

## Nuevas especies de *Pythium* que causan podredumbre radical de *Quercus* en España y Portugal

J. J. JIMÉNEZ, M. S. SERRANO, M. VICENTE, P. FERNÁNDEZ, A. TRAPERO, M. E. SÁNCHEZ

*Pythium spiculum*, una nueva especie recientemente descrita, se viene aislando desde 2003 de raíces y rizosfera de *Quercus rotundifolia* y *Q. suber* que sufren decaimiento en el sur de España y Portugal. En suelos donde crecen formaciones de *Quercus*, esta especie ha sido aislada con frecuencias similares a las encontradas para *Phytophthora cinnamomi*, especie que, hasta el momento, ha sido el único oomiceto descrito como patógeno radical de *Quercus* en esta región. Las inoculaciones artificiales llevadas a cabo en plántulas de *Q. rotundifolia* mostraron que *Py. spiculum* es un patógeno agresivo de las raíces de *Quercus*, aunque produce severidades de síntomas significativamente menores que *P. cinnamomi*. Este nuevo patógeno puede jugar un papel decisivo en el decaimiento de *Quercus* en la Península Ibérica. Otra especie recientemente descrita, *Py. sterilum*, también es patógena de raíces de *Quercus*, pero se ha encontrado únicamente en rizosfera de encinas enfermas en el centro de España, por lo que más que un factor activo de decaimiento, debe ser considerado como un riesgo potencial para las masas de *Quercus*.

J. J. JIMÉNEZ, M. VICENTE, A. TRAPERO, M.E. SÁNCHEZ. Dpto. Agronomía, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba. E-mail: aglsahem@uco.es

M. S. SERRANO, P. FERNÁNDEZ. Dpto. Ingeniería Forestal, Universidad de Córdoba.

**Palabras clave:** decaimiento, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium spiculum*, *Pythium sterilum*, *Quercus* mediterráneos.

### INTRODUCCIÓN

Desde principios de los años 90 se ha detectado un severo decaimiento en especies mediterráneas de *Quercus* que está dando lugar a una mortalidad generalizada de *Q. suber* y *Q. rotundifolia* (sinónimo: *Q. ilex* ssp. *ballota*) en España y Portugal (BRASIER *et al.*, 1993; BRASIER, 1996; MOREIRA *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2003a). BRASIER *et al.* (1993) llevaron a cabo una prospección en el centro y sur de España que puso de manifiesto la implicación de *P. cinnamomi* como el patógeno que causa los principales síntomas del decaimiento: podredumbre de raíces absorbentes, marchitez y muerte de la copa, aparición de sangraduras en los tron-

cos de algunos árboles afectados y producción de chupones (BRASIER *et al.*, 1993; BRASIER, 1996; MOREIRA *et al.*, 1997; 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2003a). Esta implicación de *P. cinnamomi* se basó fundamentalmente en el aislamiento de este microorganismo a partir de las raíces podridas y de la rizosfera de árboles enfermos (BRASIER *et al.*, 1993; BRASIER, 1996; MOREIRA *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2003a), y en los tests de patogenicidad llevados a cabo en encinas y alcornoques (TUSET *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1997; SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Sin embargo, hay otros factores implicados en el decaimiento de los *Quercus* mediterráneos que pueden producir síntomas aéreos similares: chancros causados por *Botryos-*

*phaeria* spp. (LUQUE y GIRBAL, 1989; SÁNCHEZ *et al.*, 2003b), el chancro carbonoso causado por *Biscogniauxia mediterranea* (JIMÉNEZ *et al.*, 2005), chancros bacterianos causados por *Brenneria quercina* (BIOSCA *et al.*, 2003), plagas de insectos (principalmente *Cerambyx* sp.), factores abióticos como la sequía severa, la mayor duración de la sequía estival, y también factores antrópicos, como la falta de regeneración natural debido al exceso de las cargas ganaderas que está dando lugar a dehesas muy envejecidas, podas mal realizadas, etc. (NAVARRO *et al.*, 2004). Con el objeto de conocer la incidencia de *P. cinnamomi* como patógeno radical de encinas y alcornoques, desde 2001 se han realizado un elevado número de aislamientos a partir de raicillas y rizosfera de árboles afectados de decaimiento (SÁNCHEZ *et al.*, 2000, 2003a, 2006). De estas prospecciones, llevadas a cabo en España y Portugal, se han obtenido con bajas frecuencias de aislamiento otras especies de *Phytophthora* a partir de muestras de suelo y/o raíz: *P. megasperma*, *P. drechsleri* y una especie no identificada (*Phytophthora* sp.) (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2006). En tests de patogenicidad, esta *Phytophthora* sp. se mostró tan virulenta como *P. cinnamomi*, siendo igualmente más agresiva en *Q. rotundifolia* que en *Q. suber* (SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Además, recientemente se han identificado dos nuevas especies de *Pythium* aisladas de encinas y alcornoques afectados de decaimiento: *Pythium spiculum* (PAUL *et al.*, 2006) y *Py. sterilum* (BELBAHRI *et al.*, 2006), pero aún no se conoce su patogenicidad en *Quercus* mediterráneos. Consecuentemente, el objetivo de este trabajo ha sido determinar la patogenicidad de estas especies de *Pythium* en *Q. rotundifolia* y el posible papel que pueden jugar en el decaimiento de los *Quercus* en el sur de España y Portugal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislamiento de oomicetos

En el período 2003-2005, se tomaron muestras en un total de 101 formaciones de

*Quercus* (montes y dehesas) con síntomas de decaimiento, 74 de ellas localizadas en España y 25 en Portugal (Cuadro 1). En cada parcela se tomaron muestras de raicillas absorbentes y suelo de la rizosfera de dos árboles afectados. Las muestras se tomaron siguiendo la metodología descrita en SÁNCHEZ *et al.* (2000), y se procesaron separadamente. Para cada muestra, las raicillas sintomáticas se lavaron al chorro de agua durante 2 h y se sembraron segmentos de raíz en el medio selectivo PARPH (CMA (Cornmeal-Agar)-Pimaricina-Ampicilina-Rifampicina-Pentacloronitrobenzeno-Himexazol) (JEFFERS y MARTIN, 1986) modificado, sustituyendo la Pimaricina por Nistatina a la misma concentración (NARPH) (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). Las colonias obtenidas en el medio selectivo NARPH se agruparon en función de su morfología y se transfirieron aislados al medio CA (Agar-Zanahoria) (Dhingra y Sinclair, 1995).

