

## Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña

J. P. MANSILLA, C. PINTOS Y M.<sup>a</sup> C. SALINERO

En el presente trabajo se identifica al hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands. como el agente causal de una serie de síntomas (decaimiento general de la planta, crecimiento menor, hojas cloróticas...) encontrados en viñedos de la variedad albariño, aislados o en pequeños grupos, en los Ayuntamientos de El Rosal y La Cañiza pertenecientes a la provincia de Pontevedra. Para ello se ponen a punto las técnicas que permiten el aislamiento idóneo del patógeno, utilizándose, para la inoculación, plantas de viña obtenidas por cultivo «in vitro» para favorecer la aceleración del proceso.

J. P. MANSILLA, C. PINTOS Y M.<sup>a</sup> C. SALINERO. Excma. Diputación Provincial de Pontevedra. Servicio Agrario. Estación Fitopatológica «Do Areeiro». Subida a La Robleda, s/n. 36153 Pontevedra.

**Palabras clave:** *Phytophthora cinnamomi*, viña, cultivo «in vitro», Pontevedra, Galicia, España.

### INTRODUCCION

*Phytophthora cinnamomi* fue descrito originariamente por RANDS en 1922. Posteriormente, ha sido aislado como patógeno de viña en una serie de países como Sudáfrica, India, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (California); sin embargo, según nuestras referencias, su aislamiento en España sobre este cultivo no había dado resultados positivos hasta la fecha.

El hecho de observar en viñas de la variedad albariño síntomas coincidentes con los de este patógeno nos ha movido a poner a punto las técnicas idóneas que permitan su aislamiento e identificación, proponiendo para la realización de las inoculaciones la utilización de plantas de viña de dicha variedad obtenidas por cultivo «in vitro», las cuales permiten comprobar el poder patógeno del hongo de una forma mucho más rápida que las plantas utilizadas habitualmente.

### SINTOMAS

Las viñas afectadas poseen un crecimiento menor que las plantas sanas, apareciendo entre el follaje hojas cloróticas, llegando a secar totalmente la planta si la infección se ha producido en fases tempranas del desarrollo de la misma.

La infección primaria puede producirse a través de las pequeñas raíces absorbentes que toman entonces un color marrón negro, extendiéndose posteriormente, a medida que avanza la invasión, a la raíz principal. En otros casos, ataca en primer lugar la base del tallo a nivel del cuello de la raíz, para extenderse a continuación, varios centímetros por encima y por debajo del terreno, hacia el sistema radicular. (Fig. 1)

Si eliminamos con un cuchillo parte de la corteza alrededor del cuello, observamos áreas de tejido necrótico que denotan la presencia de la enfermedad.



Fig. 1.—Raíz afectada por *P. cinnamomi*.

Se observó que la presencia del hongo era más manifiesta en viñas aisladas o en pequeños grupos (principalmente de zonas que presentan un drenaje insuficiente y consecuentemente se encharcan con relativa facilidad), siendo más frecuente entre jóvenes viñedos.

## MATERIAL Y METODOS

### Toma de muestras

Para el aislamiento del patógeno se recogieron muestras de suelo y de plantas con síntomas de la enfermedad.

Las muestras de suelo se tomaron en las zonas próximas a las raíces absorbentes, que suelen situarse a bastante profundidad.

Las plantas con síntomas de la enfermedad se trasladaron al laboratorio donde se tomaron las raíces.

### Aislamiento del hongo

#### *A partir de muestras de suelo*

Se siguieron varios procedimientos basados en la utilización de trampas vegetales o cebos (DHINGRA & SINCLAIR, 1985) que permiten «atrapar» el hongo, el cual se aísla posteriormente en medios selectivos para identificar la especie de *Phytophthora* de que se trate.

Las trampas vegetales a base de pétalos inmaduros de clavel u hojas jóvenes de aguacate troceadas son las más frecuentemente utilizadas en la determinación de la existencia de esporangios del hongo.

