

El Chancro Carbonoso de *Quercus* II: Patogenicidad de *Biscogniauxia mediterranea*

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

El Chancro Carbonoso es una enfermedad causada por el ascomiceto xilariáceo *Biscogniauxia mediterranea* (sin. *Hypoxyton mediterraneum*). Aunque se conoce desde antiguo afectando al alcornoque en la Península Ibérica, en los últimos años su incidencia ha aumentado asociada al decaimiento de *Quercus* spp en Andalucía. En inoculaciones artificiales en ramas cortadas de *Q. ilex* y *Q. suber* con *B. mediterranea*, se ha demostrado que las elevadas temperaturas favorecen el desarrollo de necrosis corticales y la formación del estroma carbonoso. Las inoculaciones en plantones sanos de *Q. suber*, *Q. ilex* y *Q. coccifera*, mostraron que, si bien el hongo es capaz de colonizar las plantas endofíticamente, las necrosis corticales sólo aparecen cuando las plantas sufren estrés hídrico severo, siendo el alcornoque el huésped más susceptible. El comportamiento como patógeno de debilidad que ha mostrado *B. mediterranea* indica que el Chancro Carbonoso se puede estar sobrevalorando como causa primaria de muerte en los procesos de decaimiento que sufren los *Quercus* en Andalucía.

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

Palabras clave: Carbón, decaimiento, endofito, estrés hídrico, *Hypoxyton mediterraneum*, *Quercus coccifera*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*.

INTRODUCCIÓN

El Chancro Carbonoso o Enfermedad del Carbón se conoce desde antiguo afectando al alcornoque en la Península Ibérica y el norte de Marruecos (BAETA NEVES, 1948; 1949; 1954; VIEIRA NATIVIDADE, 1950; TORRES, 1985). Su agente causal, *Biscogniauxia mediterranea* (sinónimo *Hypoxyton mediterraneum*), presenta una amplia gama de huéspedes, principalmente entre las frondosas de la cuenca mediterránea (TORRES, 1993; VANNINI *et al.*, 1996a) y de Norteamérica (SINCLAIR *et al.*, 1987). Su incidencia ha aumentado a partir de los años 80, asociada a los decaimientos de *Quercus* spp., y así se ha citado en Marruecos (BAKRY y ABOU-ROUH, 1995), en Italia (AMORINI *et al.*, 1995;

VANNINI *et al.*, 1996c), en Portugal (NATERCIA y SANTOS, 1995; SANTOS *et al.*, 1999) y en España (NAVARRO y FERNÁNDEZ, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2000).

Distintos autores asocian el desarrollo de la enfermedad al estrés hídrico sufrido por el huésped (VANNINI y MUGNOZZA, 1991; VANNINI *et al.*, 1992; VANNINI y VALENTINI, 1994; LUQUE *et al.*, 2000), considerando que es un parásito facultativo que causa lesiones necróticas sólo en estas condiciones. Sin embargo, otros autores (SANTOS *et al.*, 1999) consideran que *B. mediterranea* actúa más como un saprófito que como patógeno, desarrollando su estroma en tejidos que previamente han muerto. También está descrita como endófito en *Quercus* spp. asintomáticas (COLLADO *et al.*, 2001; MAZZAGLIA *et al.*,

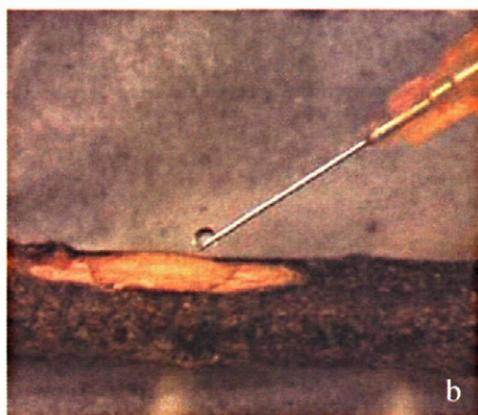
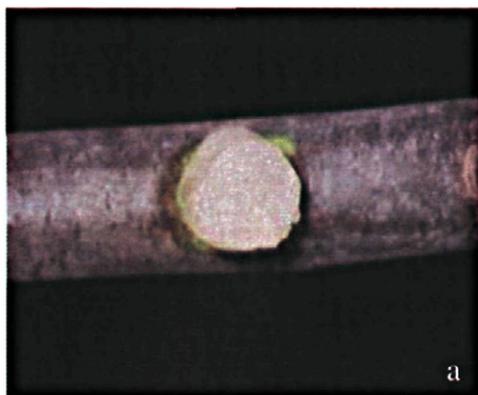


Figura 1. Metodología de la inoculación de *Quercus* spp. con *Biscogniauxia mediterranea*, a) inoculación de rama cortada mediante micelio con herida, b) inoculación de rama cortada con 50 µl de suspensión de ascosporas, c) inoculación en planta viva con 50 µl de suspensión de ascosporas.

2001), aunque no se conocen bien las condiciones necesarias para el paso de la fase endofítica a la fase patogénica. En España se han realizado pocos trabajos sobre la patogenicidad de *Biscogniauxia mediterranea*, por lo que no está claro el papel que juega en el decaimiento de *Quercus* spp. Por ello, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos: (i) caracterizar la patogenicidad de *B. mediterranea* sobre *Quercus ilex*, *Q. suber* y *Q. coccifera* y (ii) determinar la colonización endofítica en *Quercus* spp.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento a partir de leñas de encina

En marzo de 2001 se tomaron al azar restos de poda de encina libres de estroma carbonoso, en una finca con alta incidencia de Carbón, en Villanueva de Córdoba. Se realizaron aislamientos de 40 de estas ramas, sembrando cuñas de tejido cortical en placas de PDA acidificado, empleando la metodología utilizada por SÁNCHEZ *et al.* (2003).

Ensayos de patogenicidad

Para evaluar la capacidad de los aislados para reproducir los síntomas observados en campo y cumplimentar los postulados de Koch, se realizaron inoculaciones artificiales en diferentes condiciones, utilizando distinto tipo de material vegetal.

