

La podredumbre radical del pinsapo II: Diseminación de *H. abietinum* en bosques de *Abies pinsapo*

P. DE VITA, J. J. JIMÉNEZ, A. TRAPERO, P. CAPRETTI, M. E. SÁNCHEZ

Se ha determinado el número de genotipos fúngicos (genets) presentes en dos parcelas de pinsapar afectadas por la podredumbre radical causada por *Heterobasidion abietinum* en el Parque Natural de la Sierra de las Nieves. El mayor genet identificado se encontró colonizando 10 árboles a lo largo de una distancia de 57 m. El gran tamaño de los principales genets implica que *H. abietinum* se está diseminando preferentemente mediante contactos o injertos radicales a partir de viejos focos de infección establecidos antes de la creación del Parque Natural en 1989. Los veranos excepcionalmente largos y secos que se registran en la zona desde hace dos décadas pueden haber debilitado al pinsapar y favorecido la diseminación de la enfermedad.

P. DE VITA, P. CAPRETTI. Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sez. Patologia Vegetale, Università degli Studi di Firenze, Italia;

J. J. JIMÉNEZ, A. TRAPERO, M. E. SÁNCHEZ. Departamento de Agronomía, Patología Agroforestal, Universidad de Córdoba, España. Dirección de correo electrónico: aglsahem@uco.es.

Palabras clave: ecosistemas naturales, especie protegida, *Heterobasidion annosum*.

INTRODUCCIÓN

Abies pinsapo Boiss. constituye una singularidad botánica de elevado valor ecológico (ARISTA *et al.*, 1997) que crece únicamente en los Parques Naturales protegidos de la Sierra de Grazalema en Cádiz y en la Sierra de las Nieves y Sierra Bermeja en Málaga. En 2002 se detectó una enfermedad radical del pinsapo que da lugar a la muerte en pie o bien a su caída en verde como consecuencia de la podredumbre y destrucción de las raíces de anclaje. La podredumbre radical, causada por el grupo de intersterilidad F de *Heterobasidion annosum* (*H. abietinum*) (SÁNCHEZ *et al.*, 2005), se distribuye en forma de focos, con un número variable de árboles muertos en el centro, rodeados de árboles infectados con distinto grado de severidad de síntomas aéreos. En 2002 se

localizaron 72 de estos focos en la Sierra de las Nieves (NAVARRO *et al.*, 2003) y desde entonces la incidencia de la enfermedad ha ido aumentando progresivamente a lo largo del tiempo.

Heterobasidion annosum sensu lato se disemina fundamentalmente a través de basidiosporas que son transportadas por el aire desde los carpóforos en los que se originan. Cuando estas basidiosporas germinan en la superficie de tocones recién cortados inician el proceso de infección y el micelio resultante coloniza las raíces del tocón. La posterior infección de los árboles colindantes tiene lugar a través de contactos o injertos radicales entre las raíces infectadas del tocón y las raíces sanas (STENLID y REDFERN, 1998). En los tocones infectados, *H. annosum* *sl* puede permanecer activo durante más de 62 años (GREIG y PRATT, 1976). Otras vías de infec-

ción, como la colonización de heridas en el tronco o raíces de árboles vivos o la transmisión del hongo mediante insectos vectores, aparecen como de mucha menor importancia (STENLID y REDFERN, 1998).

Debido a la creciente incidencia de la podredumbre radical causada por *H. abietinum* en los pinsapares de la Sierra de las Nieves, el objetivo del presente trabajo ha sido conocer la principal vía de diseminación de las infecciones. Como se trata de un Parque Natural protegido no sometido a cortas, la hipótesis de trabajo ha sido considerar que las infecciones de tocones vía basidiosporas debe tener una importancia limitada en la dispersión de la enfermedad en comparación con el crecimiento de viejos focos de enfermedad mediante la transmisión directa del patógeno de árboles enfermos a sanos a través contactos o injertos radicales, muy frecuentes en esta especie (ARISTA *et al.*, 1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

El parque Natural de la Sierra de las Nieves tiene una extensión de unas 3000 ha y registra unas precipitaciones anuales de hasta 1800 mm, con un período de sequía estival en los meses de julio y agosto en el que las precipitaciones descienden hasta 15 mm. Las precipitaciones en forma de nieve son frecuentes de enero a marzo. El pinsapar de la Sierra de las Nieves no está sometido a cortas desde su establecimiento como Parque Natural en 1989. Sólo se cortan selectivamente los pinsapos muy atacados por *Cryphalus numidicus*, plaga que causa severos daños en los pinsapares andaluces (HERRERA *et al.*, 2002). Antes de 1989, el único aprovechamiento económico de los pinsapares era la producción de árboles de Navidad, para lo cual se cortaban pies jóvenes, de aproximadamente 15 cm de diámetro normal.

