

Agentes fúngicos presentes en plantaciones de nísperos (*Eriobotrya japonica* Lindl.) con síntomas de decaimiento en la provincia de Alicante

E. GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, A. PÉREZ-SIERRA, L. A. ÁLVAREZ, M. LEÓN, P. ABAD-CAMPOS, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ

España es el primer país productor de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) del área mediterránea y el segundo país productor a nivel mundial después de China. En los últimos años se viene detectando un problema creciente caracterizado por el decaimiento y muerte de árboles. El problema afecta tanto a nuevas plantaciones como a las ya establecidas. Los objetivos del presente trabajo fueron tipificar la sintomatología de la afección y determinar los agentes fúngicos presentes en plantaciones de nísperos. Para ello se prospectaron un total de 31 parcelas situadas en el término municipal de Callosa d'En Sarrià (Alicante). Mediante estas observaciones se caracterizó el síndrome, consistente en: clorosis y marchitez de hojas junto con la defoliación del árbol y seca de ramas, con formación de chancros en la base del tronco y pudrición de raíces con posible presencia de micelio en ambos casos. Ocasionalmente, se produjeron exudaciones gomosas en el tronco. La muerte de árboles ocurrió de forma lenta en árboles de mayor edad o rápidamente en plantones jóvenes. Se llevó a cabo la identificación tanto morfológica como molecular de los agentes fúngicos presentes. En las parcelas afectadas se detectaron: *Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*, *Phytophthora nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. cambivora*, *P. cactorum* y *P. cryptogea*. La especie predominante fue *A. mellea* (40,6% de las parcelas muestreadas) seguida de *R. necatrix* (34,4%) y *Phytophthora* spp. (18,7%). En más de la mitad de las parcelas (59,4%) se aisló un único patógeno.

E. GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, A. PÉREZ-SIERRA, L. A. ÁLVAREZ, M. LEÓN, P. ABAD-CAMPOS, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. aperesi@eaf.upv.es

Palabras claves: *Armillaria*, *Phytophthora*, *Rosellinia*, hongos del suelo.

INTRODUCCIÓN

España es el primer país productor de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) del área mediterránea y el segundo país productor a nivel mundial después de China (CALABRESE, 2006). La provincia de Alicante concentra el 45% de la superficie total y un 60% de la producción (MAPA, 2007). Esta producción se centra en la comarca de La Marina Baixa en los valles de los ríos Algar y Guadalest, con pueblos como Callo-

sa d'En Sarrià, Polop o Altea que han desarrollado el cultivo en los últimos 30 años, consiguiendo altas producciones debido a su alto grado de tecnificación (CALABRESE, 2006). El cultivar "Algerie" y sus mutaciones suponen alrededor del 98% de la producción total de níspero en esta zona (SOLER *et al.* 2007).

Desde hace diez años se viene observando en el término municipal de Callosa d'En Sarrià un problema grave de decaimiento progresivo y muerte de árboles de níspero.

Las pérdidas medias anuales estimadas debidas a este síndrome se calculan en unas 900 t y un millón de euros (E. SOLER, comunicación personal).

El decaimiento progresivo de árboles frutales puede estar asociado a los hongos del suelo *Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix* o *Phytophthora* spp. La formación de chancros en la base del tronco junto con la presencia de un micelio blanco-cremoso bajo su corteza son síntomas asociados a la infección causada por *A. mellea* (MORRISON *et al.*, 1991; RIZZO *et al.*, 1998; AGUÍN-CASAL, 2001; PÉREZ-SIERRA, 2003; BAUMGARTNER, 2004). La pudrición de raíces, junto con la presencia de un micelio blanco algodonoso sobre la superficie de éstas, son síntomas de la colonización por *R. necatrix* (SZTEJNBERG *et al.*, 1987; SZTEJNBERG y MADAR, 1980; MARTIJN y KRAUSS, 2005; PÉREZ-JIMÉNEZ, 2006; Beltrán-Paredes, 2006). La formación de chancros descrita previamente, pero en ausencia de micelio, se ha referenciado como un síntoma de la presencia de *Phytophthora* spp. (MATHERON *et al.* 1988; ÁLVAREZ *et al.*, 2006). En la zona radicular, la pudrición de raíces sin formación de micelio visible es otro de los síntomas descritos para *Phytophthora* spp. (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2001).



