

INFLUENCIA DEL CULTIVO DE *LUPINUS LUTEUS* L. EN LA DENSIDAD DE INÓCULO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* EN SUELOS DE DEHESA

M.S. SERRANO¹, M.E. SÁNCHEZ², P. DE VITA², M.D. CARBONERO¹, A. TRAPERO², P. FERNÁNDEZ-REBOLLO¹

¹Dpto. Ingeniería Forestal, ²Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal). ETSIAM. Universidad de Córdoba. 14014 Córdoba. ir1ferep@uco.es

RESUMEN

Phytophthora cinnamomi es un patógeno que causa podredumbre radical en el arbolado de la dehesa y también en *Lupinus luteus*, cultivo frecuente en dehesas de Andalucía occidental. En dehesas que mostraban distintas situaciones en cuanto a decaimiento del arbolado y severidad de la enfermedad en el altramuz, el aislamiento y conteo de colonias de *P. cinnamomi* a partir de muestras de suelo ha mostrado la capacidad del cultivo herbáceo para mantener o incrementar la densidad de inóculo y así potenciar la infección de las encinas. Los resultados obtenidos desaconsejan el cultivo de esta leguminosa en dehesas con presencia del patógeno en el suelo, tanto si el arbolado sufre la enfermedad radical o no.

Palabras clave: decaimiento, encina, podredumbre radical, tremosilla.

INTRODUCCIÓN

Desde hace unos 15 años se viene observando un severo decaimiento del arbolado en las dehesas del sur de España y Portugal, originándose una elevada mortalidad de encinas y alcornoques (Navarro *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006), debido fundamentalmente a la podredumbre radical causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* (Brasier, 1996; Gallego *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008), patógeno difícil de controlar debido, entre otras cosas, a su amplio rango de huéspedes leñosos, aunque también infecta algunas herbáceas del género *Lupinus* (Kirby y Grand, 1975; Serrano *et al.*, 2009). En las dehesas del sur peninsular es una práctica habitual la siembra de tremosilla o altramuz amarillo (*L. luteus*) (MAPA, 2006). En dehesas con el arbolado afectado por podredumbre radical (Jiménez *et al.*, 2008) así como en oquedales formados por la muerte de las encinas, se han observado rodales de tremosilla con síntomas de enfermedad. En tests de patogenicidad se ha demostrado que *L. luteus* es susceptible a *P. cinnamomi*, provocando amarillez, flacidez y marchitez en la parte aérea, así como podredumbre de las raicillas y muerte de la

planta (Serrano *et al.*, 2009). Sin embargo, aún no se conoce el efecto que el cultivo de *L. luteus* puede tener sobre la disponibilidad de inóculo de *P. cinnamomi* para la infección del arbolado de la dehesa. En el patosistema *Verticillium dahliae*-olivo, la infección de herbáceas sí tiene una gran influencia en la multiplicación del inóculo, aumentando la presión de enfermedad sobre el huésped leñoso (Trapero y Blanco, 2004). La infección de sus huéspedes herbáceos sirve además para la dispersión del patógeno, por lo que la siembra de herbáceas susceptibles no está recomendada en el olivar (Trapero y Blanco, 2004).

