ESTACIÓN FITOPATOLÓGICA "DO AREEIRO", SUBIDA A LA ROBLEDA S/N 36153 PONTEVEDRA.

RESUMEN

Con esta comunicación se pretende determinar el agente patógeno causal de la muerte de *Pinus radiata* D. Don en distintos viveros de la Comunidad Gallega. Realizándose, a su vez, las Pruebas de Patogenicidad pertinentes, una vez identificado dicho agente como *Phytophthora cinnamomi* Rands Cepa tipo A₂

P.C.: Galicia, *Pinus radiata*, *Phytophthora cinnamomi*, vivero forestal.

SUMMARY

This communication intends to determine which is the pathogen agent that causes death of *Pinus radiata* D. Don, in different nurseries in Galicia (Spain). Once the agent is identified as *Phytophthora cinnamomi* A₂ type. The findings and conclusions of the pertinent pathogenicity tests made are described.

K.W.: Galicia, *Pinus radiata*, *Phytophthora cinnamomi*, forest nursery.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi Rands es uno de los principales patógenos de coníferas y más concretamente de *Pinus spp.*, afectando tanto a planta adulta como a material de vivero. Provoca amarilleamiento y clorosis del follaje que se torna posteriormente bronceado y marrón rojizo, acículas y brotes más pequeños, así como, necrosis y pudrición del sistema radicular que en algunos casos pueden conllevar finalmente a la muerte de la planta (SINCLAIR *et al.*, 1987).

Ante las muestras de *Pinus radiata* procedentes de diferentes viveros de la Comunidad Gallega recibidas en nuestra Estación, que presentaban síntomas coincidentes con un ataque de *Phytophthora cinnamomi*, se decidió determinar el agente causal y comprobar su poder patogénico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Aislamiento e identificación

Para el aislamiento del hongo se tomaron muestras de *Pinus radiata* de los viveros que presentaban síntomas que se correspondían con un ataque de *Phytophthora cinnamomi*. Las

muestras venían dispuestas en bandejas de plástico negras con compartimentos para cada planta. Se tomaron seis muestras de cada bandeja y se realizaron los análisis oportunos.

- Muestras de raíz: las raicillas finas sospechosas de estar afectadas por el hongo se lavaron con agua estéril, se cortaron posteriormente en trozos de 1-2 cm. y se sembraron en medio selectivo, V₈ modificado. Una vez observado el crecimiento del micelio, se transfirió a medios de cultivo generales (PDA, Agar malta, etc) para el estudio de sus características morfológicas (MANSILLA *et al*, 1993).

El micelio aparece como no tabicado muy ramificado, pudiendo aparecer algún tabique o septo en hifas viejas o delimitando órganos sexuales. Las hifas son botriosas coraloides con hinchamientos hifales característicos de esta especie denominados “hyphal swelling”. La presencia de clamidosporas es abundante en V₈. (STAMPS D.J., 1990).

Las características del micelio de nuestros aislamientos se corresponden con el micelio típico de *Phytophthora cinnamomi*.

- A partir de muestras de suelo: se tomaron muestras del substrato donde se encontraban las plantas de Pino y se dispusieron en trampas vegetales utilizando hojas jóvenes de aguacate troceadas que permiten determinar la existencia de esporangios del hongo.

Los esporangios aparecieron no papilados con un ligero espesamiento apical, persistentes, de forma y tamaño variables aunque solían ser ovoides, elipsoides, y con abundante proliferación interna.

Las características de estos esporangios se correspondían con las de *Phytophthora cinnamomi*.

Al ser *Phytophthora cinnamomi* una especie heterotálica, la presencia de órganos sexuales se produce en cruzamientos intraespecíficos, cruzando cepas de dos tipos de compatibilidad distintos (A₁ y A₂) con la cepa que queremos estudiar, (ZENTMYER, G.A., 1980). Al realizar estos cruzamientos, con cepas cedidas por D. Carlos J. López Herrera, del laboratorio de Fitopatología de la Junta de Andalucía, se obtuvo que nuestra cepa era A₂.

Por todas estas características se determinó que el hongo aislado de las plantas de *Pinus radiata* era *Phytophthora cinnamomi* cepa tipo A₂.

2) Pruebas de Patogeneicidad

Para determinar que el hongo aislado era el causante de los síntomas observados se realizaron inoculaciones sobre plantas de *Pinus radiata*.

Las plantas se obtuvieron de semillas que habían sido previamente desinfectadas sumergiéndolas durante 10 minutos en lejía comercial (40 g de Cl₂ activo por litro), eliminando su presencia por sucesivos aclarados con agua estéril (TELLO *et al*, 1991).

El substrato utilizado consistió en una mezcla de arena de río lavada y turba en proporción 2:1 que fué esterilizado dos veces en autoclave durante 1 hora, esperando 24 horas entre ambas esterilizaciones. Se utilizaron para el ensayo macetas de plástico negro de 1 litro.

Se utilizaron dos métodos para realizar las inoculaciones.

A) Método de Wilcox y Mircetich (1987)

En tarros de vidrio de 250 cc. se mezclan 100 cc. de vermiculita, 70 cc. de jugo de tomate y vegetales y 10 cc. de granos de trigo enteros esterilizándose en autoclave a 120 °C durante 30 minutos dos veces con 24 horas entre ambas.

