

## Muerte de árboles cítricos causada por ataques de *Phytophthora citrophthora* a ramas principales

L. A. ÁLVAREZ, A. VICENT, D. GARCÍA-RELLÁN, P. MARTÍNEZ-CULEBRAS, E. DE LA ROCA, J. BASCÓN, J. ARMENGOL, P. ABAD-CAMPOS, A. ALFARO-LASSALA, J. GARCÍA-JIMÉNEZ

En los últimos años, una inusual afección de árboles cítricos caracterizada por la presencia de chancros y exudaciones gomosas sobre ramas principales y secundarias ha sido observada en la Comunidad Valenciana y la provincia de Huelva. Esta enfermedad afecta principalmente a la zona de la variedad causando la muerte del árbol cuando las lesiones rodean completamente el tronco o las ramas impidiendo el flujo de savia. *Phytophthora citrophthora* se aisló consistentemente de los tejidos afectados siendo identificada sobre la base de sus características culturales, morfológicas, fisiológicas y moleculares. Cincuenta y dos aislados representativos de diversas zonas geográficas y diferentes cultivares se inocularon sobre frutos de naranja cv. Valencia Late para seleccionar los más virulentos. Las cepas seleccionadas se inocularon mediante herida en plantas de dos años de edad de los cultivares Clemenules, Nour, Hernandina, Nova, Fortune y naranjo dulce cv. Navelina, injertados sobre citrange Carrizo. El experimento se realizó en invernadero y las evaluaciones se hicieron 60, 90 y 120 días después de la inoculación. Se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto a susceptibilidad de cultivares frente a la infección y también de agresividad entre los aislados ensayados.

L. A. ÁLVAREZ, A. VICENT, D. GARCÍA-RELLÁN, P. MARTÍNEZ-CULEBRAS, J. ARMENGOL, P. ABAD-CAMPOS, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. E-mail: luialber@eaf.upv.es  
E. DE LA ROCA, J. BASCÓN. Laboratorio de Sanidad Vegetal de Huelva, Ctra. El Portil - Rompido s/n, 21459, Cartaya-Huelva.  
A. ALFARO-LASSALA. Servicio de Sanidad Vegetal de Silla - Generalitat Valenciana. Ctra. Alicante -Valencia km 276,5. Apartado 125, Silla - Valencia.

**Palabras clave:** Susceptibilidad varietal, gomosis, chancros.

### INTRODUCCIÓN

Desde 2002 se ha tenido constancia de una severa afección de árboles cítricos caracterizada por la formación de chancros extensos con exudaciones de goma sobre ramas y troncos de la variedad, ocasionando frecuentemente la muerte del árbol. Este síndrome se observó inicialmente en la provincia de Huelva afectando diversos cultivares de cítricos, principalmente del grupo de las mandarinas tales como Clemenules y Nour, híbri-

dos como Nova y Fortune, y naranjas como Salustiana y Navelina. Posteriormente, esta enfermedad se ha observado en la Comunidad Valenciana afectando originalmente el cultivar Hernandina y, recientemente, en Clemenules, Marisol, Clemenpons, Fortune y Navelina.

Estudios preliminares de este nuevo síndrome mostraron que los síntomas observados están ligados a ataques de *Phytophthora* sp. (VICENT *et al.*, 2004). Enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* en cítricos han

Cuadro 1. Características morfológicas, fisiológicas y culturales de los aislados de *Phytophthora* estudiados.

Código	Origen	Variedad/Patrón	Estructuras asexuales				Clamidoporas Ø (µm)	Estruct. Sexuales	Temperaturas cardinales		Diámetro de la colonia a 24°C	Especie
			Esporangios			Forma			Crecimiento 5°C	Crecimiento 35°C		
			Long. (µm)	Anch. (µm)	L/A							
Phy 001	Castellón	Hernandina/Carrizo	46,3*	34,5*	1,3:1	Obpiriforme	26,7 *	estéril	Si	No	64,1**	<i>P. citrophthora</i>
Phy 002	Castellón	Hernandina/Carrizo	46,5	30,0	1,6:1	Obpiriforme	24,3	estéril	Si	No	51,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 003	Castellón	Hernandina/Carrizo	56,0	31,0	1,8:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	51,8	<i>P. citrophthora</i>
Phy 004	Castellón	Hernandina/Carrizo	49,3	35,0	1,4:1	Obpiriforme	25,5	estéril	Si	No	63,2	<i>P. citrophthora</i>
Phy 005	Castellón	Hernandina/Carrizo	41,5	30,5	1,4:1	Obpiriforme	24,6	estéril	Si	No	69,6	<i>P. citrophthora</i>
Phy 006	Huelva	Fortune/Volkameriana	44,5	31,5	1,4:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	64,8	<i>P. citrophthora</i>
Phy 007	Huelva	Fortune/Volkameriana	44,8	33,5	1,3:1	Obpiriforme	12,3	estéril	Si	No	66,4	<i>P. citrophthora</i>
Phy 008	Huelva	Fortune/Volkameriana	46,5	33,0	1,3:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	64,5	<i>P. citrophthora</i>
Phy 010	Huelva	Fortune/Volkameriana	42,8	30,0	1,4:1	Limoniforme	12,5	estéril	Si	No	66,0	<i>P. citrophthora</i>
Phy 011	Huelva	Fortune/Volkameriana	52,0	35,5	1,5:1	Obpiriforme	17,0	estéril	Si	No	64,2	<i>P. citrophthora</i>
Phy 012	Huelva	Fortune/Volkameriana	35,6	27,5	1,3:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	65,7	<i>P. citrophthora</i>
Phy 013	Huelva	Fortune/Volkameriana	50,0	31,8	1,6:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	65,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 014	Huelva	Fortune/Volkameriana	49,2	32,5	1,5:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	69,5	<i>P. citrophthora</i>
Phy 016	Huelva	Clemenules/amargo	38,5	28,0	1,4:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	64,5	<i>P. citrophthora</i>
Phy 017	Huelva	Clemenules/amargo	41,3	31,3	1,3:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	64,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 018	Huelva	Clemenules/amargo	44,0	29,0	1,5:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	67,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 020	Huelva	Clemenules/amargo	45,0	31,3	1,4:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	70,0	<i>P. citrophthora</i>
Phy 022	Huelva	Clemenules/amargo	43,9	26,1	1,7:1	Obpiriforme	20,0	estéril	Si	No	58,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 023	Huelva	Clemenules/amargo	51,5	34,3	1,5:1	Obpiriforme	21,7	estéril	Si	No	66,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 025	Huelva	Hernandina/Carrizo	44,4	26,0	1,7:1	Obpiriforme	17,0	estéril	Si	No	64,7	<i>P. citrophthora</i>
Phy 026	Huelva	Hernandina/Carrizo	45,0	32,8	1,4:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	67,5	<i>P. citrophthora</i>
Phy 027	Huelva	Clemenules/amargo	47,5	34,5	1,4:1	Obpiriforme	18,8	estéril	Si	No	58,7	<i>P. citrophthora</i>
Phy 028	Huelva	Nour/carrizo	39,0	28,8	1,4:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	66,2	<i>P. citrophthora</i>
Phy 029	Huelva	Nour/carrizo	52,3	32,0	1,6:1	Obpiriforme	35,0	estéril	Si	No	65,8	<i>P. citrophthora</i>
Phy 030	Huelva	Nour/carrizo	42,5	30,8	1,4:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	38,4	<i>P. citrophthora</i>
Phy 031	Huelva	Nour/carrizo	53,5	30,8	1,7:1	Limoniforme	21,3	estéril	Si	No	44,8	<i>P. citrophthora</i>
Phy 032	Huelva	Nour/carrizo	34,5	28,8	1,2:1	Obpiriforme	14,0	estéril	Si	No	47,2	<i>P. citrophthora</i>