Figura 1. Mapa de localización del término municipal de Callosa d'En Sarrià en la provincia de Alicante.

En las últimas décadas se han citado varios de estos patógenos asociados a podredumbre de raíces, decaimiento y muerte de árboles de níspero: *R. necatrix* (SZTEJNBERG y MADAR, 1980; LIN y DUAN, 1988), y diferentes especies de *Phytophthora* como *P. cactorum* (FRISULLO *et al.*, 1997), *P. parasitica* (CHERN *et al.*, 1998), *P. palmivora* (CHERN *et al.*, 1998) e híbridos naturales de *P. parasitica* y *P. cactorum* (MAN IN 'T VELD, 2001; ARAGON-CABALLERO *et al.*, 2006). En España, estos patógenos son frecuentes afectando a árboles frutales pero, hasta la fecha, no han sido descritos en plantaciones de níspero.

Con el presente estudio se propuso caracterizar el síndrome de esta afección e identificar los agentes fúngicos presentes en plantaciones de nísperos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Prospección de parcelas y toma de muestras

Entre los años 2004 y 2007 se prospectaron un total de 31 parcelas de níspero (Cuadro 1) situadas en el término municipal de Callosa d'En Sarrià (provincia de Alicante) (Figura 1). En cada una de las parcelas se examinaron todos los árboles afectados, se anotó su sintomatología y se tomaron fotografías. Se tomaron muestras de chancros de tronco, raíces gruesas, raicillas y suelo de la rizosfera de al menos tres árboles afectados por parcela, aumentando el número en el caso de que éstos presentaran diferente sintomatología. En cada árbol afectado, para la toma de muestra de suelo, se siguió el siguiente proceso: se tomó suelo de cuatro puntos alrededor del tronco (100 g aproximadamente cada una), a una profundidad de 10-20 cm. Estas cuatro muestras se mezclaron, procesándose 100 g para la detección de *Phytophthora* spp.

Procesado de muestras

Los tejidos afectados se desinfectaron en un baño de hipoclorito sódico (1,5% de cloro activo) durante 1 minuto seguido de dos

baños con agua estéril y se sembraron en medio PDAS (39 g de patata-dextrosa-agar; 0,5 g de sulfato de estreptomycin; 1 litro de agua destilada) y medio Russell modificado (10 g de extracto de malta; 15 g de agar; 0,05 g de penicilina; 0,4 g de tiabendazol; 0,05 g de sulfato de estreptomycin; 0,025 g de polymyxina B sulfato; 1 litro de agua destilada) (RUSSELL, 1956; PÉREZ-SIERRA, 2003). En el caso de tejidos afectados en los que se sospechaba la posible presencia de oomicetos, las muestras se sumergieron en un baño de alcohol al 70 % durante 1 minuto seguido de dos baños de agua estéril y se sembraron en medio selectivo para oomicetos PARBH (17 g de harina de maíz-agar; 0,4 g de pimáricina; 0,125 g de ampicilina; 0,01g de rifampicina; 0,02 g de benomilo; 0,069g de himexazol; 1 litro de agua destilada) (JEFFERS y MARTIN, 1986). Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Las placas de aislamientos se incubaron en estufa a 25 °C en oscuridad durante 2-3 días. De las colonias resultantes se extrajeron puntas hifales que se repicaron a medio PDA para su posterior identificación.

Además, se realizaron cámaras húmedas con fragmentos de material vegetal procedentes de la base del tronco o de raíces de mayor grosor, las cuales se incubaron a 25 °C durante una semana.

Para las muestras de suelo se utilizaron manzanas verdes de las variedades Granny Smith o Golden Delicious como trampa vegetal y se procesaron mediante la técnica de Hendrix y Campbell (1970). En las manzanas se realizaron cuatro huecos con la ayuda de un sacabocados (1 cm de diámetro), se rellenaron con suelo, se saturaron con agua destilada estéril y se sellaron con cinta adhesiva transparente. Las manzanas se incubaron a 25° C durante 3-4 días hasta la aparición de lesiones firmes y de color marrón sobre la pulpa. Las manzanas se cortaron por la mitad y se realizaron aislamientos tomando porciones del límite de la lesión, que se sembraron en medio PARBH. De las colonias resultantes se extrajeron

puntas hifales las cuales se repicaron a medio PDA para su posterior identificación.

