

Phytophthora ramorum* nuevo patógeno en España sobre *Camellia japonica* y *Viburnum tinus

C. PINTOS VARELA, J. P. MANSILLA VÁZQUEZ, O. AGUÍN CASAL

Excma. Diputación Provincial de Pontevedra, Servicio Agrario, Estación Fitopatológica "Do Areeiro", Subida a la Robleda, s/n; 36153 Pontevedra-España. E-mail: efa@efa-dip.org

En este trabajo queda reflejado el aislamiento positivo de *Phytophthora ramorum*, por primera vez en España, sobre *Viburnum tinus* y *Camellia japonica*. Así mismo también ha sido identificado el patógeno sobre *Rhododendron* spp. La identificación se ha realizado por sus características morfológicas diferenciales así como por técnicas moleculares.

C. PINTOS VARELA, J. P. MANSILLA VÁZQUEZ, O. AGUÍN CASAL. Excma. Diputación Provincial de Pontevedra, Servicio Agrario, Estación Fitopatológica "Do Areeiro", Subida a la Robleda, s/n; 36153 Pontevedra-España. E-mail: efa@efa-dip.org

Palabras clave: *Phytophthora ramorum*, ornamentales, inoculación, PCR-RFLP, nested-PCR, Grupo de compatibilidad A1

INTRODUCCIÓN

En Europa, *P. ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld sp. nov., ha sido inicialmente descrita como una especie nueva dentro del género *Phytophthora*, en Alemania y Holanda en el año 2001, a partir de aislados de *Rhododendron* y *Viburnum* obtenidos en un período comprendido entre 1993 y 1999 y de los cuales se desconocía el agente patógeno (WERRES *et al.*, 2001). Los síntomas que provocaba, en estos cultivos, eran fundamentalmente necrosis foliares y muerte de ramas de ahí el nombre latino del patógeno. Casi a la par, en marzo de 2002, Rizzo y sus colaboradores identifican a *P. ramorum* como el agente causal del síndrome conocido coloquialmente en USA como "sudden oak death" SOD (Rizzo *et al.*, 2002), el cual ha alcanzado proporciones epidémicas en la zona central y norte de California (GOHEEN

et al., 2002) donde ha causado la muerte fundamentalmente a *Lithocarpus densiflorus* y *Quercus* spp y daños a una amplia gama de plantas nativas.

Hasta el momento, *P. ramorum*, no ha sido identificada sobre las especies europeas de roble desconociéndose, así mismo, si pueden ser naturalmente susceptibles al ataque del patógeno, aunque en ensayos de inoculaciones llevadas a cabo sobre *Quercus robur*, con aislados europeos y americanos del patógeno, se han mostrado no susceptibles al ataque del mismo (GRUYTER *et al.*, 2002). Hasta la fecha solo existe una cita del hongo afectando a una especie de roble rojo (*Quercus falcata*) originario de USA y que sería la primera cita del patógeno sobre roble en Europa.

El hongo aislado en huéspedes europeos se comporta fundamentalmente como un patógeno foliar y no es inicialmente letal,



Figura 1: Síntomas foliares en *Rhododendron* sp.

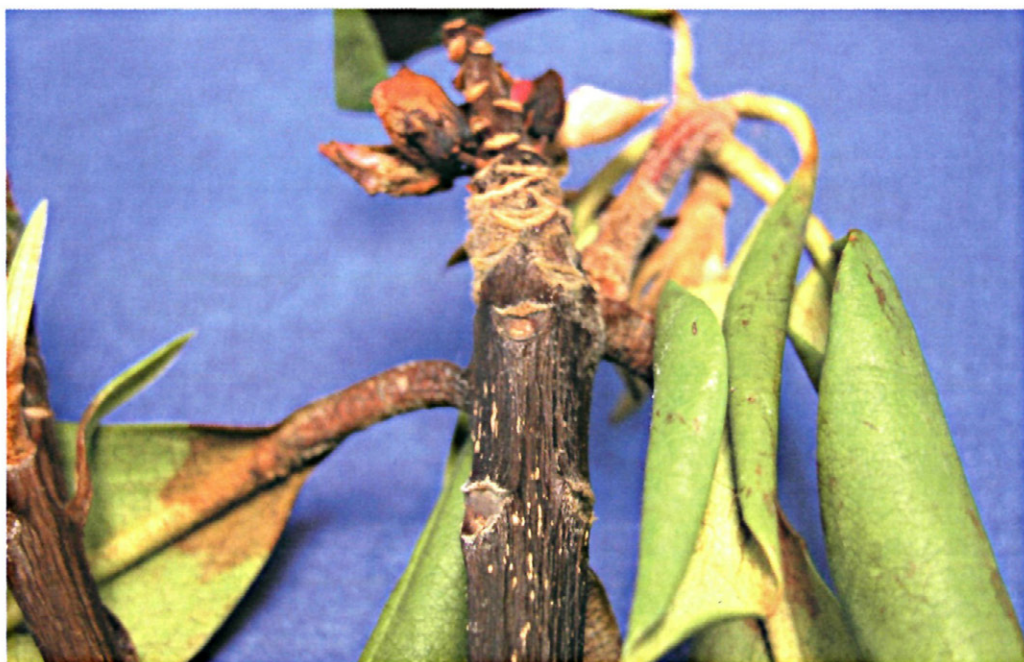


Figura 2: Necrosis del brote y la yema terminal en *Rhododendron* sp.



Figura 3: Daños foliares sobre *Viburnum tinus*.



Figura 4 : Hojas de *Camellia japonica* afectadas de *P. ramorum*.

salvo en planta joven, pero su presencia puede favorecer el ataque e invasión de organismos secundarios los cuales si pueden provocar su muerte; por el contrario, en ciertos huéspedes arbóreos americanos, como *Quercus agrifolia*, *Quercus kelloggii*, *Q. parvula* var. *shrevei* y *Lithocarpus densiflorus* el hongo parece ser mortal en muchos casos, identificándose también en USA sobre *Sequoia sempervirens* (MALONEY *et al.*, 2002) y *Pseudotsuga menziesii* (DAVIDSON *et al.*, 2002) donde hasta el momento solo aparece provocando daños sobre acículas y ramillos pero no muerte del árbol, proponiéndose en USA el nombre de “*ramorum dieback*” para los casos en donde el hongo provoca la muerte súbita del árbol y el nombre del “*ramorum leaf blight*” para los daños sobre huéspedes foliares.