Para la preparación de las capturas se pesaron 125 gr 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 superfi-

cie 4 ó 5 pétalos inmaduros de clavel y disponiéndose 10 placas por cada muestra de suelo. El mismo método se utilizó con trozos de hojas jóvenes de aguacate o, en su defecto, hojas adultas que hayan sido desinfectadas previamente con alcohol.

Las placas se incubaron en condiciones de laboratorio de 4 a 10 días, observándose periódicamente al microscopio a partir del segundo o tercer día para determinar así la presencia o ausencia de esporangios del hongo.

A partir de los pétalos de clavel u hojas jóvenes de aguacate que capturaron esporangios se determinó la especie de *Phytophthora* aislada sembrando dichos pétalos (después de eliminar el exceso de agua con un papel de filtro) en medios selectivos; a los 3-4 días se observa el micelio característico de *Phytophthora cinnamomi* si esta especie está presente.

En nuestro caso la utilización de hojas jóvenes de aguacate resultó muy efectiva para determinar la presencia de esporangios de *Phytophthora cinnamomi*.

También empleamos frutos de aguacate como trampa vegetal, siendo estos eficaces para el aislamiento de esta especie (ZENTMYER, *et al.*, 1967). La técnica seguida se detalla a continuación:

Se eligen frutos de aguacate de piel lisa que se encuentren lo más lejos posible de su punto de maduración y que no hayan tocado el suelo. Se disponen tales frutos en cajas pequeñas de plástico donde se introduce el suelo problema, enrasándose con agua hasta superar ligeramente el punto de saturación. Se incuba el fruto en el suelo durante 4 ó 5 días a 24-27° C, después de los cuales se retira, se lava con agua destilada y se deja 3 ó 4 días a temperatura ambiente, observándose sobre los frutos manchas de color marrón púrpura en la zona de contacto con el suelo (Fig. 2). Se toman trozos de pulpa de la zona de avance y se siembran en medios selectivos, V<sub>8</sub>, apareciendo a los 3-4 días un crecimiento miceliar típico en roseta o camelia que presenta las características del micelio de *Phytophthora cinnamomi*: micelio coraloide, «hyphal swellings», etc.

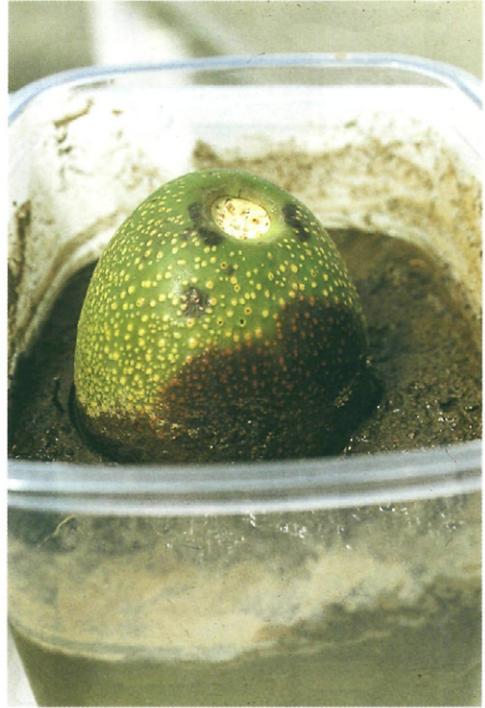


Fig. 2.—Trampa vegetal utilizando frutos de aguacate.

#### A partir de muestras de raíces y raicillas

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 placas Petri en medios selectivos, V<sub>8</sub> modificado o PONCHET (1972).

Las raíces más gruesas se desinfectaron por inmersión en lejía al 2 % durante unos minutos, se lavaron con agua estéril y se seleccionaron trozos de la zona límite interior de la corteza para sembrar en medios selectivos.

