

TINTA DEL CASTAÑO



AGENTE CAUSAL

Phytophthora cinnamomi Rands.

Otra especie de *Phytophthora*, *P. cambivora* (Petri) Buisman, se ha citado como responsable de la tinta del castaño, de forma independiente o asociada a *P. cinnamomi*. La realidad es que *P. cambivora* es mucho menos frecuente en castaños españoles y portugueses (Mansilla et al., 2003, Madureira, 2004). También se han citado en castaño las especies *P. cryptogea*, *P. megasperma* y *P. citricola*, siendo esta última especie la única con esporangio papilado. Una descripción micológica más detallada de estas especies puede consultarse en Stamps et al. (1990).

OTROS NOMBRES

Ink disease (inglés), tinta do castanheiro (portugués)

ARBOLES HOSPEDADORES

El rango de hospedadores de *P. cinnamomi* es muy amplio, con casi 1000 especies vegetales a las que puede infectar (Zentmyer, 1983). El principal hospedador es el aguacate, al que causa podredumbre de raíz; aunque también ataca de forma significativa a castaños, robles, coníferas o eucaliptos.

Los principales hospedadores de este patógeno son: *Persea americana*, *Ananas comosus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Castanea*, *Pinopsida*, *Ericaceae*, *Rhododendron*, *Eucalyptus*, *Juglans*, *Camellia*, *Fagus*, *Quercus*, *Banksia*, *Chamaecyparis*, *Cupressus*, *Taxus baccata* y *Xanthorrhoea*.

DISTRIBUCIÓN EN ESPAÑA

Generalizada. A principios del siglo pasado *P. cinnamomi* estaba presente en casi todos los sotos gallegos y se estima que en los años 1940 la mitad de los castaños de Lugo habían sido destruidos por la tinta (Vieitez et al., 1996).

DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

Generalizada. El origen geográfico de *P. cinnamomi* no está claro. Se describió por primera vez en la isla de Sumatra (Indonesia), por lo que podría tratarse de un hongo de clima tropical o subtropical que se ha diseminado a otros países.

En 1838 se describió en el norte de Portugal una enfermedad de la raíz de castaño conocida como “tinta”, aunque la enfermedad podría haberse extendido con el árbol desde su entrada en Europa a través de Turquía.

IMPACTO ECONÓMICO

Los daños más importantes son los producidos en aguacate y piña, pero empieza a ser considerable el efecto económico de la tinta sobre la industria de madera y fruto de castaño. También se ve afectada la industria de viveros que suministran plantones de castaño.

En el norte de Portugal la tinta es una enfermedad devastadora (Abreu, 1996) y, dada la proximidad fronteriza de Salamanca, las consecuencias de la enfermedad en nuestra provincia podrían ser muy graves.

DAÑOS

P. cinnamomi afecta en primer lugar a las raíces absorbentes y les provoca una rápida maceración. A continuación, ataca a las raíces gruesas y al cuello de la planta. Los síntomas empiezan a manifestarse sobre la parte aérea con amarilleamiento de las hojas, aclaramiento de la copa del árbol, y puntas secas en algunas ramas (Figura 14). Las hojas se reducen en número y tamaño, y caen antes del otoño. Los frutos no alcanzan la madurez y permanecen en las ramas. Sin embargo, estos síntomas no son característicos de la enfermedad y pueden ser provocados por otros factores bióticos y abióticos (carencia nutricional o estrés hídrico).

A medida que el patógeno invade el sistema radicular y los tejidos del árbol, se manifiestan síntomas más característicos: aparecen ramas muertas y pudrición de las raíces que pueden presentar sobre las mismas exudados negro-azulados como consecuencia de la oxidación de las sustancias fenólicas que se producen como reacción del árbol al ataque de *P. cinnamomi* (Mansilla et al., 2003). La pudrición puede avanzar desde las raíces hasta el cuello, a una altura de unos 50 cm sobre la base del tronco (Figura 15), con aparición de grietas en la corteza que se desprende con facilidad (Figura 16), y exudación de una sustancia gomosa de color negro (tinta).