La importancia de los huéspedes foliares, tanto europeos como americanos, radica no solo en el daño que el patógeno puede causarles como tales (la mayoría son ornamentales y por ello el daño estético es ya de por sí importante) sino en el que puedan actuar como reservorio del patógeno y como una importante fuente de diseminación del mismo; de hecho en USA, donde conviven huéspedes arbóreos y foliares, se ha comprobado que no existe esporulación en los chancros y ramas de los árboles infectados, postulándose que la infección en dichos árboles provendría de otros huéspedes foliares afectados próximos, a partir de los cuales se produciría la diseminación de las zoosporas por el viento o el agua hasta alcanzar los árboles.

El rango de plantas susceptibles y de países, dentro y fuera de la Unión Europea, donde el hongo ha sido identificado aumenta día a día, de hecho, desde su primera cita en Europa en el año 2001 sobre *Rhododendron* spp y *Viburnum* sp, también ha sido aislado sobre *Pieris* spp, *Kalmia latifolia*, *Arbutus unedo*, *Taxus baccata*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Leucothoe* sp, *Syringa* sp y *Camellia japonica*. Identificándose, así mismo, el primer huésped herbáceo del patógeno en USA (*Trientalis latifolia*), no descartándose a su vez la aparición de nuevos huéspedes, a

medida que se produzca la expansión de la enfermedad, de hecho en ensayos de inoculaciones se muestra distinta susceptibilidad potencial al ataque del hongo en numerosos cultivos ornamentales y forestales todavía no citados como huéspedes naturales (INMAN *et al.*, 2002).

El origen de la enfermedad, es decir, como se ha introducido *P. ramorum* en Europa y USA, es motivo de controversia entre los investigadores, sin embargo, parece poco probable la diseminación de un continente a otro postulándose, por el contrario, una entrada diferente en cada uno de los continentes en momento y lugar que se desconocen. Esta teoría parecía verse apoyada por el hecho de que solo el tipo de compatibilidad A1 había sido identificado en Europa (WERRES *et al.*, 2001; RIZZO *et al.*, 2002) y solo el A2 en USA (RIZZO *et al.*, 2003) sin embargo, recientemente, un aislado del tipo A1 ha sido encontrado en USA y otro A2 en Bélgica, si los aislados del tipo de compatibilidad A2 se establecieran en Europa o viceversa podrían existir fenómenos de recombinación genética que incrementarían su patogenicidad y su rango de huéspedes. En ensayos de inoculaciones realizados con aislados europeos y americanos del patógeno no parecen observarse diferencias apreciables entre ellos con respecto a su patogenicidad (GRUYTER *et al.*, 2002; BRASSIER *et al.*, 2002).

Actualmente *P. ramorum* se encuentra encuadrada en la lista de alerta de la EPPO (EPPO, 2002) y pendiente de su inclusión en el listado de patógenos de cuarentena de este organismo, sometida de esta forma a la legislación de la Unión Europea bajo su decisión (2002/757/EC) de 1 de noviembre de 2002 (ANÓNIMO, 2002) y pendiente de la revisión de las medidas contempladas en la misma, a finales del 2003. A partir de la primera identificación positiva del patógeno, numerosos países europeos (de dentro y fuera de la UE) han comenzado la inspección del material vegetal susceptible lo que ha dado como resultado la identificación positiva del patógeno en un gran número de ellos: Holanda,

Alemania (WERRES *et al.*, 2001) Francia (DELATOUR *et al.*, 2002), Italia, España (MORALEJO *et al.*, 2003), Bélgica (MERLIER *et al.*, 2003), Suiza, Polonia (ORLIKOWSKI *et al.*, 2002) y U.K (LANE *et al.*, 2002, INMAN *et al.*, 2003). Ante esta problemática y, debido a que Galicia es una zona propicia para la implantación de algunas plantas ácidas susceptibles al ataque del hongo como son *Rhododendron* spp y *Camellia japonica*, la Xunta de Galicia, a través de su servicio de Sanidad y Producción Agrícola, decidió realizar un exhaustivo muestreo en viveros ornamentales durante el año 2003, trasladándose las muestras al laboratorio de la Estación Fitopatológica "Do Areeiro" para la realización del análisis e identificación de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo

Se tomaron muestras tanto de planta de producción propia como de planta importada, fundamentalmente de *Rhododendron* spp, *Viburnum tinus* y *Camellia japonica*, así como, de algunas otras especies ornamentales

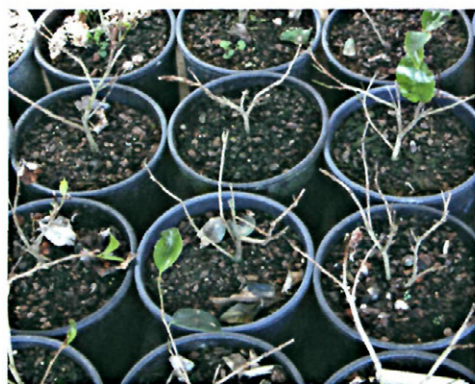


Figura 5 : Defoliación generalizada en vivero de *Camellia*.

y forestales susceptibles. Se recogieron muestras foliares y de ramillo fundamentalmente sintomáticas, si estaban presentes, y sino asintomáticas. También se tomaron algunas muestras de suelo procedentes de las macetas donde crecían las plantas sintomáticas.

A su vez se recogieron 61 muestras de *Camellia japonica*, creciendo al aire libre, en los principales parques y jardines de la comunidad gallega.

Figura 6: Aislados seleccionados, temperaturas cardinales y crecimiento radial diario al óptimo de temperatura.

AISLADO	CULTIVO	PROVINCIA	TEMPERATURA CARDINALES			CRECIMIENTO AL ÓPTIMO DE TEMPERATURA
			Mínimo	Óptimo	Máximo	Mm / 24 horas
C 39	<i>Camellia japonica</i>	Pontevedra	1 - 2 °C	18 - 20 °C	29°C	2,8 mm
C 98-2-7	<i>Camellia japonica</i>	Pontevedra	1 - 2 °C	18 - 20 °C	29°C	3 mm
C 98-5-2	<i>Camellia japonica</i>	Pontevedra	1 - 2 °C	18 - 20 °C	29°C	2,6 mm
C 187-2	<i>Camellia japonica</i>	Pontevedra	1 - 2 °C	18 °C	27°C	2,7 mm
C 253-A	<i>Camellia japonica</i>	A Coruña	1 - 2 °C	18 - 20 °C	29°C	2,6 mm
C 256-B	<i>Camellia japonica</i>	A Coruña	1 - 2 °C	18 - 20 °C	29°C	2,8 mm
C 296-B	<i>Camellia japonica</i>	A Coruña	1 - 2 °C	20 °C	29°C	2,6 mm
C 290-E	<i>Camellia japonica</i>	A Coruña	1 - 2 °C	20 °C	27°C	2,8 mm
C 360-3	<i>Camellia japonica</i>	Pontevedra	1 - 2 °C	18 °C	29°C	2,6 mm
R 190-3	<i>Rhododendron</i> sp	Pontevedra	1 - 2 °C	18 - 20 °C	29°C	2,5 mm
R 283-1	<i>Rhododendron</i> sp	Pontevedra	1 - 2 °C	20 °C	27°C	2,7 mm
R 1175	<i>Rhododendron</i> sp	Pontevedra	1 - 2 °C	20 °C	29°C	2,5 mm
V 154-5	<i>Viburnum tinus</i>	Pontevedra	1 - 2 °C	20 °C	29°C	2,5 mm
V 237-1	<i>Viburnum tinus</i>	Pontevedra	1 - 2 °C	20 °C	29°C	2,6 mm
V 236-2	<i>Viburnum tinus</i>	Pontevedra	1 - 2 °C	18 - 20 °C	27°C	2,5 mm

