

## El Chancro Carbonoso de *Quercus* I: Distribución y caracterización del agente causal

J. J. JIMÉNEZ, M. E. SÁNCHEZ, A. TRAPERO

El Chancro Carbonoso está causado por el ascomiceto *Biscogniauxia mediterranea*. A partir de los años 80 su incidencia se ha asociado a los procesos de decaimiento que sufren los *Quercus* en la cuenca mediterránea. En España aparece principalmente en masas viejas de encina y alcornoque sobre pies decrepitos. Se ha determinado que la falta de vigor del huésped, independientemente de su edad, es el factor decisivo en la aparición del estroma carbonoso en condiciones de campo; formación que no está asociada a la presencia de exudados por parte de la planta huésped. A partir de las muestras obtenidas de árboles afectados, fundamentalmente *Quercus* spp., en Andalucía y otras localizaciones, se ha obtenido una colección de aislados monoascospóricos. La caracterización morfológica de sus colonias y la caracterización microscópica de las estructuras de reproducción sexual y asexual, han mostrado la alta variabilidad de las poblaciones naturales del hongo. Aunque las características de los aislados concuerdan con la descripción de la especie *B. mediterranea*, las dimensiones de las ascosporas no encajan plenamente en ninguno de los rangos establecidos para las tres variedades descritas en esta especie, poniendo en duda la validez de este criterio para discriminar variedades, al menos en aislados españoles.

J. J. JIMÉNEZ, M. E. SÁNCHEZ, A. TRAPERO. Dpto. Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080-Córdoba. Dirección de correo electrónico: ag1sahem@uco.es

**Palabras clave:** *Biscogniauxia mediterranea*, Carbón, decaimiento, *Hypoxylon mediterraneum*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*.

### INTRODUCCIÓN

El Chancro Carbonoso es una enfermedad ampliamente distribuida en la cuenca mediterránea y Norteamérica. Se describió por primera vez en Portugal afectando al alcornoque (*Q. suber*) (BAETA NEVES, 1948; 1949; 1954; VIEIRA NATIVIDADE, 1950). En 1931 se identifica al hongo asociado al Carbón como *Nummularia regia*, pero un trabajo de 1952 atribuido a Malencon y Manion, describe la enfermedad del Carbón en Marruecos como causada por *Hypoxylon mediterraneum* (BAETA NEVES, 1954; OLIVA y MOLINAS, 1984; VANNINI y MUGNOZZA, 1991). En España, la primera referencia al

Chancro Carbonoso es de 1963, atribuido a *Hypoxylon mediterraneum* (TORRES, 1985), aunque desde esa fecha hasta 1985 los daños causados en encina y alcornoque pasaron prácticamente desapercibidos (TORRES, 1985). En 1985, *H. mediterraneum* estaba considerado como el parásito más importante de encinares y alcornocales en España (TORRES, 1985), aunque en el mismo trabajo se afirma que el hongo limita su actividad únicamente a pies debilitados. En Italia, la atención de los fitopatólogos no ha recaído sobre el Chancro Carbonoso hasta los años 80, como enfermedad asociada al decaimiento de los *Quercus* (VANNINI y MUGNOZZA, 1991).

Según los últimos criterios taxonómicos, la especie fúngica responsable del Chancro Carbonoso de *Quercus* se clasifica dentro del género *Biscogniauxia* de los ascomicetos xilariáceos como *B. mediterranea*. El tamaño de las ascosporas es un parámetro que permite distinguir las tres variedades descritas para esta especie (JU *et al.*, 1998). Los estudios filogenéticos más recientes confirman esta reordenación taxonómica (MAZZAGLIA *et al.*, 2001a; 2001b).

En la actualidad, el Chancro Carbonoso se considera fundamentalmente como una enfermedad asociada al decaimiento de los *Quercus* mediterráneos. Las especies más afectadas son *Q. cerris* y *Q. suber*. También

afecta, aunque en menor medida, a *Q. ilex*, *Q. frainetto* y *Q. pubescens* (OLIVA y MOLINAS, 1984; TORRES, 1985; 1993; VANNINI y MUGNOZZA, 1991; BIOCCHA y MOTTA, 1995; LUISI *et al.*, 1995; VANNINI *et al.*, 1996a; 1996b; SICOLI *et al.*, 1998; FRANCESCHINI *et al.*, 1999; RAGAZZI *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 1999; MAZZAGLIA *et al.*, 2001c).

A pesar de la amplia distribución e incidencia del Carbón, los trabajos realizados en España sobre esta enfermedad son escasos, por lo que se conoce poco sobre su etiología. Por este motivo, los objetivos del presente trabajo son (i) la caracterización cultural de aislados monoascospóricos de *B. mediterranea* y (ii) la caracterización morfológica de

Cuadro 1. Origen de los estromas carbonosos recolectados en campo

Provincia	Término Municipal	Huésped	Nº de muestras (estromas)	Aislado monoascospórico seleccionado
Cádiz	Los Barrios	Alcornoque	2	HYP-22
Córdoba	Cardeña	Encina	1	-
	Córdoba	Alcornoque	3	HYP-4
		Castaño	1	HYP-23
	Espiel	Encina	1	-
		Quejigo	2	HYP-1
	Fuente Obejuna	Encina	1	-
	Hornachuelos	Alcornoque	2	-
		Encina	1	-
	Montoro	Encina	1	-
	Pozoblanco	Encina	1	-
	Villanueva de Córdoba	Encina	5	HYP-8
Huelva	Alájar	Encina	2	-
	Gibraleón	Alcornoque	1	HYP-41
	Santa Olalla del Cala	Alcornoque	1*	-
	Zufre	Encina	1	HYP-30
Jaén	Andújar	Encina	1	HYP-27
Sevilla	Cazalla de la Sierra	Alcornoque	2	-
		Encina	1	
	Constantina	Alcornoque	1	HYP-94
	El Real de la Jara	Alcornoque	1	
	El Ronquillo	Encina	1*	HYP-91
Badajoz	Azuaga	Encina	2	HYP-31
Gerona	La Bisbal	Alcornoque	2	HYP-40

\* El asterisco señala los estromas de los que se obtuvieron las ascas utilizadas para la caracterización morfológica.

la fase sexual y asexual. Los resultados preliminares se han expuesto en el congreso de la Sociedad Española de Fitopatología de 2004 (JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislamiento de *B. mediterranea* a partir de estromas carbonosos

