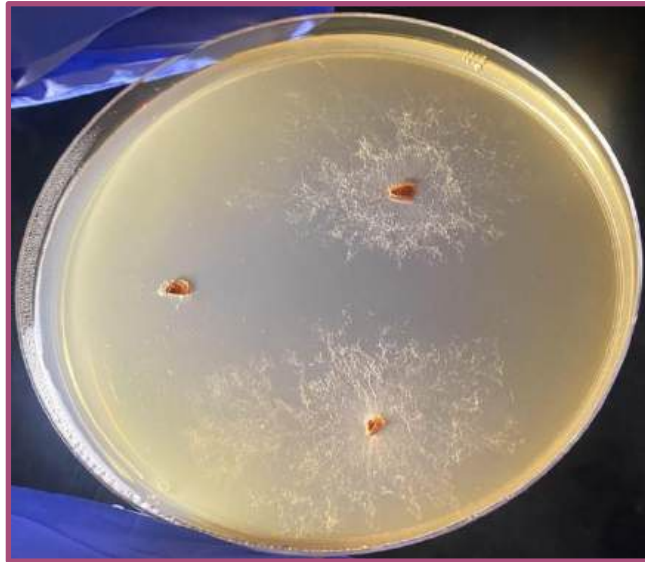


PHYTOPHTHORA, LA DESTRUCTORA DE PLANTAS



ALUMNADO

Daniel Ramos Meseguer (1º Bachillerato, IES Medina Azahara, Córdoba)
Emilia Sánchez-Carrasco Ayúcar (1º Bachillerato, IES Medina Azahara, Córdoba)
Mario Lomeña Romero (4ºESO, IES Fidiana, Córdoba)
Judit Mesa Ruiz (4º ESO, IES Fidiana, Córdoba)

INVESTIGADORAS

Mª Ángeles Romero Martín
Rosa López García

PROFESORES COORDINADORES

Manuel Ojeda Rivero
María del Mar Moreda Moreno

CENTROS

Universidad de Córdoba
IES Fidiana de Córdoba
IES Medina Azahara de Córdoba

ÍNDICE

ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	4
2.1. OBJETIVOS.....	4
2.2. HIPÓTESIS.....	4
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
3.1. CLASIFICACIÓN.....	5
3.2. CICLO DE VIDA	7
3.3. DIAGNÓSTICO	8
3.4. CONTROL.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1. METODOLOGÍA	9
4.2. MATERIALES EMPLEADOS.....	12
5. RESULTADOS.....	14
6. CONCLUSIONES.....	16
7. AGRADECIMIENTOS	17
8. BIBLIOGRAFÍA.....	17

ABSTRACT

Phytophthora cinnamomi es un oomiceto responsable de la podredumbre de las raíces de los *Quercus*. El impacto de este organismo sobre el alcornoque o la encina fue demostrado recientemente y es altamente preocupante ya que es el causante de la destrucción de la dehesa mediterránea de forma irreversible y puede mermar significativamente la producción de jamón, corcho, castañas.

Aunque hay más de 1000 especies afectadas por *Phytophthora sp.*, quedan muchas especies por identificar como por ejemplo *Celtis australis* con el que se ha ensayado.

Para esto se han realizado inoculaciones en rama de distintas especies de *Quercus sp.* con el fin de comparar las diferentes lesiones producidas entre ellas, a causa de la infección causada por *Phytophthora*, realizando mediciones de anchura y longitud de las lesiones y la presencia o no de anillamiento.

Se extrajo la lesión con la ayuda del bisturí y se procedió al aislamiento en medio selectivo, es decir, medio con antibióticos y antifúngicos y finalmente, se incubaron las placas a 23°C. Tras el análisis de resultados se observó que las lesiones causadas en las distintas especies son similares destacándose una especial susceptibilidad en el caso de *Celtis australis* (almez).

Palabras clave: *Phytophthora sp.* oomiceto, encina, susceptibilidad, inoculación.

1. INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi es un oomiceto responsable de la podredumbre de las raíces de los *Quercus*. El impacto de este organismo sobre el alcornoque o la encina ha sido frecuentemente demostrado y es altamente preocupante, debido a que es el causante de la destrucción de la dehesa mediterránea de forma irreversible y puede mermar significativamente la producción de jamón, corcho y castañas. Investigaciones sobre este organismo son de gran importancia, ya que mediante la clasificación de las especies afectadas por la enfermedad y el posible descubrimiento de especies resistentes, se podría llegar a una solución para este gran problema de nuestra región.

El organismo una vez que infecta al árbol, pudre las raicillas primarias y le impide por tanto absorber el agua y los nutrientes, causando efectos comparables con una sequía. Los síntomas observables en el follaje son confusos e inespecíficos, pero en las raíces se puede observar un color negro muy característico, que se puede llegar a apreciar incluso en el tronco una vez que se retira la corteza.

Aunque hay más de 1000 especies afectadas por *Phytophthora sp.*, quedan muchas especies por identificar como por ejemplo *Celtis australis* con el que se ha ensayado.

Para esto se han realizado inoculaciones en rama de distintas especies de *Quercus sp.* con el fin de comparar las diferentes lesiones producidas entre ellas, a causa de la infección causada por *Phytophthora*.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. OBJETIVOS

- Evaluar la susceptibilidad diferencial de distintas especies de *Quercus sp.*; entre las que están *Celtis australis*, *Quercus suber* y *Quercus ilex*, al oomiceto *Phytophthora cinnamomi*.
- Analizar la presencia o no de lesiones en especies de *Quercus ilex* (encina), *Quercus suber* (alcornoque) y *Celtis australis* (almez) tras ser inoculadas con un cultivo puro de *Phytophthora cinnamomi*.
- Comparar las lesiones en las distintas especies en caso de producirse.

2.2. HIPÓTESIS

Phytophthora cinnamomi, uno de los principales agentes causantes de la podredumbre de raíz de la encina, el alcornoque y el almez, produciendo lesiones en ramas, como hacen otras especies de *Phytophthora*.

Las hipótesis de partida han sido:

- Las lesiones causadas por *Phytophthora cinnamomi* son similares en las distintas especies empleadas (encina, alcornoque y almez), aunque pueden variar en tamaño según la especie.
- Debido a que *Celtis australis* (almez) no es una especie que se suele asociar a la enfermedad, se espera que sus lesiones sean menos graves que en la encina y el alcornoque.
- En las ramas utilizadas como control (ramas no inoculadas) no se observan lesiones producidas por el patógeno, lo que muestra que las lesiones en las ramas inoculadas son causadas directamente por la infección y no por otros factores.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. CLASIFICACIÓN

Phytophthora cinnamomi pertenece al reino *Stramenopila*, phylum *Oomycota*, clase *Oomycetes*, orden *Pythiales*, familia *Pythiaceae*. Está incluido en el grupo VI de Waterhouse, tratándose de una especie heterotática, de esporangios no papilados y anteridios anfigios. El género *Phytophthora* tiene carácter acuático y esto implica que está ecológicamente favorecido por la presencia de agua en el suelo. Presenta un micelio cenocítico (aseptado) y diploide, constituido por hifas tubulares ramificadas, de 5 a 8 micras de diámetro. El micelio joven es hialino. Las hifas pueden ser lisas, nudosas o presentar hinchazones. En la especie *P. cinnamomi* las hinchazones hifales se producen muy abundantemente y constituyen una característica



fundamental para diferenciarla de otras especies. Su estructura de resistencia son las clamidosporas, que pueden permanecer en el suelo durante largos periodos de tiempo.



