

VARIACIONES EN LA SUSCEPTIBILIDAD A *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* DE DIFERENTES CLONES DE CASTAÑO: COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE INOCULACIÓN

RIAL, C.¹; BARROS, A.¹; SALINERO, C.¹; MANSILLA, J.P.^{1,2}; PINTOS, C.¹ Y CUENCA, B.³

¹Estación Fitopatológica do Areiro (Diputación Pontevedra), Subida la Robleda s/n. 36153 Pontevedra. efa@efa-dip.org

²Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.

³TRAGSA. Vivero de Ourense. Departamento de Mejora Agroforestal. Crta. Maceda-Valdrey km. 2. 32708 Maceda, Ourense. bcuenca@tragsa.es

Palabras clave: “*in vitro*”, explantos, clon HS, *C. mollissima*.

Resumen: El objetivo de este estudio radica en aumentar el conocimiento existente, en cuanto al grado de tolerancia al hongo *P. cinnamomi*, de diferentes especies y clones híbridos de castaño. Para ello se estableció un ensayo comparativo en el que se utilizaron plantas de *C.sativa*, *C.mollissima*, junto con clones híbridos euroasiáticos, en dos fases de desarrollo-aclimatadas y explantos de cultivo “*in vitro*”- suministradas, ambas, por la empresa TRAGSA vivero de Ourense. Las plantas aclimatadas continuaron su proceso de aclimatación en las cámaras de la Estación Fitopatológica do Areiro (EFA) para ser inoculadas una vez iniciada la brotación. La inoculación se llevó a cabo con micelio, en crecimiento activo, de *P.cinnamomi*, el cual fue añadido mediante riego a la superficie del sustrato. Los explantos, una vez multiplicados y enraizados “*in vitro*,” fueron inoculados con trozos de micelio que contenían esporangios del hongo. Las plantas se analizaron para comprobar el reaislamiento del patógeno, procesos, todos ellos, realizados en los laboratorios de la EFA. Se apreciaron diferencias en la susceptibilidad entre las especies y los clones de castaño estudiados, así como, entre los dos métodos de inoculación aplicados, encontrándose que el clon híbrido HS y *C. mollissima*, eran los menos susceptibles al ataque de *P. cinnamomi*.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi es un hongo ficomiceto causante de una de las enfermedades radiculares más importantes del castaño. En España este hongo se aísla por primera vez en el año 1941 en la Estación Fitopatológica Agrícola de la Coruña por D. Pedro Urquijo aunque sus síntomas y daños eran conocidos desde mucho antes. En las primeras décadas del siglo XX se produce la expansión de la enfermedad por casi toda Galicia, siendo su presencia mucho menor en la parte Oriental de la misma (MANSILLA *et al.*, 2003).

P. cinnamomi provoca una pudrición del sistema radicular que afecta en primer lugar a las raíces absorbentes, más desprotegidas, produciendo una rápida maceración de las mismas afectando finalmente a las raíces gruesas y al cuello de la planta. Las raíces finas aparecen ennegrecidas y blandas, y con una coloración negro azulada. A medida que el hongo va invadiendo el sistema radicular los síntomas se van haciendo más extremos. La pudrición alcanza el cuello de la raíz agrietándose la corteza en la base del tronco y desprendiéndose con facilidad observándose la exudación de una sustancia gomosa de color negro característica (tinta) (MANSILLA *et al.*, 2000).

El control de este patógeno es complicado y pasa por la integración de medidas culturales, biológicas y químicas. Estos métodos son particularmente efectivos aplicados como preventivos en las plantas próximas a plantas afectadas, por lo que se recurre a la

plantación de castaños resistentes obtenidos por hibridación controlada de castaños europeos con chinos (*Castanea mollisima*) y japoneses (*Castanea crenata*) (VIÉITEZ *et al.*, 1996).

El objetivo del presente estudio radica en aumentar el conocimiento existente, en cuanto al grado de tolerancia a *P. cinnamomi* de las especies *Castanea sativa* y *Castanea mollisima* y los clones híbridos HS y 44.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el año 2006 se realizó en la EFA un ensayo en el que se estableció la susceptibilidad a *P. cinnamomi* en plantas de castaño en dos fases de desarrollo:

1- Plantas aclimatadas, suministradas por Tragsa (vivero de Ourense), pertenecientes a las especies *Castanea sativa* y *Castanea mollisima* y a los clones híbridos euroasiáticos HS y 44.

2- Explantos de cultivo *in vitro* pertenecientes a la especie *C. sativa* y a los clones híbridos HS y 44 (no se llevaron a cabo inoculaciones en los explantos de *C. mollisima* debido al bajo crecimiento que alcanzaban los explantos una vez multiplicados, lo que imposibilitó el enraizamiento y posterior inoculación).