Cuadro 1. Características morfológicas, fisiológicas y culturales de los aislados de *Phytophthora* estudiados.  
(Continuación)

Código	Origen	Variedad/Patrón	Estructuras asexuales					Estruct. Sexuales	Temperaturas cardinales		Diámetro de la colonia a 24°C	Especie
			Esporangios			Clamidosporas Ø (µm)	Crecimiento 5°C		Crecimiento 35°C			
			Long. (µm)	Anch. (µm)	L/A Forma							
Phy 033	Huelva	Nour/carrizo	40,3	29,5	1,4:1	Obpiriforme	27,5	estéril	Si	No	63,0	<i>P. citrophthora</i>
Phy 041	Huelva	Hernandina/Carrizo	45,6	33,8	1,4:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	25,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 044	Castellón	Hernandina/Carrizo	84,9	33,0	1,6:1	Obpiriforme	21,3	estéril	Si	No	35,8	<i>P. citrophthora</i>
Phy 045	Castellón	Hernandina/Carrizo	62,2	42,5	1,5:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	69,5	<i>P. citrophthora</i>
Phy 046	Castellón	Hernandina/Carrizo	52,3	33,5	1,6:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	68,7	<i>P. citrophthora</i>
Phy 047	Castellón	Hernandina/Carrizo	42,8	27,0	1,6:1	Limoniforme	No	estéril	Si	No	68,0	<i>P. citrophthora</i>
Phy 048	Castellón	Hernandina/Carrizo	37,3	24,0	1,6:1	Limoniforme	28,0	estéril	Si	No	68,9	<i>P. citrophthora</i>
Phy 049	Castellón	Hernandina/Carrizo	52,8	29,5	1,8:1	Limoniforme	No	estéril	Si	No	61,2	<i>P. citrophthora</i>
Phy 050	Castellón	Hernandina/Carrizo	59,3	39,5	1,5:1	Obpiriforme	20,0	estéril	Si	No	68,4	<i>P. citrophthora</i>
Phy 051	Castellón	Hernandina/Carrizo	51,2	29,6	1,7:1	Obpiriforme	16,0	estéril	Si	No	66,2	<i>P. citrophthora</i>
Phy 052	Castellón	Hernandina/Carrizo	48,3	28,7	1,7:1	Obpiriforme	19,0	estéril	Si	No	64,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 053	Castellón	Hernandina/Carrizo	44,8	22,3	2,0:1	Distorsionada	16,3	estéril	Si	No	64,7	<i>P. citrophthora</i>
Phy 054	Castellón	Hernandina/Carrizo	40,5	24,5	1,7:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	60,0	<i>P. citrophthora</i>
Phy 055	Castellón	Hernandina/Carrizo	60,8	19,3	3,2:1	Distorsionada	No	estéril	Si	No	62,2	<i>P. citrophthora</i>
Phy 056	Valencia	Hernandina/Carrizo	38,0	21,3	1,8:1	Obpiriforme	17,2	estéril	Si	No	57,2	<i>P. citrophthora</i>
Phy 057	Valencia	Hernandina/Carrizo	41,7	20,5	2,0:1	Distorsionada	No	estéril	Si	No	67,1	<i>P. citrophthora</i>
Phy 058	Valencia	Hernandina/Carrizo	39,8	23,1	1,7:1	Obpiriforme	22,0	estéril	Si	No	28,7	<i>P. citrophthora</i>
Phy 061	Castellón	Hernandina/Carrizo	38,3	21,3	1,8:1	Obpiriforme	20,6	estéril	Si	No	60,5	<i>P. citrophthora</i>
Phy 062	Huelva	Nour/carrizo	44,8	31,0	1,4:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	30,8	<i>P. citrophthora</i>
Phy 063	Huelva	Nour/carrizo	73,5	33,3	2,2:1	Distorsionada	No	estéril	Si	No	64,5	<i>P. citrophthora</i>
Phy 064	Huelva	Hernandina/Carrizo	54,5	36,3	1,5:1	Limoniforme	No	estéril	Si	No	64,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 065	Huelva	Fortune/Volkameriana	70,0	20,0	3,5:1	Distorsionada	32,5	estéril	Si	No	62,6	<i>P. citrophthora</i>
Phy 066	Huelva	Fortune/Volkameriana	50,5	34,0	1,5:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	63,7	<i>P. citrophthora</i>
Phy 067	Huelva	Fortune/Volkameriana	94,3	58,6	1,6:1	Obpiriforme	No	estéril	Si	No	64,3	<i>P. citrophthora</i>
Phy 068	Huelva	Hernandina/Carrizo	51,5	30,8	1,7:1	Obpiriforme	19,5	estéril	Si	No	69,3	<i>P. citrophthora</i>

\* Media de 25 medidas

\*\* Media en mm de 6 diámetros a los 7 días de crecimiento.

sido citadas desde hace mucho tiempo en España. Aunque el agente causal aparentemente no fue correctamente identificado en un principio, se considera que la epidemia de pudrición de raíces y del cuello de árboles cítricos a finales del siglo XIX en las Islas Baleares y Castellón (BOU, 1879; RULLÁN, 1896) fue ocasionada por *Phytophthora*. FAWCETT (1932) identificó a *P. citrophthora* como el agente causal del "aguado de los frutos" (TUSET, 1977, ERWIN y RIBEIRO, 1996). TUSET (1983) hace referencia a la amplia distribución de *P. parasitica* y *P. citrophthora* en todas las plantaciones cítricas del país como los agentes causales de la "gomosis" y "podredumbre del cuello de la raíz".

A pesar de todas estas referencias, no se tiene conocimiento de citas sobre afecciones en cítricos con esta sintomatología encontrada recientemente en España. Por tal motivo, el presente estudio tuvo como objetivos identificar el agente causal, determinar la susceptibilidad de diversos cultivares de cítricos frente a dicho agente y caracterizar la patogenicidad de aislados representativos del patógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización del síndrome

Se visitaron parcelas afectadas en diversas localidades de la Comunidad Valenciana y provincia de Huelva, correspondiente a diferentes variedades y edades de plantas. Paralelamente, en el laboratorio se recibieron muestras de plantas afectadas, anotándose en todos los casos la sintomatología observada.

### Aislamiento y conservación de aislados

Las muestras analizadas procedían del cultivar Hernandina de las provincias de Castellón y Valencia en la Comunidad Valenciana, y de los cultivares Fortune, Clemenules, Nour y Nova de la provincia de Huelva en Andalucía.