Se eligieron dos parcelas en la Sierra de las Nieves en masas puras de pinsapo, en las zonas conocidas como Merendero (parcela M) y Pozo de la Nieve (parcela P) (Figura 1). La parcela M medía 50 x 50 m y contenía 60

árboles adultos. La P, con una densidad doble, incluía 120 pies adultos en una superficie de 55 x 60 m. Ambas parcelas incluían al menos un foco de enfermedad, según se estimó visualmente (Figura 1). Según los registros del Parque Natural, los pies dominantes en ambas parcelas tenían una edad de 30-50 años y la última corta selectiva de árboles muy afectados por *C. numidicus* se realizó en 1995. En esta corta los tocones generados se trataron con urea al 25% para impedir infecciones fúngicas. Sin embargo, antes del establecimiento del Parque Natural en 1989, las cortas, tanto sanitarias como para la obtención de árboles de Navidad, se realizaban sin ningún tratamiento posterior para proteger los tocones. De hecho, en las parcelas experimentales se localizaron también tocones antiguos con síntomas de podredumbre (Figura 2). Nueve de ellos se registraron en la parcela M y 19 en la P.

En ambas parcelas se numeraron y georeferenciaron todos los árboles mediante un dispositivo GPS (Garmin) y se mapearon utilizando el programa ArcView GIS 3.2 ESRI. Se tomaron muestras de madera de todos los árboles mediante una barrena de Pressler. De cada árbol se extrajeron dos cilindros de madera, en posición perpendicular uno con respecto al otro, aplicando la barrena a la base del tronco a nivel del suelo. Los cilindros, de 8-10 cm de longitud, se colocaron individualmente en tubos de plástico estériles y los agujeros practicados en el árbol se sellaron inmediatamente con Sellapro (Probelte SA), un producto cicatrizante que además incorpora fungicidas.

Una vez en el laboratorio, los cilindros se limpiaron y desinfectaron superficialmente con un trozo de algodón empapado en alcohol. Posteriormente se cortaron en pequeñas secciones transversales con un escalpelo estéril y se sembraron en el medio semiselectivo BAPS (Bactopeptona-Agar con PCNB y estreptomina; Kuhlman y Hendrix 1962), incubando las placas a 20° C. Las colonias fúngicas obtenidas se transfirieron a otras placas conteniendo medio MA (Agar-Malta) al 1,5%. Como no en todos los casos se obtuvo aislamiento de



Figura 1 (a). Vista general de las dos parcelas experimentales establecidas en masas puras de pinsapo de la Sierra de las Nieves, parcela M (Merendero).



Figura 1 (b). Vista general de las dos parcelas experimentales establecidas en masas puras de pinsapo de la Sierra de las Nieves, parcela P (Pozo de la Nieve).



Figura 2 (a). Tocones antiguos de pinsapo con síntomas de podredumbre localizados en la parcela M.



Figura 2 (b). Tocones antiguos de pinsapo con síntomas de podredumbre localizados en la parcela P.

Heterobasidion a partir de muestras tomadas de árboles sintomáticos, se realizó una segunda toma de muestras en estos árboles, extrayéndose otros dos cilindros de madera de la base del tronco mediante el mismo procedimiento. En este segundo lote de muestras, cada cilindro se desinfectó superficialmente y luego se cortó en dos piezas longitudinales. Ambas piezas se colocaron en placas de Petri de 9 cm que contenían un disco de papel filtro estéril empapado en agua también estéril, actuando así como cámara húmeda. Cuando fue necesario se eliminó el extremo más superficial del cilindro para ajustar su longitud a 9 cm. Las cámaras húmedas se incubaron a 18-20° C durante 10-15 días, momento en el que en la superficie de la madera aparecían masas blanquecinas constituidas por conidióforos de

Heterobasidion, tal y como se comprobó por observación directa al microscopio estereoscópico. Por medio de una aguja estéril se transfirieron conidios a placas con medio MA al 1,5% y se incubaron durante otros 10-15 días a la misma temperatura.

