

***Phytophthora cinnamomi* Rands**

Tinta del castaño

CASTAÑO

Castanea sativa Mills.**Distribución en España**

Presente, ampliamente distribuida.

Cultivos afectados

Numerosas especies leñosas y arbustivas.

Sintomatología

Los síntomas se manifiestan primeramente sobre la parte aérea apreciándose durante el período vegetativo, hojas cloróticas y de menor tamaño que caen antes del otoño. A medida que el hongo invade los tejidos los síntomas son más manifiestos, apareciendo ramas muertas y pudrición en las raíces que pueden presentar, sobre las mismas, exudados negro azulados. Cuando esta pudrición alcanza la base del tronco se observa una lesión a nivel de cuello apareciendo alguna hendidura o chancro sobre la misma y pudiendo presentar exudados de color negro (de ahí el nombre de tinta del castaño). En las últimas fases la corteza se desprende fácilmente.



Crecimiento en PDA.

Análisis de la muestra

Muestras de raíces, raicillas y tronco. – Las raicillas finas sospechosas de estar afectadas se lavan y secan, posteriormente se cortan en trozos de 1-2 cm y se siembran en medio selectivo V₈-Agar al que se le añaden los siguientes antibióticos y fungicidas (pimaricina 5 mg/l, rifampicina 25 mg/l, benomilo 5-10 mg/l, himexazol 5 mg/l).

Micelio de *P. cinnamomi*.

Esporangio no papilado.

También puede aislarse fácilmente el hongo de los chancros que aparecen sobre el tronco. Los márgenes de dichos chancros presentan coloraciones marrón rojizas; sembrando trozos del tejido adyacente se obtienen aislamientos positivos del hongo tanto en Patata Dextrosa Agar (PDA) como en V₈-Agar.

Una vez que se observa el crecimiento del micelio se transfiere a medios de cultivo generales PDA, Agar Malta (AM), etc., para el estudio de sus características morfológicas.

Muestras de suelo. – Las muestras de suelo se disponen en trampas vegetales o cebos. Para su preparación se pesan 125 g de suelo y se suspenden en 500 cc de agua destilada estéril; se agita esta suspensión y antes de que decante se vierte en placas Petri estériles a razón de 20-25 cc por placa, añadiéndose en la superficie 4 ó 5 pétalos inmaduros de clavel y disponiéndose 10 placas por cada muestra de suelo. El mismo método se utiliza con trozos de hojas jóvenes de aguacate. Las placas se incuban en condiciones de laboratorio de 4 a 10 días, observándose periódicamente al microscopio a partir del segundo o tercer día para determinar así la presencia o ausencia de esporangios del hongo. Los pétalos de clavel u hojas jóvenes de aguacate que hayan capturado esporangios se siembran en medios selectivos

(después de eliminar el exceso de agua con un papel de filtro); a los 3 ó 4 días se observa el micelio característico de *P.cinnamomi* si esta especie está presente.

También pueden emplearse frutos de aguacate como trampa vegetal. La técnica es la siguiente: se eligen frutos de aguacate de piel lisa que se encuentren lo más lejos posible de su punto de maduración y que no hayan tocado el suelo. Se disponen tales frutos en cajas pequeñas de plástico donde se introduce el suelo problema, enrasándose con agua hasta superar ligeramente el punto de saturación. Se incuba el fruto en el suelo durante 4 ó 5 días a 24-27 °C después de los cuales se retira, se lava con agua destilada y se deja 3 ó 4 días a temperatura ambiente, observándose sobre los frutos manchas de color marrón púrpura en la zona de contacto en el suelo. Se toman trozos de pulpa de la zona de avance y se siembran en medios selectivos, apareciendo a los 3 ó 4 días el crecimiento micellar típico en roseta o camelia que presenta las características del micelio de *P.cinnamomi*.

Identificación

Esta especie pertenece al grupo VI de la clave de Waterhouse y se caracteriza por la presencia de esporangios no papilados, persistentes, de forma y tamaño bastante variables dependiendo de las condiciones nutricionales, aunque suelen ser ovoides-elipsoides y presentan abundante proliferación interna. La presencia de esporangios de *Phytophthora cinnamomi* sólo se produce en medio líquido, ya sea en las capturas, como se detalló anteriormente, o induciendo la producción de los mismos con suspensiones de suelo preferiblemente no estéril, para ello, partiendo de cultivos del hongo en medio agarizado se toman trozos de micelio con medio de cultivo que se introducen en placas petri vacías a las que se añade 1 cc de una suspensión de suelo y agua estéril, aportando posteriormente esta última hasta cubrir ligeramente el medio. A continuación se colocan las placas bajo luz continua y al cabo de 5-7 días se detecta la presencia de esporangios de *P.cinnamomi*.



Clamidosporas de *P. cinnamomi*.

El micelio es generalmente no tabicado de aspecto muy ramificado, pudiendo aparecer algún tabique o septo en hifas viejas o delimitando los órganos sexuales. La aparición de este micelio en PDA o V₈ es muy característica por la presencia de hifas coraloides y de hinchamientos hifales denominados «hyphal swelling» que son determinantes de esta especie.

Al ser una especie heterotálica la presencia de órganos sexuales se produce únicamente en cruza-mientos interespecíficos o intraespecíficos cruzando cepas A₁ y A₂ con la cepa que queremos estudiar. Los oogonios son esféricos, lisos y con pie estrecho, el anteridio es siempre anfigino. Las clamidosporas pueden ser intercalares o terminales.

La identificación molecular se lleva a cabo a partir de micelio aislado en placa utilizando las parejas de iniciadores ITS4/DC6 e ITS4/ITS6 (Cooke *et al.*, 2000). El producto de la segunda PCR se digiere con las enzimas *AluI*, *MspI* y *TaqI*. Los patrones de restricción obtenidos se comparan con los propuestos por Cooke y Smith (www.phytid.org).

Bibliografía

- COOKE, D. E. L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J. M.; WAGELS, G. y BRASIER, C. M., 2000: A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal genetics and biology*. 30: 17-32.
- COOKE, D. E. L. y SMITH, J. An on line resource for the molecular identification of *Phytophthora* species (en línea). <<http://www.phytid.org/Data.asp?ID=61>> (Consulta: 15 nov. 2006).
- MANSILLA, J. P.; SALINERO, C.; PÉREZ, R. y PINTOS, C., 2003: Problemas Fitosanitarios de los Robles y Castaños en Galicia. Diputación provincial de Pontevedra. 29-39.
- STAMPS, D. J.; WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J. y HALL, G. S., 1990: Revised Tabular Key to the Genes *Phytophthora*. *Mycological papers* 162. CAB international
- ZENTMYER, G. A., 1980: *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograph 10. APS.

GRUPO DE TRABAJO DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO

Excma. Diputación Provincial de Pontevedra. Servicio Agrario.
Estación Fitopatológica do Areeiro.

Mansilla Vázquez, J. P.; Pintos Varela, C.; Abelleira Argibay, A. y Aguin, O.