Los estromas carbonosos se obtuvieron en 48 fincas localizadas en las provincias de Cádiz, Córdoba, Huelva, Jaén, Sevilla, Badajoz y Gerona (Cuadro 1). Se seleccionaron árboles vivos con placas carbonosas que además presentaran defoliación y/o ramas secas. En su defecto, los estromas se obtuvieron de árboles muertos y restos de leñas. Cada muestra consistió en 3-6 placas carbonosas de un mismo árbol. Los estromas obtenidos se limpiaron, se etiquetaron y se almacenaron a 4° C en oscuridad. A partir de estos estromas se obtuvieron aislados monoascospóricos. Para provocar la descarga de ascosporas se utilizó el método descrito por TRAPERO y KAISER (1992) con ligeras modificaciones. Los estromas se humedecieron y se pegaron en la tapa de placas de Petri de 6 cm de diámetro que contenían 5 ml de agua desionizada estéril. Las placas se incubaron a 22° C durante 12 h, periodo tras el cual los carbonos habían esporulado en forma de un exudado negro. De este modo se obtuvieron suspensiones de ascosporas que se extendieron mediante un asa de siembra estéril en placas de Petri con Agar-Agua al 20% (DHINGRA y SINCLAIR, 1995). Observando estas placas al microscopio invertido, se capturaron ascosporas aisladas con una aguja estéril y se sembraron en placas de PDA acidificado para inhibir el crecimiento bacteriano (SÁNCHEZ *et al.*, 2002), sembrando 12 ascosporas de cada uno de los estromas. Las placas se incubaron durante 3 días a 22° C con 12 h de fotoperiodo. De todos los aislados monoascospóricos obtenidos se eligieron 12 para su caracterización morfológica, buscando la máxima variabilidad en cuanto a su origen geográfico y el huésped de procedencia (Cuadro 1).

### Morfología de las colonias de aislados monoascospóricos

Para caracterizar la morfología de las colonias, los 12 aislados seleccionados (Cuadro 1) se sembraron en placas de PDA suplementado con 5 g/l de extracto de levadura (PDYA), ya que en ensayos previos se observó que este medio era el más adecuado para el crecimiento de esta especie fúngica (JIMÉNEZ *et al.*, 2004), sembrándose tres placas por aislado en tres bloques. Las colonias se evaluaron a los 6 y 20 días de incubación a 20° C con 12 h de fotoperiodo. En cada evaluación se consignó el color de la colonia en el anverso y en el reverso, la textura del micelio y la presencia o ausencia de exudados u otras estructuras.

### Tasa de crecimiento de los aislados a 20° C

Para caracterizar el crecimiento de los 12 aislados monoascospóricos seleccionados, se sembraron en placas de PDYA y se incubaron a 20° C con 12 h de fotoperiodo. Se sembraron tres placas por aislado en dos bloques. Tras la siembra, se midió el diámetro de las colonias cada 12 h y se calcularon las tasas de crecimiento diario. Con los datos correspondientes a la tasa máxima de crecimiento diario para cada aislado, se realizó un análisis de la varianza y comparaciones de medias según el test LSD protegido de Fisher a un nivel de probabilidad del 5% (STEEL y TORRIE, 1985), empleando el programa Statistix for Windows (ANALYTICAL SOFTWARE, 2003).

### Caracterización de las estructuras de reproducción sexual

Se realizó un seguimiento del proceso de formación del estroma carbonoso en condiciones naturales en una rama seca de un alcornoque localizado en la Sierra de Córdoba que, en octubre de 2003, se desgajó de la cruz y apareció tendida en el suelo con las hojas secas aún prendidas (Figura 1). Sobre esta rama se describió la formación y la morfología del estroma y de las peritecas.

A partir de las peritecas presentes en las muestras de Carbón (Cuadro 1) se realizaron montajes microscópicos de ascas y ascosporas, tiñéndolos con fucsina ácida al 0,01% en



Figura 1. Alcornoque con una rama seca desgajada del tronco sobre la que se realizó el seguimiento del proceso de formación del estroma carbonoso.

Cuadro 2. Características de las colonias de aislados monoascospóricos de *Biscogniauxia mediterranea* cultivados en PDYA a 20°C

Aislado	Anverso			Reverso	
	Color		Nódulos estromáticos*	Color	
	A los 6 días	A los 20 días		A los 6 días	A los 20 días
HYP-22	Blanco	Marrón	-	Amarillo claro	Marrón oscuro
HYP-4	Gris claro	Centro gris claro y borde gris oscuro	-	Centro verde y borde marrón	Gris oscuro
HYP-23	Gris claro	Gris verdoso	-	Centro verde y borde marrón claro	Verde oscuro
HYP-1	Gris claro	Marrón	-	Gris oscuro	Gris oscuro
HYP-8	Blanco	Blanco	+	Marrón claro	Marrón oscuro
HYP-41	Gris claro	Gris oscuro	+	Verde claro	Gris oscuro
HYP-30	Centro amarillo y borde blanco	Centro verde y borde gris	-	Marrón claro	Gris oscuro
HYP-27	Gris claro	Centro verde y borde gris oscuro	-	Centro verde y borde marrón claro	Gris oscuro
HYP-94	Blanco	Marrón oscuro	+	Marrón claro	Gris oscuro
HYP-91	Centro amarillo y borde blanco	Marrón	-	Marrón claro	Gris oscuro
HYP-31	Amarillo claro	Marrón claro	-	Amarillo	Verde oscuro
HYP-40	Blanco	Gris oscuro	+	Marrón claro	Gris oscuro

\* + = presencia, - = ausencia.

lactoglicerol al 80%, y se midió la longitud y la anchura de 25 ascas de dos procedencias distintas (Cuadro 1) y de 50 ascosporas de las 37 procedencias (Cuadro 1). Las mediciones se hicieron con el programa Analysis 2.1 (Soft Imaging System), a partir de fotografías microscópicas digitales. Con los datos correspondientes a las dimensiones de las ascas y ascosporas se realizó un análisis de la varianza. Las comparaciones de medias se realizaron según el test de Tukey al nivel de probabilidad del 5% (STEEL y TORRIE, 1985).