Cada uno de los aislados obtenidos se observó al microscopio (x100) por el reverso de las placas para la observación de uniones en fibrilla, características del estado heterocariótico.

Los aislados heterocarióticos obtenidos de las parcelas M y P se confrontaron entre sí de dos en dos en todas las combinaciones posibles. Para ello se cortaron discos de agar de 5 mm de diámetro del margen de colonias creciendo activamente y se sembraron en el centro de placas de Petri con el medio MA a 1 cm de distancia (Figura 3). Estas placas se

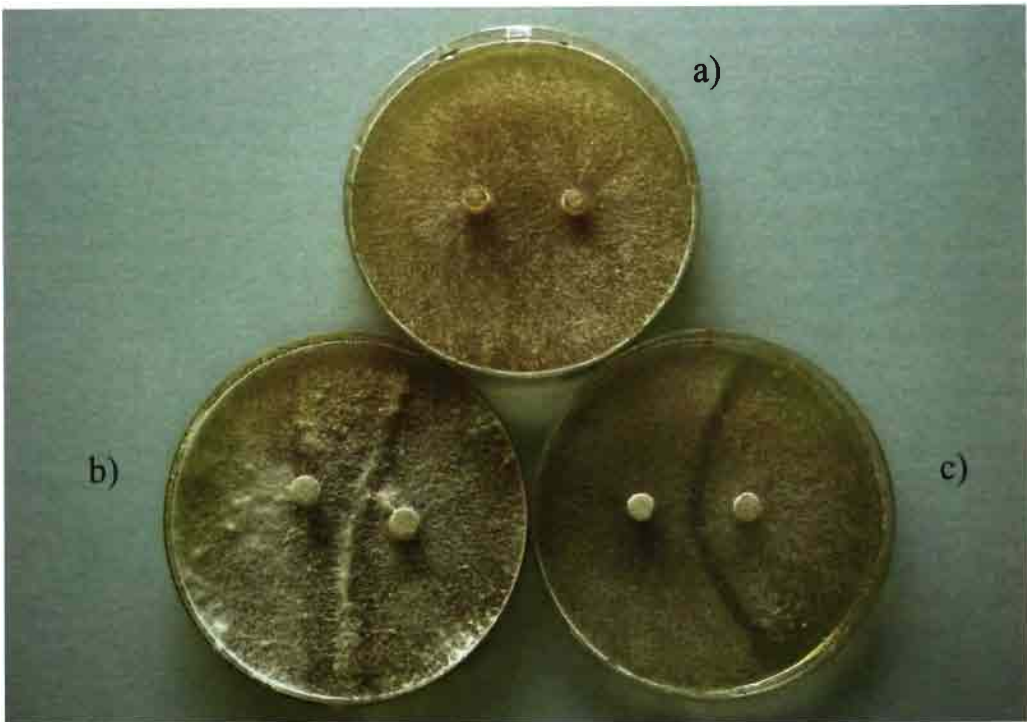


Figura 3. Reacciones de compatibilidad somática entre aislados heterocarióticos de *H. abietinum* aislados de pinsapo. a) Reacción compatible entre aislados pertenecientes al mismo genotipo fúngico (genet), b) reacción de incompatibilidad somática entre aislados pertenecientes a distinto genet caracterizada por la aparición de una barrera de micelio entre ambas colonias, c) reacción de incompatibilidad somática entre aislados pertenecientes a distinto genet caracterizada por la aparición de una zona de inhibición del crecimiento micelial entre ambas colonias.

incubaron a 18-20° C durante 6-8 semanas, examinándolas periódicamente para detectar la presencia de reacciones de incompatibilidad somática (STENLID, 1985). Cada combinación de dos de aislados se repitió tres veces, preparando tres placas distintas en distinto momento.