Con estos antecedentes el objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar la relación presencia de *L. luteus*-*P. cinnamomi* en campo, con el fin de establecer el efecto que la interacción entre ambos puede tener sobre los *Quercus* de la dehesa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las prospecciones se realizaron en 2007 en cuatro dehesas de encina (*Quercus ilex* spp. *ballota*) situadas en la comarca del Andévalo (Huelva). En tres de ellas (fincas 2, 3 y 4) se conocía la presencia de *P. cinnamomi* como agente causal de la podredumbre radical que afecta a las encinas (Jiménez *et al.*, 2008), mientras que la cuarta finca prospectada, dehesa 1, es una repoblación de 10 años de edad, en la que las encinas jóvenes no mostraban ningún síntoma de enfermedad radical. En todos los casos se había sembrado altramuz amarillo en 2006-2007 para ser consumido directamente por el ganado. En cada una de las fincas se seleccionó un foco de altramuz sintomático para su evaluación y muestreo. En las fincas 2 y 3, los focos de plantas de altramuz se encontraban situados en focos de encinas afectadas por podredumbre radical. En la dehesa 4 las muestras se tomaron en un gran foco de altramuces sintomáticos situado en un oquedal generado por la muerte de las encinas afectadas (Jiménez *et al.*, 2008). En la finca 1 se localizó un foco de altramuz situado en una vaguada, en el que las plantas mostraban una ligera flacidez y reducción del crecimiento, aunque el arbolado se mostraba asintomático. Se evaluó el grado de defoliación medio que presentaba el arbolado de la finca siguiendo una escala de 0 a 5, correspondiendo el 0 a un porcentaje de defoliación de 0 al 10%, 1 (11-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) 4 (>76%) y 5 (árbol muerto) (Sánchez *et al.*, 2003) (Tabla 1). En los focos seleccionados se delimitó una parcela de 10 x 10 m² haciendo coincidir su extremo con el centro del foco, y en su diagonal se marcaron 10 subparcelas de 1 m². Las subparcelas se numeraron del 1 al 10, según la distancia al centro del foco de enfermedad, donde se tomaron las diferentes muestras.

Tabla 1. Valores medios del grado de defoliación de los *Quercus* y severidad de síntomas aéreos de los altramuces en cada una de las parcelas.

Fincas	Grado de defoliación de los <i>Quercus</i> (0-5)	Síntomas aéreos en altramuz (0-4)
1	0,0	1,3
2	1,5	1,9
3	2,0	1,5
4	4,0	2,2

Se llevaron a cabo dos prospecciones, una en primavera, cuando *L. luteus* está al comienzo de la floración y otra a principios de verano, cuando la planta, infectada o no, estaba muerta. En la primera prospección se evaluó la severidad de los síntomas aéreos de las plantas de altramuz, y se tomaron muestras de raíz y suelo. En verano la vegetación se encontraba agostada, por lo que solamente se tomaron muestras de suelo. Para la evaluación de los síntomas aéreos se utilizó la siguiente escala: 0 = parte aérea asintomática, 1 (síntomas leves) = < 40 % de planta sintomática (flaccidez y/o marchitez), 2 (síntomas graves) = 41-90 %, 3 = planta muerta y 4= falta de emergencia. Se evaluó el número de plantas que mostraban cada una de las categorías de severidad en cada subparcela, utilizando la media ponderada como valor representativo de la severidad de síntomas para cada una de ellas. Para la toma de muestras de raíz, se eligieron raíces de 10 plantas de altramuz pertenecientes a la categoría predominante en cada parcela, en cada uno de los focos.

Las muestras de raíz procedentes de cada subparcela fueron tratadas separadamente. Las raicillas sintomáticas se sembraron en el medio selectivo NARPH (Jiménez *et al.*, 2008).

Las muestras de suelo se secaron al aire y se tamizaron. Para cada muestra se pesaron 10 g de suelo seco y se suspendieron en 200 ml de Agar-Agua estéril al 0,2%. De esta mezcla se tomaron alícuotas de 1 ml y se extendieron en placas de Petri conteniendo el medio NARPH. Las placas se incubaron a 24° C en oscuridad durante 24 h y posteriormente se lavó la superficie de cada placa con agua estéril, incubándose otras 48 h a 24° C en oscuridad. Las colonias obtenidas se identificaron y contaron, expresando los resultados como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (ufc/g). (Jiménez *et al.*, 2008).

La identificación de las colonias fúngicas obtenidas de las muestras de raíz y de suelo se basó en su morfología y en la observación al microscopio invertido de estructuras características: hinchazones hifales y/o clamidosporas (Erwin y Ribeiro, 1996; Jiménez *et al.*, 2008).