Las muestras de suelo se secaron al aire y se tamizaron (2mm de tamaño de poro). Para cada muestra se pesaron 10 g de suelo seco y se suspendieron en 200 ml de Agar-Agua estéril al 0,2% y se homogeneizaron con agitador magnético. De esta mezcla se tomaron alícuotas de 1 ml y se sembraron en placas de Petri conteniendo el medio NARPH, utilizando un asa de vidrio estéril para distribuir el material por toda la superficie de la placa. Esta dilución ha resultado la más adecuada cuando se procesan muestras de suelo de dehesas afectadas por la enfermedad, que presentan una densidad de inóculo de entre 30 y 130 propágulos por g de suelo (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). Con esta dilución se obtiene un número de colonias de *P. cinnamomi* lo suficientemente individualizadas como para poder ser contadas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). Para cada muestra de suelo se prepararon un total de 20 placas de Petri. Las placas se incubaron a 24° C en oscuridad durante 24 h y posteriormente se lavó la superficie de cada placa con agua estéril, eliminando la mezcla suelo-agar-agua. Una vez lavadas, las placas se incubaron otras 48 h a 24° C en oscuridad y las colonias obtenidas se identificaron y

Cuadro 1. Número de encinares y alcornoques prospectados en España y Portugal durante el período 2003-2005 y aislamiento de oomicetos

País	Provincia	Huésped	Número de encinares y alcornoques				
			Prospectados	Afectados por podredumbre radical	Con aislamiento positivo de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	Con aislamiento positivo de <i>Pythium spiculum</i>	Con aislamiento positivo de ambos patógenos
España	1. Cáceres	<i>Q. suber</i>	1	1	0	1	0
	2. Badajoz	<i>Q. rotundifolia</i>	1	1	0	1	0
	3. Toledo	<i>Q. rotundifolia</i>	1	1	0	1	0
	4. Ciudad Real	<i>Q. rotundifolia</i>	7	3	0	2	1
	5. Huelva	<i>Q. rotundifolia</i>	39	27	8	9	10
		<i>Q. suber</i>	3	3	0	0	3
	6. Sevilla	<i>Q. rotundifolia</i>	5	4	2	2	0
		<i>Q. suber</i>	1	1	0	1	0
	7. Córdoba	<i>Q. rotundifolia</i>	14	12	1	4	7
8. Jaén	<i>Q. rotundifolia</i>	2	2	0	2	0	
9. Cádiz	<i>Q. suber</i>	2	1	0	1	0	
Portugal	10. Alentejo	<i>Q. rotundifolia</i>	1	1	0	0	1
		<i>Q. suber</i>	11	7	4	0	3
	11. Algarve	<i>Q. suber</i>	13	10	4	1	5
Total			101	74	19	25	30

contaron. Igualmente, se transfirieron aislados al medio de cultivo CA.

La identificación de las colonias aisladas de raíz y suelo se realizó sobre montajes microscópicos de los aislados incubados en medio CA a 24° C durante 4-6 días. En estos montajes, teñidos con fucsina ácida en lactofenol, se observaron estructuras específicas, como el micelio botrioso con hinchazones hifales en racimo en el caso de *P. cinnamomi* (ERWIN y RIBEIRO, 1996) y la típica ornamentación de las oosporas en el caso de *Py. spiculum* (PAUL *et al.*, 2006).

Previamente, en 2001 se recibieron muestras de raíz y suelo de dos encinas afectadas de decaimiento situadas en el Monte de El Pardo (Madrid) que se procesaron de la misma forma ya descrita.

### Experimentos de inoculación

Los aislados utilizados para las inoculaciones artificiales se obtuvieron de raíz o suelo de encinas y alcornoques enfermos,

mantenidos en aceite mineral en la colección fúngica del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba (Cuadro 2). De estos aislados, algunos (PE154, PE155, PE156, PA053, PA054) se han utilizado para la caracterización morfológica y molecular de la especie *Py. spiculum* (PAUL *et al.*, 2006) y el aislado PE101 se utilizó para describir la especie *Py. sterilum* (BELBAHRI *et al.*, 2006). Todos los aislados que aparecen en el Cuadro 2, previamente identificados morfológicamente, se inocularon en plantas sanas de *Q. rotundifolia* de 4 años de edad. Las plantas se obtuvieron a partir de la siembra de semillas seleccionadas y se cultivaron en el invernadero del Departamento de Agronomía en macetas de plástico negro de 20 cm de diámetro, en sustrato de turba fertilizada.

Se realizaron dos experimentos de inoculación. En el primero (Experimento 1), las plantas se inocularon separadamente con dos aislados de *Py. spiculum* (PE137 y PA055, Cuadro 2). Un tercer lote de plantas se ino-

Cuadro 2. Aislados utilizados en los tests de patogenicidad sobre *Quercus rotundifolia*

Aislado	Huésped	Fecha de aislamiento	País	Provincia	Origen	Especie
PE101	<i>Quercus rotundifolia</i>	01/2001	España	Madrid	Suelo	<i>Pythium sterilum</i>
PE137		01/2003	España	Huelva	Raíz	
PE138		01/2003	España	Huelva	Raíz	
PE144		09/2004	España	Huelva	Suelo	
PE154	<i>Quercus rotundifolia</i>	09/2004	Portugal	Algarve	Suelo	
PE155		09/2004	Portugal	Algarve	Suelo	<i>Pythium spiculum</i>
PE156		03/2005	Portugal	Algarve	Suelo	
PA053	<i>Quercus</i>	09/2004	España	Huelva	Suelo	
PA054	<i>suber</i>	11/2004	España	Huelva	Suelo	
PA055		09/2004	España	Huelva	Suelo	
PE090*	<i>Quercus rotundifolia</i>	12/2000	España	Huelva	Suelo	<i>Phytophthora cinnamomi</i>

\*SÁNCHEZ *et al.*, 2003a

culó con el aislado PE090 de *P. cinnamomi* (Cuadro 2). Para la preparación de los inóculos, cada aislado se sembró separadamente en placas de Petri conteniendo 20 ml de extracto líquido de zanahoria (DHINGRA y SINCLAIR, 1995). Las placas se incubaron a 20° C en oscuridad. Tras 4 semanas de incubación, el medio líquido se filtró en condiciones asépticas y el micelio obtenido se suspendió en agua destilada estéril y se batió durante 3 min (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2004). Para *Py. spiculum*, se estimó la concentración de oosporas del inóculo utilizando una cámara Neuwauer, ajustándose a  $2 \times 10^4$  oosporas por ml añadiendo agua destilada estéril. El inóculo de *P. cinnamomi* se preparó de la misma manera, con una concentración de  $2 \times 10^4$  clamidosporas por ml. Para la inoculación, cada planta se sacó de su contenedor y el cepellón se cubrió homogéneamente con 100 ml del inóculo correspondiente antes de transferir la planta a una maceta de mayor tamaño (SÁNCHEZ *et al.*, 2004) conteniendo 3,5 l de turba. Las plantas testigo se trataron de la misma manera, añadiendo a sus cepellones 100 ml de agua libre de patógenos. Se prepararon 10 repeticiones (plantas) por inóculo ensayado, más 10 plantas testigo. Todas las macetas se colocaron

en bandejas de plástico en cámara de crecimiento (17-25° C y 12 h de luz -228  $\phi$ E/cm<sup>2</sup>s- por día). Para evitar contaminaciones, las macetas inoculadas con el mismo aislado y los testigos se situaron en bandejas separadas y se regaron según necesidad. Una semana tras la inoculación, cada bandeja, incluyendo los testigos, se llenó parcialmente de agua del grifo, como ya se ha descrito en trabajos anteriores (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2004), manteniendo el encharcamiento del sustrato durante 2 días por semana (SÁNCHEZ *et al.*, 2004) durante 3 meses (Figura 1).