#### Caracterización de las estructuras de reproducción asexual

La caracterización morfológica de las estructuras asexuales se realizó sobre las formadas en cultivos *in vitro* de los 12 aislados monoascospóricos seleccionados y también las formadas en ramas de encina y alcornoque en condiciones naturales. Para la descripción de la morfología de los conidióforos y conidias se realizaron montajes microscópicos y se midió la longitud y anchura de 50 conidias de cada uno de los aislados monoascospóricos, de una rama de alcornoque de la Sierra de Córdoba y de una rama de encina y otra de alcornoque de la provincia de Huelva, siguiendo la misma metodología que en el apartado anterior. Con los datos correspondientes a las dimensiones de las conidias se realizó un análisis de la varianza. Las comparaciones de medias se realizaron según el test LSD de Fisher al nivel de probabilidad del 5% (STEEL y TORRIE, 1985).

## RESULTADOS

### Sintomatología asociada al Chancro Carbonoso

No se observó una sintomatología específica asociada a la presencia del estroma carbonoso. El Carbón aparecía en árboles defoliados y/o puntisecos, en ramas muertas (Figura 2a) o en ramas secas ya desprendidas del árbol (Figura 2b). Cuando el estroma se encontraba en el tronco, aparecía siempre en zonas de corteza muerta (Figura 2c). Con independencia de la edad de la planta, la presencia de estroma carbonoso estuvo siempre



Figura 2. Presencia del estroma de *Biscogniauxia mediterranea* en la Sierra de Córdoba, a) en ramas muertas de alcornoque en pie, b) en ramas muertas desprendidas de un alcornoque, c) detalle del estroma en tronco de encina.

asociada a un estado de severa pérdida de vigor o muerte de la rama o del pie afectado. De hecho, la mayoría de las muestras se tuvieron que tomar de ramas o árboles muertos e incluso de restos de leñas.

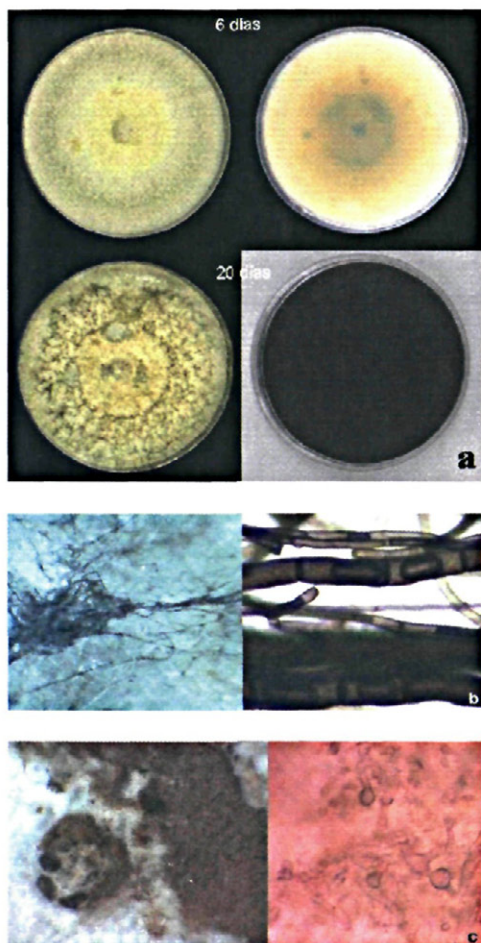


Figura 3. Morfología de las colonias de aislados monoascospóricos de *Biscogniauxia mediterranea* creciendo en PDYA a 20° C con 12 h de fotoperiodo. a) colonia del aislado HYP-91, en la que se aprecia el cambio de coloración en el anverso y en el reverso de la colonia a los 6 y a los 20 días de incubación, b) fibras de micelio formadas por hifas de paredes gruesas y melanizadas (dcha., x400), c) nódulos estromáticos de consistencia dura formados por hifas con hinchazones (dcha., x400). Obsérvese la abundante producción de conidias (izda., masas pulverulentas marrones).

### Morfología de la colonia

Se registró una gran variabilidad entre aislados, tanto en la coloración de las colonias como en la distribución de la pigmentación (Cuadro 2). Inicialmente el anverso de las colonias de *B. mediterranea* es de color blanco y a partir de los 6 días de crecimiento, vira a tonos grises, verde oliva o marrón, empezándose a pigmentar la zona central de la colonia y avanzando hacia el borde. Esta pigmentación aparece también en el reverso de la colonia, oscureciéndose progresivamente hasta alcanzar un color gris oscuro o negro a los 20 días de incubación (Figura 3a). La pigmentación se distribuyó en forma de coronas en ocho aislados y en cuatro aislados en forma de manchas. A partir de los 6 días de incubación aparecen fibras de micelio aéreo formadas por hifas de paredes gruesas y melanizadas (Figura 3b). En cuatro aislados se observó la formación de nódulos estromáticos de consistencia dura, asociados a una gran producción de conidias (Figura 3c). Estos nódulos están formados por hifas melanizadas y con hinchazones (Figura 3c). También aparecieron exudados de color marrón tras 6 días de incubación. Los exudados se repartían de forma irregular por la colonia, con mayor presencia en los bordes de los nódulos estromáticos y en la zona central de la colonia.

### Tasa de crecimiento a 20° C

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas en la tasa máxima de crecimiento de los distintos aislados monoascospóricos, pero no se pudieron establecer grupos homogéneos en función de su procedencia (Figura 4), destacando el aislado HYP-22, que mostró una tasa de crecimiento máxima significativamente menor al resto de los aislados.

### Estructuras de reproducción sexual

La formación del estroma carbonoso se inició con la aparición de una capa amorfa de color pardo rojizo en las grietas longitudinales de las ramas secundarias presentes en la rama de alcornoque desprendida del árbol (Figura 5a). Al cabo de un mes, en noviembre de 2004, esta capa se empezó a despren-