Figura 7: Resultado de las inoculaciones de *P. ramorum* sobre distintas especies de *Camellia*.

CÓDIGO	ESPECIE	LONGITUD DE LA NECROSIS TRANSCURRIDOS X DÍAS DESDE LA INOCULACIÓN			
		7 días	15 días	21 días	28 días
143	<i>Camellia sinensis</i>	6-8 mm	15 mm	25 mm	45 mm
139	<i>Camellia rosiflora</i>	5 mm	8 mm	15 mm	20 mm
323	<i>Camellia lutchuensis</i>	1 mm	1 mm	2 mm	3 mm
326	<i>Camellia yuhsienensis</i>	5 mm	8 mm	15 mm	20 mm
147	<i>Camellia oleifera</i>	8 mm	15 mm	25 mm	30 mm
184	<i>Camellia reticulata</i>	8 mm	15 mm	25 mm	35 mm
Bravo 1	<i>Camellia japonica</i>	10 mm	15 mm	35 mm	50 mm

Aislamiento en laboratorio

Las muestras sintomáticas (los síntomas aparecen descritos en el apartado de resultados) se sembraron en medio V8 agar suplementado con: pimáricina 5mg/l, rifampicina 25 mg/l, hymexazol 5 mg/l y benomilo 10 mg/l (MANSILLA *et al.*, 1993), tomando trozos del borde de la lesión después de un lavado previo con agua destilada, y se incubaron en oscuridad a 20 - 22 °C. Al cabo de 3 o 4 días, si se observaba crecimiento micelial susceptible de ser *Phytophthora* spp, se repicaba por duplicado a medio CPA (carrot, pieces, agar) (WERRES *et al.*, 2001) incubándose, simultáneamente, en estufa en oscuridad a 20 °C y bajo luz con un fotoperiodo de 16 horas. Así mismo, las hojas se dispusieron en cámara húmeda para determinar la presencia de esporangios del patógeno, los cuales aparecen a los dos o tres días, si este está presente, en el envés de las mismas, pudiendo también aparecer en el haz si el ataque es fuerte.

Los suelos, para determinar en ellos la presencia de esporangios, fueron analizados siguiendo la técnica de capturas utilizando como trampas vegetales hojas de aguacate (MANSILLA *et al.*, 1993).

De las muestras que resultaron positivas, para el aislamiento de *P. ramorum*, se seleccionaron una serie de aislados de distintas procedencias y cultivos (Fig. 6) con los que se procedió de la siguiente forma: se determinaron las temperaturas cardinales mínimas, óptimas y máximas de crecimiento y el crecimiento radial diario al óptimo de tem-

peratura para lo cual, los distintos aislados, se hicieron crecer por duplicado en CPA a 24 °C y posteriormente se incubaron a distintas temperaturas entre 1 y 30 °C midiéndose el crecimiento en un período de 24 horas (WERRES *et al.*, 2001).

La identificación morfológica de *Phytophthora ramorum* se basó en cuatro premisas:

Tipo de micelio, forma y tamaño de las clamidosporas, forma, tamaño y desarrollo de los esporangios y producción de órganos sexuales (WERRES *et al.*, 2001; RIZZO *et al.*, 2002).

Las características del micelio, clamidosporas y esporangios, fueron estudiadas en medio CPA situado bajo luz con un fotoperiodo de 16 horas. La luz, en algunos casos, favorece la producción de esporangios (ERWIN *et al.*, 1996).

El tamaño de los esporangios y su ratio longitud/anchura (aunque también se producen abundantemente en medio sólido y en cámara húmeda) fue estudiado sumergiendo trozos de CPA, que contenían micelio del hongo, en agua e incubándolos dos días a temperatura ambiente 20 - 22 °C (WERRES *et al.*, 2001). Se midieron 50 esporangios por aislado, largo, ancho y ratio.

La formación de órganos sexuales, al tratarse de una especie heterotálica, solo se produce en cruzamientos interespecíficos con cepas de compatibilidad conocida. En la bibliografía consultada (WERRES *et al.*, 2001; MORALES *et al.*, 2002) los mejores resultados se obtienen, hasta el momento, con *P. cryptogea* A1 y A2.

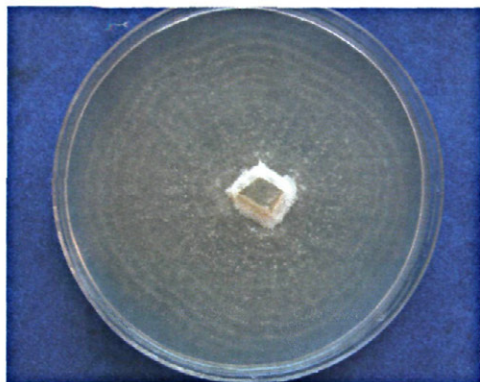


Figura 8: Crecimiento en placa de *P. ramorum*.



Figura 9: Clamidosporas de *P. ramorum*.

Los cruzamientos fueron llevados a cabo en medio CPA y V8, confrontando los distintos aislados con aislados de *P. cryptogea* de compatibilidad conocida, A1 y A2, suministrados amablemente por la Dra. Sabine Werres (cepa BBA65909 A1 y cepa BBA63651 A2) e incubándolos en estufa en oscuridad a 20 ° C por un periodo superior a cuatro semanas, observándose posteriormen-

te al microscopio para determinar la presencia, el tamaño y la posición de los anteridios, oogonios y oosporas.