Sobre este substrato depositaremos trozos del hongo (*Phytophthora cinnamomi*) que había crecido previamente en placa. Los tarros se incuban en obscuridad a 24°C durante 10 días y transcurrido ese tiempo se comprueba que el hongo ha colonizado todo el medio así como el buen estado del inóculo.

Las plantas de pino se dispusieron sobre el substrato (arena de río y turba en proporción 2:1) el mismo día que se inoculó.

La inoculación se realizó añadiendo a cada maceta 25 cc. de inóculo por litro de sustrato mezclándose manualmente. (AGUIRRE *et al*, 1995)

B) Método de Riego al Sustrato con el Inóculo.

El hongo a inocular (*Phytophthora cinnamomi*) se multiplica en placa en medio PDA hasta que alcanza el borde de la placa.

La “unidad de inóculo” está constituida por la resultante de triturar el contenido de la placa Petri crecida con el hongo en 100 ml. de agua destilada (TELLO *et al*, 1991).

Con esta unidad de inóculo se riega el sustrato que había sido previamente esterilizado, donde crecían los *Pinus radiata* del ensayo.

Se inocularon un número de 8 plantas por cada uno de los sistemas que se colocaron en una cámara climatizada con un fotoperíodo de 16 h y una humedad controlada.

Las plantas se sometieron a períodos de inundaciones durante 48 horas repetidas cada 15 días durante dos meses, al cabo de los cuales las plantas se retiraron de las macetas y se sembraron, las raíces, en medios selectivos para comprobar si se reaislaba *Phytophthora cinnamomi*.

Como testigos se tomaron 16 plantas de las cuales 8 fueron sometidas a un sistema de inundaciones, igual que el que sufrían las plantas inoculadas, y otras 8 se regaron normalmente.

RESULTADOS

Después de realizar los aislamientos oportunos, como se indicó anteriormente, se determinó que el hongo aislado de las raíces de *Pinus radiata* era *Phytophthora cinnamomi* cepa tipo A₂.

Se observó que al realizar las inoculaciones con esta cepa, las plantas comenzaban a manifestar síntomas a los 15 días. Las puntas de las acículas se volvían de color rojizo y terminaban por secarse, comenzaba un necrosamiento a nivel del cuello y caída de la planta.

Los síntomas seguían evolucionando hasta que las plantas se secaban.

Al retirar las plantas, pasados los dos meses, se observaban abundantes necrosis en el sistema radicular.

Las plantas testigo que fueron inundadas presentaban pequeños enrojecimientos en la punta de las acículas que no evolucionaban y que podrían deberse al encharcamiento.

Una vez sembrado, en medio selectivo V₈, el sistema radicular de todas las plantas, los resultados expresados en tanto por ciento de plantas que han dado un aislamiento positivo de *Phytophthora cinnamomi* en V₈ son los siguientes:

- Método de Wilcox y Mircetich 71%
- Método Riego de sustrato con el inóculo 66%
- Testigos inundados 0%
- Testigos no inundados 0%

CONCLUSIONES

De los datos obtenidos en los resultados se deduce, que el porcentaje de plantas inoculadas que han dado positivo para el aislamiento de *Phytophthora cinnamomi* Cepa A₂ es suficiente para determinar el poder patógeno de este hongo, deduciéndose así, que los síntomas observados sobre *Pinus radiata* en vivero eran causados por dicho hongo.

No se observan diferencias significativas entre los dos métodos de inoculación empleados aunque cabe reseñar que con el método de Wilcox se produce una respuesta más rápida, presentándose los primeros síntomas antes de los 15 días posteriores a la inoculación, provocando la muerte de la planta más rápidamente.

BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE J. & MORENO A. (1995). *Aislamiento de Phytophthora spp. Patógenos de Prunus en España*. Congreso de S.E.F. Sitges (1995).

MANSILLA, J.P.; PINTOS, C. & SALINERO, M.C. (1993) *Aislamiento e identificación en la Provincia de Pontevedra de Phytophthora cinnamomi como patógeno de viña*. M.A.P.A. Bol. Veg. Plagas, 19: 541-549.

SINCLAIR, W.A., LYON, H. & JOHNSON, W.T. (1987) *Diseases of trees and Shrubs*. Correll University Press, 574pp.

STAMPS, D.J.; WATERHOUSE, G.M.; NEWHOOK, F.S. & HALL G.S. (1990). *Revised Tabular Key to the Genus Phytophthora*. Mycological Papers nº162 . CAB Internacional.

TELLO, J.; VARES, F. & LACASA, A. (1991). *Pruebas de Patogeneicidad en Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos bacterias y nematodos fitopatógenos*. M.A.P.A. 79-85 p.

WILCOX, W.F. & MIRCETICH, S.M. (1987). *Lack of host specificity among isolates of Phytophthora megasperma*. Phytopathology 77: 1132-1137.

ZENTMYER, G.A. (1980) *Phytophthora cinnamomi and the Diseases it Causes*. Monograph nº 10 A.P.S: 96 pp.