Figura 14. Castaño con pérdida de masa foliar, infectado por *Phytophthora cinnamomi*. Lagunilla (Salamanca)



Figura 15 Daños en el cuello (tinta) causados por *P. cinnamomi*



Figura 16. Castaño con síntomas de tinta bajo la corteza. El Cerro (Salamanca)

IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO

P. cinnamomi puede aislarse de raíces y de suelo. Las raíces finas potencialmente infectadas se lavan, se secan, se cortan en trozos de 1-2 cm y se siembran en medios selectivos [Ponchet (agar 17 g, malta 10 g, penicilina G sódica 250 mg, sulfato de polimixina B 250 mg, benomilo 15 mg, pentacloronitrobenzeno (PCNB) 100 mg) o V8-agar con pimarcina 5 mg/litro, rifampicina 25 mg/litro, benomilo 5-10 mg/litro e himexazol 5 mg/litro]. Las raíces más gruesas se desinfectan con lejía al 2%, se lavan con agua estéril, se secan, se seleccionan trozos de la zona límite interior de la corteza y se siembran en medios selectivos. En los márgenes de los chancros de la corteza que presentan coloración marrón-rojiza, se puede aislar *P. cinnamomi* sembrando trozos de tejido adyacente al chancro en los medios patata dextrosa agar (PDA) o V8-agar. Las colonias desarrolladas en los medios de cultivo indicados se resiembran en PDA o en agar-malta para estudiar las características morfológicas.

La presencia del patógeno de muestras de suelo se determina directamente mediante cuantificación del número de propágulos de *P. cinnamomi* en suelo infestado de forma natural o artificial. El método utilizado es el descrito por Gees y Coffey (1989) ligeramente modificado: de la muestra de suelo se prepara, en matraces de 100 ml, una suspensión de 25 g de suelo y 50 ml de agar agua al 0.1% (AA: 1 g de agar disuelto en 1 l de agua). Estos matraces se mantienen en agitador durante 60 minutos a 150 rpm. Pasado este tiempo, y con ayuda de una jeringa, se toma 1 ml de esta mezcla de AA y suelo y se extiende en placas Petri con un medio selectivo para *P. cinnamomi* descrito por Kellan y Coffey (1985):PARPH (composición por litro de medio: harina de maíz agar: 17 g/l; pimaricina: 10 mg/l; ampicilina: 250 mg/l; rifampicina: 10 mg/l; PCNB: 100mg/l; hymexazol: 50 mg/l). Se hacen de tres a cinco repeticiones por muestra. Las placas se incuban en oscuridad durante dos días. Transcurrido este tiempo, se retira la mezcla que permanece en la superficie de la placa, pulverizándola con agua destilada, a continuación se determina el número de colonias de *P. cinnamomi* que se han desarrollado. Para aislar *P. cinnamomi* de muestras de suelo se dispone una suspensión del mismo (125 g de suelo /500 ml de agua) en placas Petri sobre las que se depositan 4-5 pétalos inmaduros de clavel u hojas jóvenes de aguacate, a modo de cebo para capturar esporangios del patógeno. Posteriormente, se transfieren los esporangios a medios selectivos para observar el micelio característico de *P. cinnamomi* después de 3-4 días de incubación a temperatura ambiente.

Las colonias se localizan primero a simple vista, tienen un aspecto de rosea, y seguidamente se confirman las que son de *P. cinnamomi*, al observar el micelio coraloide y las características hinchazones de las hifas con el microscopio invertido. Al día siguiente, se realiza una nueva lectura para asegurar el resultado y anotar el posible desarrollo de nuevas colonias de *P. cinnamomi*. Si la concentración de *P. cinnamomi* en suelo es muy alta se hacen diluciones de la mezcla en agar-agua. El resultado se expresa como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (ufc/g suelo).