A partir de chancros de ramas y troncos de árboles afectados en campo, se extrajeron secciones de corteza conteniendo tejido sano

y afectado. En laboratorio, se seleccionaron fragmentos de tejidos, se lavaron con agua del grifo y, posteriormente, se desinfectaron superficialmente con etanol. Pequeños segmentos del frente de avance de las lesiones se sembraron en el medio selectivo para oomicetos PARPH, compuesto por medio CMA (Agar harina de maíz) como medio base con 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de pimáricina, 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de rifampicina, 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de pentachloronitrobenzeno (PCNB), 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de benomilo, y 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de himexazol (Jeffers y Martin, 1986). Las placas se incubaron en estufa a 24 °C en oscuridad durante 5 días. De las colonias desarrolladas en este medio se extrajeron puntas de crecimiento hifal, las cuales se transfirieron a medio de cultivo PDA (Patata Dextrosa Agar).

Para la conservación de aislados, alrededor de 10 a 12 discos de agar de 8 mm de diámetro de cada cepa se adicionaron a viales de vidrio conteniendo 15 ml de solución de extracto de suelo estéril, y conservados a 7 y 20 °C.

### Caracterización fenotípica de los aislados

Se utilizaron un total de 52 aislados (Cuadro 1) que fueron caracterizados morfológica, cultural y fisiológicamente. El estudio de la morfología de las estructuras asexuales de cada cepa incluyó la observación de esporangios y clamidosporas producidos en discos de agar colonizado en solución de extracto de suelo estéril. Para la observación de caracteres sexuales se indujo la producción de gametangios apareando las cepas a identificar mediante la técnica de los cultivos duales con los aislados de referencia CBS-308.62 y CBS-307.62 pertenecientes respectivamente a los grupos de apareamiento  $A_1$  y  $A_2$  de *P. cryptogea* Pethybridge et Lafferty. Las placas se incubaron en oscuridad a 24 °C y se realizaron observaciones a los 15, 30 y 45 días después de las siembras para comprobar la formación de oosporas. El apareamiento de  $A_1$  y  $A_2$  de *P. cryptogea* se incluyó como control.

Para el estudio de las características fisiológicas, las cepas se sembraron en placas con medio de cultivo PDA en grupos de tres repeticiones por aislado y se evaluó su crecimiento a temperaturas de 5 °C, 24 °C y 35 °C. El patrón cultural de la colonia y la tasa de crecimiento de cada aislado se determinó tras siete días de crecimiento en medio PDA a 24 °C en oscuridad.

### Caracterización molecular de los aislados

La extracción del DNA de los cultivos se realizó a partir del micelio recogido de una placa Petri, y se llevó a cabo con el "kit" de extracción EZNA (Omega Bio-tek) siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Para amplificar por PCR el DNA ribosómico de las cepas de *Phytophthora* se utilizaron los

Cuadro 2. Patogenicidad de aislados de *P. citrophthora* de diversos orígenes geográficos en frutos de naranja cv. Valencia Late.

Aislado	I.D. <sup>X</sup>	LSD	Localidad	Provincia
Phy 031	0,2	a <sup>Y</sup>	Gibraleón	Huelva
Phy 032	0,2	a	Gibraleón	Huelva
Phy 013	0,3	a	Z	Huelva
Phy 057	0,4	a	Ribaroja	Valencia
Phy 003	0,4	a	Onda	Castellón
Phy 004	0,4	a	Onda	Castellón
Phy 065	0,5	a	-	Huelva
Phy 008	0,5	a	-	Huelva
Phy 040	0,6	ab	Zalamea	Huelva
Phy 064	0,8	abc	Nerva	Huelva
Phy 056	0,8	abc	Ribaroja	Valencia
Phy 049	1	abcd	Villarcál	Castellón
Phy 017	1	abcd	Zalamea	Huelva
Phy 059	1	abcd	-	Huelva
Phy 001	1	abcd	Onda	Castellón
Phy 055	1,4	bcd <sup>ef</sup>	Burriana	Castellón
Phy 044	1,6	bcd <sup>ef</sup>	Alquerías	Castellón
Phy 054	1,8	cde <sup>fg</sup>	Burriana	Castellón
Phy 026	2	cf <sup>gh</sup>	Nerva	Huelva
Phy 020	2,2	ef <sup>ghi</sup>	Zalamea	Huelva
Phy 058	2,2	ef <sup>ghi</sup>	Ribaroja	Valencia
Phy 009	2,2	ef <sup>ghi</sup>	-	Huelva
Phy 030	2,2	ef <sup>ghi</sup>	Gibraleón	Huelva
Phy 027	2,4	f <sup>ghi</sup>	Zalamea	Huelva
Phy 005	2,6	g <sup>hi</sup>	Onda	Castellón
Phy 033	2,8	h <sup>i</sup>	El Campillo	Huelva
Phy 053	2,8	h <sup>i</sup>	Burriana	Castellón
Phy 051	3	i	Alquerías	Castellón

<sup>X</sup> I.D. Índice de daño en una escala de 0 (sin síntomas) a 5 (76-100 % de fruto superficie del fruto afectado).

<sup>Y</sup> En la misma columna, números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de significación LSD (P<0,05).

Z -No existen datos.



Figura 1. Amarilleo de nervaduras en hojas.

oligonucleótidos *its5* e *its4* (WHITE *et al.*, 1990). Estos cebadores amplifican una región (5.8S-ITS) del DNA ribosómico que contiene los espaciadores internos ITS1 e ITS2 y el gen que codifica el RNA ribosómico 5.8S. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Eppendorf Mastercycler personal) consistiendo en 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C. En cada reacción se utilizó una unidad de enzima (Netzyme, N.E.E.D. S.L), dNTPs a una concentración de 100  $\mu$ M y los oligonucleótidos a una concentración de 0,2  $\mu$ M, todo ello en el tampón de reacción suministrado por el proveedor.

La purificación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó con el "kit" "high pure PCR product purification" de Roche, siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Los fragmentos purificados se secuenciaron directamente, utilizando los cebadores *its5* e *its4* y el "kit" ABI PRISM™, que utiliza terminadores marcados y como enzima se utilizó la Amplitaq DNA polimerasa de Perkin Elmer. El trabajo se realizó con el secuenciador automático ABI 373 DNA sequencer.

## Ensayos de patogenicidad

### a. Inoculación de frutos

Se realizó un ensayo preliminar para determinar la patogenicidad y agresividad de

los aislados de *Phytophthora* sobre frutos. Se seleccionaron 28 aislados representativos en función de sus zonas de procedencia y cultivar de aislamiento (Cuadro 2).