Figura 1. Esporangio no papilado

Figura 2. Oogonio y Anteridio anfigino



Figura 3. Hifas e hinchazones hifales



Figura 4. Clamidospora

3.2. CICLO DE VIDA

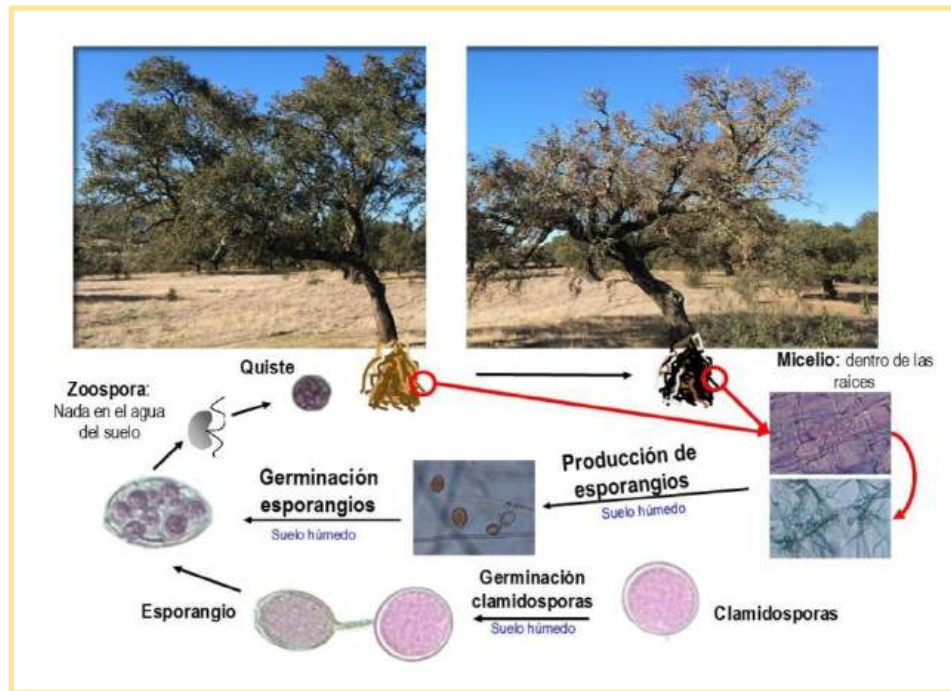


Figura 5. Ciclo de vida *Phytophthora cinnamomi*

En la Península Ibérica, *Phytophthora cinnamomi* se encuentra en el suelo en forma de clamidosporas. Cuando las condiciones de humedad y temperatura en el suelo son las adecuadas, las clamidosporas germinan produciendo esporangios, que a su vez germinan emitiendo zoosporas móviles. La dispersión de estas zoosporas se ven favorecidas por la presencia de agua libre en suelo, desplazándose activamente y siendo atraídas por los exudados de las raíces de las plantas susceptibles. Cuando infecta al huésped, desarrolla el micelio en su interior, produciendo rápidamente sucesivos ciclos de producción de esporangios y su germinación, aumentando la población del patógeno en el suelo. Cuando las condiciones ambientales son adversas para *P. cinnamomi* o la raíz infectada está prácticamente muerta, el patógeno produce nuevas estructuras de resistencia (clamidosporas), que quedan en el suelo hasta que vuelvan a darse las condiciones favorables.

3.3. DIAGNÓSTICO

Phytophthora cinnamomi es uno de los patógenos más destructivos del mundo, produciendo una destrucción masiva de raíces absorbentes de los árboles que infecta, reduciendo la capacidad de absorción de agua y nutrientes del suelo de estos árboles, ocasionando síntomas similares a los de la sequía. La sintomatología aérea de los árboles afectados es muy inespecífica y por tanto, poco útil para el diagnóstico: clorosis y/o marchitez foliar, defoliación, muerte regresiva de brotes y ramas (puntisecado), etc.

Cuando la infección radical es severa, el descalce parcial de los árboles afectados muestra la ausencia de raicillas absorbentes. En estos casos los árboles infectados se colapsan repentinamente (síndrome de muerte súbita o apoplejía). En otros casos, el proceso de muerte puede durar varios años (síndrome de muerte lenta), particularmente en climas más frescos y húmedos.