Identificación de *Rosellinia*

La identificación morfológica de los aislados de *Rosellinia* se hizo a partir de los cultivos puros, comprobándose bajo el microscopio la presencia de los hinchamientos hifales característicos de la especie *R. necatrix*.

La identificación molecular se llevó a cabo a partir de ADN genómico del micelio obtenido con el kit comercial EZNA Plant DNA Miniprep (Omega). Mediante la técnica PCR se amplificó la región ITS (Espaciadores Transcritos Internos) del ADN ribosómico con los cebadores específicos R2 (5'-CAA AAC CCA TGT GAA CAT ACC A-3') y R8 (5'-CCG AGG TCA ACC TTT GGT ATA G-3') (SCHENA *et al.*, 2002). Se utilizó el kit comercial MBL Taq DNA Polimerasa (Dominion). En cada reacción se utilizó una unidad de Taq, dNTPs a una concentración de 800 µM, MgCl₂ a una concentración de 2,5 mM y los cebadores a una concentración de 0,4 µM, todo ello en el tampón de reacción suministrado por el proveedor. De cada aislado se utilizó 1 µl de ADN genómico. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador programable (PTC 200, MJ Research), con un programa específico para el caso de *R. necatrix* consistente en 35 ciclos de 30 seg a 95° C, 30 seg a 50° C y 1 min a 72° C, seguidos de 10 min a 72° C de extensión final de los iniciadores (SCHENA *et al.*, 2002).

Los productos de la amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Identificación de *Armillaria*

Inicialmente se realizó una identificación morfológica a partir de las características de crecimiento de su micelio y la formación de rizormorfos que permitieron encuadrar los aislados dentro del género *Armillaria*.

Para la identificación morfológica tradicional de los aislados se realizó un estudio



Figura 2. Síntomas de decaimiento general del árbol: amarillo, seca de hojas y defoliación.



Figura 3. Producción abundante de frutos de pequeño tamaño que no llegan a desarrollarse.

de compatibilidad somática, enfrentando 9 aislados de *Armillaria* spp. procedentes de distintos árboles de níspero con los aislados haploides de referencia de cada una de las siguientes especies del género *Armillaria*: *A. cepistipes*, *A. gallica*, *A. mellea*, *A. ostoyae* y *A. tabescens*. La confrontación se realizó en placas de MEA al 2% (20 g de extracto de malta; 20 g de agar; 1 litro de agua destilada). Para ello, se colocaron dos discos de 3 mm de diámetro, uno de la especie de *Armillaria* a identificar y el otro del aislado haploide de referencia, separados entre sí 3 mm. Se realizaron 2 repeticiones por enfrentamiento y se mantuvieron en oscuridad a 24 °C durante 60 días. La identificación de los aislados se confirmó mediante la diploidización de los aislados de referencia, manifestada en el aspecto de la colonia, que pasó de tener un aspecto algodonoso a costroso.

La identificación molecular de los aislados de *Armillaria* se realizó utilizando la técnica PCR-RFLP. El proceso de extracción del ADN fue similar al descrito para *Rosellinia*. En este caso la PCR amplificó la región IGS (Espaciador Intergénico) del ADN ribosómico con los cebadores específicos LR12R (5'-CTG AAC GCC TCT AAG TCA GAA-3') y O-1 (5'-AGT CCT ATG GCC GTG GAT-3')

(Veldman *et al.*, 1981; Duchesne y Anderson, 1990). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 35 ciclos de 60 seg a 60° C, 120 seg a 72 °C y 60 seg a 95°C, seguidos de 10 min a 72° C de extensión final de los iniciadores. La digestión del producto de PCR amplificado se llevó a cabo añadiendo 0,5 µl del enzima de restricción *AluI* (Roche Diagnostics), e incubándolo a 37° C durante 1 hora. Los fragmentos digeridos por el enzima se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2,4%.

Identificación de *Phytophthora* spp.

Se llevó a cabo a partir de sus características morfológicas, fisiológicas y culturales utilizando como referencia las claves de ERWIN y RIBEIRO (1996). A partir de observaciones microscópicas del micelio, se observó la presencia de estructuras sexuales para confirmar su naturaleza homotática o heterotática. Para la observación de estructuras asexuales, a partir del margen de la colonia de cada aislado crecido en medio agar jugoV8 (200 ml de zumo V8; 2 g de CaCO₃; 15 g de agar; 800 ml de agua destilada), se extrajeron discos colonizados, que se colocaron en placas Petri con solución de extracto de suelo estéril. Tras 3 ó 4 días de



Figura 4. Seca de ramas y muerte del árbol.

incubación a 24 °C y fotoperiodo de 12 horas de luz, se observaron las características de los esporangios y otras estructuras asexuales inducidas.