Los castaños aclimatados se trasplantaron a un sustrato estéril, se podaron a 4-5 yemas y continuaron con el proceso de aclimatación manteniéndose a 20° C, 83% HR y 16 horas luz durante 7 días; 18° C, 75% HR y 12 horas luz durante 15 días; 10° C, 75% HR y 10 horas luz durante 15 días; 5° C, 75% HR y 8 horas luz durante 1 mes; 15° C, 75% HR y 8 horas luz durante 7 días, y finalmente a 20-22° C, 75% HR y 10 horas luz hasta el momento de la inoculación.

Una vez iniciada la brotación se inocularon con micelio de *P. cinnamomi*. La unidad de inóculo estaba constituida por la resultante de triturar el contenido de una placa Petri crecida con *P. cinnamomi* en zumo de vegetales V8, en 200 ml de agua destilada, la cual fue añadida mediante riego a la superficie del sustrato donde crecían las plantas (TELLO *et al.*, 1991).

Las plantas inoculadas se mantuvieron en una cámara a 22° C, 75% de humedad relativa y con un fotoperiodo de 10 horas luz, observándose periódicamente en espera de la aparición de síntomas del ataque de *Phytophthora*. El número de plantas inoculadas de cada clon, así como los testigos se muestran en la tabla 1. Como testigos se utilizaron plantas de las mismas especies y clones cuyos sustratos fueron regados con la resultante de triturar el contenido de una placa Petri con medio de cultivo V8 en 200 ml de agua destilada.

Una vez que las plantas mostraban síntomas, que comenzaban con un amarilleamiento de la parte aérea y un posterior ennegrecimiento de la base del tallo, se levantaron de las macetas para comprobar el estado de las raíces y se analizaron en laboratorio, comprobándose de esta forma si el hongo inoculado estaba presente en la tierra y en el sistema radicular y era, por tanto, el causante de los síntomas observados. Las plantas que no mostraron síntomas, después de 6 meses de su inoculación, se analizaron para determinar si el hongo había penetrado en el sistema radicular aunque exteriormente no presentasen síntomas.

Para el aislamiento de *P. cinnamomi* a partir de las muestras de tierra se siguió el procedimiento basado en la utilización de trampas vegetales (MANSILLA *et al.*, 1993), que permite detectar la presencia de esporangios de *Phytophthora* en el suelo y “capturar” al hongo. Para la preparación de las capturas se pesaron 125 gramos de suelo que se suspendieron en 500 cc de agua destilada estéril; se agitó esta suspensión y, antes de que decante, se vertió en placas Petri estériles a razón de 20 a 25 cc por placa, añadiéndose en la superficie 10-15 trozos de hojas jóvenes de aguacate, disponiéndose un total de 4 placas por muestra, que se incuban en condiciones de laboratorio de 4-8 días observándose

periódicamente al microscopio para determinar la presencia o ausencia de esporangios del hongo.

Las raicillas se lavaron con abundante agua destilada, se cortaron posteriormente en trozos de 1-2 cm y se sembraron en placas Petri en medio de cultivo V8 clarificado, con antibióticos y fungicidas para conseguir un medio selectivo. Las placas se incubaron en estufa a 22-24° C en oscuridad y se observaron al microscopio pasados 4-7 días. Una vez que se observó el crecimiento miceliar se procedió al estudio de sus características morfológicas, comprobándose si se correspondía con el hongo inoculado.

Los explantos de cultivo *in vitro*, enviados por Tragsa (vivero de Ourense), se elongaron y multiplicaron, hasta obtener un número suficiente de brotes, de entre 4-5 cm, sobre los que realizar el enraizamiento. La elongación consistió en la subdivisión de brotes, para que los explantos adquirieran un mayor desarrollo y crecimiento. Para este proceso se empleó el medio MS (Murashige & Skoog) 1/2 NO₃+ 1mg BAP (bencilaminopurina) (VIEITEZ *et al.*, 1987). Una vez elongados, los brotes de castaño se subdividieron de modo que cada fragmento llevase al menos una yema axilar para poder ser subcultivados de nuevo, a intervalos de 35 días aproximadamente. El medio de cultivo empleado para la multiplicación fue el WPM (woody plant médium, Lloyd & McCown) + 0,1 mg/l BAP.

El método empleado para el enraizamiento fue la inmersión basal o “dipping”, que consistió en la inmersión de la parte basal del explanto en una solución muy concentrada de auxina (ácido indolbutírico-AIB) durante un corto periodo de tiempo (2 minutos). Este método resultó muy eficaz obteniéndose los primeros primordios de raíz a partir de los 7 días aproximadamente.

Una vez enraizados, los explantos se inocularon en cámara de flujo en condiciones de esterilidad, con trozos de micelio (5 mm de diámetro aproximadamente) de *P. cinnamomi* que contenían esporangios, de los cuales se liberan, posteriormente, las zoosporas en el interior de los tubos de cultivo *in vitro*.