Experimento 1: Inoculaciones en ramas cortadas

El material vegetal se obtuvo de dos fincas de la provincia de Huelva, con escasa o nula presencia del Carbón, y consistió en ramas de encina y alcornoque asintomáticos, de 5-15 mm de diámetro y 24 cm de longitud. Las ramas cortadas se lavaron, se desinfectaron superficialmente con un algodón impregnado en alcohol y se sellaron sus extremos con Parafilm. Se utilizaron 3 métodos de inoculación, micelio con herida, micelio sin herida y ascosporas.

En las inoculaciones con micelio se utilizaron dos aislados monoascospóricos: HYP-8, obtenido de estromas de encina de Villanueva de Córdoba y HYP-22, procedente de estromas de un alcornoque situado en Los Barrios



Figura 2. Inoculación de plantas de *Quercus* spp. con *B. mediterranea*, a) plantas sanas de 3 años antes de la inoculación, tutoradas y etiquetadas al azar en umbráculo, b) plantas inoculadas y asintomáticas tras 5 meses de incubación en umbráculo, trasladadas a invernadero para someterlas a estrés hídrico.

(Cádiz), ambos conservados en la colección del Departamento de Agronomía de la UCO. Como inóculo se emplearon cilindros de agar (PDA con 5 g/l de extracto de levadura (PDYA), JIMÉNEZ *et al.*, 2004) de 5 mm de diámetro y 3 mm de espesor, conteniendo micelio en crecimiento activo. Para las inoculaciones con herida, se realizaron heridas superficiales en el punto medio de la rama con un sacabocados estéril, retirando la corteza externa y colocando el inóculo en contacto con la corteza interna (Figura 1a), según la metodología utilizada por SÁNCHEZ *et al.* (2003) para la inoculación de ramas de encina con *Botryosphaeria* spp. En las inoculaciones sin herida, se colocó directamente el disco de agar con micelio en contacto con la corteza, previamente desinfectada con un algodón impregnado en alcohol, en el punto medio de la rama, y posteriormente se selló con Parafilm. En ambos casos, a las ramas testigo se les aplicó una pieza de agar estéril. Las ramas inoculadas y testigo se colocaron en cámaras húmedas. Las cámaras consistieron en bandejas de 27 x 27 x 12,5 cm con el fondo cubierto de agua, en las que se colocaron rejillas de plástico sobre las que se situaron las ramas. Las bandejas se cerraron y se incubaron en cámaras de crecimiento a 15, 20, 25 y 30° C con 12 h de fotoperiodo durante 1 mes.

Para las inoculaciones con ascosporas se utilizaron los mismos estromas de los que procedían los aislados monoascospóricos empleados en las inoculaciones con micelio: HYP-8, ascosporas producidas en estromas carbonosos presentes en encinas de Villanueva de Córdoba, y HYP-22, ascosporas producidas en estromas de alcornoque de Los Barrios, Cádiz. Los estromas se humedecieron y se pegaron a la tapa de varias placas de Petri vacías, incubándolas durante 12 h a 22° C para provocar la descarga de ascosporas. Posteriormente, se tomaron 5 ml de agua desionizada estéril y se lavó un número de placas suficiente para obtener una concentración de $1,5 \times 10^6$ ascosporas/ml. Con un escalpelo estéril se hizo un corte superficial longitudinal en forma de lengüeta de unos 2 cm de longitud, en el punto medio de la rama a inocular. En la herida se aplicaron 50 ml de la suspensión de ascosporas o de agua estéril en el caso de las ramas testigo (Figura 1b). Todas las ramas se colocaron en cámara húmeda y se incubaron en cámara de crecimiento a 20° C durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se sellaron las heridas con Parafilm y se incubaron las ramas a distintas temperaturas, siguiendo el mismo procedimiento empleado en las inoculaciones con micelio.

En este ensayo se prepararon seis repeticiones (ramas) por cada aislado inoculado, huésped, método de inoculación y temperatura, así como los correspondientes testigos sin inocular, inoculando así un total de 432 ramas.

Para la evaluación de síntomas y signos se estimó el porcentaje de superficie de la rama cubierta de estroma según la siguiente escala: 0 = ausencia total de estroma, 1 = 1-33% de superficie cubierta de estroma, 2 = 34-66%, y 3 = 67-100%. También se consignó el número de ramas en las que hubo producción de conidias en grietas de la corteza, y tras retirar la corteza externa con un escalpelo, se midió la longitud de las necrosis corticales, en el sentido basal y apical a partir del punto de inoculación. Para el reaislamiento de la especie inoculada, se tomaron muestras de tejido cortical cada 2,5 cm y se sembraron en PDYA, empleando la metodología utilizada por SÁNCHEZ *et al.* (2003).

Con los datos correspondientes a la superficie cubierta de estroma y a la longitud de las lesiones, se realizó un análisis de la varianza utilizando el programa Statistix for Windows (ANALYTICAL SOFTWARE, 2003). Las comparaciones de medias se realizaron según el test LSD protegido de Fisher, al nivel de probabilidad del 5% (STEEL y TORRIE, 1985). También se hicieron contrastes polinómicos de la longitud de la lesión en función de la temperatura de incubación.

Experimento 2: Inoculaciones en plantas vivas

Los plantones de alcornoque, encina y coscoja utilizados en este experimento se obtuvieron del vivero San Jerónimo (Sevilla) de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. Eran plantas procedentes de semilla, de 3 años de edad y de una altura de 1 a 1,8 m. Estas plantas se colocaron en umbráculo, se tutoraron y se inocularon en abril de 2003, utilizando la misma metodología de inoculación, el mismo tipo de inóculo (micelio de aislados monoascospóricos y ascosporas procedentes de los mismos estromas) y los mismos aislados (HYP-8 y HYP-22) empleados en la inoculación de

ramas cortadas. Para la inoculación con ascosporas se relizaron cortes en forma de lengüeta en el punto medio del tallo y allí se depositó un volumen de 50 ml de suspensión de ascosporas o de agua estéril en el caso de las plantas testigo, sellando inmediatamente las heridas con Parafilm (SÁNCHEZ *et al.*, 2002) (Figura 1c).