En los aislados no homotáticos se indujo la producción de estructuras sexuales mediante el método de los cultivos duales (ERWIN y RIBEIRO, 1996). En una placa Petri conteniendo medio agar jugo V8 se colocó un disco colonizado con el aislado a identificar y a 3 cm de éste, un disco colonizado con el aislado de referencia de los grupos de apareamiento A1 ó A2. Los aislados de referencia CBS-308.62 y CBS-307.62, pertenecientes a los grupos de apareamiento A1 y A2 respectivamente, de *P. cryptogea* Pethbridge & Lafferty se utilizaron en los apareamientos. Como controles se cruzaron ambos aislados de referencia. Las placas se incubaron de 1 a 4 semanas en estufa a 24 °C y en oscuridad. Aislados que produjeron gametos sexuales con el aislado de referencia A1 se consideraron como A2, y los aislados que los formaron con el A2 se consideraron como A1.

La caracterización molecular de los aislados del género *Phytophthora* se llevó a cabo mediante la secuenciación de la región ITS. La metodología seguida para la extrac-



Figura 5. Síntomas sobre el tronco: formación de chancros en los que se observa placas de micelio bajo la corteza.

ción del ADN fue idéntica a la descrita anteriormente. En este caso, los cebadores utilizados en la reacción de PCR fueron ITS4 e ITS6 (White *et al.*, 1990; Cooke *et al.*, 2000). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, seguidos de 10 min a 72 °C de extensión final de los iniciadores.

La purificación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó con el “kit” “high pure PCR product purification” (Roche), siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Los fragmentos purificados fueron secuenciados, utilizando los cebadores ITS4 e ITS6 y el “kit” ABI PRISM, que utiliza terminadores marcados y como enzima se utilizó la Amplitaq ADN polimerasa (Perkin Elmer). La secuenciación se realizó con el secuenciador automático ABI 373 ADN sequencer por el Servicio de Secuenciación del ADN del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) de la Universidad Politécnica de Valencia.



Figura 6. Placa de micelio bajo la corteza de la raíz afectada.



Figura 7. Micelio algodonoso sobre raíces con síntomas de pudrición.

RESULTADOS

Sintomatología

Los primeros síntomas de decaimiento observados en los nísperos afectados fueron el amarilleo y la marchitez de las hojas, que posteriormente caían causando la defoliación del árbol (Figura 2). En muchos casos esta defoliación se produjo en tramos largos de las ramas, apareciendo penachos de hojas al final de éstas. En general, se observó pérdida de vigor y seca de ramas. En algunos casos, en árboles que presentaban un estado avanzado de la enfermedad, se produjo una fuerte fructificación, no llegando los frutos a completar su desarrollo y quedándose con un tamaño pequeño (Figura 3). Todos estos síntomas aumentaban en intensidad con el tiempo y los árboles finalmente morían (Figura 4).

En la base del tronco de bastantes árboles se observó un descortezamiento y la producción de chancros, los cuales podían extenderse a lo largo del tronco y base de las ramas (Figura 5). En muchos casos, al desprenderse la corteza, se observó debajo de ésta la presencia de placas de micelio de

color blanco o crema, las cuales se extendían en forma de abanico.

Al desenterrar las raíces, éstas presentaron pudriciones y, en algunos casos, apareció micelio visible el cual podía encontrarse bajo la corteza en forma de placas (Figura 6) o sobre la superficie de la raíz, con textura algodonosa (Figura 7).

Durante las prospecciones también se observó la muerte de plantones jóvenes, plantados en zonas en las que previamente habían muerto árboles con los síntomas de decaimiento descritos (Figura 8).

Identificación de los aislados de *Rosellinia*

La especie de *Rosellinia* que se aisló consistentemente de los árboles afectados fue *R. necatrix*. Se identificaron 27 aislados procedentes de 11 parcelas distintas (Cuadro 1). Todos los aislados mostraron un crecimiento sobre medio de cultivo PDA y cámara húmeda característico de *R. necatrix*: abundante producción de micelio blanco y algodonoso

Cuadro 1. Parcelas prospectadas y detección de *R. necatrix*, *A. mellea* y *Phytophthora* spp. en las mismas.