La presencia de esporangios de *P. cinnamomi* sólo se produce en medio líquido induciendo la producción de los mismos con extractos de suelos no estériles o mediante lavados con una solución salina (CHEN & ZENTMYER, 1970), método empleado en este ensayo. Para ello, partiendo de cultivos de 2-3 días se toman pequeñas porciones de micelio (5 mm de diámetro aproximadamente) y se transfieren a placas con V8 clarificado. Los trozos de micelio se incuban a 25° C durante 24 horas después de las cuales se lavan 5 veces, a intervalos de media hora, con 15-20 ml de una solución salina autoclavada. Los cultivos son incubados en esta solución a 24-27° C en placas Petri bajo lámparas de luz fluorescente. La esporulación comienza 8 horas después del primer lavado y alcanza un máximo en 24-36 horas (ERWIN & RIBEIRO, 1996) tras las que la solución salina es reemplazada por agua destilada estéril. Cada una de las porciones de micelio con esporangios de *P. cinnamomi* obtenidas por este método se usan para inocular a las plantas de cultivo *in vitro*.

El proceso de inoculación consistió en introducir uno de estos trozos de micelio, que contenían esporangios, en cada tubo con los explantos previamente enraizados, llevándose a cabo en una media de 50 plantas de cada especie y clon (tabla 2).

Una vez inoculados, los explantos eran observados semanalmente, y a medida que aparecían síntomas, se sembraban en medio de cultivo V8, determinándose así el reaislamiento positivo o negativo de *P. cinnamomi* tanto en la raíz como en el tallo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Plantas aclimatadas

Las primeras plantas en mostrar síntomas de la inoculación con *P. cinnamomi*, fueron las pertenecientes al clon 44, presentando, después de 30-40 días de la inoculación,

amarilleamiento de la parte aérea y un ennegrecimiento progresivo de la base del tallo, hasta su posterior muerte. De este clon murieron un 80% de las plantas inoculadas (tabla 1). Las plantas muertas tenían las raíces negras, y una vez analizadas en laboratorio se reaisló *P. cinnamomi* tanto en la tierra como en la raíz de las mismas, comprobándose de esta forma la persistencia del hongo inoculado en el suelo y su penetración en el sistema radicular.

P. cinnamomi se caracteriza por la presencia de esporangios no papilados, persistentes, de forma y tamaño bastante variables, aunque suelen ser ovoides-elipsoides y con abundante proliferación interna. El micelio es no tabicado, de aspecto muy ramificado y caracterizado por la presencia de hifas coraloides y de hinchamientos hifales denominados “Hyphal swelling”. Es una especie heterotálica, englobada en la sección VI de la clave de Stamps y Waterhouse (1990) que produce oosporas (órganos de reproducción sexual) y clamidosporas (esporas de resistencia terminales, intercalares o en racimos), cuando las condiciones del entorno son desfavorables para su crecimiento vegetativo, características, todas ellas observadas en nuestros aislamientos.

En la única planta que sobrevivió del clon 44 se comprobó la presencia del hongo en el suelo, y, al contrario que en las anteriores, las raíces presentaban buen aspecto resultando negativo el aislamiento de *P. cinnamomi*.

En la especie *C. sativa* los síntomas fueron similares pero tardaron más tiempo en aparecer. Las plantas murieron entre 45 días y 6 meses después de su inoculación, muriendo un total de 83,3% de las plantas inoculadas. Tanto las plantas muertas, como las dos que sobrevivieron, presentaban las raíces negras, resultando positivo el aislamiento de *P. cinnamomi* tanto en el suelo como en la raíz.

Las plantas de la especie *C. mollisima* y del clon híbrido HS no mostraron síntomas 6 meses después de su inoculación y en ninguna de ellas se reaisló *P. cinnamomi* a partir de la raíz, pero sí del suelo, lo cual demuestra la persistencia del patógeno en el suelo.

Ninguna de las plantas testigo presentaba síntomas, vegetando perfectamente.

Explantos de cultivo *in vitro*

La especie *C. mollisima* no se ha podido testar *in vitro* debido al bajo crecimiento de los explantos una vez multiplicados.

Tanto los explantos de *C. sativa*, como los clones híbridos HS y 44 fueron susceptibles al ataque de *Phytophthora* en mayor o menor medida.

Pasados aproximadamente 5 días de las inoculaciones se empezaron a observar los primeros síntomas, que consistían en un ennegrecimiento progresivo de la base del tallo, secándose posteriormente yemas y brotes. A los 8 días las hojas iban adquiriendo un aspecto clorótico, empezando por los nervios, hasta la muerte de las plantas. En todos los casos el ennegrecimiento comenzaba en el cuello del explanto, a la altura del callo, e iba ascendiendo hacia la parte aérea. Posteriormente se producía un oscurecimiento de las raíces, aunque este no era muy notable y se observó en pocas plantas. Esto quedó plasmado en los resultados pues todas las plantas en las que se reaisló el patógeno en la raíz ya se había reaislado previamente del tallo. Por ello, el número de plantas en las que se aisló *P. cinnamomi* en el tallo siempre fue superior que en la raíz (tabla 2).