En este experimento se realizaron cinco repeticiones por aislado, huésped y método de inoculación, con sus correspondientes testigos, siendo la unidad experimental la planta inoculada. De este modo, se inocularon un total de 135 plantas.

Las plantas se colocaron en umbráculo al azar (Figura 2a) y se mantuvieron allí durante 5 meses, hasta finales de septiembre de 2003. Durante este período, se regaron cada 48 h, y se fueron realizando observaciones periódicas de los síntomas. Transcurrido este tiempo, se trasladaron a invernadero, y se sometieron a estrés hídrico (Figura 2b). El estrés fue gradual, incrementándose progresivamente durante 10 semanas. En primer lugar se suprimió el riego hasta que las plantas mostraron síntomas de sequía: amarillez y marchitez foliar. Esto sucedió a los 10 días, y entonces se regaron con 50 ml de agua por planta, utilizando esta dosis cada vez que se regó. Tras cada riego, se incrementó en 1 semana el periodo de sequía. De este modo, se regó a la semana siguiente, 2 semanas más tarde y 3 semanas más tarde. Por último, 4 semanas después del último riego, se levantó el experimento. Así, el experimento transcurrió a lo largo de 8 meses, de los cuales los 3 últimos las plantas estuvieron sometidas a estrés hídrico. Una vez concluido el experimento se cortaron las plantas a la altura del cuello de la raíz y se eliminaron las ramillas laterales. Con un escalpelo estéril se retiró la corteza externa y se midió la longitud de las necrosis presentes en la corteza interna. Posteriormente, mediante incisiones más profundas en el tejido leñoso, se midió la longitud de la tinción de vasos en el sentido basal y apical a partir del punto de inoculación. Para el reaislamiento de la especie inoculada, se tomaron cuñas de corteza de todos

los tallos a 2 cm del punto de inoculación y posteriormente cada 10 cm, en las direcciones distal y proximal, y se sembraron en medio PDYA.

Con los datos de longitud de las lesiones y longitud de la tinción de vasos, se realizaron análisis de la varianza utilizando el programa Statistix for Windows (ANALYTICAL SOFTWARE, 2003). Las comparaciones de medias se realizaron según el test LSD protegido de Fisher, al nivel de probabilidad del 5% (STEEL y TORRIE, 1985). En los casos en los que la varianza interna era muy elevada, se hizo una transformación logarítmica de los datos antes del análisis estadístico.

Una vez finalizada la evaluación, se cortó cada tallo en segmentos de 20 cm de longitud, y se incubaron durante 1 mes a 30° C en cámaras húmedas, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el ensayo de patogenicidad en rama cortada.

RESULTADOS

Aislamiento a partir de leñas de encina

A partir del tejido cortical de leñas de encina asintomáticas se obtuvo el anamorfo de *B. mediterranea* (*Periconiella* sp.) en siete de las 40 ramas muestreadas (17,5%). También se aislaron otros hongos de los géneros *Diplodia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichotecium* y *Penicillium*.

Ensayos de patogenicidad

Experimento 1: Inoculaciones en ramas cortadas

La sintomatología observada en las ramas inoculadas fue la producción de estroma en forma de nódulos negros que rompieron la corteza y salieron al exterior (Figura 3a), la producción de conidias bajo la corteza (Figura 3b) y la necrosis del tejido cortical (Figura 3c). El tejido cortical necrótico sólo fue visible tras retirar la corteza externa, presentando una coloración de marrón oscura a negra, tomando en ocasiones tonos grises. La presencia de estos síntomas se correspondió con el aislamiento consistente del anamorfo de *B. mediterranea* a partir del

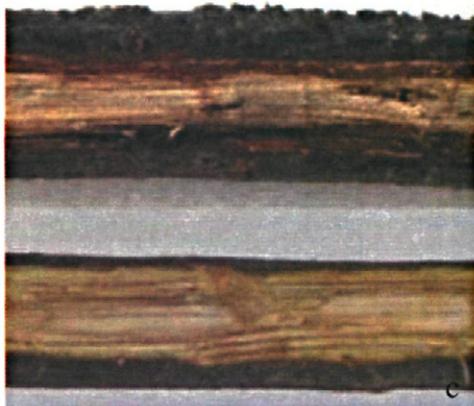
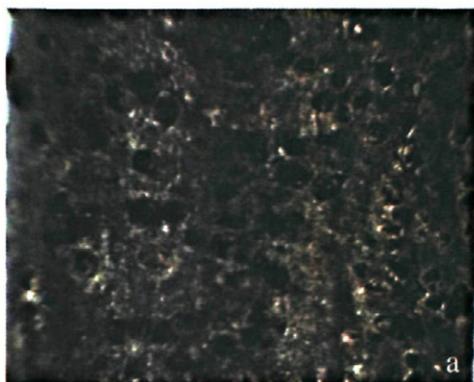


Figura 3. Sintomatología en ramas cortadas de *Quercus* spp. inoculadas con *B. mediterranea*, a) estroma en forma de nódulos negros, b) producción de conidias en las grietas de la corteza, c) lesiones necróticas en la corteza interna de una rama inoculada. Abajo, ausencia de síntomas en una rama testigo.