Análisis por técnicas moleculares

Todos los aislados donde se observaba crecimiento micelial de *Phytophthora* spp., una vez repicados a CPA, fueron analizados por técnicas moleculares. La extracción del

Figura 10: Tamaño de los esporangios y las clamidosporas para cada uno de los aislados seleccionados.

AISLADO	Presencia en cámara húmeda	ESPORANGIOS			CLAMIDOSPORAS			PCR
		Longitud	Anchura	Media	Raño L/A	Rango	Media	
C39	+	19.7µ - 74.0µ	9.9µ - 34.5µ	49.55µ x 27.85µ	1.8	25 - 64µ	46µ	+
C98-2-7	+	19.7µ - 64.1µ	9.9µ - 34.5µ	44.13µ x 24.16µ	1.9	30 - 64µ	49µ	+
C98-5-2	+	29.6µ - 93.7µ	14.8µ - 39.4µ	50.78µ x 25.88µ	2	30 - 69µ	51µ	+
C187-2	+	29.6µ - 69.0µ	14.8µ - 34.5µ	47.33µ x 25.88µ	1.9	25 - 69µ	49µ	+
C253-A	+	29.6µ - 69.0µ	19.7µ - 39.4µ	45.36µ x 26.37µ	1.8	34 - 69µ	52µ	+
C256-B	+	24.7µ - 83.8µ	14.8µ - 34.5µ	48.81µ x 23.17µ	2.10	30 - 74µ	51µ	+
C296-B	+	29.6µ - 74.0µ	19.7µ - 39.4µ	50.78µ x 28.35µ	1.9	35 - 69µ	52µ	+
C290-E	+	24.7µ - 83.8µ	14.8µ - 39.4µ	46.59µ x 26.38µ	1.8	30 - 69µ	51µ	+
C360-3	+	24.7µ - 64.1µ	14.8µ - 29.6µ	47.08µ x 25.4µ	1.9	35 - 74µ	51µ	+
R190-3	+	24.7µ - 78.9µ	19.7µ - 44.4µ	47.08µ x 26.63µ	1.8	30 - 74µ	51µ	+
R283-1	+	29.6µ - 74.0µ	19.7µ - 34.5µ	51.77µ x 28.84µ	1.79	25 - 74µ	50µ	+
R1175	+	29.6µ - 74.0µ	14.8µ - 34.5µ	50.04µ x 27.13µ	1.84	30 - 74µ	53µ	+
V154-5	+	29.6µ - 74.0µ	14.8µ - 34.5µ	48.56µ x 26.38µ	1.84	25 - 69µ	51µ	+
V237-1	+	29.6µ - 78.9µ	19.7µ - 39.4µ	52.01µ x 28.59µ	1.81	30 - 74µ	52µ	+
V236-2	+	30.0µ - 75.0µ	18.5µ - 34.6µ	50.10µ x 27.32µ	1.83	39 - 64µ	52µ	+



Figura 11: Ramificación simpodial característica de los esporangios de *P. ramorum*.

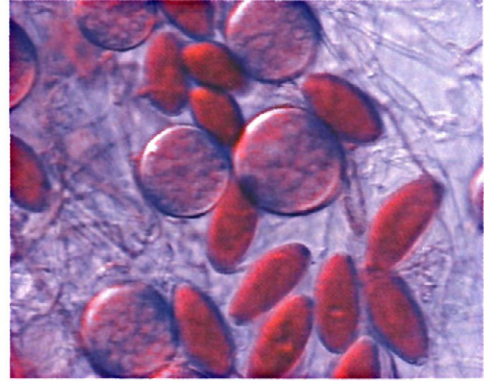


Figura 12: Esporangios y clamidosporas de *P. ramorum*.

ADN se realizó siguiendo el protocolo corto estándar del kit EZNA fungal DNA (Omega Bio-tek) pero sin añadir mercaptoetanol ni RNasa. En un tubo de microcentrifuga estéril se pesaron entre 10-40 mg del micelio que se mezclaron y centrifugaron, de forma sucesiva, con los diferentes componentes del kit.

La amplificación del ADN extraído se llevó a cabo mediante dos procedimientos: PCR-RFLP y nested-PCR.

Para la técnica PCR-RFLP se aplicó el protocolo propuesto por la CABI Bioscience (<http://www.phytid.org>) con modificaciones propias. Se utilizaron los cebadores ITS 4 de secuencia: 5'-TCCTCCGCTTATTGA-

TATGC- 3' e ITS 6: 5'-GAAGGTGAA-GTCGTAACAAGG-3'. La amplificación se realizó con las PureTaq-Ready-To-Go-PCR beads (Amersham Biosciences) añadiendo 1 μ l de la solución de extracción, los cebadores y agua hasta completar 25 μ l. Las fases de amplificación consistieron en: 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos seguido de 35 ciclos de 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos y 94°C durante 30 segundos acabando con un paso final de 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis a 100 voltios en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X y posterior tinción en bromuro de etidio. En cada prueba se incorporó un control negativo (sin ADN) y un control positivo que consistió en micelio de *P. ramorum* cultivado en el medio CPA facilitado por D. Eduardo Moralejo. Una vez comprobada la amplificación se realizó el análisis RFLP con las enzimas de restricción *Alu* I, *Taq* I y *Msp* I. Las condiciones de digestión fueron las establecidas por la casa comercial suministradora. El ADN digerido se sometió a una electroforesis a 100 voltios en gel de agarosa al 3% sobre tampón TBE 1X y posterior tinción en bromuro de etidio. La imagen del gel se capturó mediante un sistema de fotodocumentación y se analizó con el programa de densitometría 1D-Manager (TDI-Madrid).



Figura 13: Anteridio anfigino característico de *P. ramorum*.

La técnica nested-PCR se puso a punto basándonos en el procedimiento propuesto por Hayden, *et al.* (2002) y Davidson, *et al.* (2003). Los cebadores utilizados en la primera fase de amplificación fueron Phyto 1 (5'-CATGGCGAGCGCTTGA-3') y Phyto 4 (5'-GAAGCCGCCAACACAAG-3'). Los componentes del cóctel consistieron en: tampón de PCR (1X), dNTPs (0,2 mM), MgCl₂ (1,5 mM), Taqpolimerasa (0,05U/μl) y cebadores (0,5μM) completando con el ADN extraído y agua para un volumen final de 25μl.

Las etapas establecidas para el termociclador fueron: 1 ciclo a 94°C durante 85 segundos, seguido de 34 ciclos de 93°C durante 35 segundos, 62°C durante 55 segundos y 72°C durante 50 segundos añadiendo 5 segundos a cada ciclo. El proceso finalizó con 1 ciclo de 10 minutos a 72° C.