Una vez que se observó el crecimiento del micelio, se transfirió a medios de cultivo generales (PDA, agar malta, etc.) para el estudio de sus características morfológicas.

### Obtención de esporangios y liberación de zoosporas

La presencia de esporangios de *Phytophthora cinnamomi* sólo se produce en medio líquido, ya sea en las capturas, como se detalló anteriormente, o induciendo la producción de los mismos con soluciones de extractos de suelo no estériles, como describió primeramente MEHRILCH en 1935: para ello, partiendo de cultivos del hongo en PDA, se tomaron trozos de micelio con medio de cultivo que se introdujeron en placas Petri vacías a las que se añadió 1 cc de una suspensión de suelo y agua estéril, aportando posteriormente esta última hasta cubrir ligeramente el medio.

También, como variante de esta técnica, puede añadirse 1 cc de una solución de agua estéril y nitrato cálcico al 3 %, la cual parece inducir la producción de esporangios. En nuestro caso, sin embargo, resultaron mucho más efectivos los extractos de suelo no estériles.

A continuación se colocaron las placas bajo cultivo continuo y al cabo de 5-7 días se apreció la inducción de esporangios de *Phytophthora cinnamomi*. Posteriormente, las tiras de medio sobre las que se han formado los esporangios, se pasaron a placas Petri que contenían agua estéril, y se introdujeron en la nevera durante 1-2 horas; pasado ese tiempo, se mantuvieron durante 2 ó 3 horas más a temperatura ambiente, observándose, una vez transcurrido ese período, una liberación máxima de zoosporas debida al choque térmico.

La obtención de la suspensión de zoosporas que se utilizó para realizar las inoculaciones sobre las viñas obtenidas por cultivo «in vitro», se llevó a cabo de la siguiente forma: el sobrenadante de las placas mantenidas a temperatura ambiente se filtró por papel Watman n.º 1 que deja pasar solamente las zoosporas, titulándose posteriormente en una célula Thoma o Malassez, obteniéndose de esta manera la suspensión necesaria para inocular (TELLO, 1985).

### Obtención de material vegetal para la realización de las inoculaciones

La obtención de plantas de viña para las pruebas de patogenicidad se realizó por cultivo «in vitro». Para ello se sembraron en medio MS (MURASHIGE y SKOOG 1962) segmentos nodales desinfectados previamente en hipoclorito sódico al 10 % y lavados posteriormente tres veces en agua destilada estéril. A partir de estos segmentos se desarrollaron, al cabo de 25-35 días, dos pequeños brotes que se fragmentaron para obtener varios explantos nodales; de ellos —sembrados nuevamente en medio MS sin adición de hormonas—, se desarrollaron, al cabo de un mes, brotes de más de 2 cm que se trasplantaron sin fragmentar (después de ser tratados basalmente durante 10 segundos con una solución hidroalcohólica de ácido indolbutírico a razón de 2 mg/l) al mismo medio de cultivo líquido (sin gelificante), sosteniéndolos sobre bandas de papel de filtro.

En estos tubos de ensayo las plantitas formaron sus raíces, obteniéndose al cabo de 25 días plantas de viña con un abundante sistema radicular formado en el seno del medio líquido.

### IDENTIFICACION

El género *Phytophthora*, creado por de BARY en 1876, pertenece al orden Peronosporales, familia *Peronosporaceae*, subfamilia *Phythiae*. La especie *Phytophthora cinnamomi* pertenece al grupo VI de la clave de Waterhouse y se caracteriza por la presencia de esporangios no papilados con un ligero espesamiento apical, persistentes, de forma y tamaño bastante variables dependiendo de las condiciones nutricionales aunque suelen ser ovoides-elipsoides, con un tamaño comprendido entre 25-100 × 18-43 µ, y con abundante proliferación interna. (Fig. 3)

El micelio es generalmente no tabicado y de aspecto muy ramificado, pudiendo aparecer algún tabique o septo en hifas viejas o delimitando los órganos sexuales. La apari-