Se inocularon cinco frutos maduros de naranja cultivar Valencia Late por cada cepa seleccionada. Para ello, se colocaron dos discos de micelio del mismo aislado sobre cada fruto previamente desinfectado con etanol. Uno de los discos se colocó directamente sobre el fruto y el segundo sobre una herida de aproximadamente 3 mm de longitud y 2 mm de profundidad realizada con bisturí. Se realizaron cinco repeticiones (frutos) para cada aislado y los frutos se incubaron en cámaras húmedas con un fotoperiodo de 12 horas de luz a 25 °C durante 7 días. Para la evaluación de los resultados de las inoculaciones se diseñó una escala basada en el porcentaje del fruto afectado por el patógeno con respecto al área total del mismo: 0 = Sin síntomas; 1 = 1-5%; 2 = 6-25%; 3 = 26-50%; 4 = 51-75% y 5 = 76-100%.



Figura 2. Oscurecimiento de la corteza y exudación de gomas.

### ***b. Inoculación de plantones***

Este ensayo tuvo como objetivos evaluar la susceptibilidad de diversos cultivares de cítricos frente al patógeno así como determinar la agresividad de los aislados seleccionados mediante inoculaciones artificiales a diversos cultivares de cítricos. Para esta prueba se eligieron ocho de los aislados que resultaron más virulentos en el ensayo anterior.

Como hospedantes se utilizaron plantones de cítricos de dos años de edad de los cultivares *Hernandina*, *Fortune*, *Clemenules*, *Nour*, *Nova* y *Navelina* injertados sobre *Citrango Carrizo*. Las plantas se mantuvieron en invernadero a una temperatura entre  $26 \pm 2$  °C y la humedad relativa alrededor del 90% durante todo el ensayo. El experimento se realizó mediante un diseño completamente aleatorizado con 54 tratamientos (8 aislados + 1 testigo x 6 cultivares de cítricos) y 5 repeticiones (plantones) por tratamiento.

Para la inoculación, se emplearon cultivos de cinco días de crecimiento de cada aislado en medio PDA. A partir de la zona del avance de la colonia, se extrajeron discos de agar de 5 mm de diámetro mediante un sacabocados. Mediante el uso de un injertador, se realizaron heridas longitudinales de aproximadamente 15 x 10 mm en la zona de la variedad de cada planta con la finalidad de separar la corteza de la madera pero manteniéndola unida por uno de los lados. Una vez realizada la herida, se levantó la corteza y se introdujo en el interior un disco de agar con micelio de cada aislado. La herida se selló con parafilm y el conjunto se cubrió con papel de aluminio para evitar la desecación del inóculo. Los controles fueron inoculados utilizando discos de PDA estéril.

A las 8, 12 y 16 semanas después de la inoculación se midió la longitud de la lesión desarrollada a partir del punto de inoculación, a este valor se le restó la longitud de la herida inicial de inoculación. Tras la última evaluación, se procedió al reaislamiento del patógeno en laboratorio a partir de una de las plantas de cada combinación mediante

siembra de fragmentos del frente de avance de las lesiones en medio selectivo PARPII.

### **Análisis de datos**

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de los promedios de índice de daño en el ensayo de inoculación de frutos y de los valores de las longitudes de las lesiones de las tres evaluaciones en el ensayo de inoculación de plantones. La significación del experimento se realizó empleando el test de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher-LSD (Least Significant Difference). Los datos fueron procesados utilizando el software estadístico Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics, Inc. Rockville - Maryland, USA).

## **RESULTADOS**

### **Sintomatología**

Las plantas afectadas en campo mostraron hojas verde-pálidas con un marcado amarillamiento en sus nervaduras (Fig. 1). Sobre la corteza de troncos, ramas principales y secundarias, se observaron manchas de color oscuro en las que se originaron heridas o grietas con exudaciones gomosas (Fig. 2). Sobre estas lesiones se formaron posteriormente chancros a diferentes alturas del árbol (Fig. 3). El frente de avance de las lesiones progresó en sentido ascendente y descendente a partir del punto de infección (Fig. 4), que en algunos casos, coincidió con la zona de inserción de las ramas o axilas (Fig. 5), afectando posteriormente las ramas principales y secundarias (Fig. 6). Estas lesiones no tuvieron conexión con infecciones en la parte inferior del árbol (Fig. 7).

La enfermedad afectó únicamente a la zona de la variedad, ya que la destrucción de tejidos en síntomas avanzados no sobrepasó la zona límite del punto de unión entre el patrón y el injerto (Fig. 8). Al extenderse las lesiones descritas, se produjo el colapso de los tejidos floemáticos provocando la muerte de ramas (Fig. 9) y finalmente del árbol (Fig. 10). Los cultivares en los cuales se ha detectado esta enfermedad, que en su



Figura 3. Formación de chancro en rama.



Figura 4. Progresión de las lesiones en sentido ascendente y descendente a partir de la zona de infección.

mayoría son mandarinas del grupo de las clementinas, son altamente susceptibles a la infección, este hecho ha sido corroborado en inoculaciones a ramas con el patógeno (Fig. 11). La importancia de esta enfermedad ha llegado al extremo que en algunas zonas de la provincia de Huelva han sido eliminadas parcelas enteras afectadas con este síndrome.

#### Aislamiento y caracterización de los aislados

De las lesiones descritas, se aisló consistentemente *Phytophthora* sp. Todas las cepas mostraron un patrón de crecimiento tipo petaloide a 24 °C sobre PDA y carentes de micelio aéreo. Se apreciaron diferencias entre las tasas de crecimiento de los aislados (Cuadro 1). La mayor parte de las cepas mostraron a los 7 días diámetros de colonia entre 50 - 70 mm, aunque algunos presentaron tasas de crecimiento menores, de hasta 25,3 mm.

Morfológicamente, los esporangios fueron papilados o semipapilados con una o dos

papilas, no caducos, no proliferantes y con simpodios de 2 a 3 esporangios frecuentemente unidos lateralmente al esporangióforo. El tamaño de los esporangios fue de (34,5-) 40,8 (-94,3) x (19,3-) 29,5 (-58,6)  $\mu\text{m}$ . El ratio Longitud:Anchura (L:A), fue de (1,2:1-) 1,4:1 (-1,8:1). La forma dominante de los esporangios fue obpiriforme en un 75 % de los casos, seguida por limoniforme (15 %) y de formas distorsionadas en el 10 % restante; estos últimos no se tuvieron en cuenta para las medias de mediciones de esporangios. Algunos aislados produjeron clamidosporas que fueron terminales o intercalares y promediaron un diámetro de 29,6  $\mu\text{m}$ . En las pruebas de temperatura todos los aislados llegaron a crecer a 5 °C, pero ninguno lo hizo a 35 °C.

El apareamiento de los aislados de este estudio con las cepas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> de *P. cryptogea* no indujo la formación de estructuras sexuales en ninguno de los intervalos de evaluación.

Basándose en las características culturales, morfológicas y fisiológicas estudiadas, todos



Figura 5. Lesiones en la zona de bifurcación de ramas.



Figura 6. Lesiones en ramas secundarias.



Figura 7. Infección en tronco en la zona de la variedad, con progresión descendente.

los aislados se identificaron como *Phytophthora citrophthora* (R. E. & E. H. Smith) Leonian. Los productos de PCR secuenciados (5.8S-ITS) de los diferentes aislados de *Phytophthora* analizados, presentaron una longitud de 850 pb. Mediante el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information, USA), se compararon dichas secuencias con aquellas otras depositadas en las bases de datos (GenBank). Los resultados confirmaron la pertenencia de todos los aislados a la especie *P. citrophthora*.