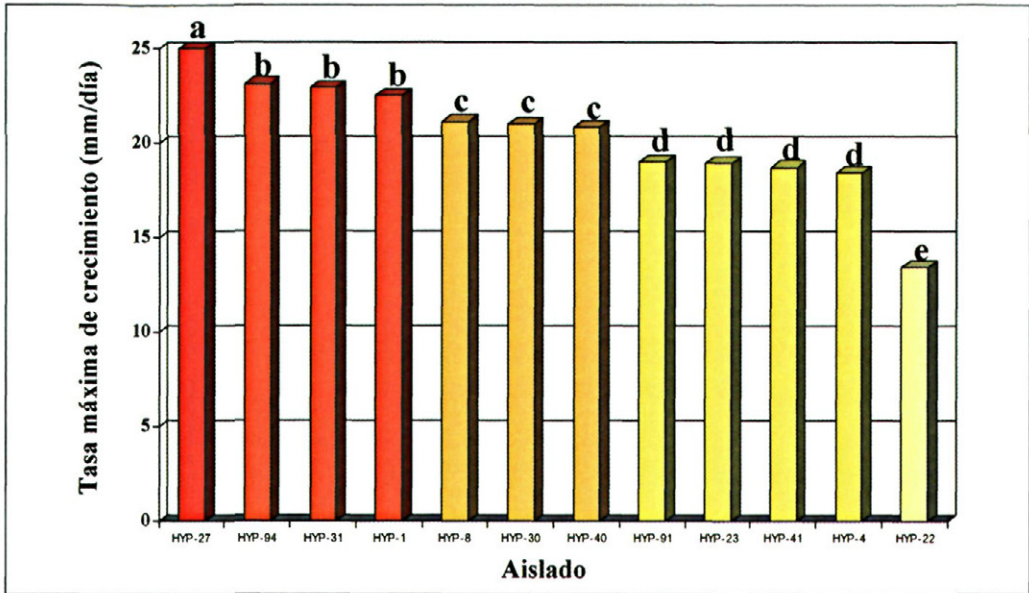


Figura 4. Tasa máxima de crecimiento a 20° C en el medio PDYA de aislados monoascospóricos de *Biscogniauxia mediterranea*. Las columnas con una letra común no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ), según el test de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985).

der, dejando al descubierto el estroma carbonoso, plano y de color negro (Figura 5b). El estroma maduro presenta bordes engrosados que coinciden con los márgenes de las grietas de la corteza y únicamente se forma en dichas grietas, nunca debajo de la corteza, como se pudo apreciar al desprenderla de la rama (Figura 5c). La zona de corteza donde se localiza el estroma aparece necrosada, pero el leño subyacente permanece inalterado (Figura 5d). En la superficie del estroma maduro se observan pequeñas protuberancias de forma papilada que corresponden al cuello de las peritecas (Figura 6a), que se encuentran inmersas en el estroma, en lóculos carbonosos, compartiendo varias peritecas un canal ostiolar común (Figura 6b). Las ascas, que se encuentran en el interior de las peritecas, son cilíndricas, inoperculadas e hialinas, de (85,9)-102,1-(121,8)  $\mu\text{m}$  de longitud y (8,2)-10,1-812,8)  $\mu\text{m}$  de anchura, y contienen ocho ascosporas en disposición uniseriada (Figura 6c). No hubo diferencias significativas en la longitud de las ascas de

las dos procedencias estudiadas, pero las ascas de alcornoque de Huelva fueron significativamente más anchas que las de encina de Sevilla.

Las ascosporas inicialmente son hialinas y al madurar adquieren un color marrón oscuro (Figura 6c). Son unicelulares, elipsoidales y ligeramente asimétricas con respecto al eje longitudinal, de (8,7)-15,8-(22,3)  $\mu\text{m}$  de longitud y (4,9)-7,7-(13,3)  $\mu\text{m}$  de anchura (valor (mínimo)-medio-(máximo)). Las ascosporas maduras son lisas y poseen una abertura germinativa recta y de longitud similar a la de la ascospora (Figura 6d). A pesar de que el análisis de la varianza reveló diferencias significativas en función de la longitud y anchura de las ascosporas, no se pudieron establecer grupos homogéneos en función de su procedencia geográfica ni de su huésped.

**Estructuras de reproducción asexual**

En condiciones naturales, la producción de conidióforos y conidias ocurre antes de la formación del estroma y tiene lugar bajo la

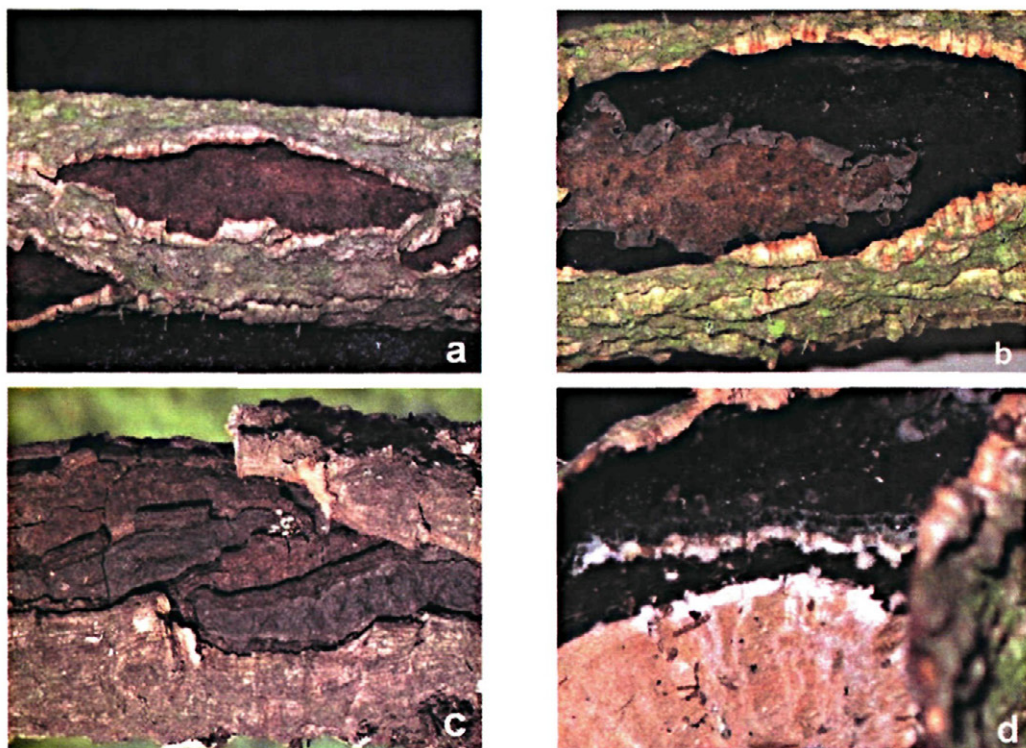


Figura 5. Formación del estroma de *Biscogniauxia mediterranea* en condiciones naturales, a) estroma inmaduro, con la capa externa dehisciente de color marrón rojizo, b) capa externa dehisciente del estroma desprendiéndose, c) borde engrosado del estroma que coincide con el contorno de las grietas de la corteza externa. En la imagen, se ha arrancado la corteza de la parte superior derecha para poder apreciar mejor los bordes, d) corte transversal del estroma sobre la corteza necrosada, mientras que el leño permanece en buen estado.

corteza externa (Figura 7a), dando lugar a abultamientos visibles en ramas delgadas, debidos a la acumulación de gran cantidad de conidias. Posteriormente la corteza externa se agrieta y queda en superficie una masa seca de conidias de aspecto pulverulento. Este proceso podría favorecer la diseminación de las conidias por el viento, sin embargo, sólo se ha observado en ramillas. En ramas gruesas las conidias permanecen bajo la corteza externa y no salen al exterior. En los cultivos *in vitro* de aislados monoascospóricos la producción de conidias tiene lugar a partir de los 20 días de incubación a 20° C.