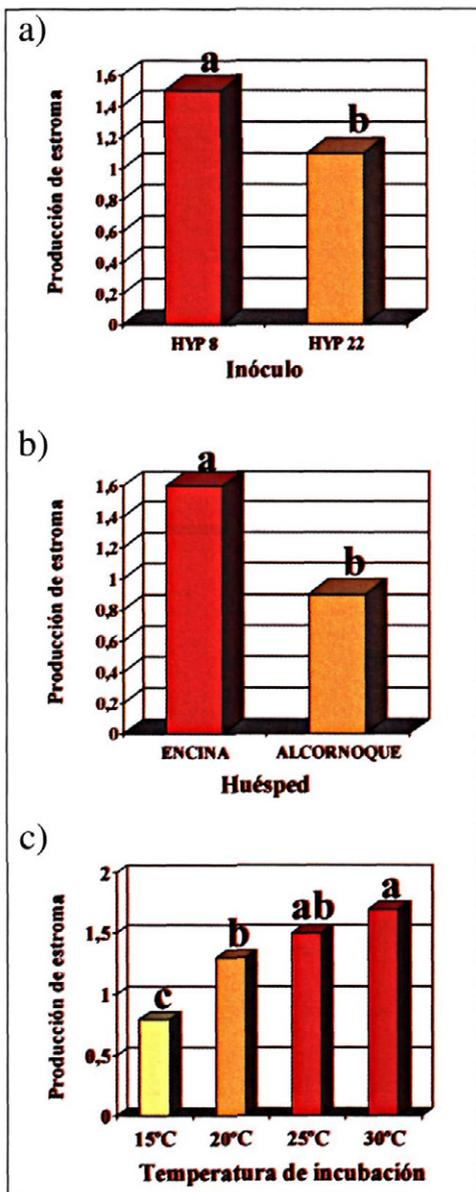


Figura 4. Inoculación de ramas cortadas de *Quercus* spp. con *B. mediterranea*, a) formación de estroma en función del inóculo, b) formación de estroma en función del huésped, c) formación de estroma en función de la temperatura de incubación.

La formación de estroma se evaluó según la escala 0 = ausencia de estroma, 1 = 1-33% de superficie cubierta de estroma, 2 = 34-66%, y 3 = 67-100%. Para cada gráfico, las columnas con una letra común no difieren significativamente ($P = 0,05$), según el test de Fisher (Steel y Torrie, 1985).

tejido cortical. Las ramas testigo no presentaron estos síntomas ni se recuperó el hongo a partir de ellas, por lo que no se incluyeron en los análisis estadísticos.

Los análisis de la varianza no mostraron diferencias significativas en la superficie cubierta de estroma en función del método de inoculación (micelio con o sin herida y ascosporas), pero sí las hubo en función del inóculo, de la especie de planta y de la temperatura de incubación. Así, el inóculo HYP-8 (tanto el aislado monoascospórico como las ascosporas) dio lugar a una producción de estroma significativamente más alta que el HYP-22 (aislado monoascospórico y ascosporas) (Figura 4a), mientras que se produjo significativamente más estroma en ramas de encina que en las de alcornoque (Figura 4b). También hay un incremento significativo en la producción de estroma con el aumento de la temperatura (Figura 4c).

No se produjo esporulación del anamorfo a 15° C, pero sí se observó esporulación a 20° C en las ramas de los dos huéspedes inoculadas con micelio del aislado HYP 8 con y sin herida, y en ramas de alcornoque inoculadas con el aislado HYP 22 mediante micelio con herida. Se registró un incremento de la esporulación a 25 y 30° C, temperaturas en las que esporularon todas las ramas excepto las testigo.

En cuanto a las lesiones corticales, los contrastes polinómicos mostraron que hay un incremento lineal y cuadrático de la longitud de la lesión con el aumento de la temperatura (Figura 5a). El análisis global de la varianza mostró que no hay diferencias significativas en la longitud de las lesiones en función del método de inoculación, del inóculo ni del huésped. El análisis de la varianza individualizado por temperaturas de incubación mostró que solamente a 15° C el inóculo HYP-8 produce lesiones significativamente mayores que el inóculo HYP-22 (Figura 5b), y que en ramas de encina se producen unas lesiones significativamente mayores que en alcornoque (Figura 5c).

Experimento 2: Inoculaciones en plantas vivas

Durante los 5 meses que las plantas testigo e inoculadas estuvieron libres de estrés hídrico, no se observó ningún síntoma. Una vez que se sometieron a estrés hídrico se observó amarillez y marchitez foliar hasta que se secaron las copas de todas las plantas, incluidas las testigo (Figura 6). Al término del experimento, tras levantar la corteza, se observaron necrosis corticales de distinto aspecto según el huésped y tinción de vasos. En encina y coscoja sólo aparecieron pequeñas lesiones corticales (de 0,9 a 1,6 cm de longitud en encina, y de 1,2 a 3,4 cm de longitud en coscoja) en las plantas inoculadas con micelio de HYP-8 con herida, y variaron de marrón oscuro a gris oscuro o negro (Figura 7a). En los alcornoques, sin embargo, aparecieron lesiones corticales de mayor tamaño (de 6 a 196 cm de longitud) y de color gris claro en todas las plantas inoculadas (Figura 7b), pero no en los testigos.

Dado que ninguna planta testigo de ninguna de las tres especies mostró lesiones corticales ni tinción de vasos, y además no se pudo reaislar *B. mediterranea* a partir del tejido cortical, sus correspondientes valores (todos 0) no se incluyeron en los análisis estadísticos.

El análisis de la varianza de la longitud de las lesiones en alcornoque no mostró diferencias significativas en función del inóculo ni del método de inoculación.

Para comparar entre sí a los distintos huéspedes se realizó un análisis de la varianza de la longitud de la lesión presente en las plantas inoculadas con el micelio HYP-8 mediante herida. La comparación de medias mostró que la longitud de las lesiones es significativamente mayor en alcornoque que en encina y coscoja, no habiendo diferencias significativas entre estos dos últimos huéspedes (Figura 8a).