### Pruebas de patogenicidad

#### *Inoculación de frutos*

En frutos inoculados mediante herida, al final de la incubación no pudo realizarse un análisis de la agresividad de las cepas debido a que todas produjeron extensas lesiones en la zona inoculada sin ninguna diferencia aparente entre los diversos tratamientos. Por tal motivo, sólo se evaluaron las lesiones producidas en la inoculación sin herida, donde se caracterizó la agresividad de los aislados en función de su capacidad de producir lesiones en el fruto. El análisis de datos de este ensayo mostró diferencias estadísticas significativas de agresividad entre los aislados ensayados de

acuerdo con la prueba de significación LSD (Cuadro 2). Ocho aislados que no mostraron entre sí diferencias estadísticas significativas, cuatro de la Comunidad Valenciana (Phy 051, Phy 053, Phy 005 y Phy 058) y cuatro de la provincia de Huelva (Phy 033, Phy 027, Phy 030 y Phy 009) se seleccionaron para el ensayo de inoculación de plántones.

#### *Inoculación de plántones*

Los resultados de las evaluaciones en diversos cultivares de cítricos con los aislados seleccionados de *P. citrophthora* se muestran en el Cuadro 3. En este experimento, los ensayos de susceptibilidad de cultivares de cítricos frente al patógeno (Cuadro 4), indicaron que existen diferencias estadísticas significativas entre cultivares de acuerdo a la prueba de significación LSD. En la primera evaluación (60 días de la inoculación), sólo se observaron diferencias significativas entre el cultivar Nova (más susceptible) y Naveli-



Figura 8. Patrón resistente y variedad susceptible a *P. citrophthora*. Nótese la línea de demarcación entre el tejido resistente (inferior) y el tejido necrosado susceptible (superior).

Cuadro 3. Longitud media (cm) de las lesiones ocasionadas por aislados de *P. citrophthora* sobre diversos cultivares de cítricos.

Aislado	Cultivares																	
	Clemenules			Fortune			Hernandina			Navelina			Nour			Nova		
	1ª eval. <sup>W</sup>	2ª eval. <sup>X</sup>	3ª eval. <sup>Y</sup>	1ª eval.	2ª eval.	3ª eval.	1ª eval.	2ª eval.	3ª eval.	1ª eval.	2ª eval.	3ª eval.	1ª eval.	2ª eval.	3ª eval.	1ª eval.	2ª eval.	3ª eval.
Phy 005	1.1 <sup>Z</sup>	1.95	4	0.82	1.85	3.78	1.94	2.5	3.5	0.78	1.63	3.1	0.46	2.75	4	1.86	2.5	4.9
Phy 009	1.42	2.43	3.48	1.18	1.43	3.65	0.84	2.18	4.18	0.98	1	3.73	0.46	0.9	5.3	1.16	2.03	5.8
Phy 027	1.7	2.98	3.3	1.5	1.2	3.65	1.88	1.88	4.2	1.64	2.77	4.33	1.42	2.15	2.95	1.08	1.16	3.45
Phy 030	1.24	1.8	3.55	0.82	2.1	3.02	1.24	1.68	3.65	1.04	1.48	3.28	0.78	0.78	3.8	2.68	3.05	4.8
Phy 033	1.74	1.93	4.033	1.16	1.23	3.5	1.88	2.18	3.35	1.54	1.6	2.57	4.48	4.48	4.48	0.88	3.87	5.13
Phy 051	3.02	3.1	4.55	1.06	2.1	3.43	2.86	3	4.5	1.17	1.23	3.47	5.34	5.34	5.34	2.66	7.84	9.3
Phy 053	0.64	1.8	3.7	1.02	1.55	3.53	0.6	2.43	3.37	0.24	0.58	3	0.2	2.1	4.2	2.74	1.68	3.58
Phy 058	1.02	2.5	3.1	0.94	2.35	3.38	1.2	1.35	3.93	0.58	1.83	3.73	0.78	1.45	4.8	0.9	2.5	2.95
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>W</sup> Observaciones a los 60 días de la inoculación

<sup>X</sup> Observaciones a los 90 días de la inoculación

<sup>Y</sup> Observaciones a los 120 días de la inoculación

<sup>Z</sup> Cada dato es la media de 5 repeticiones.

na y Fortune. En la segunda y tercera evaluación (90 y 120 días de la inoculación), los cultivares más susceptibles resultaron ser Nova y Nour sin diferencias estadísticas significativas entre ellos.

En el Cuadro 5, se observan los resultados del ensayo de agresividad de aislados sobre cultivares de cítricos. La prueba de significación LSD mostró diferencias estadísticas significativas entre aislados, siendo Phy 051 de Alquerías (Castellón), y Phy 033 de El Campillo (Huelva) los que mostraron mayores promedios de longitud de lesión en todas las evaluaciones.

## DISCUSIÓN

El presente estudio describe un síndrome inusual caracterizado por la presencia de chancros y exudaciones gomosis afectando ramas principales y secundarias de árboles cítricos. Los resultados obtenidos demuestran que *P. citrophthora* es el agente causal de la enfermedad debido a que este patógeno se aisló de todas las lesiones ligadas a la enfermedad y por los resultados de los ensayos de patogenicidad.

Diversas enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* spp. tales como "podredumbre del pie", "podredumbre fibrosa de la raíz", "gomosis", "damping off" y "aguado en frutos" han sido descritas en cítricos a nivel mundial (THOMER *et al.*, 1993; EAWIN y RIBEIRO, 1996; TUSSET, 2000). Sin embargo, existen escasas citas de afectaciones a la parte aérea de árboles cítricos. FAWCETT (1936) mencionó la presencia de *P. citrophthora* atacando todas las partes del árbol desde las raíces hasta las ramas secundarias en pomelos en la provincia del Western Cape en Sudáfrica. Este autor hace referencia a un caso similar en Egipto, donde las lesiones en árboles afectados empezaron a la altura de las raíces progresando hasta las ramas secundarias. GRAHAM y MENGE (1999) mencionan que grandes chancros pueden formarse en las ramas de los árboles, provocando su muerte al estrangulartas. Este fenómeno se produce en especies susceptibles de cítricos

Cuadro 4. Ensayo de inoculación en plántones de cítricos: Prueba de susceptibilidad de cultivares en función del promedio de longitud de lesión.

Cultivar	Longitud de lesión (cm)		
	1ª evaluación (60 días después de la inoculación)	2ª evaluación (90 días después de la inoculación)	3ª evaluación (120 días después de la inoculación)
Navelina	0,89 <sup>Y</sup> a <sup>Z</sup>	1,64 a	3,40 a
Fortune	0,94 a	1,72 a	3,49 a
Clemenules	1,29 ab	1,98 a	3,71 a
Hernandina	1,38 ab	2,03 a	3,81 a
Nour	1,54 ab	2,84 b	5,36 b
Nova	2,67 b	3,02 b	5,56 b

<sup>Y</sup> Cada dato es media de 40 repeticiones.