Tanto en ramas como en cultivo, los conidióforos son ramificados, manteniendo la dominancia apical a partir del eje principal

(Figura 7b). La mayor producción de conidias se da en el extremo de la ramificación, donde se forman varias células conidiógenas. Esta morfología del conidióforo corresponde al tipo *Periconiella* de los anamorfos del género *Biscogniauxia* (JU *et al.*, 1998).

Las conidias producidas en las ramas infectadas son de forma elipsoidal (Figura 7c) y tienen unas dimensiones de (2,6)-4,1-(5,2)  $\mu\text{m}$  de longitud y (2,2)-2,9-(4,2)  $\mu\text{m}$  de anchura (valor (mínimo)-medio-(máximo)). Las formadas en cultivos *in vitro* son principalmente de forma obovoide (Figura 7d), de (1,9)-3,9-(6,6)  $\mu\text{m}$  de longitud y (1,2)-2,1-(3,7)  $\mu\text{m}$  de anchura. En ambos casos la pared de las conidias es lisa, sin estrías ni aberturas germinativas, con un pequeño



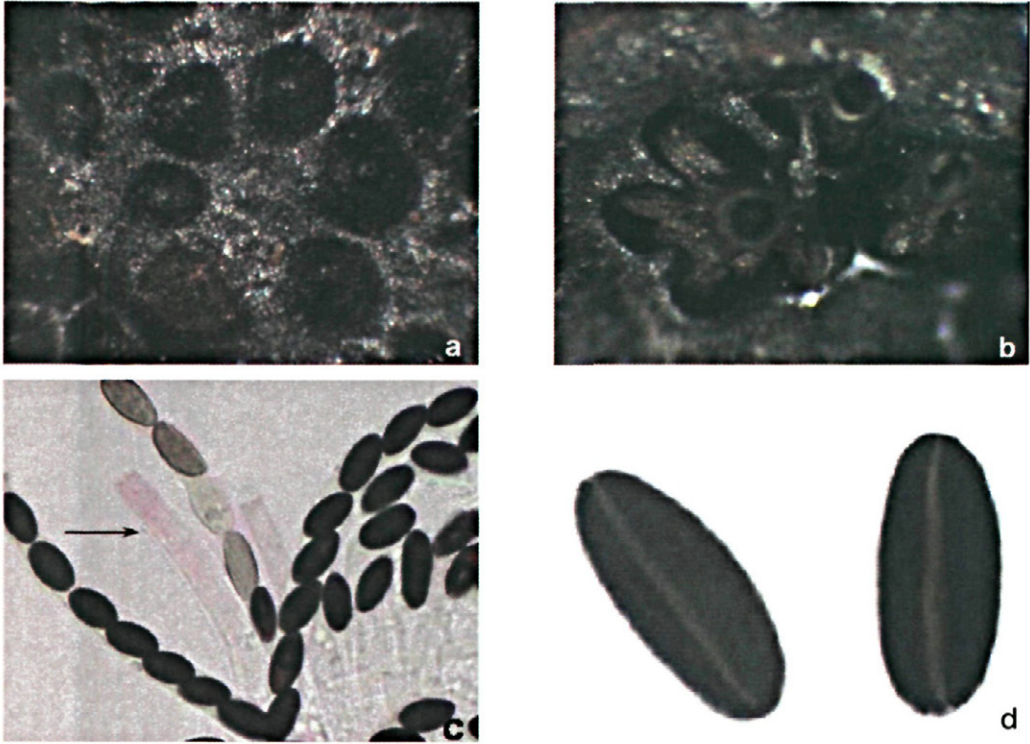


Figura 6. Estructuras de reproducción sexual de *Biscogniauxia mediterranea*, a) cuellos de las peritecas sobresaliendo del estroma maduro, b) peritecas en lóculos estromáticos compartiendo un canal ostilar común, c) ascas y ascosporas en distinto estado de madurez. Las ascosporas maduras son de color marrón oscuro. La flecha señala un ascas inmadura, hialina, en la que aún no se han diferenciado las ascosporas (x400), d) ascosporas maduras con abertura germinativa recta y de longitud semejante a la ascospora (x400).

pedúnculo bien visible cuando se encuentran unidas al conidióforo. Aunque el análisis de la varianza mostró diferencias significativas entre los distintos aislados, no se pudieron discriminar grupos distintos en función de la longitud de las conidias, pero sí en función de su anchura, siendo significativamente más anchas las producidas en ramas de encina y alcornoque (Figura 8).

## DISCUSIÓN

A pesar de que *B. mediterranea* tiene una amplia gama de huéspedes en la cuenca mediterránea (OLIVA y MOLINAS, 1984; TORRES, 1993; VANNINI *et al.*, 1996a), muchos de los cuales están presentes en

Andalucía, su estroma se encuentra principalmente en encina y en alcornoque, siendo su presencia un hecho común en casi toda el área de distribución de estas especies. Los síntomas genéricos de defoliación y puntisechado que presentan frecuentemente los *Quercus* en Andalucía (SÁNCHEZ *et al.*, 2003a) no se han podido asociar con la presencia del estroma del hongo en los árboles afectados, ya que en la mayoría de los casos, estos síntomas aparecían en árboles libres de Carbón. Aunque se ha descrito que *B. mediterranea* es capaz de anillar ramas y causar su muerte (OLIVA y MOLINAS, 1984), esta sintomatología parece corresponder más bien a los chancros causados por *Botryosphaeria corticola* en *Quercus* spp. (SÁNCHEZ *et al.*, 2003b;