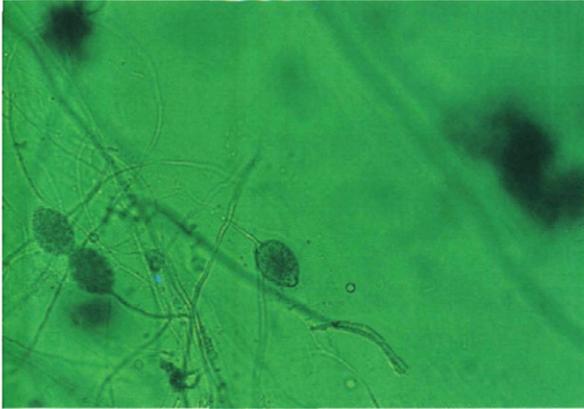


Fig. 3.—E esporangios de *P. cinnamomi*.

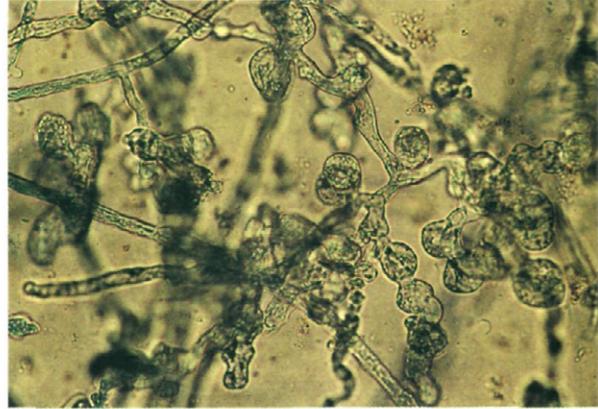


Fig. 4.—Hifas coraloides.



Fig. 5.—«Hyphal swelling».



Fig. 6.—Oogonio con anteridio anfigino.

ción de este micelio en PDA o V<sub>8</sub> es muy característica, por la presencia de hifas coraloides (Fig. 4) y de hinchamientos hifales típicamente esféricos denominados «hyphal swellings» que son determinantes de esta especie. (Fig. 5)

La presencia de clamidosporas es abundante en V<sub>8</sub>, aplicando el término clamidospora, como lo utiliza ZENTMYER, a las esporas globosas de pared gruesa que a menudo aparecen en racimos y que suelen tener su origen en «hyphal swellings» esféricas.

Tanto las características de los esporangios de nuestros aislamientos como el mico-

lio típico se corresponden con *Phytophthora cinnamomi*.

Al ser una especie heterotálica, la presencia de órganos sexuales se produce en cruzamientos interespecíficos cruzándola con *Phytophthora cryptogea*, o intraespecíficos cruzando cepas de dos tipos de compatibilidad distintos (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>), con la cepa que queremos estudiar, como demostró en 1960 GALINDO y GALLEGLY y en años posteriores otros autores: GALINDO y ZENTMYER (1964); ERWIN, *et al.*, (1967); SAVAGE, *et al.*, (1968); GALLEGLY (1968, 1970)..., que completaron los estudios

sobre la sexualidad de este género. Sin embargo, los estudios realizados han permitido constatar que la inducción de órganos sexuales de *P. cinnamomi*, puede producirse de forma homotática bajo determinadas condiciones, entre las que se incluyen: estimulación química provocada por un extracto de raíz de aguacate (ZENTMEYER, 1952), por la acción de *Trichoderma viridae* (BRASSIER, 1971), o en presencia de ciertas condiciones nutricionales. A pesar de ello, este comportamiento homotático sólo ha sido constatado, hasta la fecha, para el tipo de compatibilidad A<sub>2</sub>, que es el más frecuente.