Entre los días 4 de junio y 7 de julio de 2004, se realizó una prospección de suelos y árboles sospechosos de padecer tinta en diferentes localizaciones de la provincia de Salamanca: Béjar (Monte Mario y El Castañar), El Cerro y Lagunilla; demostrándose la existencia de *P. cinnamomi* y la enfermedad de la tinta en nuestros castaños.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las principales características de *P. cinnamomi* son los esporangios no papilados, persistentes, de forma y tamaño variable aunque en su mayoría son ovoides o elipsoidales (Figura 17). La hifas son continuas, sin tabicar salvo en micelio viejo, y con hinchazones esféricas que les confieren un aspecto coraloide. También se puede encontrar en el micelio clamidosporas intercalares y terminales. Sólo se aprecian estructuras sexuales (anteridios, oogonios y oosporas) cuando se produce cruzamiento entre estirpes compatibles (OEPP/EPP0, 2004).

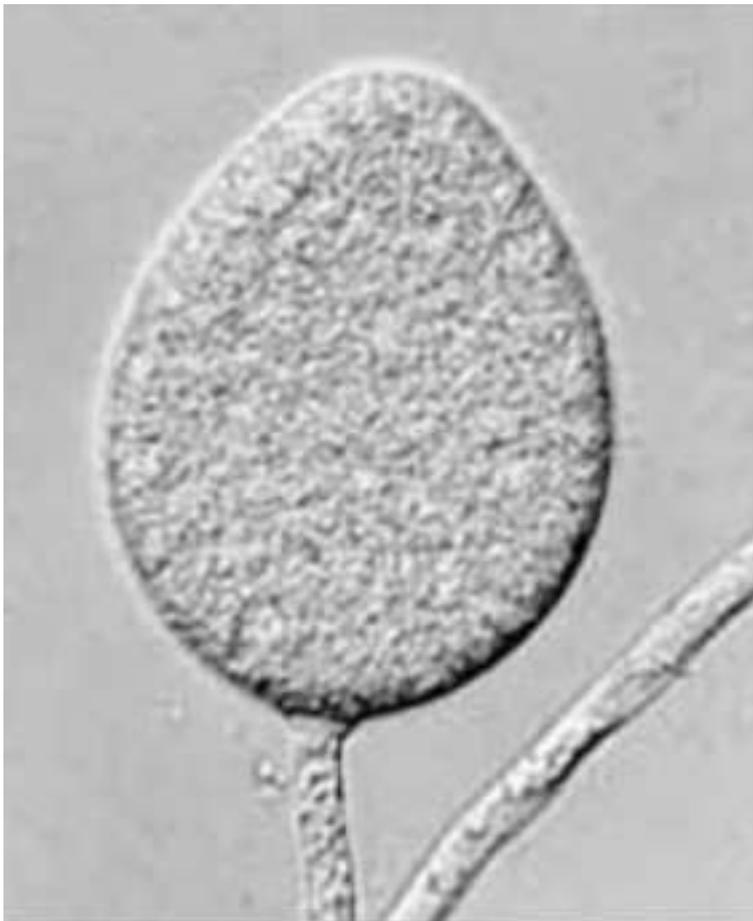


Figura 17. Esporangio no papilado de *P. cinnamomi*

DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

P. cinnamomi se puede detectar por métodos serológicos. Existen inmunoensayos del tipo ELISA-DAS que son específicos del género *Phytophthora* y se han validado para *P. cinnamomi*. Hay anticuerpos específicos disponibles para este patógeno (Cahill y Hardham, 1994). MacDonald y Duniway (1979) desarrollaron un método de detección de *P. cinnamomi* basado en anticuerpos fluorescentes.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Existen técnicas moleculares, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten identificar *P. cinnamomi* de otras especies de *Phytophthora*. Coelho et al (1997) determinaron polimorfismos en el gen que codifica para el metabolito cinnamomina, pero no deja de haber reacciones cruzadas con *P. cambivora*. Los espaciadores intergénicos ITS, adyacentes al gen 5.8S rDNA, han demostrado ser más útiles en la identificación de *P. cinnamomi* (Cacciola et al., 2001). Recientemente, la comparación de secuencias de la región ITS y la aplicación de la técnica RAPD-PCR ha permitido separar poblaciones portuguesas de *P. cinnamomi* y *P. cambivora*, dentro de un tesis doctoral presentada en la Universidad de Tras os Montes y Alto Douro en Vila Real (Madureira, 2004).