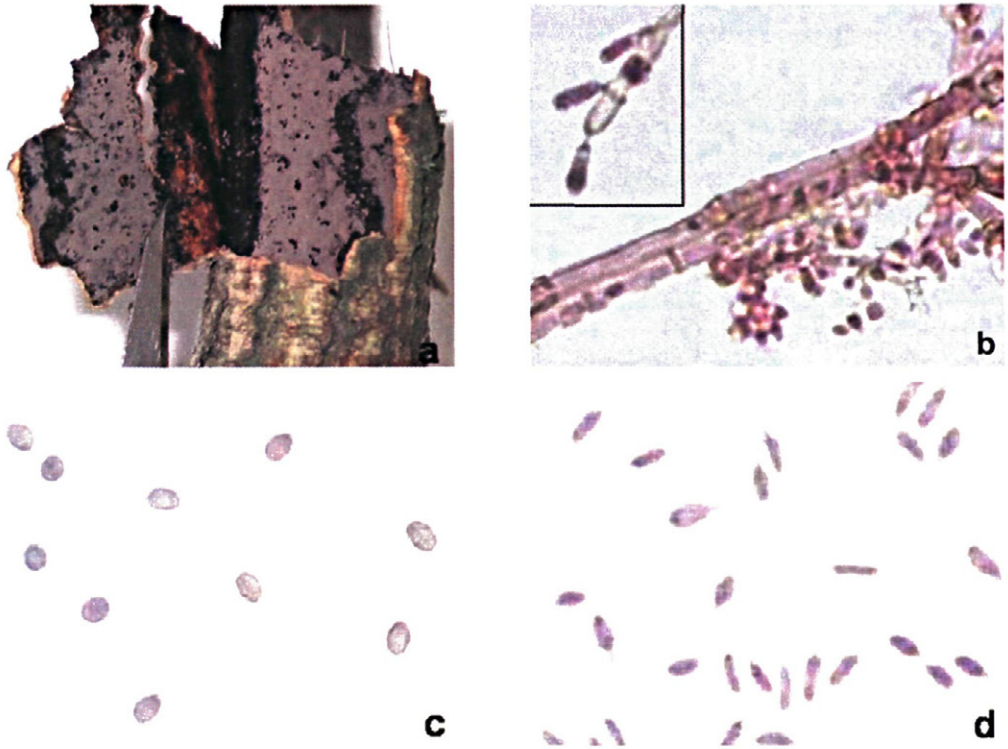


Figura 7. Estructuras de reproducción asexual del anamorfo de *Biscogniauxia mediterranea*. a) abundante producción de conidias bajo la corteza externa de una rama de alcornoque, b) conidióforo tipo *Periconiella* (x400). En el recuadro se aprecia la forma de inserción de las conidias por medio de un pedúnculo (x1000), c) conidias obovoides producidas en condiciones naturales (x400), d) conidias elipsoidales formadas en cultivo artificial (x400).

ALVES *et al.*, 2004). También se le atribuye a *B. mediterranea* la capacidad de degradar el leño y producir la rotura de la rama afectada (OLIVA y MOLINAS, 1984), pero nuestras observaciones indican que, si bien el estroma de *B. mediterranea* se encuentra frecuentemente en ramas secas o restos de leñas con la madera ya degradada, cuando el leño no ha sufrido aún procesos de degradación debidos a la acción de hongos de podredumbre de la madera, permanece inalterado aun después de la formación del estroma. Tampoco se ha podido establecer una relación entre la aparición de brotes adventicios y la presencia del Carbón, tal y como describe TORRES (1985). En la mayoría de los casos, los brotes adventicios aparecen en pies defoliados pero libres de estroma carbonoso. El único síntoma ine-

quívocamente asociado a la presencia del hongo es la necrosis del tejido cortical en la zona donde se localiza el estroma.

El hecho de que el estroma aparezca a comienzos del otoño puede estar relacionado con el incremento que se observa en la colonización del tejido cortical de los huéspedes por parte de *B. mediterranea* desde la primavera hasta el final del verano (BIOCCA y MOTTA, 1995; COLLADO *et al.*, 1999; 2001; MAZZAGLIA *et al.*, 2001c). Aunque se ha descrito que el estroma maduro se forma bajo la corteza y que, una vez formado y debido a la presión que ejerce, ésta se agrieta quedando el estroma en superficie (OLIVA y MOLINAS, 1984), en este trabajo no se ha observado en ningún caso la presencia de estroma bajo la corteza, iniciándose su formación en grietas