<sup>Z</sup> En la misma columna, números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de significación LSD ( $P < 0,05$ ).

Cuadro 5. Ensayo de inoculación de plántones de cítricos: Prueba de agresividad de aislados de *P. citrophthora* en función del promedio de longitud de lesión en cm.

Aislado	Evaluaciones		
	1ª evaluación (60 días después de la inoculación)	2ª evaluación (90 días después de la inoculación)	3ª evaluación (120 días después de la inoculación)
Testigo	0,01 <sup>Y</sup> a <sup>Z</sup>	0,01 a	0,01 a
Phy 058	0,91 ab	1,84 b	3,64 b
Phy 053	0,93 ab	1,84 b	3,68 b
Phy 030	1,05 ab	2,2 bc	3,87 bc
Phy 005	1,82 abc	2,26 bc	3,89 bc
Phy 009	1,85 abc	2,33 bc	4,33 bcd
Phy 027	2,35 bc	2,56 bc	4,46 bcd
Phy 033	2,75 bc	2,8 c	4,67 cd
Phy 051	4,00 c	4,00 d	5,23 d

<sup>Y</sup> Cada dato es media de 5 repeticiones.

<sup>Z</sup> En la misma columna, números seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de significación LSD ( $P < 0,05$ ).

como limones cuando las condiciones de lluvias son elevadas.

No obstante, las afecciones observadas para este síndrome en campo difieren de los síntomas citados anteriormente debido a que las lesiones en ramas aparentemente no están conectadas con infecciones en la parte inferior del árbol. Esto sugiere un mecanismo de infección diferente a los típicamente observados o descritos para *Phytophthora* spp. en cítricos.

Las cepas aisladas en este estudio reúnen las características morfológicas, fisiológicas,

culturales y moleculares descritas para *P. citrophthora*. Dentro de las características morfológicas, los esporangios de este hongo han sido catalogados como caducos (STAMPS *et al.*, 1990) y como no caducos (KELLAM y ZENTMYER, 1986; ERWIN y RIBEIRO, 1996). Todos los aislados de este estudio presentaron esporangios no caducos. STAMPS *et al.*, (1990) y ERWIN y RIBEIRO, (1996), contemplan ratios longitud:anchura (L:A) menores de 1,6:1 para los esporangios de *P. citrophthora*, sin embargo, KELLAM y ZENTMYER,



Figura 9. Muerte de ramas por el colapso de los tejidos floemáticos.



Figura 10. Muerte del árbol.

(1986) citan ratios de 1,6:1 o mayores para esta especie. Los ratios (L:A) de los esporangios de los aislados de este estudio variaron entre 1,2:1 y 1,8:1, siendo la media de 1,4:1 y observándose además formas distorsionadas que llegaban a ratios L:A de hasta 3,5:1.

En la descripción inicial de la especie por Smith y Smith (1906), la formación de clamidosporas no fue incluida; sin embargo, KELLAM y ZENTMYER (1986) la citaron en aislados de *P. citrophthora* procedentes de cacao en Brasil. En este estudio, se ha observado que alrededor del 52% de los aislados estudiados presentaron clamidosporas.

La sexualidad de *P. citrophthora*, no está bien definida; algunos investigadores han caracterizado la especie como estéril (STAMPS *et al.*, 1990), mientras que otros la han descrito como heterotálica con anteridios anfígenos (RIBEIRO, 1978; LIYANAGE y WHEELER, 1989). En el presente estudio, ninguno de los aislados fue capaz de inducir la formación de oosporas cuando fue emparejado con los grupos de apareamiento de la especie heterotálica relacionada, *P. cryptogea*.

Las temperaturas cardinales fueron de gran ayuda para la identificación de especies de *Phytophthora*. ERWIN y RIBEIRO (1996), señalan que la temperatura mínima para el crecimiento de *P. citrophthora* es menor de 5 °C, y la máxima de 32 a 33 °C. En este estudio, no se obtuvo crecimiento a 35 °C de ninguno de los aislados identificados como *P. citrophthora*. Estos resultados sugieren que la incapacidad de los aislados de esta especie de crecer a 35 °C puede ser un criterio útil para la caracterización de los mismos y separarlos de otras especies patógenas de cítricos como *P. parasitica*.

Las características morfológicas, culturales y fisiológicas de los aislados estudiados concuerdan con la descripción de *P. citrophthora*. No obstante, las diferencias observadas en el ratio de crecimiento diario entre aislados de esta especie, así como las diferencias en sus características asexuales como son la presencia o ausencia de clamidosporas, en el ratio L:A de los esporangios, y la diferencia de agresividad entre cepas,



Figura 11. Lesiones en las ramas de cultivares susceptibles 30 días después de la inoculación.

son evidencias de la existencia de variabilidad, sugiriendo una variación a nivel intra-específico de la población estudiada. Estos resultados concuerdan con estudios previos sobre otras especies de *Phytophthora* que señalan la variabilidad poblacional de este patógeno (LINDE *et al.*, 1997; ROBIN *et al.*, 1998; HÜBERLI *et al.*, 2001; COHEN *et al.*, 2003; VERNIÈRE *et al.*, 2004; EIKEMO *et al.*, 2004).

En los experimentos de inoculación en cultivares de cítricos llevados a cabo en este estudio, todos los aislados utilizados fueron patogénicos; no obstante, se observaron diferencias estadísticas significativas de agresividad entre ellos. Asimismo, todos los cultivares comerciales ensayados fueron en mayor o menor medida susceptibles a la enfermedad. Este resultado corrobora las afirmaciones de GRAHAM y MENGE (1999) quienes afirman que todos los cultivares son susceptibles o muy susceptibles a la infección por *Phytophthora*. Estos resultados reflejan un comportamiento similar entre la severidad de afección de los cultivares en

invernadero y el observado en campo, en donde aparentemente las mandarinas y sus híbridos son más afectadas que las naranjas.

*P. citrophthora* se citó por primera vez en España en 1932 por FAWCETT (ERWIN y RIBEIRO, 1996). En las últimas décadas ha sido la principal especie asociada al "aguado de frutos", "gomosis" y "podredumbre del cuello de la raíz" (TUSET, 1977; TUSET, 1983; TUSET *et al.*, 1990). Los trabajos de BOCCAS y LAVILLE (1978), RICCI *et al.*, (1990) y COHEN *et al.* (2003) en Córcega – Francia, corroboran la importancia de esta especie en las afecciones de cítricos en la cuenca Mediterránea en donde es la especie dominante.