El cruzamiento de la cepa aislada por nosotros, con cepas conocidas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> y (suministradas por el Laboratorio de Rhône-Poulenc, Torre de la Reina [Sevilla]) nos llevó a determinar, como esperábamos, que nuestra cepa era A<sub>2</sub> obteniéndose oosporas que llenan casi completamente el oogonio, oogonios esféricos, lisos y con pie estrecho y anteridios siempre anfiginos (Fig. 6).

Por todas estas características se determinó que el hongo aislado sobre cepas de la variedad albariño era *Phytophthora cinnamomi* Rands cepa tipo A<sub>2</sub>.

## PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Para determinar que el hongo aislado era el causante de los síntomas observados, se realizaron pruebas de patogenicidad que resultaron complejas debido a la obligatoria presencia de agua líquida en el medio, sustrato de la planta, necesaria para posibilitar la formación de esporangios y la posterior liberación de zoosporas.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron sobre las plantitas de viña (variedad albariño) enraizadas y en crecimiento activo en medio líquido en el interior de tubos de ensayo: se inoculó en ellos una suspensión de zoosporas en agua estéril, obtenida como se detalló anteriormente, añadiendo a cada tubo 0.5 ml de dicha

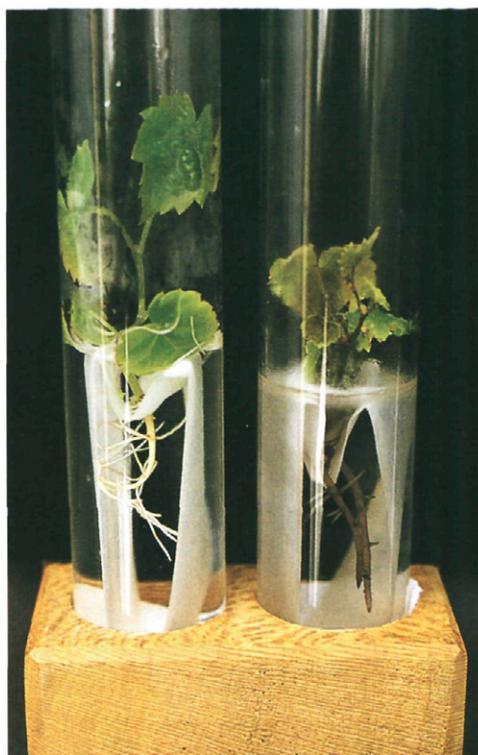


Fig. 7.—Planta de cultivo «in vitro» inoculada. Al lado planta sana.

suspensión (en su defecto puede añadirse un pequeño trozo de micelio que contenga esporangios del hongo, de los cuales se liberan, posteriormente, las zoosporas en el interior de los tubos de cultivo «in vitro»). A los dos días de la inoculación se observó que las raicillas laterales tomaban un color negruzco comenzando por la punta, e invadiendo en días sucesivos toda la raíz incluida la principal (Fig. 7), posteriormente las hojas comenzaban a amarillear y las plantitas se secaban totalmente.

Una vez extraídas y sembradas estas raíces en medios selectivos se reisoló *P. cinnamomi*, con lo cual se demostraba que este hongo era el causante de los síntomas descritos (Fig. 8).



Fig. 8.—Plantas sanas junto a plantas inoculadas una vez extraídas del tubo.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los aislamientos realizados a partir de las muestras de viña de la variedad albariño recibidas en la Estación Fitopatológica «Do Areeiro», así como de los muestreos realizados por nosotros mismos, han dado como resultado la presencia del género *Phytophthora* en los ayuntamientos de la provincia de Pontevedra que se muestran en el mapa de localización (Fig. 9), aislándose *Phytophthora cinnamomi* Rands cepa tipo A<sub>2</sub> en los Ayuntamientos de El Rosal y La Cañiza.