Figura 6. Raíz sin raicillas absorbentes



Figura 7. Muerte súbita de árbol



Figura 8. Puntisecado de ramas

3.4. CONTROL

El control de este patógeno es complicado debido a su amplia gama de huéspedes, al período a veces largo entre el establecimiento de la infección y la manifestación de síntomas, su alta capacidad de diseminación en suelos mal drenados o encharcados, además de la longevidad de sus estructuras de resistencia en el suelo.

Ante la dificultad de erradicar totalmente al patógeno en aquellas zonas en las que ya se ha instalado, las medidas de control variarán en función de la presencia o ausencia de la enfermedad en el territorio. En las zonas libres del patógeno, las medidas a tomar serán las destinadas a prevenir su llegada y su establecimiento, mientras en las que ya se encuentra establecida, las medidas de control deben ir

*Figura 9. Medida preventiva
Inyección al tronco.*



*Figura 10. Aplicación de carbonato para reducir
la población de *P. cinnamomi*.*



encaminadas a disminuir la población del patógeno.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. METODOLOGÍA

El proyecto de investigación se ha realizado en la Universidad de Córdoba, concretamente con el Grupo: AGR-157 RECURSOS GENÉTICOS, MEJORA Y SANIDAD DEL OLIVO (UCOLIVO). DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA.

Se ha realizado en cuatro sesiones:

PRIMERA SESIÓN (4 horas)

En primer lugar se observó el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*, en medio de cultivo. En el que se pudo apreciar la morfología característica del micelio.

A continuación se preparó el medio de cultivo Zanahoria-Agar. Para ello se utilizó una batidora, un autoclave, placas de Petri y una campana de flujo laminar con la que se mantuvo la esterilidad durante el procedimiento.

Una vez que el medio de cultivo estuvo preparado se procedió a transferir el microorganismo al medio utilizando el escarpelo y un mechero de alcohol para esterilizar el material. Se sellaron las placas, se rotularon y se incubaron en condiciones controladas de luz y temperatura.

Finalmente se realizó una visita a las instalaciones del grupo AGR-157 (UCOLIVO).



Figura 11. Colonia de *Phytophthora*



Figura 12. Preparación del medio de cultivo CA



Figura 13. Sellado de las placas

SEGUNDA SESIÓN (4 horas)

En primer lugar se procedió a la preparación de ramas de alcornoque, encina y almez, sobre las que se realizó el ensayo. Se limpió y se selló los extremos de las ramas con parafilm para evitar la desecación de las mismas.

Se seleccionaron tres ramas control, y se inocularon cinco ramas de cada una de las tres especies (*Quercus suber*, *Quercus ilex* y *Celtis australis*).

Seguidamente, se inocularon las ramas con el oomiceto en el punto medio de cada una. Para ello, se utilizó un sacabocados, de diámetro de 5cm, para realizar las lesiones, se eliminó la sección de corteza cortada con un escalpelo y se colocó en su lugar un cilindro de agar de igual dimensiones de la lesión con micelio de *P. cinnamomi* en las ramas. Igualmente se hizo para las ramas control, pero en este caso el agar sin micelio. Todo se realizó en la campana de flujo laminar y un mechero de alcohol para asegurarse de la esterilidad de los materiales. Se cubrió la lesión con algodón estéril, parafilm y papel aluminio para favorecer la infección. Por último, las ramas se etiquetaron y se introdujeron en una bolsa con algodón húmedo, cerrándose estas bolsas lo más herméticas posibles para mantener la humedad de las ramas.

Por último, se incubaron las ramas en una cámara de cultivo en condiciones controladas de oscuridad y temperatura (23°C) durante cuatro semanas.



Figura 14. Preparación de las ramas



Figura 15. Ramas sobre las que se realizó el ensayo.