La importancia de *P. citrophthora* en zonas con climas mediterráneos (primaveras lluviosas y veranos secos), se debe a que su desarrollo es favorecido por temperaturas suaves (alrededor de 15 a 24 °C) y alta pluviometría (ERWIN y RIBEIRO, 1996). Estas condiciones se producen en España en primavera y otoño donde esta especie se puede aislar fácilmente (TUSET, 1983). En campo, dada la alta susceptibilidad a la infección por algunos cultivares y debido a que las condiciones medioambientales son propicias para su desarrollo, las infecciones en ramas y troncos de árboles cítricos es muy rápida. FONS (2005), en inoculaciones con *P. citrophthora* a árboles del cultivar Hernandina, encontró lesiones de alrededor de 18 cm de longitud en un lapso de 30 días en la estación primaveral, ocasionando la muerte de las ramas inoculadas. Esto indica que bajo condiciones medioambientales favorables para el patógeno, el desarrollo de las lesiones es muy rápido, ocasionando en períodos relativamente cortos la muerte de ramas e incluso árboles enteros.

Hernandina es el cultivar en el cual se ha observado con mayor incidencia y severidad la enfermedad a nivel de campo en la Comunidad Valenciana. Este cultivar en las pruebas de patogenicidad presentó promedios de lesión inferiores que otros cultivares. Este hecho podría explicarse debido a que, a nivel experimental, se alojó directamente al patógeno en el interior de la corteza, obviando

los pasos de reconocimiento y penetración en el hospedante, etapas claves en el proceso de infección.

La re-emergencia de este patógeno en los cítricos españoles y que difieren de las típicas enfermedades observadas anteriormente pueden ser consecuencia de diversos factores. Dentro de éstos, un cambio en la población pre-existente del patógeno pudo acontecer como consecuencia de las variaciones en las prácticas culturales, a la introducción de nuevos patrones o cultivares de cítricos, a una adaptación de la población de *P. citrophthora* a nuevos mecanismos de diseminación, a cambios climáticos que han favorecido la diseminación a nivel epidémico de la enfermedad o a la influencia de todos estos factores en conjunto. Otras posibilidades pueden ser la introducción de nuevas poblaciones dando origen a cruces intraespecíficos (COHEN *et al.*, 2003), o interespecíficos (COOK *et al.*, 2003; APPIAN *et al.*, 2003).

Dentro de los mecanismos de diseminación, es probable que el impacto de las gotas de lluvia sobre el suelo pueda transportar propágulos del patógeno hacia la parte superior de árbol como las ramas y que éstas puedan ser infectadas directamente. Mediante este mismo mecanismo, otra posibilidad es que al producirse la infección de frutos o "aguado", éste sirva como una fuente terciaria de inóculo de *Phytophthora* sobre la copa, y que las infecciones de las ramas sean una consecuencia de esta infección. Esta hipótesis viene apoyada por la capacidad de *P. citrophthora* de producir abundantes esporangios sobre la superficie del fruto, y que éstos puedan ser diseminados a frutos más altos en el árbol por el impacto de las lluvias (GRAHAM *et al.*, 1998). No obstante, no se han observado fuertes ataques de "aguado" en frutos de parcelas afectadas, lo que podría indicar que es otro el mecanismo de infección de ramas por *P. citrophthora*.

El viento y el impacto de las lluvias pueden dispersar esporangios siempre que éstos sean caducos, sin embargo, *P. citrophthora* produce esporangios no caducos. Otros

mecanismos de diseminación de la enfermedad desde el suelo hacia las partes aéreas de la planta incluyen el transporte de propágulos mediante hormigas, roedores y caracoles (EL-HAMALAWI y MENGE, 1996; KONAM y GUEST, 2004).

Cambios poblacionales en especies de *Phytophthora* han sido documentados en muchos patosistemas (LINDE *et al.*, 1997; HÜBERLI *et al.*, 2001; APPIAH *et al.*, 2003; EIKEMO *et al.*, 2004). COHEN *et al.* (2003), encontraron que existen cuatro poblaciones de *P. citrophthora* en cítricos en Córcega (Francia), siendo el grupo 1 (G1) la población mayoritaria en esta zona citrícola y más virulenta sobre patrones que sobre cultivares y caracterizado por ser cepas sexualmente estériles. Asimismo, cepas del G2, caracterizadas por ser heterotálicas mayormente del grupo de apareamiento A2, fueron más virulentas sobre variedades que sobre patrones. Los grupos G3 y G4 fueron grupos minoritarios dentro de la población y semejantes al G1 molecularmente.

Un factor cultural que puede haber influido en la presencia de la enfermedad podría ser el desarrollo de nuevos sistemas de irrigación. Durante los últimos 5 años, las zonas citrícolas del país se han implementado con nuevos sistemas de irrigación. Cerca del 95 % de los campos muestreados en este ensayo usaban el sistema de riego por goteo. El incremento de la humedad del suelo por sistemas de irrigación durante periodos normalmente secos de julio a septiembre, podría favorecer la supervivencia y dispersión del patógeno. Este hecho ha sido observado

anteriormente en enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* en otros cultivos (BRASIER *et al.*, 1993; REILLY *et al.*, 1998). La transmisión de inóculo por equipo de poda y heridas sobre árboles ha sido demostrada en otras especies de *Phytophthora*. El "chancro del cacao" causado por *P. palmivora* fue fácilmente transmitido por el equipo de poda (ZAIGER y ZENTMEYER, 1965).

Hasta el momento, no se conoce cual es el factor o factores ligados a la aparición y desarrollo de este nuevo síndrome en España. Aunque se observó inicialmente a finales de 2002, su amplia distribución geográfica sugiere que la enfermedad ha estado presente anteriormente o que posiblemente el patógeno se ha diseminado a estas áreas por el material vegetal tales como plantones infectados en viveros. La falta de citas adicionales publicadas puede ser una consecuencia de que la enfermedad inicialmente no ha sido grave, o que ha estado presente y no diagnosticada satisfactoriamente. Este síndrome puede estar causando actualmente daños más graves de lo que se conoce, debiendo ponerse más énfasis sobre la naturaleza potencialmente destructiva de la misma.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Servicio de Sanidad Vegetal de Silla de la Generalitat Valenciana, y a la Asociación de Citricultores de la Provincia de Huelva por el apoyo logístico y financiero en la realización de este estudio; así como a J. M. Rodríguez-Reina por su ayuda técnica.

## ABSTRACT

ÁLVAREZ L. A., A. VICENT, D. GARCÍA-RELLÁN, P. MARTÍNEZ-CULEBRAS, E. DE LA ROCA, J. BASCÓN, J. ARMENGOI, P. ABAD-CAMPOS, A. ALIARO-LASSALA, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. 2006. **Death of citrus trees caused by attacks of *Phytophthora citrophthora* on main branches.** *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 241-258.

In the last years, an unusual disease characterized by the formation of cankers and exudation of gums on branches and trunks of citrus trees has been observed in the Comunidad Valenciana and the Huelva province. This disease affects mainly the scion causing the death of the tree when the lesions girdle completely the branches or the trunk. *Phytophthora citrophthora* was consistently isolated from affected tissues and was identified

on the basis of cultural, morphological, physiological and molecular characteristics. Fifty-two representative isolates of diverse geographical origins and varieties were inoculated on orange fruits cv. Valencia Late to select the most virulents. The isolates selected were inoculated in two year old plants of the cultivars Clemenules, Nour, Hernandina, Nova, Fortune and sweet orange cv. Navelina, grafted on Carrizo citrange. The experiment was carried out in a greenhouse and the development of the lesions was evaluated 60, 90 and 120 days after the inoculation. There were statistically significant differences between cultivars affected and virulence between isolates tested.