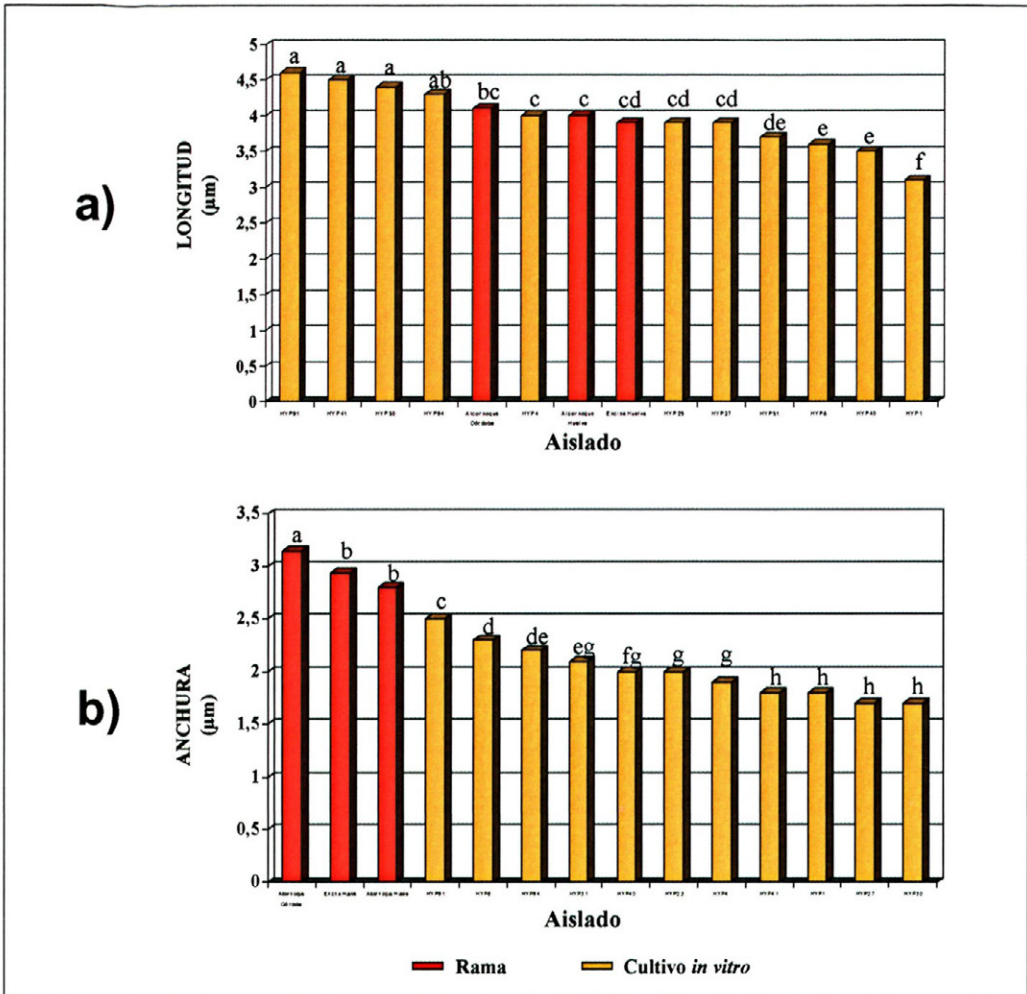


Figura 8. Dimensiones medias de las conidias de *Biscogniauxia mediterranea* producidas *in vitro* e *in vivo*, a) longitud, b) anchura. Las columnas con una letra común no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ), según el test de Fisher (Steel y Torrie, 1985).

preexistentes. La formación del estroma tampoco apareció asociada a la presencia de exudados de la planta, por lo que no parece que las exudaciones oscuras, frecuentes en encinas y alcornoques debilitados (SÁNCHEZ *et al.*, 2003a), puedan atribuirse a la acción de *B. mediterranea*, como indican algunos autores (TORRES, 1985; 1993; ANÓNIMO, 1993). De hecho, estos exudados aparecen en troncos y ramas de *Quercus* como conse-

cuencia de la infección por patógenos radicales (BRASIER *et al.*, 1993; BRASIER, 1996) o por infecciones bacterianas (SORIA *et al.*, 1997). La capa externa del estroma inmaduro es rojiza, coincidiendo con la descripción de OLIVA y MOLINAS (1984), aunque JU *et al.* (1998) indican que esta capa es de color marrón oscuro.

Se observó una alta variabilidad entre procedencias en cuanto a la morfología de la

colonia, tasa de crecimiento y estructuras de reproducción, como cabe esperar de una especie que se reproduce sexualmente con un sistema de reproducción heterotálica (VANNINI *et al.*, 1999). La forma de las conidias producidas en cultivo y en ramas infectadas es distinta. Aunque en cultivo *in vitro* predomina la formación de conidias obovoides, coincidiendo con la descripción hecha por JU *et al.* (1998), las que se producen en ramas son siempre elipsoidales, según describen OLIVA y MOLINAS (1984). Estas diferencias en la morfología de las conidias podría tener influencia en su capacidad infectiva. Algunos autores sostienen que las conidias son unidades de inóculo efectivas (OLIVA y MOLINAS, 1984; JU *et al.*, 1998) mientras otros consideran que tienen poca influencia en la propagación de la enfermedad (TORRES, 1985; MUÑOZ y RUPÉREZ, 1987). Según nuestras observaciones, en condiciones naturales las conidias se forman bajo la corteza externa y aunque pueden salir al exterior, como indican JU *et al.* (1998) en ramas delgadas, en ramas gruesas sólo se ha consignado la presencia de conidias tras reti-

rar la corteza de forma mecánica, pero en ningún caso se observó su salida al exterior, pudiendo ser éste un factor limitante para su dispersión. Las dimensiones de las conidias producidas tanto en cultivo como en ramas, resultan mayores que las publicadas previamente (OLIVA y MOLINAS, 1984; BIOCCA *et al.*, 1996) para esta especie.

Las dimensiones de las ascosporas son el principal criterio utilizado para diferenciar variedades dentro de la especie *B. mediterranea* (JU *et al.*, 1998). Sin embargo, el rango de valores de longitud y anchura de las ascosporas de aislados españoles no concuerda plenamente con ninguno de los establecidos para las tres variedades de esta especie. Aunque los valores de anchura encajan bien dentro del rango de la variedad *sensu stricto* (6,5-10 µm), la longitud de las ascosporas de nuestros aislados abarcan el rango establecido para la variedad *sensu stricto* (15,5-21 µm) y también para la variedad *microspora* (12-17 µm), poniendo en duda la validez de este criterio para discriminar variedades de *B. mediterranea*, al menos en aislados españoles.

#### ABSTRACT

JIMÉNEZ J. J., M. E. SÁNCHEZ, A. TRAPERO. 2005. Charcoal Canker of *Quercus* I: Distribution and characterisation of the causal agent. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31: 549-562.

Charcoal Canker is caused by the ascomycete *Biscogniauxia mediterranea*. Since the 80's, its incidence has been associated with the declining of *Quercus* spp. in the Mediterranean basin. In Spain is frequent in old forests on dying cork and holm oaks. In field conditions, the weakness of the host is the main factor for the formation of the charcoal stroma, independently of the tree age. This formation is not associated with the presence of bleeding cankers on the host. A number of monoascosporic isolates has been obtained from samples taken from affected trees, mainly *Quercus* spp., in southern Spain and other locations. The morphology of their colonies and the microscopical characterisation of the sexual and asexual reproductive structures have shown the high variability of the natural fungal populations. Since the characteristics of the isolates conform to the description of *B. mediterranea*, ascospore dimensions do not agree with any range established for the three varieties of this species, making doubtful this criterion to distinguish varieties in Spanish isolates.

**Key words:** *Biscogniauxia mediterranea*, charcoal, decline, *Hypoxylon mediterraneum*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*.