La tinción de vasos consistió en la pigmentación oscura que adquirió el xilema en la cara donde estaba el punto de inoculación. Esta tinción se observó en los tres huéspedes, pero únicamente en las inoculaciones con HYP-8 con herida (micelio y ascosporas) y en las inoculaciones con ascosporas de

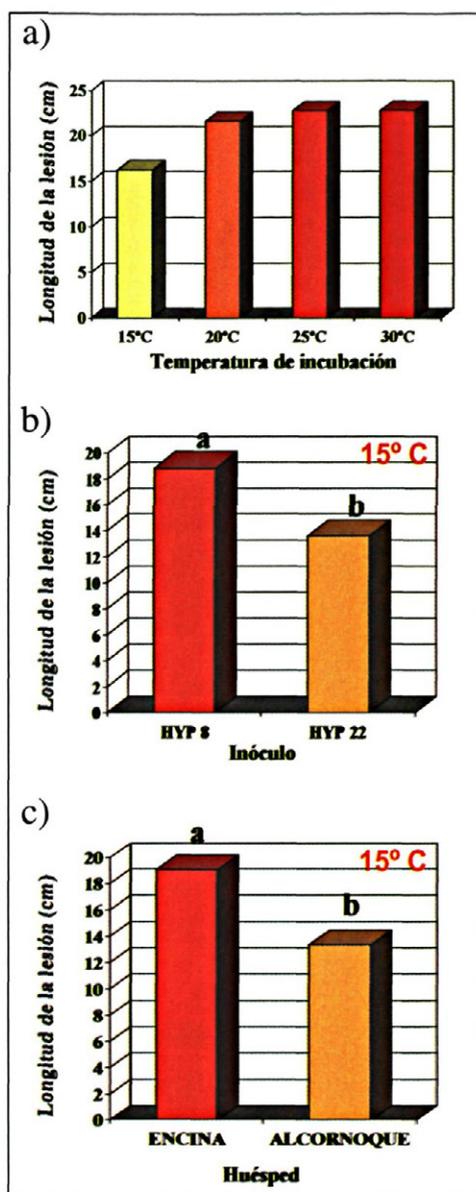


Figura 5. Inoculación de ramas cortadas de *Quercus* spp. con *B. mediterranea*.

- a) longitud de las lesiones en función de la temperatura de incubación,
- b) longitud de las lesiones en función del inóculo para las ramas incubadas a 15° C,
- c) longitud de las lesiones en función del huésped para ramas incubadas a 15° C.

Para cada gráfico, las columnas con una letra común no difieren significativamente ($P = 0,05$), según el test de Fisher (Steel y Torrie, 1985).



Figura 6. Plantas de *Quercus* spp. inoculadas con *B. mediterranea* tras 3 meses de estrés hídrico. Obsérvese la marchitez foliar generalizada.

HYP-22. El análisis de la varianza y la comparación de medias para las plantas inoculadas con HYP-8 (Figura 8b) mostró que para

los tres huéspedes las inoculaciones con micelio producen una tinción de vasos significativamente mayor que con ascosporas. El



Figura 7. Lesiones necróticas en plantas de *Quercus* spp. inoculadas con el micelio HYP-8 de *B. mediterranea* mediante herida, a) pequeña lesión oscura en escina. Abajo, el mismo tallo una vez retirada la corteza externa, b) lesión grisácea extensa en alcoraque. Se ha retirado la corteza externa alrededor del punto de inoculación para apreciar mejor la necrosis del tejido cortical.

análisis de los datos correspondientes a las plantas inoculadas con ascosporas mostró que las de HYP-22 produjeron una tinción de vasos significativamente mayor que las ascosporas de HYP-8 (Figura 8c).

El reaislamiento de *B. mediterranea* a partir del tejido cortical de las plantas inoculadas, fue positivo para los tres huéspedes únicamente en las inoculaciones mediante micelio de HYP-8 con herida y en las plantas inoculadas con ascosporas de los dos orígenes, en clara correspondencia con la aparición de las tinciones de vasos en estas plantas. También se reaisló *B. mediterranea*, en un solo caso, de una planta de coscoja inoculada con micelio de HYP-8 sin herida.

Cuando, tras evaluar los síntomas, se cortaron los tallos y se incubaron en cámara húmeda a 30° C, apareció el estroma y la esporulación del anamorfo de *B. mediterranea* en todos los tallos, incluso en aquellos en los que no fue posible su aislamiento de la corteza, con la única excepción de las plantas testigo.

DISCUSIÓN

El aislamiento de *B. mediterranea* de ramas de encina asintomáticas indica la existencia de una colonización endofítica del huésped. Los porcentajes de aislamiento son similares a los obtenidos por otros autores al realizar aislamientos de tejidos asintomáticos (BIOCCA y MOTTA, 1995; VANNINI *et al.*, 1996c; 1999; MAZZAGLIA *et al.*, 2001; RAGAZZI *et al.*, 2001). Por lo tanto, la ausencia de estroma no indica necesariamente la ausencia del hongo, ya que se ha descrito como endofito en especies del género *Quercus*, pudiendo estar presente en esta fase no patogénica en toda el área de distribución de sus huéspedes. Ya se ha observado que es frecuente que en las áreas de distribución natural de cada huésped haya un determinado número de especies endofíticas específicas (FISHER *et al.*, 1994; CARROLL, 1995), y en especial de aquellas con mayor presencia en el huésped, como es el caso de *B. mediterranea* en varias especies de *Quercus* (BIOC-