Los explantos del clon 44 y los de *C. sativa* presentaron un mayor porcentaje de planta muerta a los 10 días, mientras que el clon HS a los 20 días.

Los resultados de los aislamientos de *P. cinnamomi* (tabla 2) muestran un mayor porcentaje de reaislamiento a partir de la raíz en los explantos de la especie *C. sativa* (57,4%), seguida del clon 44 (45,1%) y por último el clon HS con un porcentaje del 29,7%.

Los tres clones presentaron porcentajes de reaislamiento similares en el tallo, siendo algo superior el de la especie *C. sativa* (68,8%), seguido del clon HS (62,5%) y del 44 (60,8%).

El método de inoculación con explantos de cultivo *in vitro* nos permitió comprobar el poder patógeno del hongo de una forma mucho más rápida que en las plantas aclimatadas, pues mientras en éstas los síntomas no eran notables hasta, al menos, 30 días después de la inoculación, en los explantos *in vitro* ya se observaban a los 5 días.

Los resultados del ensayo muestran que las plantas más susceptibles al ataque de *P. cinnamomi*, tanto en la fase de aclimatadas como de explantos de cultivo *in vitro* fueron las pertenecientes a la especie *C. sativa* y al clon híbrido 44 (gráfico 1).

La especie *C. mollisima* y el clon HS se comportan como tolerantes al hongo en la fase de aclimatadas, sin embargo el clon HS se muestra susceptible a la inoculación *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- CHEN, D.W.; ZENTMYER, G.A., 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62: 397-402.
- ERWING, D.C.; RIBEIRO, O.K., 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press.
- MANSILLA, J.P.; PINTOS, C.; SALINERO, M^a.C., 1993. Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña. *Bol. San. Veg. Plagas*, 19: 541-549.
- MANSILLA VÁZQUEZ, J.P.; PEREZ OTERO, R.; PINTOS VARELA, C.; SALINERO CORRAL, C.; IGLESIAS VÁZQUEZ, C., 2000. Plagas y enfermedades del castaño en Galicia. Xunta de Galicia. Consellería de Agricultura, Ganadería e Política Agroalimentaria. 27-34.
- MANSILLA VÁZQUEZ, J.P.; SALINERO CORRAL, C.; PEREZ OTERO, R.; PINTOS VARELA, C., 2003. Problemas fitosanitarios de los robles y castaños en Galicia. Excm. Diputación Provincial de Pontevedra. 29-39.
- STAMPS, D.J.; WATERHOUSE, F.J.; NEWHOOK, F.J.; HALL, G.S., 1990. Revised tabular Key to the species of *Phytophthora*. C.A.B., *Mycological Papers*, nº 162.
- TELLO, J.; VARES, F.; LACASA, A., 1991. Pruebas de patogenicidad en: Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos, 5: 81-82. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.
- VIÉITEZ CORTIZO, E.; VIÉITEZ, M.L.; VIÉITEZ, F.J., 1996. El Castaño. Edita Caixa Ourense. 152-188.
- VIEITEZ, A.M.^a; BALLESTER, A.; VIEITEZ, M.L.; SAN JOSÉ, M^a.C.; VIEITEZ, F.J.; VIEITEZ, E., 1987. Propagación de plantas leñosas por cultivo "in vitro". Diputación Provincial de Pontevedra.

Tabla 1.-Inoculación con *P. cinnamomi* en plantas aclimatadas

CLON	Nº PLANTAS	TESTIGOS	PLANTAS INOCULADAS	PLANTAS MUERTAS	% MORTALIDAD	% AISLAMIENTO RAÍZ	% AISLAMIENTO SUELO
<i>C. sativa</i>	16	4	12	10	83.3	100	100
<i>C. mollisima</i>	16	4	12	0	0	0	100
HS	16	4	12	0	0	0	100
44	7	2	5	4	80	80	100

Tabla 2.-Inoculación con *P. cinnamomi* en explantos de cultivo *in vitro*

CLON	PLANTAS INOCULADAS	POSITIVAS TALLO	POSITIVAS RAÍZ	% AISLAMIENTO TALLO	% AISLAMIENTO RAÍZ
HS	64	40	19	62,5	29,7
44	51	31	23	60,8	45,1
<i>C. sativa</i>	61	42	35	68,8	57,4

Grafico 1.-Comparación del porcentaje de reaislamiento de *P. cinnamomi* en plantas aclimatadas y en explantos de cultivo *in vitro*