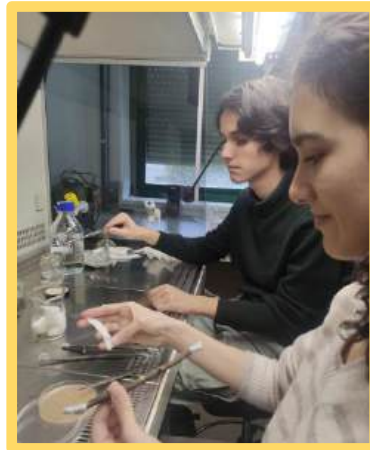


Figura 16. Inoculación de las ramas

TERCERA SESIÓN (4 horas)

En esta sesión, se levantó el ensayo, se midieron la longitud y grosor de las ramas. Se procedió a retirar el papel de aluminio, el parafilm y el algodón de la lesión. Posteriormente, se eliminó la corteza de la rama que rodeaba a la lesión y se midió la

longitud de la lesión. Además, se observó si la lesión anillaba a la rama. Para ello se utilizaron como instrumentos de medida un metro y un calibre.

Después de clasificar y medir cada una de las ramas, se realizaron los aislamientos de *P. cinnamomi* a partir de las lesiones en las ramas inoculadas y control. Se cortaron cuñas de unos 2-3 mm de tamaño de la zona de transición entre la lesión y la parte sana. Se desinfectó brevemente en una disolución de lejía al 10%, se secó el exceso de agua y se sembró en el medio de crecimiento. Se utilizó para ello un medio de crecimiento selectivo a base de harina de maíz con antibióticos y fungicidas, para asegurarnos el aislamiento de *Phytophthora*.

Finalmente las placas se incubaron en cámara de crecimiento a condiciones controladas en oscuridad y a una temperatura de 23°C durante una semana



Figura 17. Medición de las ramas



Figura 18. Preparación del aislamiento

CUARTA SESIÓN (4 horas)

Se realizó un análisis de los resultados de los aislamientos y se recopilaban los datos y los resultados obtenidos para la finalización del trabajo.



Figura 19 . Análisis de los resultados

4.2. MATERIALES EMPLEADOS

Entre otros se han utilizado los siguientes materiales:



Figura 20. Autoclave.



Figura 21. Cámara de flujo laminar.



Figura 22. Placa de Petri.



Figura 23. Escalpelo



Figura 24. Mechero de alcohol



Figura 25. Parafilm



Figura 26. Matraz Erlenmeyer



Figura 27. Vaso de precipitados y algodón estéril



Figura 28. Calibre

- **Autoclave:** Aparato que sirve para esterilizar objetos o sustancias situados en su interior, por medios diferentes, como vapor, temperatura o radiación.

- **Cámara de flujo laminar:** Recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro. **HEPA** o **ULPA** y proporcionar aire limpio a la zona de trabajo libre de partículas de hasta 0.1 micras.
- **Placa de Petri:** Recipiente redondo de cristal con una tapa de la misma forma. Se utiliza en microbiología para cultivar células, o examinar el comportamiento de microorganismos.
- **Escalpelo:** Instrumento en forma de cuchillo pequeño, de hoja fina, puntiaguda, que se usa en las disecciones anatómicas, autopsias y vivisecciones.
- **Mechero de alcohol:** Equipo de laboratorio que se utiliza para producir una llama abierta. Puede ser de latón, vidrio, acero inoxidable, aluminio...
- **Parafilm:** Lámina de cierre utilizada para sellar recipientes de laboratorio de todo tipo.
- **Matraz Erlenmeyer:** Recipiente usado para contener y medir líquidos o sustancias químicas.
- **Vaso de precipitados:** Recipiente cilíndrico que se utiliza muy comúnmente en el laboratorio, sobre todo, para preparar o calentar sustancias, medir o traspasar líquidos.
- **Calibre:** Instrumento de medición, principalmente de diámetros exteriores, interiores y profundidades.

5. RESULTADOS

No se observaron lesiones en las ramas de control de las distintas especies pero sí en las ramas inoculadas. Además, en algunas de las ramas del almez presentaron anillamiento.