Las diferencias en virulencia detectadas entre ambos aislados de *Py. spiculum* nos llevaron a plantear el segundo experimento de inoculación, incluyendo un mayor número de aislados y un aislado adicional de *Py. sterilum*. Así, en el Experimento 2, las plantas de encina de 4 años se inocularon con todos los aislados que se muestran en el Cuadro 2, incluyendo el aislado PE090 de *P. cinnamomi* (SÁNCHEZ *et al.*, 2003a). Los inóculos se prepararon de la misma forma anteriormente descrita, con una concentración final de  $2 \times 10^4$  oosporas por ml (*Py. spiculum*) o  $2 \times 10^4$  clamidosporas por ml (*P. cinnamomi*). Como *Py. sterilum* no produce esporas de resistencia, el inóculo de esta especie se preparó



Figura 1. Plantas de encina inoculadas con *P. cinnamomi* o *Py. spiculum* sometidas a encharcamiento periódico del sustrato.

batiendo el micelio producido en tres placas de Petri por cada 100 ml de agua estéril (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2004). El método de inoculación fue similar al utilizado en el Experimento 1, añadiendo 100 ml de suspensión acuosa de material fúngico por planta. Las plantas, incluyendo los testigos, se colocaron igualmente en bandejas de plástico en cámara de crecimiento (17-25° C y 12 h luz -228  $\mu\text{E}/\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$  por día). Se prepararon diez repeticiones (plantas) por aislado ensayado, incluyendo los testigos. En este experimento las plantas se sometieron a encharcamiento continuo para acelerar el proceso y que los síntomas de la enfermedad se manifestaran en un tiempo más corto (SÁNCHEZ *et al.*, 2004). Una semana tras la inoculación, cada bandeja, incluyendo los testigos, se llenó parcialmente con agua del grifo hasta

el final del experimento, 4 semanas después. El nivel del agua en las bandejas se mantuvo entre 4-6 cm por debajo de la superficie del sustrato añadiendo agua periódicamente, como ya se ha descrito anteriormente (SÁNCHEZ *et al.*, 2000, 2004).

Al término de cada experimento, la severidad de síntomas foliares y radicales se evaluó en una escala 0-4, según el porcentaje de hojas amarillas o marchitas o de podredumbre radical (0 = 0% de tejido sintomático, 1 = 10-33%, 2 = 34-66%, 3 = más del 67%, 4 = parte aérea o raíz muerta) (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2004). Con los datos de severidad de síntomas obtenidos se realizó un análisis de varianza y los valores medios se compararon entre sí mediante el test LSD protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985) a  $P < 0.05$ . Además, se tomaron muestras de raíz de

plantas testigo e inoculadas y se sembraron en el medio NARPH para el reaislamiento del patógeno inoculado.

**Frecuencia de *P. cinnamomi* y *Py. spiculum* en suelos de dehesas afectadas por el decaimiento de los *Quercus***

Se eligieron seis dehesas en la provincia de Huelva (Figura 2), en las que previamente se había detectado la presencia de ambos patógenos, para comparar su frecuencia de aislamiento a partir de muestras de suelo. En el otoño de 2005, se eligieron seis árboles sintomáticos en cada dehesa, alejados entre

sí al menos 10 m y se tomaron cuatro submuestras de suelo de la rizosfera de cada uno de ellos, siguiendo la metodología descrita en SÁNCHEZ *et al.* (2000). Para cada parcela, las cuatro submuestras se mezclaron homogéneamente, resultando un total de 400 g de suelo por muestra. Cada muestra de suelo se secó al aire, se tamizó y se procesó de la misma manera descrita anteriormente, pero sembrando un total de 50 placas del medio NARPH para cada muestra. Las placas se incubaron y lavaron en las mismas condiciones ya descritas y las colonias obtenidas se identificaron morfológicamente y se contaron.