Los datos correspondientes a la densidad de inóculo se analizaron mediante un ANOVA. Para la comparación de los valores medios se utilizó el test protegido de Fisher al nivel de probabilidad del 0,05 (Steel y Torrie, 1985). Los datos se analizaron mediante el programa Statistix (Analytical Software, Tallahassee, USA).

RESULTADOS

Los síntomas aéreos observados en los focos de altramuces enfermos consistieron en reducción del crecimiento, flacidez y amarillez foliar, marchitez de toda la planta, plántulas de altramuz muertas y por último, falta de emergencia en rodales. La extracción de las plantas sintomáticas mostró la escasez de raicillas según eran los síntomas aéreos más intensos, con necrosis extensas en las raíces existentes. En las fincas 3 y 2, la severidad de síntomas aéreos fue disminuyendo desde el centro del foco hacia el perímetro exterior (Figura 1). En las otras dos fincas la severidad de síntomas varió poco con la distancia al centro del foco, si bien la dehesa 4 alcanza valores más elevados que en la dehesa 1. En la Tabla 1 se muestran los valores medios de síntomas aéreos en los focos de altramuz para cada una de las fincas.

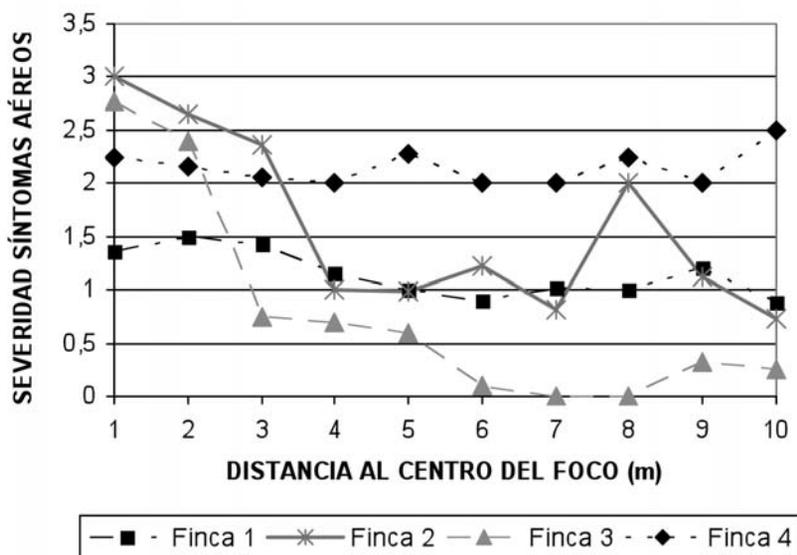


Figura 1. Variación de la severidad de síntomas aéreos en las plantas de altramuz a lo largo de la distancia al centro del foco en las cuatro fincas muestreadas.

A partir de las muestras de raíz se obtuvo de forma consistente un único tipo de colonia, redonda y muy ramificada. Las observaciones microscópicas mostraron la presencia de micelio botrioso con hinchazones hifales en racimo y clamidosporas, típico de *P. cinnamomi* (Erwin y Ribeiro, 1996; Jiménez *et al.*, 2008). La Tabla 2 muestra el porcentaje de aislamiento de *P. cinnamomi* a partir de muestras de raíz de altramuz para cada una de las fincas. En la dehesa 4 el porcentaje de subparcelas con aislamiento positivo del patógeno de raíz es tan solo del 20 %, debido a que en muchas de las subparcelas había únicamente plántulas de altramuz de tamaño muy pequeño con poca raíz o falta de emergencia, por lo que no se pudo disponer de raíz para el aislamiento. Aunque esporádicamente aparecieron algunas colonias aisladas del género *Pythium*, en ningún caso se aisló de raíces de altramuz a la especie *P. spiculum*, otro patógeno de raíz de encinas frecuente en dehesas de Andalucía occidental (Jiménez *et al.*, 2008).