RESULTADOS

En todos los casos sólo se aisló un genotipo único de *H. abietinum* a partir de las muestras procedentes de un único árbol. Todos los aislados obtenidos resultaron ser heterocarióticos, tal y como se comprobó por la presencia de uniones en fíbula. La reacción de incompatibilidad somática entre distintos genotipos fúngicos (genets) consistió mayoritariamente en la aparición de una barrera de micelio blanco entre las dos colonias enfrentadas (Figura 3b), aunque ocasionalmente también se observaron zonas de inhibición del crecimiento micelial (Figura 3c).

En la parcela M se aisló *H. abietinum* en seis de los 60 árboles muestreados (10,0%). Los seis pies mostraban los síntomas secundarios de la enfermedad radical: amarillez y marchitez de acículas en árboles en pie. Uno de estos árboles estaba caído, mostrando podredumbre radical pero con las acículas aún verdes. Se identificaron tres genets distintos en los seis aislados de *H. abietinum*. Uno de ellos se encontraba colonizando cuatro árboles, con una distancia máxima entre ellos de 21,5 m. Los otros dos genets colonizaban un único árbol cada uno de ellos (Figura 4).

En la parcela P *H. abietinum* se aisló en 14 de los 120 pies muestreados (11,7 %). Doce de estos aislados se obtuvieron de árboles sintomáticos y los dos restantes de árboles aparentemente asintomáticos, con acículas verdes. Sin embargo se pudo observar la presencia de una podredumbre incipiente en los cilindros de madera extraídos de la base del tronco. En este caso se detectaron cuatro genets entre los distintos aislados. Uno de ellos había infectado 10 árboles, otro colonizaba dos árboles y los dos genets restantes fueron localizados en árboles indi-

viduales. La distancia máxima entre árboles infectados por el mismo genet fue de 57 m (Figura 5).

DISCUSIÓN

El tamaño del mayor genotipo fúngico localizado en este estudio, 57 m, ha resultado considerablemente mayor que las publicadas previamente para genets de *Heterobasidion* que colonizan diversas especies de abetos. CAPRETTI y GOGGIOLI (1992), establecieron un diámetro máximo de 14 m para un genet de *H. abietinum* que se encontraba infectando 10 pies de *A. alba*. El mayor genet de *Heterobasidion* (tipo S norteamericano) encontrado por GARBELOTTO *et al.* (1994) en *Abies concolor* en el oeste de los Estados Unidos medía 12-15 m. El gran tamaño de algunos genets encontrados en la Sierra de las Nieves sugiere que las infecciones iniciales tuvieron lugar hace bastante tiempo, probablemente antes de 1989, cuando se estableció el Parque Natural. Hasta ese momento se cortaban pies de pinsapo para uso comercial (producción de árboles de Navidad) sin aplicar tratamientos protectores a los tocones que se generaban contra la infección aérea mediante esporas de *Heterobasidion*. No parece probable que en años más recientes se hayan producido este tipo de infecciones, ya que sólo se efectúan cortas sanitarias y además los tocones generados se protegen con urea. En las circunstancias actuales de los pinsapares de Sierra de las Nieves, la vía más probable para la diseminación del patógeno es el crecimiento de su micelio a través de contactos o injertos radicales entre árboles sanos y enfermos. La expansión de los distintos genets de *Heterobasidion* en los pinsapares se ve además favorecida por lo frecuentes que son estos contactos e injertos radicales en esta especie de abeto (ARISTA *et al.*, 1997).

No se han detectado infecciones múltiples de *Heterobasidion* en pinsapo. Este hecho puede ser también indicativo de lo poco frecuentes que son las infecciones por esporas en el Parque Natural. En formaciones de *A.*