Fecha prospección	Parcela	<i>R.</i> <i>necatrix</i>	<i>A.</i> <i>mellea</i>	<i>Phytophthora</i> spp.				
				<i>P.</i> <i>cactorum</i>	<i>P.</i> <i>cambivora</i>	<i>P.</i> <i>citrophthora</i>	<i>P.</i> <i>cryptogea</i>	<i>P.</i> <i>nicotianae</i>
19/10/2004	1	-	-	+	-	-	-	-
	2	-	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	+	-	-	+
	4	-	+	-	-	-	-	-
	5	-	+	-	-	-	-	-
30/05/2005	6	-	+	-	-	-	-	-
	7	+	-	-	-	-	-	-
	8	-	+	-	-	-	-	-
	9	+	+	-	-	-	-	-
26/09/2006	10	+	+	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	+	-
	12	+	-	-	-	-	+	-
	13	-	+	-	-	-	-	-
	14	+	-	-	-	-	-	-
15/11/2006	15	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-
	17	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	+	-	-	-	-	-
	19	+	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-
	22	+	-	-	-	-	-	-
12/02/2007	23	-	+	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	+	-	-	-	-	-
	26	+	-	-	-	-	-	-
	27	+	-	-	-	-	-	-
18/04/2007	28	-	-	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	+	-	-
	30	-	+	-	-	-	-	+
	31	+	-	-	-	-	-	-
Total de parcelas de las que se aislaron los diferentes hongos		11	13	1	1	1	2	2

+/-: indica la presencia o ausencia de cada una de las especies fúngicas en las parcelas de número prospectadas

(Figura 9), con crecimiento rápido que, transcurridos unos días, adquiría una coloración oscura. En observaciones al microscopio, se observaban los hinchamientos piriformes junto a los tabiques hifales característicos de esta especie (Figura 10). La electroforesis de los productos de amplificación mostró en

todos los aislados una banda específica para *R. necatrix* de 493 pb.

Identificación de los aislados de *Armillaria*

En el caso de *Armillaria* se identificaron 23 aislados procedentes de 13 parcelas dis-

tintas (Cuadro 1). Sobre medio de cultivo PDA estos aislados mostraron un patrón de crecimiento lento, con la formación de un micelio costroso, el desarrollo de rizomorfos y un progresivo oscurecimiento del medio de cultivo (Figura 11).

Todos los aislados procedentes de níspero fueron compatibles con el aislado haploide de referencia de *A. mellea*, adoptando este último un aspecto costroso (Figura 12a), por lo que los aislados fueron identificados como *A. mellea*. Además, la confrontación de todos los aislados procedentes del níspero con el resto de especies fue incompatible, manteniendo los aislados haploides un aspecto algodonoso (Figura 12b).

El estudio molecular de los aislados mediante PCR-RFLP con el enzima de restricción *AluI*, dio como resultado las bandas de restricción específicas para *A. mellea*. Diez de los aislados: AR-8, AR-9, AR-99, AR-104, AR-105, AR-106, AR-107, AR-108, AR-109 y AR-110 mostraron tres bandas por encima de 100 pb (320, 180 y 155 pb), por lo que se identificaron como *A. mellea* de patrón 2. El resto de los aislados mostraron dos bandas por encima de 100 pb (320 y 180 pb), que identificaron a la especie como *A. mellea* de patrón 1 (Pérez-Sierra *et al.*, 1999).



Figura 8. Plantón con síntomas de defoliación y marchitez junto a árboles sintomáticos y tocón de un árbol muerto.

Identificación de los aislados de *Phytophthora* spp.

A partir de las prospecciones realizadas, se obtuvieron un total de 25 aislados de *Phytophthora* procedentes de 6 parcelas (Cuadro 1). Sobre la base de las características morfológicas y fisiológicas de cada aislado se identificaron 5 especies: *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, y *P. nicotianae*. Los aislados de *P. cactorum* y *P. cambivora* procedían de aislamientos de material vegetal, mientras que los de *P. citrophthora*, *P. cryptogea* y *P. nicotianae* procedían de aislamientos de suelo utilizando manzanas como trampa vegetal.