MORFOLOGÍA

P. cinnamomi es un cromista englobado en la Sección VI de la antigua clave de hongos oomicetos propuesta por Stamps y Waterhouse (Stamps et al., 1990). En agar-malta las hifas son coraloides, con frecuentes nódulos de hasta 8 µm de anchura, pudiendo presentar grupos de hinchazones típicamente esféricas y tamaño medio de 42 µm. Los esporangios sólo se producen en soluciones acuosas, son entre ovoides y elipsoides (57 x 33 µm, pero pueden alcanzar un tamaño de 100 x 40 µm) y no presentan papila. Las estructuras sexuales son muy raras de ver en medios con agar. Los oogonios tienen un diámetro medio de 40 µm, presentan pared lisa y amarillean con la edad. Los anteridios son anfígenos y tienen una longitud media de 21-23 x 17 µm. Las oosporas tienen un grosor de 2 µm y casi llenan el oogonio.

Las colonias de *P. cinnamomi* crecen entre 5 y 32-34 °C y su micelio aéreo puede presentar un aspecto de roseta. La presencia de hifas coraloides en agar Malta puede ayudar a distinguir *P. cinnamomi* de *P. cambivora*.

CICLO BIOLÓGICO

P. cinnamomi necesita agua libre para desarrollarse, pero puede vivir en el suelo sobre materia orgánica durante varios años. Cuando las condiciones de humedad son favorables, *P. cinnamomi* desarrolla esporangios que al germinar liberan zoosporas capaces de nadar hasta las raíces del castaño, a una distancia de 35 mm en agua estancada o largas distancias en corriente. Las zoosporas son atraídas por quimio y electrotactismo hacia las raíces, donde penetran directamente o por zonas lesionadas. El patógeno invade progresivamente el sistema radicular del castaño hasta alcanzar el cuello de la planta produciendo finalmente la muerte. Cuando las condiciones son desfavorables para el crecimiento vegetativo, *P. cinnamomi* puede producir oosporas y clamidosporas que, junto al micelio saprofito, pueden ser transportadas por el agua, tierra, hombre, animales, labores agrícolas, aperos, etc, hacia otras zonas. Cuando las condiciones de agua y temperatura del suelo (15-30° C) son favorables, las oosporas y clamidosporas germinan, y se producen esporangios y zoosporas que continúan el ciclo (Figura 18).

FACTORES DE RIESGO

La penetración del hongo en el sistema radicular se produce directamente o a través de heridas o lesiones mecánicas. También son factores de riesgo las heridas de injertos y poda (Figura 19).

MEDIDAS PREVENTIVAS

Los suelos en los que se acumula agua y mal drenados son favorables para el desarrollo de la tinta. Son deseables medidas culturales que impliquen la elevación de suelos inundables, la mejora de la aireación y una atención a los nutrientes minerales. Los microorganismos antagonistas (Ej.: *Trichoderma*) y ectomicorrizas, junto a enmiendas del suelo adecuadas, pueden ayudar a mantener el patógeno controlado. También puede prevenirse la tinta por medio de híbridos resistentes de castaños europeos y japoneses o chinos, así como con la no propagación de semillas de castaño de procedencia desconocida o dudosa. En cualquier caso, las plantas afectadas deberán destruirse y se evitará el movimiento del suelo infectado con el calzado, herramientas y maquinaria (Mansilla et al., 2003).

La solarización de los suelos, efectiva en aguacate, presenta dificultades técnicas de aplicación en determinados castañares. No obstante, puede ser útil en plantas de vivero.

