

Presencia de *Phytophthora hibernalis* en cítricos de la provincia de Pontevedra.

Durante los meses de Enero y Febrero de 2004 se recibieron en el laboratorio de la Estación Fitopatológica do Areeiro numerosas muestras de cítricos que presentaban síntomas característicos de aguado en los frutos y manchas oleosas en las hojas. No observándose pudrición radicular ni gomosis.

Porciones del borde de la lesión, tanto de frutos como de hojas, fueron sembrados en medio V8 agar suplementado con (pimaricina 5mg/l, rifanpicina 25 mg/l, hymexazol 5 mg/l y benomilo 10mg/l) e incubados en estufa en oscuridad a 24 °C, pasados cuatro o cinco días se observaba un crecimiento micelial característico de *Phytophthora* sp.

Todas las muestras presentaban el mismo crecimiento y con las mismas características: micelio hialino, irregularmente ramificado, poco denso y de crecimiento lento. No se observaba presencia de hinchamientos hifales ni de clamidosporas. La especie aparece como homotática con oogonios esféricos, lisos y con pared gruesa con un diámetro entre 22 y 56 micras con anteridios fundamentalmente anfiginos, en algunos casos paraginos, y con oosporas que llenan casi completamente el oogonio y que adquieren una coloración amarillo– naranja con el tiempo. En ningún caso se observaba la presencia de esporangios en medio sólido por lo que se decidió situar trozos de micelio en agua estéril y en extractos de suelo sin éxito.

Al mismo tiempo se decidió analizar por PCR el micelio aislado siguiendo el método descrito por la CABI Bioscience (www.phytid.org) con modificaciones. La extracción del ADN se llevó a cabo con el kit comercial EZNA fungal DNA miniprep kit (Omega Bio-Tek) según las indicaciones del fabricante para el protocolo corto. Se amplificó la región ITS utilizando dos parejas de primers: ITS4/ITS6 e ITS4/DC6 (Cooke *et al.*, 2000). El análisis RFLP se realizó con las enzimas de restricción *AluI*, *MspI* y *TaqI* obteniéndose un patrón de restricción absolutamente uniforme en todas las muestras (Fig.1). El tamaño de los fragmentos obtenidos se introdujo en la aplicación “species identification” de la página web (www.phytid.org) y se comparó con los valores descritos en dicha página para cada especie de *Phytophthora* pero no concordó con ninguna.

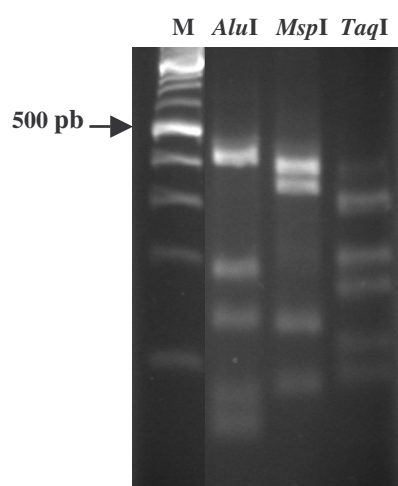


Figura 1. Análisis de restricción con *AluI* (417,185,127,75,58), *MspI* (389,339,124,80) y *TaqI* (307,203,163,109,89) del ADN amplificado con los primers ITS4 e ITS6. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Al no poder identificar la especie de *Phytophthora* aislada enviamos los cultivos al laboratorio de Sanidad Vegetal de Sevilla donde nuestra compañera Juana Páez amablemente nos identificó el hongo como *Phytophthora hibernalis* Carne.

Al conocer de que especie se trataba también pudimos saber sus exigencias de crecimiento.

El hongo tiene unas temperaturas cardinales de crecimiento bajas con un óptimo entre 16 y 20 °C. Nosotros situamos nuestros cultivos a 16°C obteniendo un crecimiento muy bueno a esta temperatura y una abundante producción de esporangios en medio de cultivo muy característicos de esta especie. En los primeros aislados no se producían esporangios por que la temperatura de cultivo (24°C) tenía un efecto inhibitorio sobre la producción de los mismos.