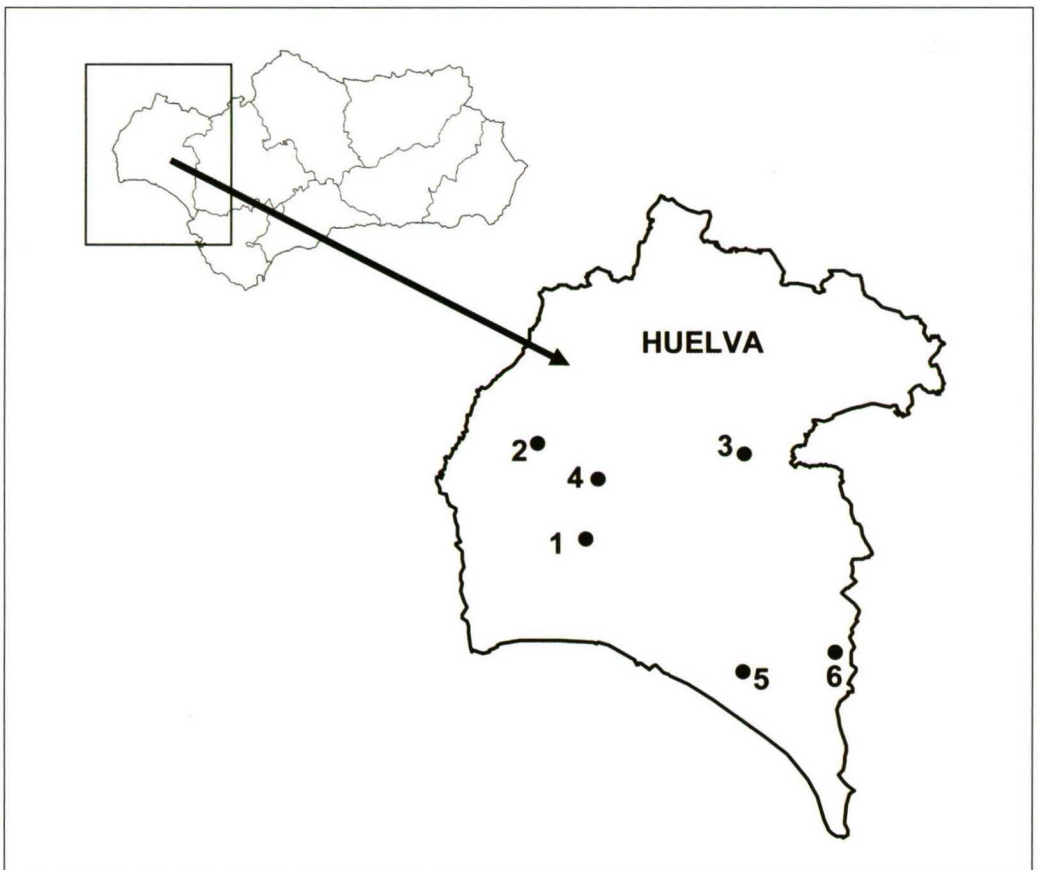


Figura 2. Localización de las dehesas afectadas de decaimiento elegidas en la provincia de Huelva para el aislamiento de oomicetos a partir de muestras de suelo. 1: El Campillo, 2: Dehesa Los Bueyes. 3: El Partido, 4: Dehesa Boyal, 5: Almonte, 6: Hinojos (ver Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencias de aislamiento de *Pythium spiculum* y *Phytophthora cinnamomi* a partir de muestras de suelo de dehesas afectadas de decaimiento en la provincia de Huelva

Huésped	Dehesa	Frecuencia de aislamiento (propágulos por g de suelo)	
		<i>Pythium spiculum</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
<i>Quercus rotundifolia</i>	1. El Campillo	20	49
	2. Dehesa los Bueyes	110	19
	3. El Partido	22	10
<i>Quercus suber</i>	4. Dehesa Boyal	14	12
	5. Almonte	6	4
	6. Hinojos	3	16

Los resultados obtenidos se expresaron como propágulos por g de suelo. Como las muestras de suelo fueron previamente secadas, se asumió que cada colonia obtenida resultó de la germinación de al menos una spora de resistencia (oospora o clamidospora).

**RESULTADOS**

**Aislamiento de oomicetos**

Los resultados de aislamiento de oomicetos obtenidos en este trabajo se muestran en el Cuadro 1. De un total de 101 fincas con síntomas de decaimiento muestreadas, 74 mostraban podredumbre radical y en todas ellas se aislaron oomicetos a partir de las muestras de raíz y/o suelo. En las 27 fincas restantes, los síntomas aéreos de decaimiento no estaban asociados a la presencia de podredumbre radical. En estas muestras no se aislaron oomicetos de las raicillas y sólo ocasionalmente se registraron bajos niveles de aislamiento en suelo.

Los síntomas aéreos observados en las distintas fincas fueron siempre inespecíficos: escaso crecimiento de los brotes del año, amarillez y marchitez foliar, defoliación, muerte regresiva de ramas e incluso muerte de árbol, independientemente de que se aislara únicamente *P. cinnamomi* (20 fincas), sólo *Py. spiculum* (25 fincas), ambos patógenos (29 fincas) o no se aislara ningún patógeno radical.

*Pythium spiculum* mostró colonias muy irregulares en el medio selectivo NARPH.

Las colonias consistieron en unas pocas ramas creciendo a partir de un punto central en el que había germinado el propágulo (forma de estrella de mar). Por el contrario, *P. cinnamomi* mostraba colonias redondas muy ramificadas. Las observaciones microscópicas de las estructuras desarrolladas en el medio CA mostraron la presencia de oosporas espiculadas típicas en las colonias de *Py. spiculum* (Figura 3), y el micelio botrioso con hinchazones hifales en racimo (Figura 4a) y clamidosporas (Figura 4b), típico de *P. cinnamomi*.

La frecuencia de aislamiento a partir de muestras de raíz, expresada como porcentaje de fragmentos de raíz que daban lugar a una colonia de *P. cinnamomi* o *Py. spiculum*, cuando se sembraba en NARPH, varió del 8 al 87%. Para las muestras de suelo, el núme-



Figura 3. Oosporas esféricas ornamentadas características de *Pythium spiculum*.

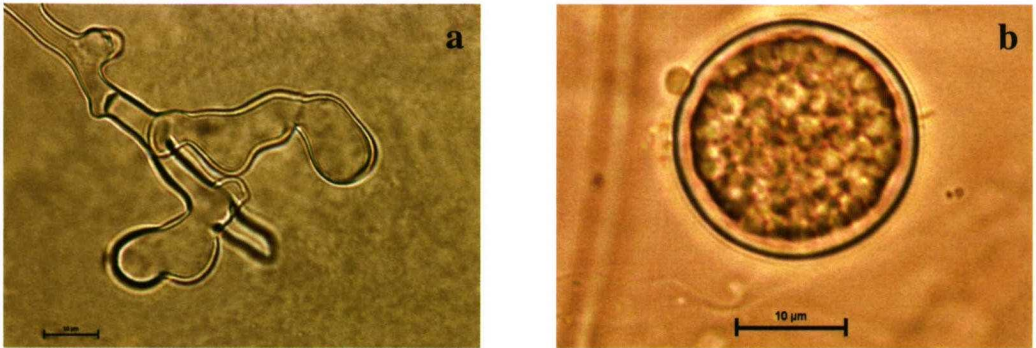


Figura 4. a) Micelio botrioso con hinchazones hifales en racimo y b) clamidosporas de *Phytophthora cinnamomi*.

ro de propágulos para cada especie de oomiceto varió entre 5 y 66 por g de suelo.

*Pythium sterilum* se aisló con baja frecuencia de las muestras de suelo del Monte de El Pardo (Madrid), no obteniéndose ninguna otra especie de oomiceto de estas muestras.

### Experimentos de inoculación

Al término de ambos experimentos, todas las plantas inoculadas mostraron síntomas de enfermedad: necrosis radical (Figura 5), extensa en el caso de *P. cinnamomi*, acompañada de síntomas foliares de moderados a severos (Figura 6). Las plantas inoculadas con ambas especies de *Pythium* mostraron los mismos síntomas foliares ya descritos

para *P. cinnamomi* (SÁNCHEZ *et al.* 2000, 2004): una marchitez que comenzaba por los márgenes y progresaba hacia el nervio central. Ocasionalmente se observó defoliación (Figura 6c), pero en general las hojas marchitas permanecían unidas al tallo (Figura 6b). Los sistemas radicales aparecían reducidos, con necrosis de las raicillas absorbentes (Figura 5b, 5c). Por el contrario, las plantas testigo mostraron un bajo nivel de síntomas radicales (Figura 5a) y en algunos casos incluso se pudo constatar el crecimiento de nuevas raicillas. En ambos experimentos, el patógeno inoculado se recuperó siempre de las raicillas necróticas de las plantas inoculadas, con una frecuencia del 20-80%, de los segmentos de raíz sembradas en NARPH.