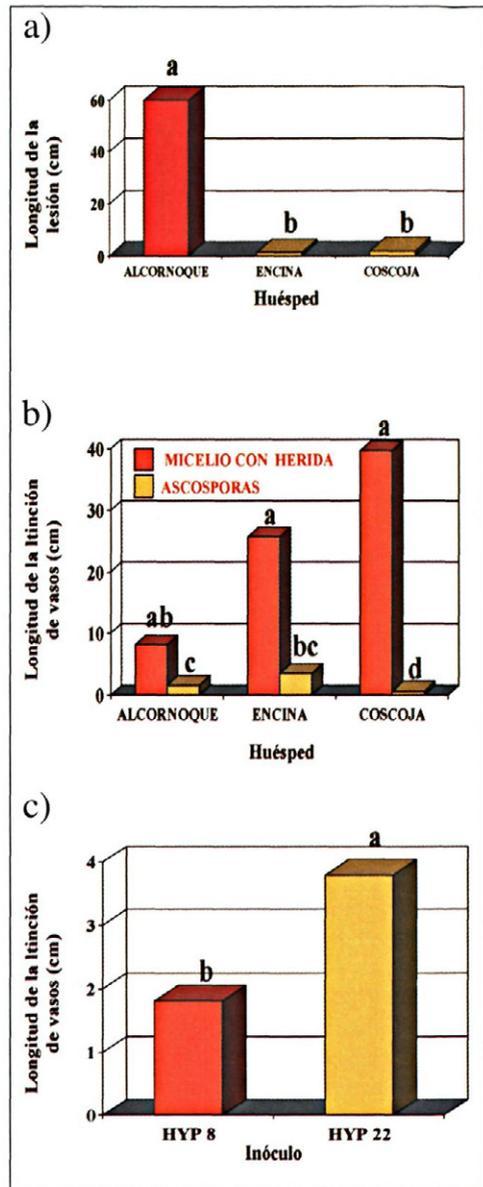


Figura 8. Inoculación de plantas de *Quercus* spp. con *B. mediterranea*, a) longitud de las lesiones en función del huésped en plantas inoculadas con micelio HYP-8 mediante herida, b) longitud de la tinción de vasos en función del huésped en las plantas inoculadas con HYP-8, c) longitud de la tinción de vasos en función del inóculo en las plantas inoculadas con ascosporas. Para cada gráfico, las columnas con una letra común no difieren significativamente ($P = 0,05$), según el test de Fisher (Steel y Torrie, 1985).

CA y MOTTA, 1995; COLLADO *et al.*, 1996; 2001; MAZZAGLIA *et al.*, 2001; RAGAZZI *et al.*, 2001).

En términos generales, los ensayos de patogenicidad sobre ramas cortadas no mostraron diferencias en la formación de estroma ni en la longitud de las lesiones en función del método de inoculación empleado, lo que indica que las hifas de *B. mediterranea* son tan infectivas en ramas cortadas como las ascosporas, y que resultan capaces de atravesar la corteza de encina y de alcornoque con escasa capacidad de defensa, originando la misma severidad de síntomas que cuando infectan a través de heridas. Sin embargo, la capacidad de producción de estroma sí fue distinta entre aislados y en función del huésped, registrándose mayor producción en ramas de encina que en alcornoque. Tampoco se observaron diferencias en la longitud de las necrosis producida por los distintos aislados de *B. mediterranea* inoculados a temperaturas superiores a 15° C, condiciones que resultan más favorables para el desarrollo de los síntomas. También en las inoculaciones de plantones, *B. mediterranea* fue capaz de infectar a todas las plantas en todos los casos, como demostró la aparición del estroma fúngico tras la incubación de las plantas ya muertas a 30° C en condiciones de elevada HR. Hay que destacar que las infecciones, en muchos casos asintomáticas, se produjeron a pesar de que las plantas no se encontraban bajo ningún tipo de estrés y con los tres tipos de inoculación. Por lo tanto, la presencia de heridas en la corteza y el estrés hídrico no parecen condiciones indispensables para que tenga lugar la infección, como sugieren VANNINI *et al.* (1999), y en contra de lo que afirman otros autores (OLIVA y MOLINAS, 1984; TORRES, 1985; 1993). Así, el hongo se mantuvo en estado latente, sin originar síntomas, durante los 5 meses (abril - septiembre de 2003) que duró la incubación en umbráculo, a pesar del hecho de que el grado de colonización del huésped aumenta en el transcurso del verano (BIOCCA y MOTTA, 1995; COLLADO *et al.*, 1999; MAZZAGLIA *et al.*, 2001).

Posteriormente, cuando las plantas se sometieron a estrés hídrico, los síntomas observados (amarillez y marchitez) afectaron a todas las plantas por igual, inoculadas y testigos, por lo que no cabe atribuir estos síntomas a la acción del hongo inoculado. Sin embargo, al levantar la corteza externa de algunas plantas inoculadas, se observaron lesiones necróticas en la corteza interna, al igual que observaron VANNINI y MUGNOZZA (1991) en *Q. cerris* sometidos a estrés hídrico y JACOBS *et al.* (1993) en plantas de *Q. suber*, con o sin estrés hídrico, aunque la longitud de las lesiones es mayor en las plantas sometidas a estrés. Otro síntoma observado en algunas de las plantas inoculadas fue la tinción de vasos, que ya habían descrito otros autores en plantas inoculadas con *B. mediterranea*, como LUISI *et al.* (1995) en *Q. cerris*, *Q. pubescens* y *Q. trojana* sometidos a estrés hídrico, y LUQUE *et al.* (2000) en *Q. suber*, con y sin estrés hídrico, aunque la tinción de vasos también resultó mayor en plantas sometidas a estrés. Este síntoma se observó únicamente en plantas vivas inoculadas, pero nunca en ramas cortadas, por lo que parece constituir una respuesta de la planta a la presencia del hongo colonizando sus tejidos. Este hecho podría explicar que las inoculaciones con micelio produjeran tinciones significativamente más extensas que las inoculaciones con ascosporas y que el aislado que se mostró menos agresivo tanto en ramas cortadas como en plantas vivas (HYP-22) fuera el que indujo en estas últimas una mayor tinción de vasos. La tinción de vasos estuvo además claramente relacionada con el reaislamiento de *B. mediterranea* a partir del tejido cortical, esto es, con la colonización de los tejidos del huésped. La recuperación del hongo tuvo lugar a lo largo de todo el tallo y no únicamente en las zonas donde aparecían las tinciones, lo que sugiere que *B. mediterranea* es capaz de colonizar de forma asintomática zonas de corteza mucho más extensas que las que alcanzan las tinciones.

El alcornoque fue la especie más susceptible, al presentar lesiones en la corteza en

todas las plantas inoculadas con *B. mediterranea*, independientemente del método y del inóculo empleado. Sin embargo, la presencia de estas lesiones corticales no dieron lugar a anillamiento y no se tradujeron en un peor estado vegetativo, ya que los alcornoques inoculados no manifestaron una sintomatología foliar más severa que la de sus testigos ni que la de los otros huéspedes, inoculados o no. El pequeño tamaño de las lesiones corticales en las plantas inoculadas y fuertemente estresadas de encina y coscoja, muestra que *B. mediterranea* tiene una capacidad patogénica muy limitada en estas especies, no llegando a producir anillamiento y muerte de los tallos infectados, aún en las condiciones extremas de estrés hídrico a las que se sometieron las plantas. Además, en más del 80% de las plantas de encina y coscoja inoculadas, no apareció ningún tipo de síntoma atribuible a *B. mediterranea*, a pesar de las fuertes condiciones de estrés que indujeron la completa marchitez de las copas.