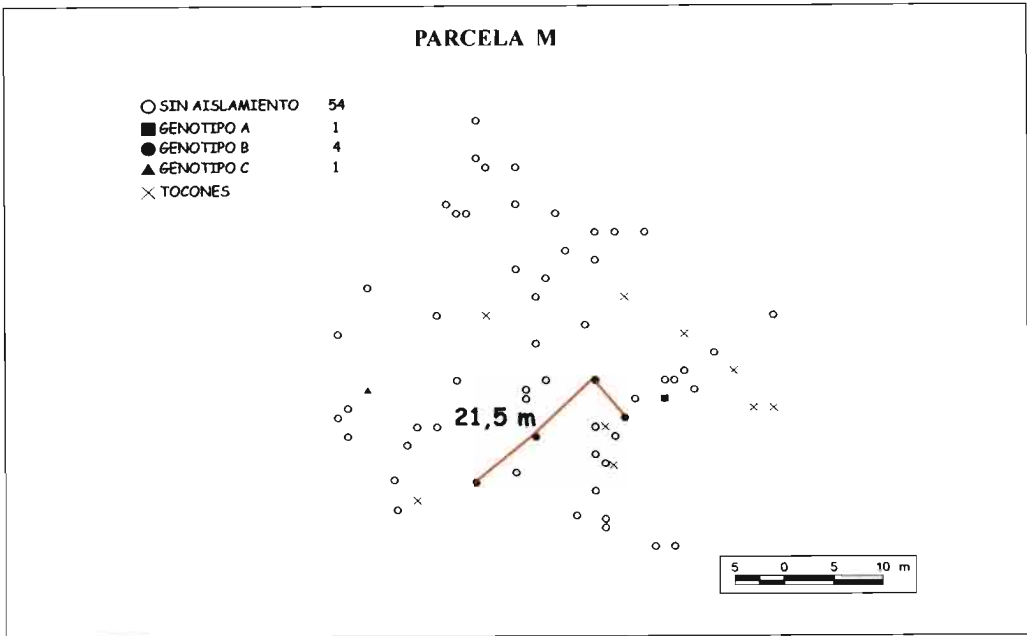


Figura 4. Plano de la parcela M donde se especifica la localización de los distintos genets de *H. abietinum* que colonizan *A. pinsapo*. Los distintos símbolos corresponden a árboles o tocones individuales.

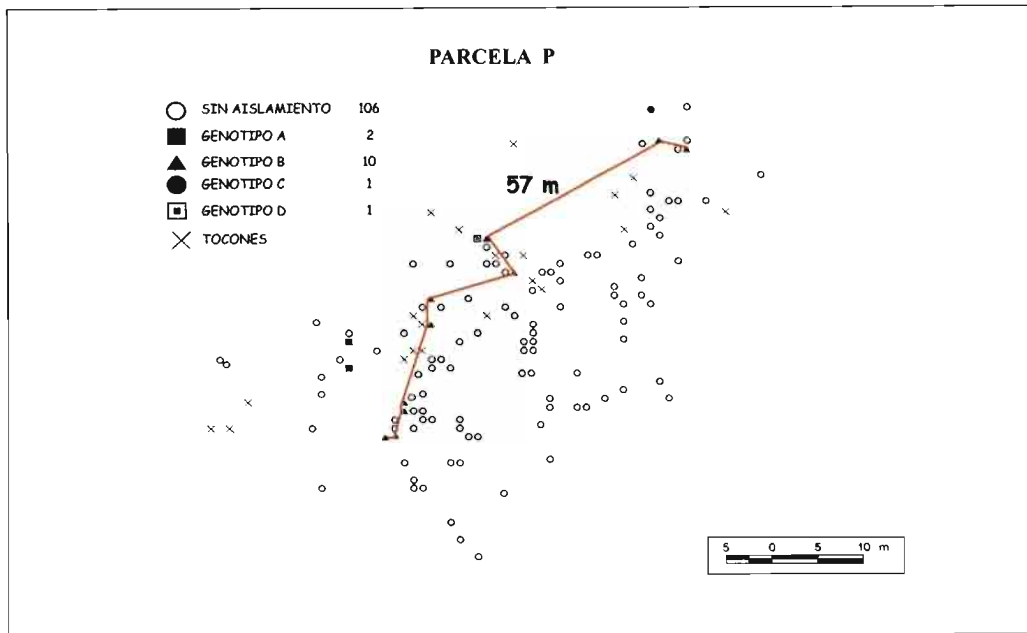


Figura 5. Plano de la parcela P donde se especifica la localización de los distintos genets de *H. abietinum* que colonizan *A. pinsapo*. Los distintos símbolos corresponden a árboles o tocones individuales.

concolor en los Estados Unidos es muy común encontrar múltiples genets de *H. annosum* colonizando el mismo árbol (GARBELOTTO *et al.*, 1994). Por otra parte, otros estudios sugieren la existencia de mecanismos que previenen las infecciones múltiples de *Heterobasidion* en *Picea abies* (STENLID 1985, SWEDJEMARK y STENLID, 1993). Cabe la posibilidad que este fenómeno también ocurra en *A. pinsapo*.