Figura 29. Ramas inoculadas y de control de la encina



Figura 30. Ramas inoculadas y de control del alcornoque



Figura 31. Ramas inoculadas y de control del almez

Tras realizarse el aislamiento de las lesiones de rama en el medio de crecimiento selectivo, sólo se observó aislamiento positivo en aquellas placas con tejido vegetal procedente de las lesiones de las ramas inoculadas con *Phytophthora*. En las placas que contenían el tejido de

las ramas control, se observaron colonias de especies fúngicas que aparecieron al perder el medio de crecimiento sus propiedades antifúngicas o no se aisló nada.

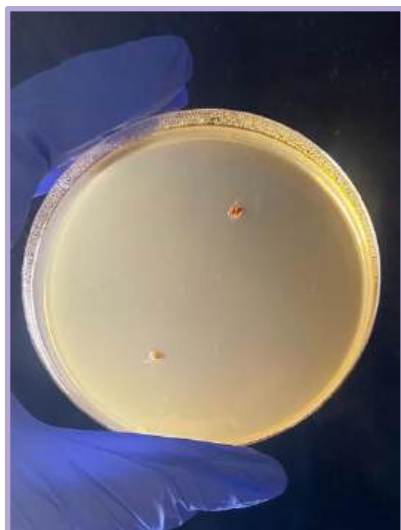


Figura 32. Placa con aislamiento de rama control de encina.



Figura 33. Placa con aislamiento de rama control de alcornoque.

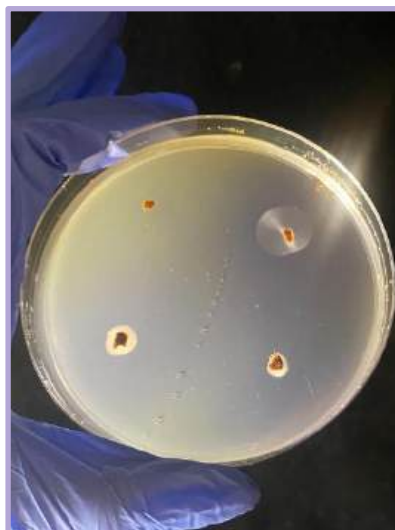


Figura 34. Placa con aislamiento de rama control de almez.

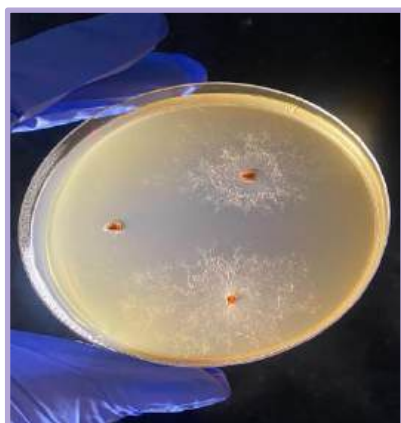


Figura 35. Placa con dos colonias de *P. cinnamomi* del aislamiento de rama de encina inoculada.