Nuestros resultados indican que este hongo es capaz de vivir durante largos períodos como endófito en varias especies de *Quercus*, como muestran los experimentos de patogenicidad y como también hemos podido comprobar al aislarlo de leñas de encina asintomáticas. La presencia endofítica del hongo puede aumentar en huéspedes en condiciones de estrés (COLLADO *et al.*, 2001; MAZZAGLIA *et al.*, 2001), pero solamente produce necrosis y producción de estroma en la corteza de tallos que previamente han muerto por otras causas (SANTOS *et al.*, 1999). Esta hipótesis concuerda con los ensayos realizados por MASON *et al.* (1991) para *B. atropunctata*, en los que demuestra que los cambios en la viabilidad de los tejidos del huésped son los responsables de los cambios producidos en su susceptibilidad frente a la colonización fúngica.

Según JU *et al.* (1998) las especies del género *Biscogniauxia* invaden los tejidos de los huéspedes sometidos a estrés, y fructifican cuando el huésped está gravemente debilitado o muerto. También afirman que

aunque las especies del género *Biscogniauxia* persisten en material muerto que ha caído al suelo, no son capaces de invadirlo, ya que no pueden competir con basidiomicetos de podredumbre (JU *et al.*, 1998). De este modo, tras la infección, *B. mediterranea* se mantiene como endófito en la planta, y cuando muere ésta o parte de sus tejidos, los coloniza rápidamente, tomando ventaja a los hongos de podredumbre. Esta hipótesis difiere de la de otros autores (OLIVA y MOLINAS, 1984; TORRES, 1985; 1993; VANNINI y MUGNOZZA, 1991; MONTOYA, 1992; VANNINI *et al.*, 1992, 1996a, 1996b, 1996c; AMORINI *et al.*, 1995; LUISI *et al.*, 1995; BIOCCHA *et al.*, 1996; MAZZAGLIA *et al.*, 2001) que asumen la patogenicidad de *B. mediterranea* en condiciones de estrés. Puesto que existen diferencias en la patogenicidad del hongo en función del huésped, aunque *B. mediterranea* puede causar lesiones importantes en *Q. cerris* sometidos a estrés hídrico (VANNINI y MUGNOZZA, 1991; VANNINI *et al.*, 1992, 1996a, 1996b, 1996c, LUISI *et al.*, 1995) esto no parece suceder con las especies de *Quercus* objeto de este trabajo, al menos con una gravedad tal que produzca síntomas severos y muerte de las plantas estresadas.

La incubación de segmentos de tallo o ramas asintomáticas en condiciones de elevada HR a 30° C puede resultar un buen método de detección de infecciones endofíticas de *B. mediterranea* en condiciones de campo, ya que fue capaz de detectar la presencia del hongo en tallos en los que no había sido posible su aislamiento por métodos convencionales de siembra de cuñas de corteza en medios de agar.

En cuanto al papel del chancro carbonoso como factor contribuyente del decaimiento o Seca de los *Quercus* (MONTOYA, 1992; NAVARRO y FERNÁNDEZ, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2000), el comportamiento como patógeno de debilidad que ha mostrado *B. mediterranea*, indica que en el proceso de debilitamiento por sequía o infecciones radicales que sufren la encina y el alcornoque en la Península Ibérica, el hongo encuentra una situación muy favorable para pasar de la fase endofítica a la

patogénica, sobre todo en alcornoque, y causar necrosis corticales. No obstante, la producción del estroma carbonoso con posterioridad a la muerte de la rama o la corteza del tronco, puede dar lugar a que, en muchos casos, se esté sobrevalorando la importancia de este agente como causa primaria de muerte en procesos de decaimiento, actuando más bien como saprófito en ramas muertas por otros agentes bióticos o abióticos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Investigación AGL2002-00530 y por el Convenio suscrito entre la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y la Universidad de Córdoba para el estudio de la Seca de *Quercus* en Andalucía. M.E. Sánchez disfruta de un contrato del Programa "Ramón y Cajal" del MEC.

ABSTRACT

JIMÉNEZ J. J., M. E. SÁNCHEZ, A. TRAPERO. 2005. Charcoal Canker of *Quercus* II: Pathogenicity and dispersion of the causal agent. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**: 563-575.

The Charcoal Canker is caused by the ascomycete *Biscogniauxia mediterranea* (sin. *Hypoxylon mediterraneum*). Since it is a well known disease affecting cork oak in Iberia, its incidence has increased in the last years associated to *Quercus* decline in southern Spain. Artificial inoculations on detached branches of *Q. ilex* and *Q. suber* demonstrated that high temperatures favour cortical necrosis and charcoal stroma development. Inoculations conducted on healthy plants of *Q. suber*, *Q. ilex* and *Q. coccifera* showed that the fungus colonizes the plants as endophyte, but cortical necrosis only appeared when the plants suffer severe water stress. In addition, cork oak has been the most susceptible host species. This behaviour as weak pathogen of *B. mediterranea* on *Quercus* spp. suggests that Charcoal Disease may be over valued as primary agent of death on *Quercus* decline in southern Spain.

Key words: Charcoal disease, decline, endophyte, *Hypoxylon mediterraneum*, *Quercus coccifera*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*, water stress.