La podredumbre radical causada por *Heterobasidion* es mucho más frecuente en bosques sometidos a manejo que en bosques naturales, donde el hongo raramente causa pérdidas significativas en sus huéspedes (KORHONEN *et al.*, 1998, REDFERN y STENLID, 1998). En base a nuestros trabajos (SÁNCHEZ *et al.*, 2005) y a la información proporcionada por los responsables del Parque Natural de la Sierra de las Nieves, podemos afirmar que *H. abietinum* es un patógeno relativamente virulento en los pinsapares, causando podredumbre radical y muerte de los pies infectados, que está dando lugar a la formación de claros en el pinsapar (SÁNCHEZ *et al.*, 2005). Estos claros originados por la muerte de pinsapos adultos a causa de la enfermedad radical son rápidamente colonizados por nuevos brinzales de pinsapo, pero también son muy frecuentes los brinzales de encina y quejigo, favoreciendo la sustitución de masas puras de pinsapo por bosques mixtos. Esta alta agresividad de *H. abietinum* también ocurre en Italia central y en el sureste europeo, donde el hongo está considerado como un patógeno virulento de distintas especies de abeto (CAPRETTI, 1998, LA PORTA *et al.*, 1998, 2005, DOGMUS-LEHTUAR-

VI *et al.*, 2006). La patogenicidad de *H. abietinum* aparece estrechamente relacionada con la larga duración de veranos secos que debilitan al árbol e incrementan su susceptibilidad a la infección por un patógeno que generalmente no resulta tan virulento (KORHONEN *et al.*, 1998, PUDDU *et al.*, 2003). La disminución de precipitaciones anuales que se está registrando en el sur de España desde hace ya dos décadas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003) ha dado lugar a una prolongación significativa del periodo seco estival en la Sierra de las Nieves (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). Este hecho puede resultar decisivo para entender el incremento creciente de la incidencia de la enfermedad radical en los pinsapares de Sierra de las Nieves, estimada en 2005 en un 10% de los pinsapos que crecen entre 1000 y 1200 m de altitud. Por encima de los 1200 m la incidencia de la podredumbre radical causada por *Heterobasidion* es casi inexistente (Informes Internos del Convenio suscrito con la Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía), coincidiendo con un microclima más frío y húmedo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2002).

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la ayuda prestada al personal del Parque Natural de la Sierra de las Nieves (Málaga), especialmente a JL Quintanilla. El trabajo ha sido financiado por un convenio suscrito entre la Universidad de Córdoba y la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. Por último, agradecemos al Dr K Korhonen la revisión crítica del manuscrito.

ABSTRACT

DE VITA P., J. J. JIMÉNEZ, A. TRAPERO, P. CAPRETTI, M. E. SÁNCHEZ. 2007. Root rot of *Abies pinsapo* II: Spread of *H. abietinum* in *Abies pinsapo* forests. *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 537-545.

Genets of the fungus were identified in two pure stands of *A. pinsapo* affected by *Heterobasidion abietinum* root rot in Sierra de las Nieves Natural Park. The largest genet found was 57 m long, and it had colonized 10 trees. The large size of the main genets implies that *H. abietinum* might have spread via root contacts or grafts from old infections generated before the establishment of the Natural Park in 1989. Exceptionally long

and dry summers during the last two decades may have weakened *A. pinsapo* and favoured the spreading of the disease.

Key words: *Heterobasidion annosum*, natural ecosystems, protected species.