El producto obtenido se diluyó a 1/1000 y se hizo la segunda PCR con los cebadores Phyto 2 (5'-AAAGCCAAGCCCTGCAC-3') y Phyto 3 (5'-GGTGGATGGG-GACGTG-3'). Los componentes del cóctel y los ciclos de amplificación fueron los mismos que los empleados en la primera fase. En ambos casos después de la amplificación se realizó una electroforesis a 100 voltios en gel de agarosa al 2% y 3% respectivamente sobre tampón TBE 1X y posterior tinción en bromuro de etidio. En cada prueba se incorporó un control negativo (sin ADN) y un control positivo (micelio de *P. ramorum*). La imagen del gel se capturó mediante un sistema de fotodocumentación y se analizó con el programa de densiometría 1D-Manager (TDI-Madrid).

Inoculaciones

Las inoculaciones fueron llevadas a cabo sobre *Rhododendron* sp. y *Viburnum tinus*, así como, sobre hojas de distintas especies de *Camellia* pertenecientes a la colección de la Estación Fitopatológica "Do Areeiro" (Fig.7). Las hojas, en número de tres, fueron sumergidas durante cinco minutos en una suspensión obtenida después de triturar el contenido de una placa de CPA, donde había

crecido el aislado del hongo seleccionado, en 100 ml de agua esteril y situadas, posteriormente, en cámara húmeda e incubadas a 20°C con un fotoperiodo de 12 horas. La longitud de las necrosis que se observaban fue medida a los 7, 14, 21 y 28 días pasado ese periodo se procedió al reaislamiento del patógeno sembrando trozos de las zonas necrosadas en medio V8. Se realizaron controles negativos sumergiendo, así mismo, tres hojas en una suspensión que contenía CPA en 100 ml de agua estéril. Para la realización de las inoculaciones se seleccionó el aislado C39 para las inoculaciones de *Camellia*, el aislado R1175 para las de *Rhododendron* y el V-236-2 para las de *Viburnum*.

También se realizaron inoculaciones en plantas de *Camellia japonica* creciendo en maceta por el sistema de riego al sustrato (TELLO *et al.*, 1991) para determinar si existía afectación de las raíces por el patógeno.

RESULTADOS

Muestreo

Se muestrearon 82 viveros en los que se recogieron un total de 267 muestras, resultando la identificación positiva de *P. ramorum*, tanto por morfología como por técnicas moleculares, en 75 de ellas. Las restantes muestras analizadas resultaron negativas, no detectándose el patógeno en ninguna planta forestal.

Las 61 muestras de *Camellia japonica*, procedentes de los principales parques y jardines de la Comunidad Autónoma, resultaron negativas.

Síntomas

Los síntomas observados diferían ligeramente dependiendo de los cultivos:

Rhododendron spp: se apreciaban manchas foliares necróticas que comenzaban fundamentalmente desde el extremo hacia el interior, las lesiones presentaban bordes difuminados. En algunos casos también podía observarse muerte de ramas, caída de hojas y secado de la yema terminal. Los síntomas eran similares a los citados por otros

autores (WERRES *et al.*, 2001; RIZZO *et al.*, 2002; MORALEJO *et al.*, 2002) (Fig. 1 y 2).

Viburnum tinus: pequeñas necrosis sobre las hojas y el peciolo de las mismas. No se observa la muerte de la planta citada por otros autores. (GARBELOTTO *et al.*, 2002) (Fig. 3).

Camellia japonica: existen muy pocos datos sobre la sintomatología que puede apreciarse en este cultivo, de hecho solo hemos encontrado una referencia de la presencia del patógeno en una planta de *Camellia japonica* en un vivero de Inglaterra. En este momento también ha sido identificado el patógeno sobre *Camellia japonica* y *C. sasanqua* en USA (DAVIDSON *et al.*, 2003). Los síntomas que hemos observado han sido fundamentalmente foliares, manchas oscuras casi negras con bordes difuminados (Fig. 4), en algunos casos con anillos concéntricos muy evidentes, las manchas podían confluir y necrosar totalmente la hoja la cual caía posteriormente. En otros casos la necrosis comenzaba por el pedúnculo avanzando hacia el interior. En algunos casos las plantas quedaban completamente defoliadas (Fig. 5). Las raíces permanecían sanas.

Aislamiento en laboratorio

Morfología del cultivo

Todos los aislados presentaban en CPA y V8 un micelio muy ramificado con hifas principales gruesas, de más de 8 μ de diámetro, y con formación de anillos concéntricos muy evidentes (Fig. 8). Las temperaturas cardinales de crecimiento del hongo son bajas, con un óptimo entre 18 y 20 °C y con un mínimo en torno a 1- 2 °C. Las temperaturas máximas de crecimiento se sitúan entre 27 y 30 °C. El crecimiento radial diario, al óptimo de temperatura, varía entre 2.5 y 3.0 mm (Fig. 6).

Clamidosporas

A los ocho días se observa abundante producción de clamidosporas, en todos los aislados, primero hialinas luego amarillentas intercalares, terminales (Fig. 9) y en algunos

casos laterales con un diámetro muy variable entre 25 μ - 74 μ y con un rango medio entre 46 μ - 52 μ (Fig. 10).

Esporangios

A partir de los 10 días se desarrollan los esporangios en todos los aislados, tanto en los situados en estufa a 20 °C como en los colocados bajo la luz. Son ovoides elipsoides, grandes con un ratio L/A comprendido entre 1.8 y 2.1 (Fig. 10), simples o ramificados simpodialmente, en simpodios laterales o terminales, con de 2 a 10 esporangios por simpodio (Fig. 11), semipapilados, con la base redondeada en algunos casos afilada y con un pedicelo corto menor de 5 μ (Fig. 12).

Se observaba un tamaño ligeramente menor en los esporangios desarrollados en medio líquido (donde han sido realizadas las medidas de los mismos) con respecto a los producidos en medio sólido. A su vez se observó una abundantísima producción de esporangios, a partir de los dos o tres días, más abundante en *Camellia japonica* y *Rhododendron* spp. que en *Viburnum tinus*, fundamentalmente en el envés de las hojas situadas en cámara húmeda aunque en el caso de *C. japonica* también se podían apreciar en el haz de la hoja, si el ataque era fuerte y en *Rhododendron* sp. podían desarrollarse en los ramillos situados en cámara húmeda.

El patógeno ha sido también aislado en el suelo de plantas afectadas determinándose la aparición de esporangios de *P. ramorum* en las capturas con hojas de aguacate; dichas hojas fueron sembradas posteriormente en medio V8 e incubadas en estufa a 20 °C apareciendo a los pocos días un micelio que cumplía todas las especificaciones morfológicas de *P. ramorum*.