REFERENCIAS

- ANALYTICAL SOFTWARE. 2003. Statistix 8. PO Box, Tallahassee.
- AMORINI, E., BELISARIO, A., BIOCICA, M., MANETTI, M.C., MOTTA, E. 1995. Sei anni di osservazioni sul deperimento di un ceduo a prevalenza di cerro nell'Italia centrale. *Monti e Boschi*, **46**: 42-50.
- BAETA NEVES, C.M. 1948. A investigação científica e os problemas da protecção 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.
- BAKRY, M., ABOUROUH, M. 1995. Cork oak decline in Morocco: the state of knowledge and prospects. *Bulletin OILB SROP*, **18**: 50-55.
- BIOCICA, M., MOTTA, E. 1995. Aspects of latency of *Hypoxylon mediterraneum* in declining Turkey oaks (*Quercus cerris*). *Petria*, **5**: 171-176.
- BIOCICA, M., MOTTA, E., FORTI, E. 1996. *Hypoxylon mediterraneum* su platano (*Platanus acerifolia*) in Italia centrale. *Informatore Fitopatologico*, **46**: 13-14.
- CARROLL, G. 1995. Forest endophytes: pattern and process. *Can. J. Bot.*, **73**: 1316-1324.
- COLLADO, J., PLATAS, G., PELÁEZ, F. 1996. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from central Spain. *Nova Hedwigia*, **63**: 347-360.
- 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.
- FISHER, P.J., PETRINI, O., PETRINI, L. E., SUTTON, B.C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytol.*, **127**: 133-137.
- JACOBS, K.A., COLINAS, C., ÁLVAREZ, I.F. 1993. Pathogenicity of 3 decline fungi on water-stressed cork oak. *Phytopathology*, **83**: 1352.

- 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.
- LUISE, N., MANICONE, R.P., TROMBETTA, N.M., CUSANO, G. 1995. Predisposizione di querce mediterranee al deperimento in relazione alla loro resistenza alla siccità. *Italia Forestale e Montana*, **50**: 44-59.
- LUQUE, J., PARLADÉ, J., PERA, J. 2000. Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *For. Path.*, **30**: 247-263.
- MASON, J.D., CHAUDOIR, L.C., FENN, P. 1991. Relationship of tissue water potential and viability to growth of *Hypoxylon atropunctatum* in oak stems. *Phytopathology*, **81**: 1207.
- MAZZAGLIA, A., LIBRANDI, I., VANNINI, A., ANSELMINI, N. 2001. Endophytic incidence of *Biscogniauxia mediterranea* in asymptomatic oak trees. Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Andalus Academic Publishing, Redondo (Portugal). pp. 291-293.
- MONTROYA, J.M. 1992. Mortandad de quercíneas: la perspectiva selvícola y los antecedentes climáticos. La cuestión de *Hypoxylon mediterraneum* en el almorcocal de Mamora (Marruecos). *Ecología*, **6**: 123-130.
- NATERCIA, M., SANTOS, S. 1995. Phytopathological situation of cork oak (*Quercus suber* L.) in Portugal. *Bulletin OILB SROP*, **18**: 38-42.
- NAVARRO, R.M., FERNÁNDEZ, P. 2000. El síndrome de la seca del encinar. Propuesta de solución para el Valle de los Pedroches. Fundación Ricardo Delgado Vizcaíno, Pozoblanco, Córdoba.
- OLIVA, M., MOLINAS, M.L.L. 1984. Incidencia de *Hypoxylon mediterraneum* en los almorcocales gerundenses. *Boletín de la Estación Central de Ecología*, **25**: 9-16.
- RAGAZZI, A., MORICCA, S., CAPRETTI, P., DELLAVALLE, I., MANCINI, F., TURCO, E. 2001. Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. *Phytopathol. Mediter.*, **40**: 165-171.
- SÁNCHEZ, M.E., NAVARRO, R.M., TRAPERO, A., FERNÁNDEZ, P. 2000. La seca de encinas y alcornoques. Una visión histórica. *Montes*, **62**: 29-39.
- SÁNCHEZ, M.E., GUTIÉRREZ, J., TRAPERO, A. 2002. *Botryosphaeria* canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathol.*, **51**: 364-372.
- SÁNCHEZ, M.E., VENEGAS, J., ROMERO, M.A., PHILLIPS, A.J.L., TRAPERO, A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Dis.*, **87**: 1515-1521.
- SANTOS, M.N.S., LIEUTIER, F., MATTSON, W.J., WAGNER, M.R. 1999. Cork oak-*Hypoxylon mediterraneum* de Not: pathogenicity tests. *Les Colloques*, **90**: 279-283.
- SINCLAIR, W.A., LYON, H.H., JOHNSON, W.T. 1987. Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- STEEL, G.D., TORRIE, J.H. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. Mc Graw-Hill, Bogotá.
- TORRES, J. 1985. El *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill. y su comportamiento en los encinares y almorcocales andaluzes. *Boletín del Servicio de Plagas*, **11**: 185-191.
- TORRES, J. 1993. Patología Forestal. Mundi-Prensa, Madrid.
- 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., VALENTINI, R., SANTURBANO, M., TIRONE, G. 1992. Possible relationship among embolism, water potential, and susceptibility to *Hypoxylon mediterraneum* of some Mediterranean oaks. In: Recent advances in studies on oak decline. Luisi, N., Lerario, P., y Vannini, A. (eds.). Tipolitografía Radio, Putignano (Bari). pp. 449-455.
- VANNINI, A., VALENTINI, R. 1994. Influence of water relations on *Quercus cerris*-*Hypoxylon mediterraneum* interaction: a model of drought induced susceptibility to a weakness parasite. *Tree Physiol.*, **14**: 129-139.
- VANNINI, A., BIOCCA, M., PAPANATTI, B. 1996a. Contributo alla conoscenza del ciclo biologico di *Hypoxylon mediterraneum* su *Quercus cerris*. *Informatore Fitopatologico*, **9**: 53-55.
- VANNINI, A., PAGANINI, R., ANSELMINI, N. 1996b. Factors affecting discharge and germination of ascospores of *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill. *Eur. J. For. Path.*, **26**: 12-24.
- VANNINI, A., VALENTINI, R., LUISI, N. 1996c. Impact of drought and *Hypoxylon mediterraneum* on oak decline in the Mediterranean region. *Ann. Sci. For.*, **53**: 753-760.
- VANNINI, A., MAZZAGLIA, A., ANSELMINI, N. 1999. Use of random amplified polymorphic DNA (RADP) for detection of genetic variation and heterothallic mating system in *Hypoxylon mediterraneum*. *Eur. J. For. Path.*, **29**: 209-218.
- VIEIRA NATIVIDADE, J. 1950. Subericultura. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, DGF, Lisboa.

(Recepción: 30 junio 2005)

(Aceptación: 17 noviembre 2005)