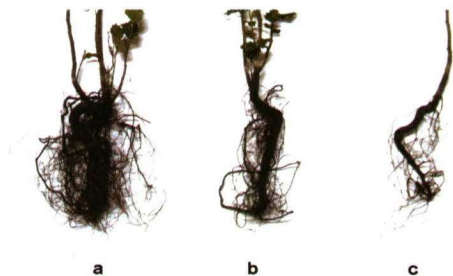


Figura 5. Síntomas radicales en plantas de encina, a) testigo no inoculado, b) inoculada con *Py. spiculum*, c) inoculada con *P. cinnamomi*.

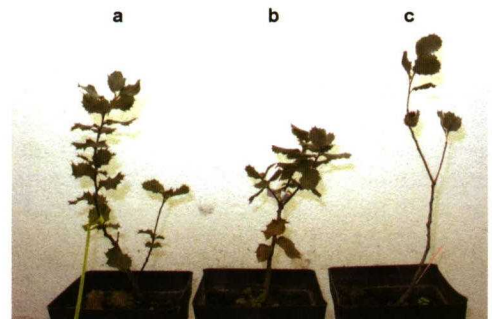


Figura 6. Síntomas foliares en plantas de encina, a) testigo no inoculado, b) inoculada con *Py. spiculum*, c) inoculada con *P. cinnamomi*.



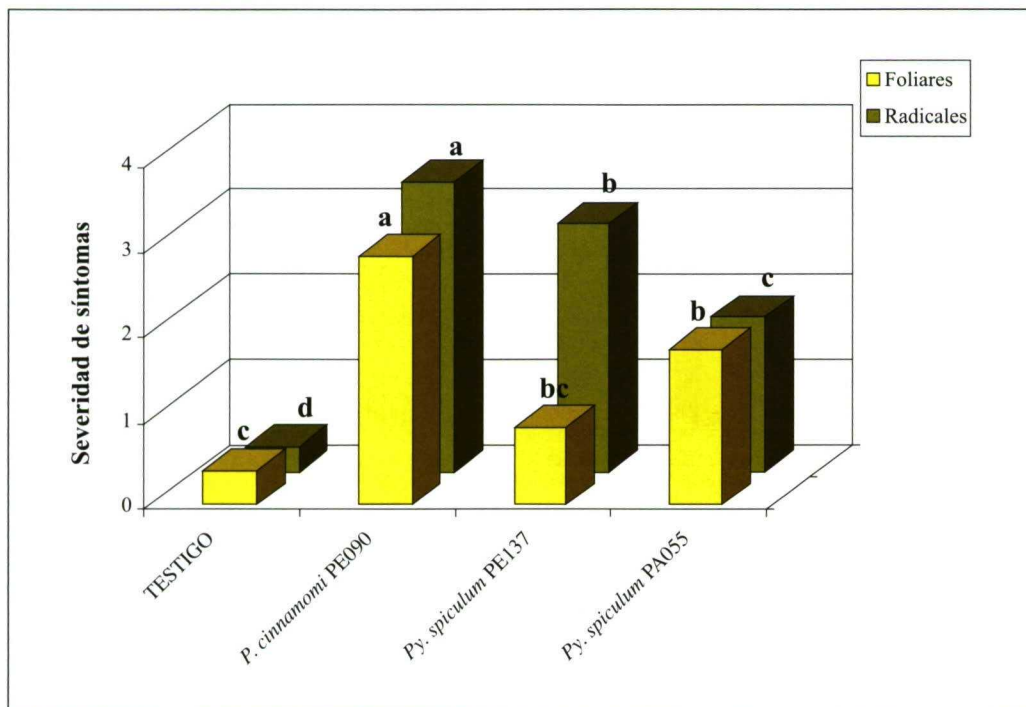


Figura 7. Patogenicidad de aislados de *Pythium spiculum* en *Quercus rotundifolia* (Experimento 1) bajo condiciones de encharcamiento periódico del sustrato (2 días por semana).

Escala de severidad de síntomas: 0 = 0%, 1 = 10-33%, 2 = 34-66%, 3 = más del 67%, 4 = planta muerta. Para cada columna, los valores con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher ( $P < 0.05$ ) (Steel y Torrie, 1985).

Ninguno de los tres patógenos se recuperó nunca de las plantas testigo.

Experimento 1: Los valores medios de severidad de síntomas registrados en las plantas inoculadas y testigo se muestran en la Figura 7, junto con la comparación de medias para cada aislado inoculado. El análisis de varianza mostró diferencias significativas de severidad de síntomas radicales entre las plantas inoculadas y las testigo. Además, los valores registrados para los síntomas radicales difirieron de unos aislados a otros. Las plantas inoculadas con *P. cinnamomi* mostraron valores de necrosis radical estadísticamente mayores que ambos aislados de *Py. spiculum*, que también difirieron entre ellos.

Experimento 2: Los resultados del experimento aparecen en la Figura 8. Cuatro sema-

nas tras el encharcamiento continuo del sustrato, todas las plantas inoculadas con *P. cinnamomi* mostraron marchitez foliar y necrosis radical severa, mientras que las plantas inoculadas con *Py. sterilum* o *Py. spiculum* mostraron síntomas moderados o severos en función del aislado inoculado. La severidad de síntomas radicales siempre resultó significativamente mayor en las plantas inoculadas con respecto a las testigo para los tres patógenos inoculados, siendo *P. cinnamomi* la especie más virulenta, produciendo una necrosis radical estadísticamente superior al resto de aislados. De nuevo se detectaron diferencias en virulencia entre los aislados de *Py. spiculum*. El principal grupo de aislados (siete de nueve) produjeron valores de necrosis radical similares al aislado de