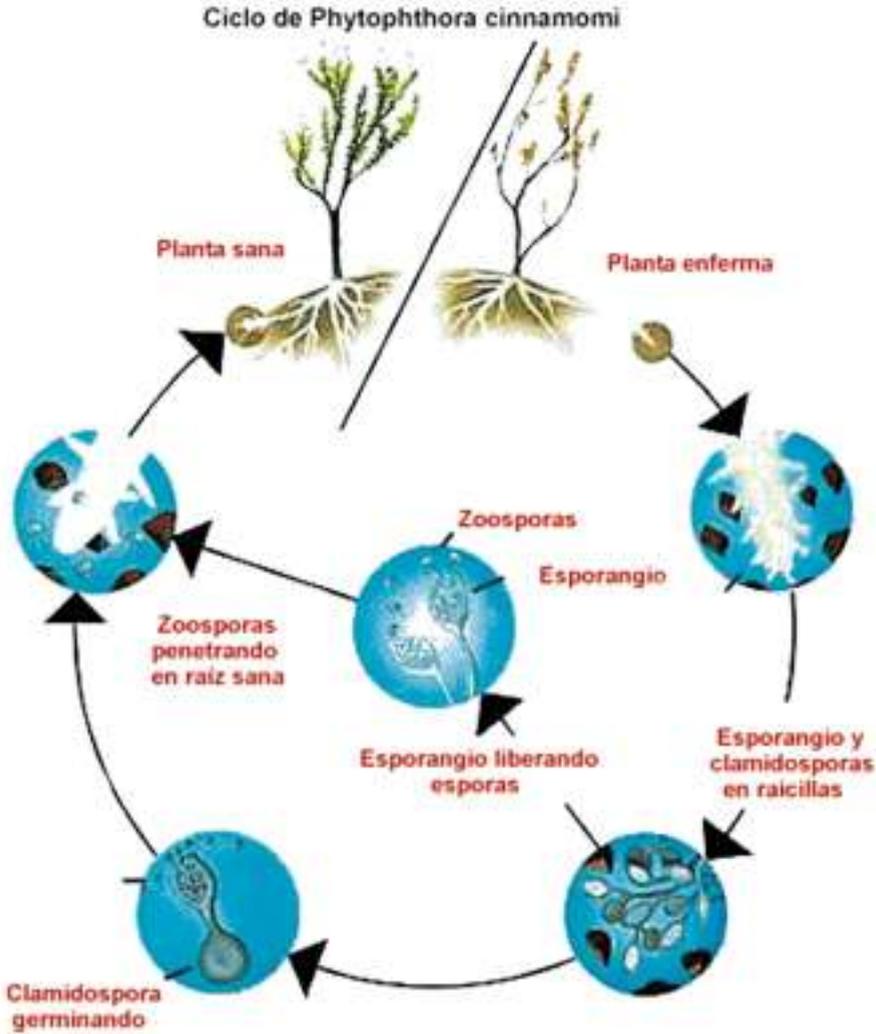


Figura 18. Ciclo biológico de *Phytophthora cinnamomi*

Con frecuencia, los agricultores dan cortes con una navaja sobre la corteza de árboles debilitados con síntomas de tinta. (Figura 20). Transcurrido un tiempo, los árboles se recuperan y no desarrollan la enfermedad. Una explicación a este fenómeno la encontramos en el hecho de que las heridas, al igual que el ataque por microorganismos o por insectos, provocan en la planta una respuesta de defensa sistémica que mantiene al patógeno controlado. Tras la herida provocada deliberadamente por el agricultor se esconde la activación de una cascada de señales moleculares que regulará en la planta los niveles de ácido jasmónico y etileno, que a su vez modularán la síntesis de proteínas inhibitoras de proteasas y de proteínas de respuesta a heridas, que colaborarán para mantener al patógeno controlado (Buchanan et al., 2000).



Figura 19. Tinta desarrollada en un rama injertada por “ambudillo”. El Cerro (Salamanca)



Figura 20. Corte preventivo sobre una rama injertada y podada de castaño. El Cerro (Salamanca).