La puesta a punto de las diferentes técnicas expuestas en este trabajo han permitido obtener un aislamiento positivo del patógeno. Entre estas técnicas cabe destacar por su novedad, la utilización de plantas de

viña de la variedad albariño obtenidas por cultivo "in vitro" para la realización de las inoculaciones. Las plantas así obtenidas permiten subsanar el problema de la necesaria presencia de agua líquida, ya que el medio utilizado es líquido, y acelerar en gran medida el proceso (la plantas manifiestan los síntomas a los dos días de la inoculación) con respecto a las utilizadas habitualmente para inocular que proceden de estaquillas de viña enraizadas y ofrecen resultados bastante variables al cabo de 2-3 meses o incluso 1 año.

Estudios posteriores permitirán obtener resultados sobre la resistencia de los patrones más comúnmente utilizados a la penetración del hongo, realizándose también ensayos de control del patógeno en laboratorio con distintas materias activas.

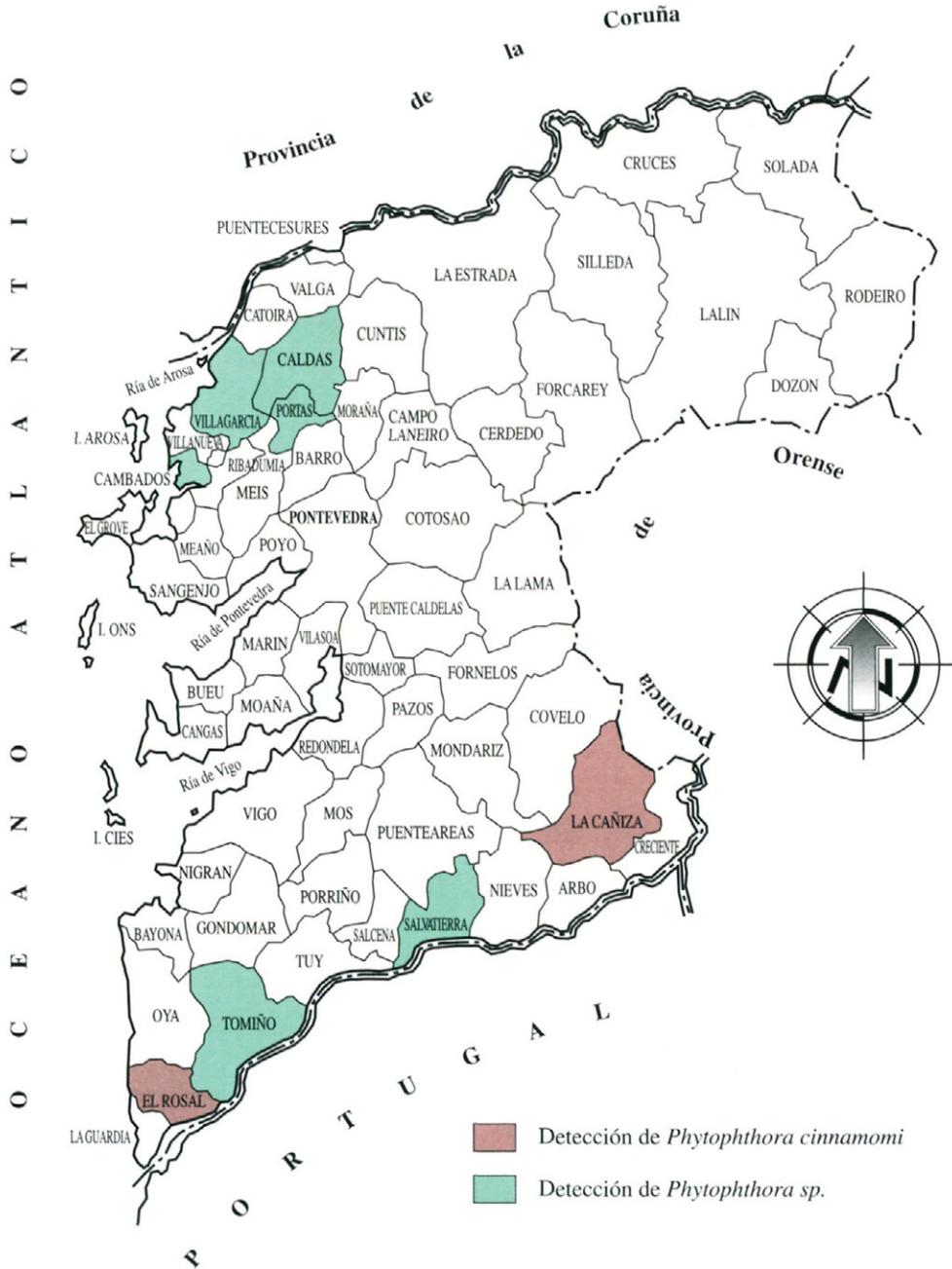


Fig. 9.—Mapa de localización de *Phytophthora* sp. y *P. cinnamomi* en la provincia de Pontevedra.

## AGRADECIMIENTOS

Nos complace manifestar nuestro agradecimiento a D. Javier Tello Marquina por su apoyo y confianza en el éxito del trabajo, a D. Joaquín Aguirre Berruezo del Laboratorio de Rhône-Poulenc (Sevilla) por su colaboración en la cesión de las cepas de *P. cin-*

*namomi* A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>; a Dña. Rosa Pérez Otero por su labor de corrección ortográfica y de expresión del trabajo, a Dña. Dolores Castro-Rial Abad por su arduo y paciente trabajo de mecanografiado y finalmente a todos los propietarios de las fincas por su apoyo en el envío y recolección de las muestras de viña.

## ABSTRACT

Mansilla, J. P.; Pintos, C. y Salinero, M.<sup>a</sup> C. (1993): Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña. *Bol. San. Veg. Plagas*, **19**(4): 541-549.