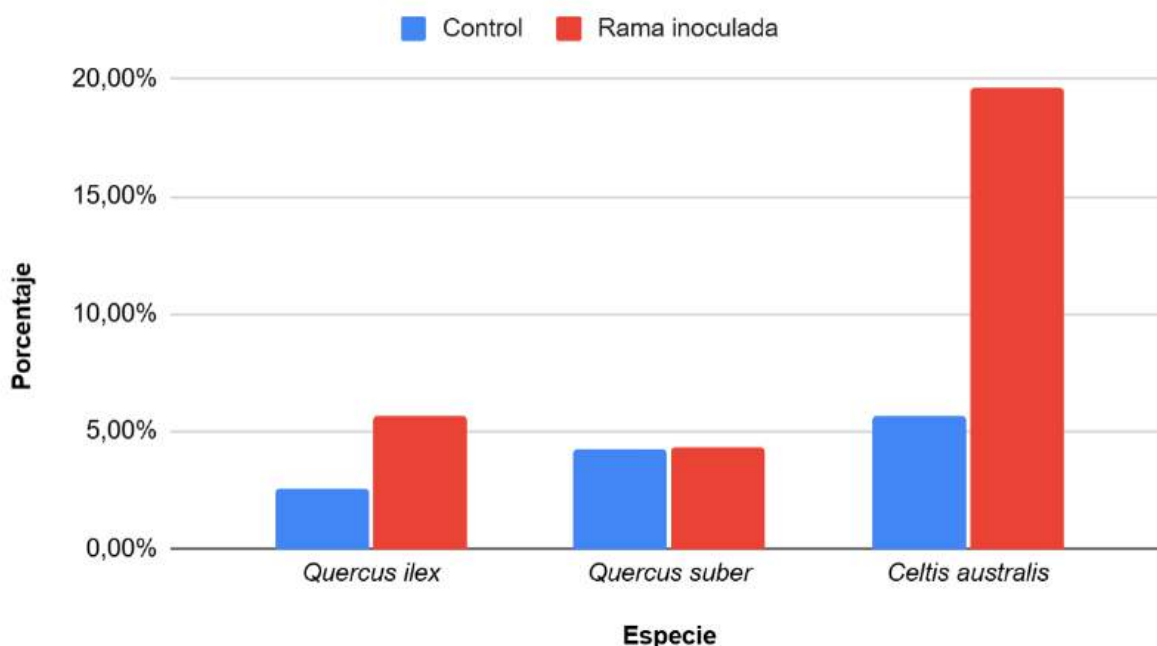


Figura 36. Placa con tres colonias de *P. cinnamomi* del aislamiento de rama de alcornoque inoculado.



Figura 37. Placa con cuatro colonias de *P. cinnamomi* del aislamiento de rama de almez inoculado.

Porcentaje de longitud de fisura



Gráfica 1: Porcentaje medio de longitud de lesión en ramas inoculadas por *Phytophthora cinnamomi* con respecto al control.

La gráfica muestra un tamaño similar en las lesiones por *Phytophthora cinnamomi* en las ramas de la encina y el alcornoque. Sin embargo, se puede observar un gran salto en tamaño al observar las infecciones en las ramas del almez, donde estas ocupan de media casi un 20% de la rama.

6. CONCLUSIONES

- Las lesiones causadas por *Phytophthora cinnamomi* son similares en las distintas especies empleadas (encina, alcornoque y almez), aunque pueden variar en tamaño según la especie. Se ha observado que en *Celtis australis* (almez) existe una mayor susceptibilidad al microorganismo, no solo por el tamaño mayor de las lesiones sino también por la presencia de anillamiento, ausente en las otras especies analizadas.
- En las ramas utilizadas como control (ramas no inoculadas) no se observan lesiones producidas por el patógeno, lo que muestra que las lesiones en las ramas inoculadas son causadas directamente por la infección y no por otros factores.

7. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo. Sobre todo al IES Fidiana y al IES Medina Azahara por ofrecernos esta oportunidad, entre ellos a los profesores Manuel Ojeda del IES Medina Azahara y a la profesora del IES Fidiana, María del Mar Moreda, por orientarnos y ayudarnos en todo momento. También agradecer a las investigadoras, M^a Ángeles Romero y Rosa López que nos han ayudado en todo nuestro proceso. Al Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba por permitirnos utilizar sus instalaciones. Y por último a nuestras familias por su apoyo incondicional.

8. BIBLIOGRAFÍA

Caetano, P. Sánchez, J.E., Sánchez, M.E. y Trapero, A. 2010. Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 6 pp. Acceso por internet: www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/documents/20151/449530/pobredumbre_encina_alcornoque.pdf

Roca, M. 2020. Sensibilidad de tres especies de *Quercus* mediterráneos frente a *Phytophthora cinnamomi*. Trabajo fin de grado. Universidad de Córdoba.

www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/areas-tematicas/medio-forestal/sanidad-forestal/seca-y-decaimiento-forestal/seca-quercus

www.uco.es/investigacion/proyectos/biodehesa/wp-content/uploads/V_Eldecaimiento_podredumbre_dehesasandaluzas.pdf