Aunque los esporangios del patógeno se aislaban también del suelo donde crecían las plantas afectadas, las raíces nunca eran dañadas y el hongo no se aislaba de ellas. Es decir que las lesiones detectadas hasta el momento se encontraban siempre por encima de la línea del suelo.



Figura 14: Oospora plerótica 100 X.

Órganos sexuales

La formación de anteridios, oogonios y oosporas se ha producido, transcurridas seis semanas, en las confrontaciones con la cepa A2 BBA63651 de *P. cryptogea* suministrada por la Dra. S.Werres, de lo que puede concluirse que la cepa de nuestros aislados es A1.

Los anteridios son siempre anfiginos con forma de barril, los oogonios son lisos, desarrollados terminal o lateralmente, casi cilíndricos con un diámetro entre 24.4 μ y 31.8 μ , las oosporas son pleróticas (Figs. 13 y 14). Se observa que la producción de órganos sexuales se realiza, como señalan otros autores (WERRES *et al.*, 2002) en las proximidades o sobre los fragmentos de zanahoria en el medio CPA no produciéndose en V8 agar.

Análisis por técnicas moleculares

En total se han analizado 83 muestras, en las que se apreciaba crecimiento micelial de *Phytophthora* spp., de las cuales se han identificado 75 como *P. ramorum* mediante las dos técnicas moleculares, lo que coincide con los resultados de identificación obtenidos mediante el estudio de las características morfológicas. Las ocho muestras restantes, también identificadas por PCR-RFLP, se correspondieron con *P. cinnamomi*, *P. syringae* y *Phytophthora* sp.

La amplificación del ADN fúngico se consiguió con las dos técnicas moleculares.

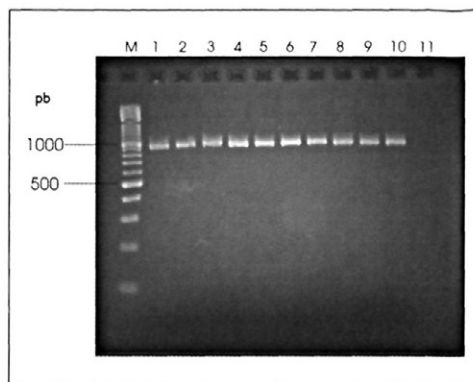


Figura 15: Gel de agarosa al 2% mostrando el fragmento de ADN amplificado de *Phytophthora* con los cebadores ITS4 - ITS6 en 9 muestras analizadas. M: marcador de 100 en 100 pares de bases, calle 10: control positivo, calle 11: control negativo.

En el caso de PCR-RFLP, los cebadores amplificaron un fragmento de aproximadamente 900 pares de bases de la región intergénica (ITS) del ADN ribosomal de *Phytophthora* (Fig. 15) en las 83 muestras analizadas. En ningún caso se obtuvo amplificación en el control negativo. La digestión del ADN amplificado dió lugar a patrones diferentes para cada una de las enzimas utilizadas *Alu I*, *Taq I* y *Msp I* pero en todos los casos, exceptuando los ocho donde se aisló otra especie de *Phytophthora*, las bandas obtenidas fueron altamente repetitivas y consistentes para la identificación de *P. ramorum* (Fig. 16). Mediante el programa de densimetría se han establecido los siguientes patrones de bandas para las enzimas en las muestras positivas para *P. ramorum*: *Alu I*: 470-180-121 pares de bases (pb), *Msp I*: 373-308-114-96 pb y *Taq I*: 296-198-103-81 pb.

Con la técnica nested-PCR, solo en las 75 muestras positivas para *P. ramorum*, en la primera fase los cebadores Phyto 1 y Phyto 4, amplificaron un fragmento de 690 pares de bases de la región ITS del ADN ribosomal, lo que coincide con los resultados obtenidos por HAYDEN *et al.* (2002) y HARRISON *et al.* (2003) y en la segunda etapa los cebadores Phyto 2 y Phyto 3 amplificaron una

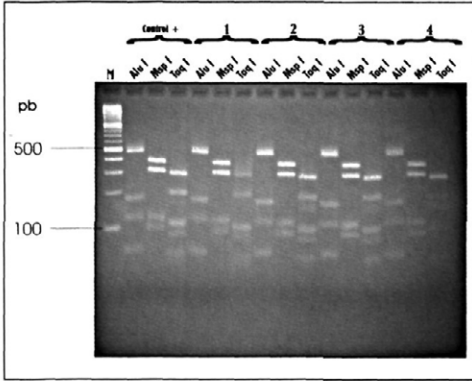


Figura 16: Gel de agarosa al 3% mostrando los fragmentos de restricción obtenidos al digerir el fragmento de ADN amplificado de *P. ramorum* con las enzimas *Alu I*, *Msp I* y *Taq I* en cuatro muestras y el control positivo. M: marcador de 100 en 100 pares de bases.

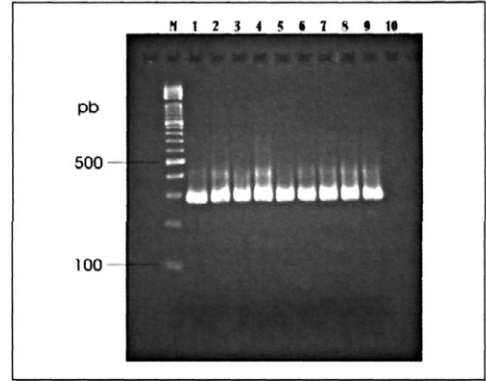


Figura 17: Gel de agarosa al 3% mostrando el fragmento amplificado de *P. ramorum* de 291 pares de bases mediante nested-PCR en 8 muestras analizadas. M: marcador de 100 en 100 pares de bases, calle 9: control positivo, calle 10: control negativo.

región del ADN de 291 pares de bases (Fig. 17). En el control negativo no se observó amplificación.

Inoculaciones

En el caso de *Camellia*, al ser la primera vez que se aísla el patógeno en España sobre *Camellia japonica*, queríamos determinar si existía diferente susceptibilidad potencial al ataque del patógeno entre *C. japonica* y otra serie de especies de nuestra colección.

En todos los casos los síntomas, similares a los producidos en la naturaleza, solían comenzar por el peciolo de la hoja lo que parece sugerir la necesaria presencia de una herida, la que se produce al soltar la hoja de la rama, para la penetración del patógeno, dato ya constatado por (INMAN *et al.*, 2002). Se apreciaba, a los pocos días, una necrosis de pocos milímetros en el peciolo que se extendía, pasados los días, pudiendo alcanzar, en algunos casos transcurridos 28 días, varios centímetros (Fig. 18).