CONTROL

Control químico

Se obtienen aceptables resultados con productos sistémicos, particularmente fosetil aluminio y metalaxil en forma de aplicación al suelo, spray foliar o inyección en el árbol. Otros agroquímicos utilizados son: etridiazol, furalaxil y propamocarb. Todos ellos detienen el crecimiento de *P. cinnamomi* en las raíces infectadas, pero no lo matan, por lo que son especialmente útiles en la prevención de la enfermedad.

Control biológico

El Control Biológico se puede definir como la utilización de organismos naturales o modificados genéticamente, genes o productos génicos, para redu-

cir los efectos de organismos indeseables y para favorecer organismos útiles para el hombre, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos beneficiosos. El agente de control biológico que se introduce en un cultivo para controlar una enfermedad recibe el nombre de “antagonista”. Los antagonistas pueden actuar de distintas formas (Harman et al., 2004): 1) colonizando el suelo y/o partes de la planta, ocupando un espacio físico y evitando que los patógenos puedan multiplicarse. 2) por medio de proteínas (“enzimas líticas”) que son producidas para destruir la pared celular de los patógenos. 3) por medio de antibióticos que matan al patógeno. 4) promoviendo el desarrollo de la planta y 5) activando los mecanismos de defensa de la planta. Algunos agentes de biocontrol utilizan sólo uno de estos mecanismos pero los más eficaces despliegan, simultánea o secuencialmente, varios métodos de control. Este es el caso del hongo *Trichoderma* (Figura 21) (Monte, 1999).



Figura 21. Conidios y conidióforo de *T. harzianum*.

Los hongos del género *Trichoderma* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, son fáciles de aislar y cultivar, crecen rápidamente en muchos sustratos, no afectan al hombre, animales y plantas superiores, actúan como micoparásitos, compiten bien por el alimento y por el espacio, producen antibióticos y tienen un sistema enzimático (β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas, quitinasas, proteasas y celulasas) capaz de atacar a un gran número de patógenos (Sanz et al., 2004). Los hongos del género *Trichoderma*, y en particular el agregado de especies *Trichoderma harzianum*, constituyen una alternativa biológica más sana, limpia, no acumulable en la cadena alimentaria y respetuosa con el medio ambiente, en contraposición a los pesticidas químicos polucionantes de uso común en Agricultura

P. cinnamomi es un patógeno sensible a la acción de *Trichoderma* como agente de control biológico (Kelley, 1977) y en nuestro laboratorio de la Universidad de Salamanca hemos seleccionado y patentado una combinación de cepas de *Trichoderma* eficaces frente a *P. cinnamomi* (López-Herrera et al., 1999). Estas cepas han sido formuladas y registradas bajo el nombre de TUSAL® (*Trichoderma* de la Universidad de Salamanca). La capacidad de bicontrol de una cepa de *T. harzianum* frente a *P. cinnamomi* queda reflejada en la Figura 22.



Figura 22. Control biológico de *T. harzianum* (colonias verdes, sembradas a la derecha de cada placa) frente a *P. cinnamomi* (colonia blanca, sembrada a la izquierda con 48 h de antelación). En la placa superior se puede apreciar la invasión y destrucción de la colonia de *P. cinnamomi* por parte de *T. harzianum*.

CONCLUSIONES

- 1) La tinta del castaño está presente en la provincia de Salamanca. Aunque no parece ser un problema fitosanitario de primera magnitud. La proximidad a las zonas de castañar portuguesas, donde *P. cinnamomi* sí es un problema importante, nos obliga a estar alerta ante esta enfermedad.
- 2) *P. cinnamomi* es un patógeno relacionado con la tinta en los castaños de Salamanca y no parece que las especies próximas, como *P. cambivora*, constituyan un problema real en nuestra provincia.
- 3) Las medidas preventivas, como un buen manejo de la humedad del suelo, drenaje y uso de híbridos resistentes, son esenciales para controlar la enfermedad y no debería permitirse la siembra de semillas de castaño cuyo origen sea dudoso.
- 4) El control biológico con cepas de *Trichoderma* ha demostrado ser eficaz para controlar *P. cinnamomi*.