Tabla 2. Aislamiento de *P. cinnamomi* a partir de las raíces necróticas de plantas de altramuz amarillo afectadas de podredumbre radical.

Fincas	Porcentaje de subparcelas con aislamiento positivo de <i>P. cinnamomi</i>	Porcentaje de recuperación de <i>P. cinnamomi</i> en subparcelas con aislamiento positivo*
1	30	6,5
2	70	7,2
3	100	18,2
4	20	2,8

*Porcentaje expresado como nº de trocitos de raíz que dieron lugar a una colonia sobre el nº total de trocitos de raíz colocados en medio selectivo (NARPH).

La densidad de inóculo en el suelo registrada a lo largo de los dos muestreos se presenta en la Tabla 3. En primavera, dos de las fincas (3 y 4) mostraron unos niveles de inóculo en suelo de 17,4 y 19,3 ufc/g, mientras que en la finca 2 la densidad fue de 6,6 y en la finca 1 de solamente 0,3 ufc/g. La densidad de inóculo en las dos primeras fincas es estadísticamente mayor que en la finca 1, en buena correspondencia con el grado de defoliación de los árboles en las diferentes dehesas. La comparación de valores medios de densidad de inóculo para cada finca entre primavera y verano se muestra en la Tabla 3. En las fincas 1 y 2 hay un incremento de densidad que sólo es significativo en la primera de ellas. En la dehesa 1, a partir de niveles de inóculo muy bajos en primavera (0,3 ufc/g) se alcanzan los niveles habituales en suelos con árboles infectados (13,3 ufc/g). Las fincas 3 y 4 presentan una disminución en la densidad de inóculo que sólo es estadísticamente significativa en la finca 3, la cual fue fertilizada con purín antes del muestreo de verano. La comparación de valores medios de densidad de inóculo en verano entre las distintas fincas no mostró diferencias significativas.

Tabla 3. Valores medios de densidad de inóculo de *P. cinnamomi* en suelo. Para cada fila, letras distintas indican diferencias significativas para $P < 0,05$.

Fincas	Densidad de inóculo en suelo (ufc/g)	
	Primavera	Verano
1	0,3 a	13,3 b
2	6,6 a	10,8 a
3	17,4 a	1,9 b
4	19,3 a	9,5 a

DISCUSIÓN

La susceptibilidad del altramuz amarillo a *P. cinnamomi* y su capacidad para incrementar la densidad de inóculo en suelo y así potenciar la infección de las encinas, queda patente en la dehesa 1 (replacación joven de encinas), donde partiendo de unos niveles de inóculo en suelo muy bajos en primavera, se alcanzan valores mucho mayores en verano, similares a los de otras fincas con un importante grado de defoliación del arbolado.

Cabe destacar la disminución en la densidad de inóculo en suelo que se produce en la dehesa 3, a pesar del cultivo de la tremosilla y de partir de niveles elevados en primavera. Esto podría deberse a la fertilización con purín ya que esta finca es una explotación ganadera con una elevada densidad de ganado porcino, en la que se distribuye con bastante frecuencia el purín en el suelo. Nuestros resultados sugieren que se debe replantear la siembra del altramuz amarillo tanto en las dehesas afectadas por la podredumbre radical de los *Quercus*, como en las no afectadas, ya que este cultivo mantiene o aumenta la densidad del patógeno en el suelo, suponiendo una seria amenaza para la supervivencia del arbolado de la dehesa. Por otra parte, en base a lo obtenido en este estudio, en la búsqueda de métodos de control efectivos contra la podredumbre radical de los *Quercus*, debemos considerar aquellos que pueden disminuir la densidad de inóculo en suelo, y en este sentido, la fertilización con purín puede ser

una buena alternativa. Por este motivo, en la búsqueda de métodos de control preventivo contra la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* en las dehesas andaluzas, se hace necesario investigar la aplicación de estiércoles al suelo como posible herramienta de control biológico del patógeno.