La susceptibilidad ha sido en general alta siendo *C. japonica* la especie más susceptible al ataque del patógeno y *Camellia lutchuensis* la menos.

En *Rhododendron spp.* y *Viburnum tinus* las manchas foliares que se observan a los 20

días eran similares a las aparecidas en los viveros.

En todos los casos se ha conseguido un reaislamiento positivo del patógeno comprobado morfológicamente y por PCR.

En las inoculaciones realizadas a las plantas creciendo en macetas, por el sistema de riego al sustrato, hasta el momento, transcurridos tres meses desde la inoculación, no se observan síntomas aéreos ni daños radiculares.

DISCUSIÓN

El estudio morfológico de los cultivos, las técnicas de PCR y el desarrollo de las inoculaciones claramente permiten concluir que los aislados del hongo, obtenidos de *Rhododendron spp.*, *Viburnum tinus* y *Camellia japonica*, se corresponden con *Phytophthora ramorum*.

Se trata de la primera identificación de *Phytophthora ramorum* en España sobre *Camellia japonica* y *Viburnum tinus* y la segunda sobre *Rhododendron sp.*, ya que el patógeno había sido ya aislado sobre este cultivo en las Islas Baleares (MORALEJO *et al.*, 2002). En cuanto a *Camellia japonica* en Europa solo hemos encontrado datos de un aislamiento positivo en un vivero en U. K.

así como algunos resultados de inoculaciones sobre hoja (INMAN *et al.*, 2002) donde señalan a *C. japonica* como altamente susceptible al ataque de *P. ramorum*, aunque por otro lado, no nos cabe la menor duda de la presencia del patógeno, sobre este cultivo, en otros países de la Unión Europea donde ha sido ya aislado sobre otros cultivos, este hecho podría explicarse por que *C. japonica* no se encuentra, actualmente, dentro de los vegetales de obligatorio control bajo la decisión (2002/757/CE), sin embargo, recientemente, ha sido añadida en USA como nuevo huésped de *P. ramorum* y sometida por tanto a las estrictas medidas de cuarentena de ese país. A finales del 2003, fecha en que todos los países sometidos a la decisión deben remitir los datos de los respectivos muestreos realizados para determinar la presencia del patógeno, pensamos que existirá una revisión de las medidas incluidas en la decisión de la UE y es probable que se añadan

nuevos huéspedes que deban ser sometidos a inspección, entre ellos, *Camellia* spp.

Morfológicamente, *P. ramorum*, se diferencia claramente de otras especies de *Phytophthora*, por la combinación de una serie de caracteres, fundamentalmente: esporangios grandes con un ratio longitud/anchura en torno a 2, con ramificación simpodial y caducos, clamidosporas muy abundantes fundamentalmente terminales o intercalares y temperaturas cardinales bajas (WERRES *et al.*, 2001). Aspectos, todos ellos, cumplidos en nuestros aislados. Todos los aislados se han mostrado morfológicamente muy similares, no observándose grandes diferencias ni entre cultivos ni entre localizaciones, siendo todos A1, al igual que los identificados en los restantes países europeos. Hay que destacar que aunque el estudio más exhaustivo se ha hecho con los 15 aislados seleccionados las 75 muestras positivas, para el análisis de *P. ramorum*, cumplían todas las caracterís-

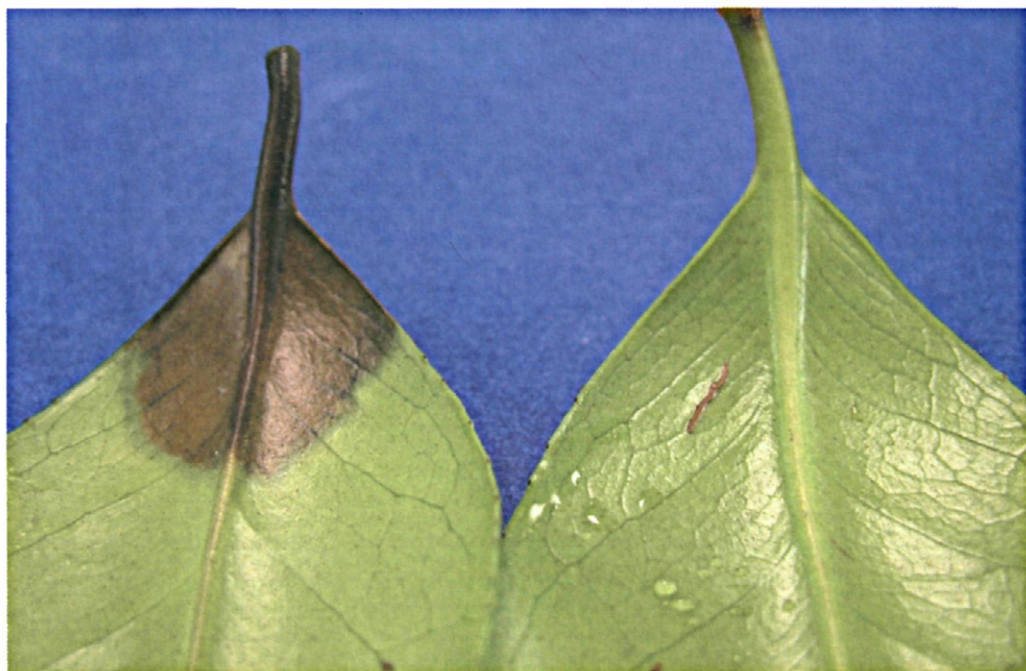


Figura 18: Inoculación de *P. ramorum* sobre *C. japonica* (inoculada y testigo).

ticas morfológicas del patógeno y todas ellas han dado positivo en el análisis por PCR, mostrándose así mismo, las técnicas moleculares utilizadas: PCR-RFLP y nested-PCR muy válidas para permitir la identificación rápida y fiable de *P. ramorum* a partir de material fúngico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra Sabine Werres (Centro Federal de Investigaciones Biológicas. Alemania) su amable colabora-

ción y la cesión de las cepas de *Phytophthora cryptogea* para la realización de los cruzamientos. A la Dra. Kate Hayden (Universidad de Berkeley-California) su aportación al desarrollo de este trabajo al facilitarnos el protocolo de la técnica Nested-PCR. A Don Eduardo Moralejo por sus indicaciones para el aislamiento del patógeno y a Dña. Ana García Servia, Dña. Begoña Loureiro Ruibal y Dña. Raquel Romero Salgueiro, técnicos de la Estación Fitopatológica "Do Areiro", por su paciente trabajo de análisis de las muestras.