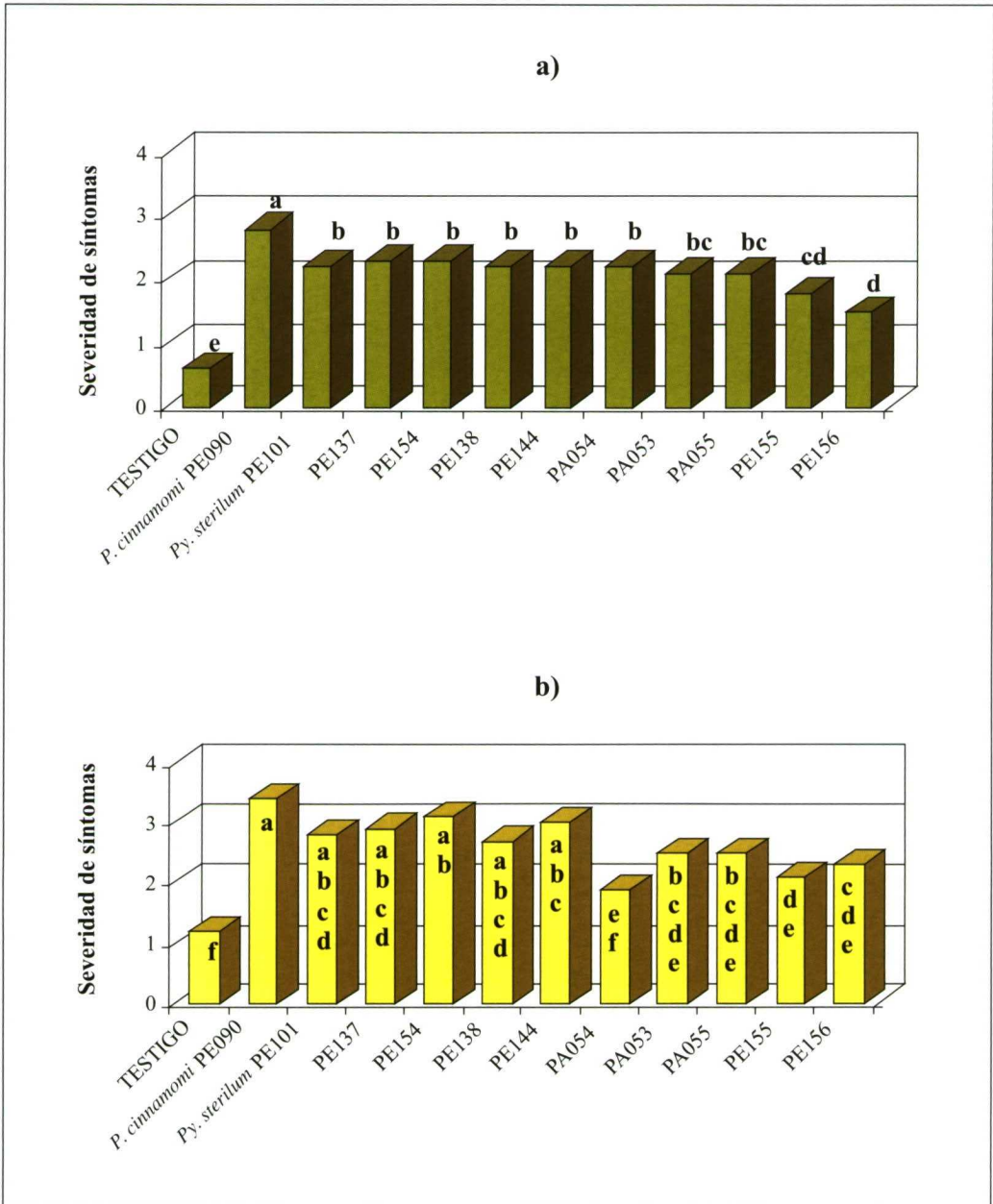


Figura 8. Patogenicidad de aislados de *Pythium sterilum* y *Py. spiculum* en *Quercus rotundifolia* (Experimento 2) en condiciones de encharcamiento continuo del sustrato.

Escala de severidad de síntomas: 0 = 0%, 1 = 10-33%, 2 = 34-66%, 3 = más del 67%, 4 = planta muerta. Para cada columna, los valores con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher ( $P < 0.05$ ) (Steel y Torrie, 1985).

- a) Síntomas radicales
- b) Síntomas foliares

*Py. sterilum* y significativamente mayores que los producidos por el segundo grupo de dos aislados de *Py. spiculum* (Figura 8).

En ambos experimentos los síntomas foliares secundarios también difirieron entre aislados de forma comparable a los síntomas radicales, aunque no hubo una correspondencia total entre el daño radical y el desarrollo de la marchitez foliar.

### Frecuencia de *P. cinnamomi* y *Py. spiculum* en suelos de dehesas afectadas por el decaimiento de los *Quercus*

Las colonias que se obtuvieron de las muestras de suelo fueron identificadas como *Py. spiculum* o *P. cinnamomi* en función de la distinta morfología de las colonias y la observación microscópica de sus estructuras características. Las frecuencias de aislamiento de *Py. spiculum* y *P. cinnamomi* en las muestras de suelo tomadas en las seis dehesas seleccionadas en Huelva aparecen en el Cuadro 3. En general, la densidad de inóculo en el suelo para ambas especies patógenas es más elevada en dehesas de encina (media de  $38 \pm 27$  propágulos por g de suelo) que en las de alcornoque (media de  $9 \pm 5$  propágulos por g de suelo), aunque la frecuencia relativa de cada patógeno mostró una alta variabilidad entre fincas. *Phytophthora cinnamomi* fue la especie dominante en las dehesas 1 y 6, *Py. spiculum* en las dehesas 2 y 3, y ambos oomicetos fueron igualmente frecuentes en las dehesas 4 y 5 (Cuadro 3), aunque los síntomas de la enfermedad fueron similares en las seis fincas.

## DISCUSIÓN

La podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* se ha descrito como la principal enfermedad asociada al decaimiento de los *Quercus* en el sur de España y Portugal (BRASIER, 1996; TUSET *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2003; NAVARRO *et al.*, 2004). Este trabajo muestra que *Py. spiculum* es un patógeno tan frecuente como *P. cinnamomi* en montes y dehesas de *Quercus* que sufren decaimiento

en esta región. Los dos patógenos aparecen juntos en un tercio de las fincas investigadas. Las frecuencias de aislamiento obtenidas de raicillas y suelo son muy variables entre fincas, probablemente debido al distinto momento y año de muestreo, con diferentes temperaturas y humedad del suelo, condiciones que resultan críticas al menos para el aislamiento de *P. cinnamomi* (SÁNCHEZ *et al.*, 2003a). Por esta razón se realizó una prospección más intensa en otoño, que es el mejor momento para el aislamiento de oomicetos en el sur de España (SÁNCHEZ *et al.*, 2003a), a partir de muestras de suelo. Se eligió la provincia de Huelva por ser la zona más severamente afectada por la podredumbre radical en Andalucía (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2006; NAVARRO *et al.*, 2004). En general, esta segunda prospección mostró la existencia de niveles similares de inóculo en el suelo en las distintas fincas estudiadas, no apareciendo un patógeno con mayor frecuencia que el otro causando podredumbre radical. *Pythium spiculum* se ha descrito en otros ecosistemas distintos: en viñedos en Francia (PAUL *et al.*, 2006) y en raíces podridas de *Prunus* sp., *Castanea sativa* y *Celtis australis* en Andalucía (Informes Internos, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía).