**Key words:** Varietal susceptibility, gums, cankers.

REFERENCIAS

APPIAH, A. A., FLOOD, J., BRIDGE, P. D. and ARCHER, S. A. 2003. Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathology*, **52**: 168-180.

BOCCAS, B. et LAVILLE, F. 1978. Les maladies à *Phytophthora* des agrumes. Inst. Rech. Fruits Agrumes (IRFA), 162 pp.

BOU, F. 1879. Estudio sobre el naranjo, limonero, cidro y otros árboles de la familia de las Auranciáceas que se cultivan en la provincia de Castellón. Editorial F. Segarra, Castellón-España. 422 pp.

BRASIER, C. M., ROBREDO, F., and FERRAZ, J. F. P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, **42**: 140-145.

COHEN, S., ALLASIA, V., VENARD, P., NOTTER, S., VERNIERE, C. and PANABIÈRES, F. 2003. Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in Eastern Corsica. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 791-805.

COOK, D. E. L., DUNCAN, J. M., BRASIER, C. M. 2003. The role of hybridization in the origin of new *Phytophthora* species. *Phytopathology*, **93**: 598.

EIKEMO, H., KLEMSDAL, S. S., RUISBERG, I., BONANTS, P., STENSVAND, A. and TRONSMO, A. M. 2004. Genetic variation between *Phytophthora cactorum* isolates differing in their ability to cause crown rot in strawberry. *Mycological Research*, **108**: 317-324.

EL-HAMALAWI, Z. and Menge, J. A. 1996. The role of snails and ants in transmitting the avocado stem canker pathogen, *Phytophthora citricola*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **121**(5): 973-977.

ERWIN, D.C. and RIBEIRO, O. K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society, St. Paul. MN, 562 pp.

FAWCETT, H. S. 1932. Brown rot of citrus in Mediterranean countries identical with that here. *California Citrograph*, **16**: 81.

FAWCETT, H. S. 1936. Citrus diseases and their control. McGraw-Hill, New York. 656 pp.

FONS, A. 2005. Ensayos de eficacia de fungicidas sistémicos en el control de los ataques de *Phytophthora citrophthora* a tronco y ramas principales de cítricos. TFC. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. 67 pp.

GRAHAM, J. H., TIMMER, L. W., DROUILLARD, D. L., and PEEVER, T. L. 1998. Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. *Phytopathology*, **88**: 724-729.

GRAHAM, J. H. and MENGE, J. A. 1999. Root diseases. En "Timmer, L.W. and Duncan, L. W. (edit.): Citrus Health Management. The American Phytopathological Society, 126-135.

HÜBERLI, D., TOMMERUP, I. C., DOBROWOLSKI, M. P., CALVER, M. C. and HADY, J. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycological Research*, **105**: 1053-1064.

JEFFERS, S. N. and MARTIN, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, **70**: 1038-1043.

KELLAM, M. K., and ZENTMYER, G. A. 1986. Comparisons of single-oospores isolates of *Phytophthora* species from naturally infected cocoa pods in Brazil. *Mycologia*, **78**: 351-358.

KONAM, J. K. and GUEST, D. I. 2004. Role of beetles (Coleoptera: Scolytidae and Nitidulac) as vectors of *Phytophthora palmivora* diseases of cocoa in Papua New Guinea. *Australasian Plant Pathology*, **33**: 55-59.

LINDE, C., DRENTH, A., KEMP, G. H., WINGFIELD, M. J. and BROEMSEN, S. L. 1997. Population structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology*, **87**: 822-827.

LIYANAGE, N. I. S. and WHEELER, B. E. J. 1989. Comparative morphology of *Phytophthora* species of rubber. *Plant Pathology*, **38**: 592-597.

REILLY, C. C.; HOTCHKISS, M. W.; HENDRIX, F. F. JR. 1998. *Phytophthora* shuck and kernel rot, a new disease of pecan caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease*, **82**: 347-349.

RIBEIRO, O. K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. Cramer, Vaduz, Liechtenstein. 417 pp.

RICCI, P., POPE DE VALLAVIEILLE, C., PANABIÈRES, F., MARAIS, A. et AUGÉ, G. 1990. Caractères comparés des espèces de *Phytophthora* pathogènes des agrumes. *OEPPEPPÔ Bulletin*, **20** : 19-28.

ROBIN, C. and DESPREZ-LOUSTAU, M. L. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 465-475.

RULLÁN, J. 1896. Cultivo del naranjo en las Baleares. Imprenta La Sinceridad. Soler- España. 189 pp.

SMITH, R. E., and SMITH, E. H. 1906. A new fungus of economic importance. *Botanical Gazette*, **42**: 215-221.

- STAMPS, D. J., WATERHOUSE, G. M., NEWHOOK, F. J. and HALL, G. S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Second Edition. Mycological Papers 162. CAB International: Wallingford, U.K.
- TIMMER, L. W., MENDGE, J. A., ZITKO, S. E., POND, E., MILLER, S. A., and JOHNSON, E. L. V. 1993. Comparison of ELISA techniques and standard isolation methods for *Phytophthora* detection in citrus orchards in Florida and California. *Plant Disease*, **77**:791-796.
- TUSET, J. J. 1977. Contribución al conocimiento del género *Phytophthora* de Bary en España. *Anales del INIA, serie protección vegetal*, **7**: 11-106.
- TUSET, J. J. 1983. La gomosis y podredumbre del cuello de la raíz de nuestros agrinos. I: Aspectos biológicos y patológicos. *Levante Agrícola*, **246**: 90-96.
- TUSET, J. J., HINAREJOS, C. and GARCÍA, J. 1990. Control of *Phytophthora* brown rot of citrus fruits. *Bulletin OEPP*, **20**: 153-161.
- TUSET, J. J. 2000. Enfermedades causadas por *Phytophthora*. En: Enfermedades de los cítricos. Monografía de la sociedad española de fitopatología N° 2. 165 pp.
- VERNIÈRE, C., COHEN, S., RAFFANEL, B., DUBOIS, A., VENARD, P. and PANABIERES, F. 2004. Variability in pathogenicity among *Phytophthora* spp. isolated from citrus in Corsica. *Journal of Phytopathology*, **152**: 476-483.
- VICENT, A., ALVAREZ, L. A., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P., ABAD-CAMPOS, P., ARMENGOL, J., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ALFARO-LASSALA, F., and DE LA ROSA, E. 2004. Outbreak of *Phytophthora* gummosis of Citrus in Spain. The Xth International Citrus Congress, Agadir-Morocco. p. 41.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White TJ (eds). PCR protocols. A guide to methods and applications (pp 315-322) Academic Press. San Diego.
- ZAIGER, D., and ZENTMEYER, G. A. 1965. *Phytophthora* canker of cacao in the Caroline Island. *Plant Disease Reporter*, **49**: 565-567.

(Recepción: 29 diciembre 2005)

(Aceptación: 13 marzo 2006)