ABSTRACT

PINTOS VARELA C., J. P. MANSILLA VÁZQUEZ, O. AGUÍN CASAL. 2004. *Phytophthora ramorum* new pathogen in Spain on *Camellia japonica* and *Viburnum tinus*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 30: 97-111.

In this work, for the first time in Spain, the positive isolation of *Phytophthora ramorum*, on *Viburnum tinus* and *Camellia japonica*, is described. The pathogen has also been identified on *Rhododendron* sp. The identification of the pathogen has been done by its morphological characteristics and by molecular techniques.

Key words: *Phytophthora ramorum*, ornamentals, inoculation, PCR-RFLP, nested-PCR, mating type A1.

REFERENCIAS

- ANONIMO: Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Decisión de la Comisión de 19 de septiembre de 2002. (2002/757/ CE). L. 252/37 - 38.
- BRASIER, C.M., ROSE, J., KIRK, S.A., WEBBER, J.F., 2002: Pathogenicity of *Phytophthora ramorum* isolates from North America and Europe to bark of European Fagaceae, American *Quercus rubra* and other forest trees. En: Sudden Oak Death Science Symposium, Monterey, California, 15-18 december 2002.
- CABI Bioscience (<http://www.phytid.org>): Identification of Plant Pathogenic *Phytophthora* species by ITS Fingerprinting.
- DAVIDSON, J.M., GARBELOTTO, M.; KOIKE, S.T., RIZZO, D.M., 2002: First report of *Phytophthora ramorum* on Douglas-fir in California. *Plant Disease* 86: 1274.
- DAVIDSON, J.M.; WERRES, S.; GARBELOTTO, M.; HANSEN, M., RIZZO, D.M., 2003. Sudden oak death and associated diseases caused by *Phytophthora ramorum*. Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP - 2003 - 0707 - 01 DG.
- DE GRUYTER, H., BAAYEN, R., MEFFERT, J., BONANTS, P., VAN KUIK, F., 2002: Comparison of pathogenicity of *Phytophthora ramorum* isolates from Europe and California. En: Sudden Oak Death Science Symposium, Paper 10. Monterey, California - USA.
- DELATOUR, C., SAUREL, C. HUSSON, C., LOOS, R. SCHENCK, N and ROSE, S., 2002. Discovery of *Phytophthora ramorum* on *Rhododendron* and experimental symptoms on *Quercus robur*. En: Sudden Oak Death Science Symposium, Monterrey, California, 15-18 December 2002.
- DE MERLIER, D.; CHANDELIER, A., CAVELIER, M., 2003: First report of *Phytophthora ramorum* on *Viburnum bodnantense* in Belgium. *Plant Disease* 87: 203.
- E.P.P.O., 2002: Alert list - *Phytophthora ramorum* sudden oak death. <http://www.eppo.org>
- ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K., 1996: *Phytophthora* diseases worldwide. A.P.S. Press. St. Paul, Minnesota. USA. 562p
- GARBELOTTO, M., RIZZO, D.M., DAVIDSON, J.M., FRANKEL, S.J., 2002. How to recognize symptoms of caused by *Phytophthora ramorum*, causal agent of sudden oak death. <http://www.suddenoakdeath.org>
- GOHEEN, E.M.; HANSEN, E.M., KANASKIE, A.; MC WILLIAMS, M.G.; OSTERBAUER, N., SUTTON, W., 2002: Sudden oak death caused by *Phytophthora ramorum* in Oregon. *Plant Disease* 86: 441.
- HAYDEN, K.; TSE, J.; IVORS, K.; GARBELOTTO, M.; BLOMQUIST, C. 2002. PCR-Based detection of *Phytophthora ramorum* in plant tissue. Abstract nº15.

- En: Sudden Oak Death Science Symposium. Monterey, California., 15-18 December 2002.USA.
- INMAN, A.J.; BEALES, P.A.; LANE, C.R., BRASIER, C.M., 2002: Comparative pathogenicity of European and American isolates of *Phytophthora ramorum* to leaves of ornamental, hedgerow and woodland understorey plants in the UK. En: Sudden Oak Death. Science Symposium: Poster 49. 15-18 December 2002. Monterey, California, USA.
- INMAN, A.J., TOWNEND, V.C., BARNES, A.V., LANE, C.R., HUGHES, K.J.D., GRIFFIN, R.L., EALES, S.J., 2003: First report of ramorum dieback (*Phytophthora ramorum*) on *Pieris* in England. Online New Disease Reports. Volume 7. British Society for Plant Pathology.
- LANE, C.R.; BEALES, P.A., HUGHES, K.J.D.; GRIFFIN, R.L.; MUNRO, D.; BASIER, C.M., WEBBER, J.F., 2002. First outbreak of *Phytophthora ramorum* in England, on *Viburnum tinus*. New Disease Reports. Volume 6. Agosto 2002 - Enero 2003. (<http://www.bspp.org.uk/ndr/>)
- MALONEY, P.E.; RIZZO, D.M.; KOIKE, S.T.; HARNIK, T.Y., GARBELOTTO, M., 2002: First report of *Phytophthora ramorum* on coast redwood in California. *Plant Disease* 86: 1274.
- MANSILLA, J.P., PINTOS, C., SALINERO, M.C., 1993. Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña. *Bol. San. Veg. Plagas*, 19: 545-549.
- MORALEJO, E., WERRES, S., 2002: First Report of *Phytophthora ramorum* on *Rhododendron* sp. in Spain. *Plant Disease* 86:9, 1052.
- ORLIKOWSKI, L.B. and SZKUTA, G. 2002. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new species in Poland recovered from *Rhododendron*. *Phytopathologica Polonica* 25, 69-79.
- RIZZO, D.M.; GARBELOTTO, M.; DAVIDSON, J.M.; SLAUGHER, G.W., KOIKE, S.T., 2002: *Phytophthora ramorum* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* 86: 205-214.
- RIZZO, D.M.; GARBELOTTO, M.; 2003: Sudden oak death: endangering California and Oregon forest ecosystems. *Ecol. Environ.* 1 (5): 197 – 204.
- TELLO, J., VARES, F., LACASA, A., 1991: Pruebas de patogenicidad. En: Manual de laboratorio. Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nematodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. 79 – 83p
- WERRES, S.; MARWITZ, R.; MAN IN'T VELD, W.A.; DE COCK, A.; BONANTS, P.; DE WEERDT, M.; THEMANN, K.; ILIEVA, E.; BAAAYEN, R.P., 2001: *Phytophthora ramorum* sp. Nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research* 105: 1155-1165.

Recepción: 13 enero 2003

Aceptación: 22 marzo 2003