Las inoculaciones artificiales han demostrado que ambas especies de *Pythium*, *Py. spiculum* y *Py. sterilum*, son patógenos agresivos de las raíces absorbentes de *Q. rotundifolia*, si bien *P. cinnamomi* resultó significativamente más virulenta que cualquiera de las dos especies de *Pythium* recientemente descritas. Además, como ya se demostró para *P. cinnamomi* (SÁNCHEZ *et al.*, 2000, 2004), su patogenicidad depende del contenido hídrico en el suelo. Así, el Experimento 2, realizado en encharcamiento continuo, dio lugar al desarrollo de los síntomas de la enfermedad radical en un tiempo marcadamente menor que el Experimento 1, que se desarrolló en condiciones de encharcamiento periódico. Estos resultados están en correspondencia con el hecho de que la podredumbre radical de los *Quercus* está claramente asociada con el encharcamiento oca-

sional del suelo en condiciones naturales (BRASIER, 1996; SÁNCHEZ *et al.*, 2000). En ambos experimentos de inoculación, la severidad de síntomas radicales en las plantas testigo siempre fue significativamente menor que en las plantas inoculadas mantenidas en las mismas condiciones de encharcamiento. Este resultado demuestra que el encharcamiento en sí mismo no es responsable de los síntomas observados en las plantas inoculadas, tal y como ya se demostró para la podredumbre radical de *Q. rotundifolia* causada por *P. cinnamomi* (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2004). Además, hay evidencias de que el ataque de *P. cinnamomi* se reduce a las raíces absorbentes de los *Quercus* que crecen en suelos generalmente secos, pero que ocasionalmente sufren encharcamientos (BRASIER, 1996; SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Estas evidencias también pueden ser aplicables a la podredumbre radical que causan las especies de *Pythium*, que se reprodujo en plantas jóvenes con abundantes raicillas absorbentes en condiciones de encharcamiento del sustrato.

El encharcamiento periódico del sustrato parece ser particularmente favorable para la infección de huéspedes leñosos por especies de *Phytophthora* (RIBEIRO, 1978; BROWNE y MIRCETICH, 1988) y especialmente en el caso de los *Quercus* mediterráneos (SÁNCHEZ *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que el encharcamiento continuo durante un corto período de tiempo (4 semanas) también favorece la infección por parte de *P. cinnamomi* y el desarrollo de síntomas, dando lugar a una podredumbre radical menos severa pero que no difiere significativamente de la que se obtiene en condiciones de encharcamiento periódico (SÁNCHEZ *et al.*, 2004).

El Experimento 1 mostró diferencias significativas en virulencia entre los dos aislados de *Py. spiculum* inoculados, aunque los síntomas aéreos registrados fueron moderados y no difirieron entre sí. En el segundo experimento de inoculación de nuevo se puso de manifiesto que existen al menos dos grupos de aislados de esta especie que difieren en su patogenicidad en encinas.

Hasta ahora, *P. cinnamomi* era el único oomiceto implicado en el decaimiento de los *Quercus* en España y Portugal (BRASIER, 1996; TUSET *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2003a; NAVARRO *et al.*, 2004). Este trabajo constituye la primera cita de otras especies que causan podredumbre radical en los *Quercus* mediterráneos. La presencia de diferentes especies de oomicetos infectando raíces de *Quercus* parece ser la situación más frecuente en el decaimiento de *Quercus* en Europa central. Se han aislado trece especies diferentes de *Phytophthora* asociadas al decaimiento en Alemania, Suiza, Hungría, Italia, Eslovenia, Francia y Suecia (JUNG *et al.*, 1996; 2000; 2002; HANSEN y DELATOUR, 1999; VETTRAINO *et al.*, 2002; JÖNSSON *et al.*, 2003). Sin embargo, hay pocas citas de especies de *Pythium* asociadas al decaimiento de los *Quercus* en Europa (JUNG *et al.*, 1996; JÖNSSON *et al.*, 2003; BELBAHRI *et al.*, 2005). Ambos patógenos, *P. cinnamomi* y *Py. spiculum*, aparecen frecuentemente y al mismo tiempo infectando raíces de *Quercus* en el suroeste de España y sur de Portugal, las zonas más severamente afectadas por la podredumbre radical (MOREIRA *et al.*, 1999; NAVARRO *et al.*, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2006). Sin embargo, la frecuencia relativa de cada patógeno puede ser muy variable entre fincas, como se ha demostrado en Huelva. Cómo estos dos patógenos pueden sobrevivir juntos sin competir en la colonización de las raíces de los *Quercus*, es una cuestión que actualmente se está investigando.

En estos experimentos también se ha demostrado la patogenicidad de *Py. sterilum* en *Q. rotundifolia*, aunque esta especie nunca se ha aislado de raíces en condiciones naturales, por lo que no hay evidencias de su posible implicación en el decaimiento de los *Quercus*. Sin embargo, esta nueva especie de *Pythium* puede representar un riesgo potencial para las formaciones de *Quercus* en el centro de España.

La mala salud de los *Quercus* en el sudoeste andaluz y en el sur de Portugal se

explica mejor por una enfermedad de etiología simple causada por *P. cinnamomi* que como un decaimiento, si bien algunos factores abióticos, como la alternancia de períodos secos y húmedos en la región, pueden jugar un papel crucial en la incidencia de la enfermedad (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2003a; 2006; NAVARRO *et al.*, 2004; MOREIRA y MARTINS, 2005). Esta situación no es la misma que la que se registra en el resto de Andalucía, donde *P. cinnamomi* representa un factor de decaimiento de entre muchos otros (NAVARRO *et al.*, 2004; SÁNCHEZ *et al.*, 2006). Nuestros resultados indican que *Py. spiculum* debe ser tenido en cuenta como un factor de decaimiento, sobre todo en aquellos casos en los que los síntomas de podredumbre radical no aparecen asociados a la presencia de *P. cinnamomi*. Aunque se han detectado diferencias de virulencia entre

distintos aislados de *Py. spiculum*, incluso los aislados menos virulentos son capaces de infectar la raíz de los *Quercus* y causar la enfermedad radical. Por el contrario, más que un factor activo de decaimiento, *Py. sterilum* debe considerarse como un riesgo potencial para los montes y dehesas de *Quercus*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto AGL2005-07151, por el programa europeo INTERREG III y la Consejería de Medio Ambiente (Junta de Andalucía). Los autores quieren también agradecer la colaboración del Dr. R. Tapias (Universidad de Huelva) por suministrarlos las muestras de suelo de la provincia de Huelva.

## ABSTRACT

JIMÉNEZ, J. J., M. S. SERRANO, M. VICENTE, P. FERNÁNDEZ, A. TRAPERO, M. E. SÁNCHEZ. 2008. New *Pythium* species causing root rot on *Quercus* in Spain and Portugal. *Bol. San. Veg. Plagas*, 34: 549-562.