## REFERENCIAS

- ANALYTICAL SOFTWARE. 2003. Statistix 8. PO Box, Tallahassee.
- ANÓNIMO. 1993. *Hypoxylon mediterraneum*. Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico, Salamanca.
- ALVES, A., CORREIA, A., LUQUE, J., PHILLIPS, A. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia*, **96**: 598-613.
- BAETA NEVES, C.M. 1948. A investigacao científica e os problemas da proteccao do sobreiro no Ribatejo. *Bul. J.N.C.*, **116**: 386-389.
- BAETA NEVES, C.M. 1949. A seca dos sobreiros. *Gazeta das Aldeias*, **2168**: 730-733.
- BAETA NEVES, C.M. 1954. A morte dos sobreiros. *Gazeta das Aldeias*, **2284**: 568-570.
- BIOCCA, M., MOTTA, E. 1995. Aspects of latency of *Hypoxylon mediterraneum* in declining Turkey oaks (*Quercus cerris*). *Petria*, **5**: 171-176.
- BIOCCA, M., MOTTA, E., FORTI, E. 1996. *Hypoxylon mediterraneum* su platano (*Platanus acerifolia*) in Italia centrale. *Informatore Fitopatologico*, **46**: 13-14.
- 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.
- COLLADO, J., PLATAS, G., GONZÁLEZ, I., PELÁEZ, F. 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.*, **144**: 525-532.
- COLLADO, J., PLATAS, G., PELÁEZ, F. 2001. Identification of an endophytic *Nodulisporium* sp. from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. *Mycologia*, **93**: 875-886.
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. 1995. Basic Plant Pathology methods. CRC Press, St. Paul, MN.
- FRANCESCHINI, A., CORDA, P., MADDAU, L., SECHI, C., RUIU, P.A., VILLEMANT, C. 1999. Main aspects of cork oak decline in Sardinia (Italy). *Bull. OILB SROP*, **22**: 1-3.
- JIMÉNEZ, J.J., SÁNCHEZ, M.E., TRAPERO, A. 2004. Caracterización morfológica y fisiológica de *Biscogniauxia mediterranea*, agente del Chancro Carbonoso de *Quercus*. XII Congreso de la SEF. Lloret de Mar, Gerona.
- JU, Y.M., ROGERS, J.D., SAN MARTÍN, F., GRANMO, A. 1998. The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon*, **66**: 1-98.
- LUISI, N., MANICONE, R.P., TROMBETTA, N.M., CUSANO, G. 1995. Predisposizione de querce mediterranee al deperimento in relazione alla loro resistenza alla siccità. *Italia Forestale e Montana*, **50**: 44-59.
- MAZZAGLIA, A., ANSELMINI, N., GASBARRI, A., VANNINI, A. 2001a. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as endophyte in oak tissues. *Mycol. Res.*, **105**: 952-956.
- MAZZAGLIA, A., ANSELMINI, N., VICARIO, S., VANNINI, A. 2001b. Sequence analysis of the 5.8S rDNA and ITS regions in evaluating genetic relationships among some species of *Hypoxylon* and related genera. *Mycol. Res.*, **105**: 670-675.
- MAZZAGLIA, A., LIBRANDI, I., VANNINI, A., ANSELMINI, N. 2001c. Endophytic incidence of *Biscogniauxia mediterranea* in asymptomatic oak trees. Proceedings of the 11th Congress of the MPU. Andalus Academic Publishing. Redondo, Portugal. pp. 291-293.
- MUÑOZ, M.C., RUPÉREZ, A. 1987. La patología de la encina (*Quercus ilex* L.) en España. *Bol. San. Veg. Plagas*, **13**: 203-212.
- OLIVA, M., MOLINAS, M.L.L. 1984. Incidencia de *Hypoxylon mediterraneum* en los alcornoques gerundenses. *Boletín de la Estación Central de Ecología*, **25**: 9-16.
- RAGAZZI, A., MORICCA, S., CAPRETTI, P., DELLAVALLE, I. 1999. Endophytic presence of *Discula quercina* on declining *Quercus cerris*. *J. Phytopathol.*, **147**: 437-440.
- SÁNCHEZ, M.E., GUTIÉRREZ, J., TRAPERO, A. 2002. Botryosphaeria canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathol.*, **51**: 364-372.
- 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. 2003.
- SÁNCHEZ, M.E., VENEGAS, J., ROMERO, M.A., PHILLIPS, A.J.L., TRAPERO, A. 2003b. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Dis.*, **87**: 1515-1521.
- SANTOS, M.N.S., LIEUTIER, F., MATTON, W.J., WAGNER, M.R. 1999. Cork oak-*Hypoxylon mediterraneum* de Not.: pathogenicity tests. *Les Colloques*, **90**: 279-283.
- SICOLI, G., DE GIOIA, T., LUISI, N., LERARIO, P. 1998. Multiple factors associated with oak decline in southern Italy. *Phytopath. Medit.*, **37**: 1-8.
- SORIA, S., LÓPEZ, M.M., LÓPEZ, J.M. 1997. Presencia, sintomatología y daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación en la seca de la encina. *Ecología*, **11**: 295-301.
- STEEL, G.D., TORRIE, J.H. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. McGraw-Hill, Bogotá.
- TORRES, J. 1985. El *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill. y su comportamiento en los encinares y alcornoques andaluces. *Boletín del Servicio de Plagas*, **11**: 185-191.
- TORRES, J. 1993. Patología Forestal. Mundi-Prensa, Madrid.
- TRAPERO, A., KAISER, W.J. 1992. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopathology*, **82**: 1261-1266.
- VANNINI, A., MUGNOZZA, G.S. 1991. Water stress: A predisposing factor in the pathogenesis of *Hypoxylon*

- mediterraneum* on *Quercus cerris*. *Eur. J. For. Path.*, **21**: 193-201.
- VANNINI, A., BIOCCA, M., PAPANATI, B. 1996a. Contributo alla conoscenza del ciclo biologico di *Hypoxyton mediterraneum* su *Quercus cerris*. *Informatore Fitopatologico*, **9**: 53-55.
- VANNINI, A., PAGANINI, R., ANSELMINI, N. 1996b. Factors affecting discharge and germination of ascospores of *Hypoxyton mediterraneum* (De Not.) Mill. *Eur. J. For. Path.*, **26**: 12-24.
- VANNINI, A., MAZZAGLIA, A., ANSELMINI, N. 1999. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPDP) for detection of genetic variation and heterothallic mating system in *Hypoxyton mediterraneum*. *Eur. J. For. Path.*, **29**: 209-218.
- VIEIRA NATIVIDADE, J. 1950. Subericultura. Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentação, DGF. Lisboa.

(Recepción: 30 junio 2005)

(Aceptación: 17 noviembre 2005)