Los esporangios son alargados elipsoides o ovoides papilados con una papila pequeña de unos 1,5 a 3,5µm de longitud y con unas medidas de 17-56µm x 10-28µm y con una ratio longitud / anchura entorno a 2. El esporangio es caduco, desprendiéndose fácilmente del esporangioforo y arrastrando un largo pedicelo de medidas muy variables entre 2µm y 56µm de longitud, pudiendo germinar directamente o hacerlo a través de zoosporas. La esporulación se produce mejor en oscuridad.

Las restantes características de los órganos sexuales ya se han indicado anteriormente y coinciden plenamente con las citadas para *P. hibernalis*.

Las inoculaciones realizadas sobre fruto de limón han reproducido los síntomas reaislándose nuevamente el hongo.

Debido a la dificultad de la identificación inicial mediante PCR nos planteamos la secuenciación y posterior desarrollo de primers específicos que permitiesen diferenciarla del resto de las especies de *Phytophthora*. En primer lugar se amplificó la región ITS utilizando los primers ITS4 e ITS6. El producto obtenido, de aproximadamente 900 pares de bases (pb), se secuenció con un ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Posteriormente se obtuvieron todas las secuencias de la región ITS publicadas en el NCBI pertenecientes al género *Phytophthora*. Se seleccionaron 263 secuencias pertenecientes a 15 especies diferentes de *Phytophthora* y junto con la obtenida en nuestro laboratorio se llevó a cabo el alineamiento utilizando el programa Clustal X. Los primers se diseñaron mediante comparación de secuencias, seleccionando regiones de mayor disimilitud y teniendo en cuenta factores como la Tm, el contenido en G-C y la posibilidad de formación de dímeros o estructuras secundarias. Una vez diseñados todos los posibles primers fueron analizados utilizando el programa Beacon Designer (Bio-rad). Se seleccionaron dos, uno directo y otro reverso, denominados Phib1 y Phib5 (Tabla 1).

Los primers seleccionados fueron evaluados mediante amplificación de la región ITS con diferentes especies de *Phytophthora*: *P. parasitica*, *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. cactorum*, *P. syringae*, *P. citricola*, *P. ramorum*, *P. fragariae*, *P. citrophthora*, *P. cinnamomi*, *P. nicotianae* junto con *P. hibernalis*. Una vez ajustadas las condiciones de amplificación se confirmó la especificidad de Phib 1 y Phib 2 para *P. hibernalis*. Estos primers amplifican un fragmento de 407 pb que comprenden el gen 5.8 S, el fragmento de la región ITS1 y la porción inicial de la región ITS2.

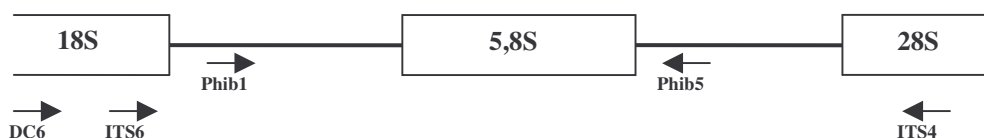


Figura 2. Diagrama esquemático de la región ITS1, ITS2 y del gen ribosomal 5,8S de *Phytophthora* y localización de los primers utilizados para amplificar el ADN de *Phytophthora* sp. (DC6-ITS6/ITS4) y para 2 identificar *Phytophthora hibernalis* (Phib1-Phib5).