REFERENCIAS

- ARISTA M., HERRERA F. J., TALAVERA S. 1997. Biología del pinsapo. Sevilla, Spain: Publicaciones de la Consejería de Medio Ambiente.
- CAPRETTI P. 1998. Impact, control and management of *Heterobasidion annosum*. Italy. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A eds. *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, pp. 377-385.
- CAPRETTI P., GOGGIOLI U. 1992. Observation on the longevity and the spread of *Heterobasidion annosum* in stumps of white fir and Norway spruce. *Mic. Ital.*, **XXI** (1): 15-20.
- DOG MUS-LEHTIJÄRVI H. T., LEHTIJÄRVI A., KORHONEN K. 2006. *Heterobasidion abietinum* on *Abies* species in western Turkey. *For. Path.*, **36**: 280-286.
- FERNÁNDEZ A., NAVARRO R. M., FERNÁNDEZ R., GIL P., CALZADO C. 2003. Actividades sobre la fitoclimatología de la Red Andaluza de Daños en los Montes: tendencias comparadas del episodio climático entre 1980-1999 en relación con el periodo 1900-1979. Sevilla, Spain: Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- FERNÁNDEZ A., NAVARRO R. M., FERNÁNDEZ R., GIL P., MANRIQUE E., CALZADO C. 2002. Fitoclimatología del pinsapo. Sevilla, Spain: Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- GARBELOTTO M. M., COBB F. W., BRUNS T. D., OTROSINA W., SLAUGHTER G., POPENUCK T. 1994. Preliminary results on the genetic structure of *Heterobasidion annosum* in white fir (*Abies concolor*) root decay centers. In: Proc. 8th Int. Conf. Root and Butt Rots, Wik, Sweden and Haikko, Finland, 9-16 August 1993, IUFRO. Ed. Johanson M, Stenlid J. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp. 227-232.
- GREIG B. J. W., PRATT J. E. 1976. Some observations on the longevity of *Fomes annosus* in conifer stumps. *Eur. J. For. Path.*, **6**: 250-253.
- HERRERA J., ARISTA M., TALAVERA S. 2002. Flora andaluza en peligro de extinción: *Abies pinsapo*. *Revista Andaluza de Medio Ambiente*, **41**: http://www.junta-deandalucia.es/medioambiente/contenidoExterno/Pub_revistama/revista_ma41/ma41_24.html.
- KORHONEN K., CAPRETTI P., KARJALAINEN R., STENLID J. 1998. Distribution of *Heterobasidion annosum* intersterility groups in Europe. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A eds. *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, pp. 93-104.
- KUHLMAN E. G., HENDRIX JR. F. F. 1962. A selective medium for the isolation of *Fomes annosus*. *Phytopathology*, **52**: 1310-1312.
- LA PORTA N., APOSTOLOV K., KORHONEN K. 1998. Intersterility groups of *Heterobasidion annosum* and their host specificity in Bulgaria. *Eur. J. For. Path.*, **28**: 1-9.
- LA PORTA N., GRUDNICKI M., KORHONEN K. 2005. Distribution of *Heterobasidion* species in Romanian spruce-fir plantations and natural forests. In: Proc. 11th Int. Conf. Root and Butt Rots, Poznan, Poland, 16-22 August 2004, IUFRO. Ed. Manka M, Lakomy P. The August Cieszuowski, Agricultural University, Poznan, pp. 73-82.
- NAVARRO R. M., CALZADO C., SÁNCHEZ M. E., LÓPEZ J., TRAPERO A. 2003. Censo de focos de *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. en ecosistemas de pinsapo. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 581-92.
- PUDDU A., LUISI N., CAPRETTI P., SANTINI A. 2003. Environmental factors related to damage by *Heterobasidion abietinum* in *Abies alba* forests in Southern Italy. *For. Ecol. Man.*, **180**: 37-44.
- REDFERN D. B., STENLID J. 1998. Spore dispersal and infection. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A eds. *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, pp. 105-124.
- SÁNCHEZ M. E., CAPRETTI P., CALZADO C., NAVARRO R., TRAPERO A. 2005. Root rot disease on *Abies pinsapo* in southern Spain. In: Proc. 11th Int. Conf. Root and Butt Rots, Poznan, Poland, 16-22 August 2004, IUFRO. Ed. Manka M, Lakomy P. The August Cieszuowski, Agricultural University, Poznan, pp. 220-223.
- STENLID J. 1985. Population structure of *Heterobasidion annosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility and isoenzyme patterns. *Can. J. Bot.*, **63**: 2268-2273.
- STENLID J., REDFERN D. B. 1998. Spread within the tree and stand. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A eds. *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, pp. 125-141.
- SWEDJEMARK G., STENLID J. 1993. Population dynamics of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* following thinning of *Picea abies*. *Oikos*, **66**: 247-54.

(Recepción: 18 octubre 2007)

(Aceptación: 19 noviembre 2007)