In this work the fungus *Phytophthora cinnamomi* Rands. is identified as the causal agent of some symptoms (general weakening of the plant low growing, chlorotic leaves,...) these symptoms were found in isolated vineyards or in small groups of the variety «Albariño» in El Rosal and in La Cañiza (villages belonging to the province of Pontevedra). The techniques that get a better isolation of the patogen are developed, and vineyards plants obtained by «in vitro» culture are used for the inoculation, what makes the process faster.

**Key words:** *Phytophthora cinnamomi*, vineyard, «in vitro» culture, Pontevedra, Galicia, Spain.

## REFERENCIAS

- ANDRÉS YEVES, M. F., *et al.*, 1991: *Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- NEWHOOK, F. J.; WATERHOUSE, G. M.; STAMPS, D. J., 1978: Tabular Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers* n.º 143. Commonwealth Mycological institute.
- ROGER, C. PEARSON; AUSTIN C. GOHEEN, 1988: *Compendium of grape diseases*. APS Press: 39-40.
- TELLO, J. C., 1985: Consideraciones sobre la taxonomía del genero *Phytophthora* de Bary. *II Curso Internacional sobre la protección fitosanitaria en plantaciones frutales de clima templado*. Servicio de Investigación Agraria. Diputación General de Aragón (Zaragoza).
- TUSET BARRACHINA, J. J: El género *Phytophthora*: Bases para la identificación de las especies.
- WATERHOUSE, G. M.; WATERSON, J. M., 1966: Descriptions of Pathogenic fungi an Bacterias. N.º 113. *Phytophthora cinnamomi*. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- WATERHOUSE, G. M., 1970: The genus *Phytophthora* De Bary. *Mycological Papers*, n.º 122. Commonwealth Mycological Institute.
- ZENTMYER, G. A.; PAULUS, A. O.; BURNS, R. M., 1967: Avocado root rot Calif. Agric. EXP. Stn. EXT. Serv. Circ. 511 Revised 16 pp.
- ZENTMYER, G. A., 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. *Monograph*. N.º 10. The American Phytopatological Society.

(Aceptado para su publicación: 2 marzo 1993)