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados y tamaño del fragmento del ADN amplificado.

| Primer directo(5'-3') | Primer reverso(5'-3') | Tamaño del fragmento (pb) |
|--|--|---------------------------|
| ITS6 GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG | ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC | 900 |
| DC6 GAGGGACTTTTGGGTAATCA | ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC | 1300 |
| Phib1 TCGGGTCTGAGCTAGTAGTCTT | Phib5 CTTCCACAACCAATTCCATTATGC | 407 |

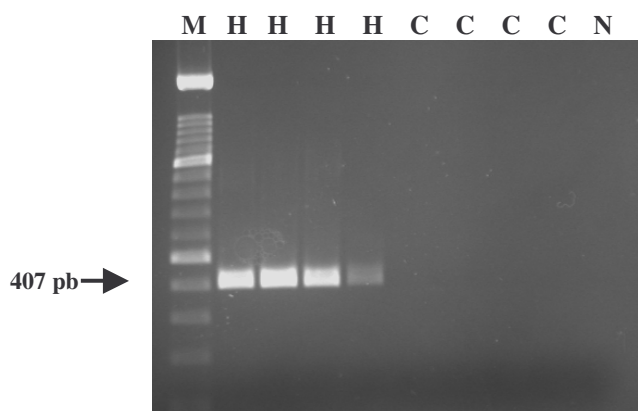


Figura 3. Optimización de la PCR con los primers Phib1 y Phib5, amplificaciones a diferentes temperaturas de anillamiento. H: *P. hibernalis*. C: *P. citricola*. M: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Al iniciar este trabajo en el Genbank no había disponible ninguna secuencia de *P. hibernalis* pero, en este momento, ya han sido incluidas. Comparando las secuencias existentes con la obtenida en nuestro laboratorio confirmamos su identificación como *P. hibernalis*.

P. hibernalis causa la denominada pudrición marrón de los frutos o también llamado mildiu o aguado de los cítricos. El hongo comienza su actividad con temperaturas superiores a 12 °C y humedad relativa superior al 70%. Inverna en el suelo fundamentalmente en forma de oosporas. Cuando las condiciones son adecuadas germina liberando zoosporas que son diseminadas por el viento y la lluvia penetrando por las estomas de las hojas originando las infecciones primarias y secundarias.

Los síntomas aparecen primariamente en las hojas y frutos más próximos al suelo, dispersándose, en infecciones secundarias, hacia la parte superior del árbol. Las hojas y frutos afectados tienen tendencia a caer.

La enfermedad es activa solo durante la estación fría, cuando la temperatura se eleva puede ser “reemplazada” por *Phytophthora citrophthora* o *Phytophthora nicotianae* especies muy presentes en cítricos y citadas también como causantes de pudrición en frutos pero de las que se diferencia bien morfológicamente. *P.citrophthora* (esporangios persistentes de forma variable a veces con dos papilas y ausencia de organos sexuales) y *P.nicotianae* (presencia de clamidosporas e hifas irradiantes).

BIBLIOGRAFÍA:

- COOKE, D.E.L., DRENTH, A., DUNCAN, J.M., WAGELS, G. Y BRASIER, C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30:17-32.
- ERWIN, D.C. Y RIBEIRO, O.K.; 1996: “*Phytophthora* diseases worldwide”. APS Press.
- STAMPS, D.J., WATERHOUSE, G.M.; NEWHOOK, F.J. Y HALL; G.S.; 1990: Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycological Papers*, N° 162. CAB
- TUSET, J.; 1977: *Phytophthora hibernalis* en Contribución al conocimiento del género *Phytophthora* de Bary en España. MAPA. 63-68.

**XX REUNIÓN ANUAL DEL GRUPO DE TRABAJO DE LABORATORIOS DE
DIAGNÓSTICO Y PROSPECCIONES FITOSANITARIAS - Pontevedra 9-12/11/2004
Diputación Provincial de Pontevedra. Servicio Agrario. Estación Fitopatológica do Areiro
Mansilla, J.P.; Abelleira, A.; Pintos, C.; Agúin, O.; Pérez, R.; Loureiro, B.; Montenegro, M^a D.**