CONCLUSIONES

Lupinus luteus, huésped herbáceo de *P. cinnamomi*, incrementa o mantiene los niveles de inóculo en suelo en condiciones naturales, lo que desaconseja su cultivo tanto si el arbolado sufre la enfermedad radical o no.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a los técnicos de la Oficina Comarcal Agraria de Huelva la ayuda prestada en la localización de las fincas, así como la ayuda prestada por R Pérez-Blanco y MA Romero, becarios del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. Este trabajo ha sido financiado por un convenio suscrito entre la Universidad de Córdoba y la Consejería de Agricultura de la Junta de Andalucía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BRASIER, C.M., 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. Sci. For.*, **53**, 347-358.
- ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, MN.
- GALLEGO, F.J.; DE ALGABA, A.P.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R., 1999. Etiology of oak decline in Spain. *Eur. J. For. Path.*, **29**, 17-27.
- KIRBY, H.W.; GRAND, L.F., 1975. Susceptibility of *Pinus strobus* and *Lupinus* spp. to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **65**, 693-695.
- JIMÉNEZ, J.J.; SERRANO, M.S.; VICENTE, V.; FERNÁNDEZ, P.; TRAPERO, A.; SÁNCHEZ, M.E., 2008. Nuevas especies de *Pythium* que causan podredumbre radical de *Quercus* en España y Portugal. *Bol. San. Veg. Plagas*, **34**, 549-562.
- MAPA, 2006. *Estadísticas agrarias*, <http://www.mapya.es>
- NAVARRO, R.M.; FERNÁNDEZ REBOLLO, P.; TRAPERO, A.; CAETANO, P.; ROMERO, M.A.; SÁNCHEZ, M.E.; FERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, I.; LÓPEZ, G., 2004. *Los procesos de decaimiento de encinas y alcornoques*. Dirección Gral. de Gestión del Medio Natural. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla.
- SÁNCHEZ, M.E.; SÁNCHEZ, J.E.; NAVARRO, R.M.; FERNÁNDEZ, P.; TRAPERO, A. 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**, 87-108.
- SÁNCHEZ, M.E.; CAETANO, P.; ROMERO, M.A.; NAVARRO, R.M.; TRAPERO, A., 2006. *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. En: *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees. Proceedings of the Third International IUFRO Working Party S07.02.09. Meeting at Freising*, 149-154. Ed. C. BRASIER, T. JUNG, W. OSSWALD. Forest Research, Farnham, UK.

SERRANO, M.S.; FERNÁNDEZ REBOLLO, P.; CARBONERO, M.D.; TRAPERO, A.; SÁNCHEZ, M.E., 2009. La tremosilla (*Lupinus luteus*): un nuevo huésped de *Phytophthora cinnamomi* en las dehesas de Andalucía occidental. *Bol. San. Veg. Plagas*, **35** (en prensa).

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H., 1985. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. McGraw-Hill, Bogotá.

TRAPERO, A.; BLANCO, M.A., 2004. Enfermedades. En: *El cultivo del olivo*. 557-614. Mundi-Prensa. Edición, 5ª revisada y ampliada. Madrid.

SUMMARY

INFLUENCE OF *LUPINUS LUTEUS* L. CROPS ON *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* INOCULUM DENSITY IN DEHESA SOILS

Phytophthora cinnamomi is a pathogen causing root rot in oak trees growing in dehesa systems and also in yellow lupine, a common pasture crop in western Andalusia. In dehesas showing different situations in terms of tree decline and disease severity in the lupines, isolation and counting of colonies of *P. cinnamomi* from soil samples has shown the ability of the herbaceous crop to maintain or increase the inoculum density and thus may enhance oak infections. The obtained results discourage the cultivation of this legume in dehesas with known presence of the pathogen in the soil, whether the trees are suffering the root disease or not.

Key words: decline, holm oak, root rot, yellow lupine.