*Pythium spiculum*, a recently described new species, has been frequently isolated from declining *Quercus rotundifolia* and *Q. suber* roots and rhizosphere since 2003 in southern Spain and Portugal. In soils of declining *Quercus* forests this species was found as frequently as *Phytophthora cinnamomi* which, until now, was the only oomycete described as a *Quercus* root rot pathogen in the region. Inoculation tests conducted on *Q. rotundifolia* young plants showed that *Py. spiculum* is an aggressive root pathogen, although producing severities of symptoms significantly lower than *P. cinnamomi*. This new pathogen could play a role as decline factor in southern Iberian Peninsula. Another new species, *Py. sterilum*, was also found pathogenic to *Quercus* roots but there are presently only few records of this organism isolated from rhizosphere of declining oaks in central Spain. More than an active decline factor, this species should be considered as a potential risk for *Quercus* forests.

**Key words:** decline, Mediterranean *Quercus*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium spiculum*, *Pythium sterilum*.

## REFERENCIAS

- BELBAHRI, L., CALMIN, G., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E., OSZAKO, T., LEFORT, F. 2006. *Pythium sterilum* sp. nov. isolated from Poland, Spain and France, its morphology and molecular phylogenetic position. *FEMS Microbiol Lett* 255: 209-14.
- BELBAHRI, L., OSZAKO, T., CALMIN, G., SANCHEZ-HERNANDEZ, E., PAUL, B., LEFORT, F. 2005. Characterization of *Pythium* spp. isolated from forest soils in Spain, Portugal and Poland and their possible implication in oak decline. In: *Phytophthora* in nurseries and forest stands, ed T. Oszako. IBL Forest Research Institute, Warsaw, Poland. pp. 5-18.
- BIOSCA, E.G., GONZÁLEZ, R., LÓPEZ-LÓPEZ, M. J., SORIA, S., MONTON, C., PÉREZ-LAORGA, E., LÓPEZ, M. M. 2003. Isolation and characterization of *Brenneria quercina*, causal agent for bark canker and

- drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. *Phytopathology* **35**: 485-92.
- BRASIER, C. M., ROBREDO, F., FERRAZ, J. F. P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathol* **42**: 140-145.
- BRASIER, C. M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann Sci For* **53**: 347-358.
- BROWNE, G. T., MIRCETICH, S. M. 1988. Effects of flood duration of the development of *Phytophthora* root and crown rots of apple. *Phytopathology* **78**: 846-851.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. Basic plant pathology methods. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, 1995.
- ERWIN, D. C., RIBEIRO, O. K. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, MN, USA, APS Press, 1996.
- HANSEN, E. M., DELATOUR, C. 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. *Ann Sci For* **56**: 539-547.
- JEFFERS, N. S., MARTIN, J. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis* **70**: 1038-1043.
- JIMÉNEZ, J. J., SÁNCHEZ, M. E., TRAPERO, A. 2005. El Chancro Carbonoso de *Quercus* II: Patogenicidad de *Biscogniauxia mediterranea*. *Bol. San. Veg. Plagas* **31**: 563-575.
- JÖNSSON, U., LUNDBERG, L., SONESSON, K., JUNG, T. 2003. First records of soilborne *Phytophthora* species in Swedish oak forests. *For Path* **33**: 175-179.
- JUNG, T., BLASCHKE, H., NEUMANN, P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur J For Path* **26**: 253-272.
- JUNG, T., BLASCHKE, H., OSSWALD, W. 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathol* **49**: 706-718.
- JUNG, T., HANSEN, E. M., WINTON, L., OSSWALD, W., DELATOUR, C. 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycol Res* **106**: 397-411.
- LUQUE, J., GIRBAL, J. 1989. Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *Eur J For Path* **19**: 7-13.
- MOREIRA, A. C., FERRAZ, J. F. P., CLEGG, J. M. 1997. Susceptibility of *Quercus suber* and *Q. rotundifolia* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Congress MPU, Montpellier. pp. 427-431.
- MOREIRA, A. C., FERRAZ, J. F. P., CLEGG, J. 1999. The involvement of *Phytophthora cinnamomi* in cork and holm oak decline in Portugal. Proceedings of the 1st IUFRO International Meeting on Phytophthoras in forest and wildland ecosystems. Hansen EM, Sutton W (eds), Grants Pass, Oregon, USA, pp. 132-135.
- MOREIRA, A. C., MARTINS, J. M. S. 2005. Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *For Path* **35**: 145-162.
- NAVARRO, R. M., FERNÁNDEZ, 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. 32 pp.
- PAUL, B., BALA, K., BELBAHRI, L., CALMIN, G., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E., LEFORT, F. 2006. A new species of *Pythium* with ornamented oogonia: morphology, taxonomy, ITS region of its rDNA, and its comparison with related species. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 317-323.
- RIBEIRO, O. K. A source book of the genus *Phytophthora*. Vaduz, J Cramer, 1978.
- RODRÍGUEZ, M., SÁNCHEZ, M. E., TRAPERO, A. 2004. Desarrollo de un método eficaz para la cuantificación de *Phytophthora cinnamomi* en muestras de suelo. XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. Lloret de Mar, Spain.
- SÁNCHEZ, M. E., CAETANO, P., FERRAZ, J., TRAPERO, A. 2000. El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva. *Bol. San. Veg. Plagas* **26**: 447-464.
- SÁNCHEZ, M. E., SÁNCHEZ, J. E., NAVARRO, R. M., FERNÁNDEZ, P., TRAPERO, A. 2003a. 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., VENEGAS, J., ROMERO, M. A., PHILLIPS, A. J. L., TRAPERO, A. 2003b. El chancro de encinas y alcornoques causado por *Botryosphaeria* spp. en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas* **29**: 593-612.
- SÁNCHEZ ME, ANDICOBERRY S, TRAPERO A. 2004. Patogenicidad de *Phytophthora* spp. causantes de podredumbre radical de *Quercus ilex* ssp. *ballota* en viveros forestales. *Bol. San. Veg. Plagas* **30**: 239-255.
- 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, Germany 11-18 September 2004. Brasier C, Jung T, Oßwald W (Eds). Forest Research, Farnham, UK. pp. 149-154.
- STEEL, R. G. D., TORRIE, J. H. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Bogotá, McGraw-Hill, 1985.
- TUSET, J., HINAREJOS, C., MIRA, J. L., COBOS, J. 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques. *Bol San Veg Plagas* **22**: 491-499.
- VETTRAINO, A. M., BARZANTI, G. P., BIANCO, M. C., RAGAZZI, A., CAPRETTI, P., PAOLETTI, E., LUISI, N., ANSELMI, N., VANNINI, A. 2002. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *For Path* **32**: 19-28.

(Recepción: 7 abril 2008)

(Aceptación: 23 septiembre 2008)