Las características a partir de las cuales se identificaron estas especies se muestran la Cuadro 2. Los esporangios de *P. nicotianae*, *P. citrophthora* y *P. cactorum* se caracterizaron por ser papilados, mientras que los de *P. cambivora* y *P. cryptogea* fueron no papilados. En el caso de *P. citrophthora*, un 20% de los esporangios observados fueron bipapilados. Los aislados pertenecientes a *P. cactorum* se mostraron caducos (Figura 13), el pedicelo era corto promediando 4,3 μm de longitud. Hubo una amplia variabilidad en la forma y el tamaño de los esporangios de las diferentes especies. Sólo los aislados de *P. nicotianae* presentaron clamidosporas, con un diámetro medio de 30,7 μm . Por otra parte, tanto los aislados de *P. cambivora* como los de *P.*



Figura 9. Raíces en cámara húmeda con abundante micelio de *R. necatrix*.



Figura 10. Hinchamientos hifales característicos de *R. necatrix*.



Figura 11. Micelio y rizomorfos de *A. mellea* sobre medio de cultivo PDA.

cryptogea se caracterizaron por formar hinchamientos hifales con distintas formas (Figura 14).

Con respecto a las estructuras sexuales, los aislados de *P. cambivora*, *P. cryptogea* y *P. nicotianae* fueron heterotálicos, los de *P. citrophthora* fueron estériles y los de *P. cactorum* homotálicos (Figura 15). Las especies *P. cambivora*, *P. cryptogea*, y *P. nicotianae*

presentaron anteridios anfígenos. Las oosporas de *P. cambivora* y *P. cryptogea* fueron pleróticas mientras que *P. nicotianae* las presentó apleróticas. *P. cactorum* presentó anteridios paraginos con oosporas pleróticas. Excepto *P. cambivora*, que presentó oosporas de superficie ornamentada (Figura 16), las demás especies de *Phytophthora* presentaron oosporas de superficie lisa.

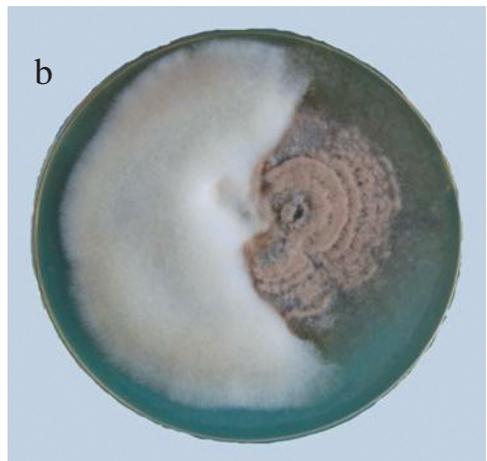
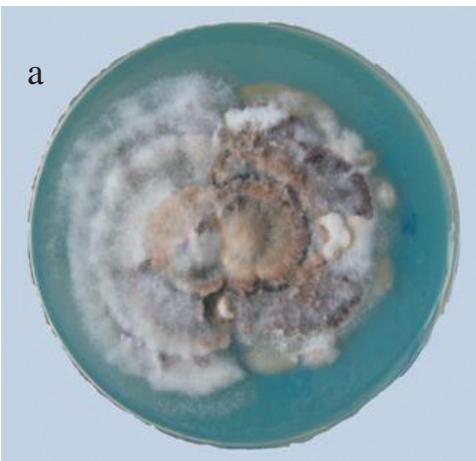


Figura 12 (a y b). Reacción de compatibilidad mostrada en la confrontación del aislado haploide de referencia de *A. mellea* con el aislado de *A. mellea* de níspero (a). Reacción de incompatibilidad mostrada en la confrontación del aislado haploide de referencia de *A. tabescens* con el aislado de *A. mellea* de níspero (b)

Cuadro 2. Principales características de las distintas especies de *Phytophthora* aisladas de las parcelas de nispero estudiadas.

Especie	Características morfológicas										Características fisiológicas		
	Estructuras asexuales					Estructuras sexuales					Patrón de crecimiento	Temperatura óptima (°C)	
	Long. (µm)	Anch. (µm)	Ratio L/A	Papilación	Caducidad esporangios	Ciandiosporas Ø (µm)	Tipob	Anteridio ^c	Oosporas Ø (µm)				
<i>P. cambivora</i>	37,5 (41,9)	47,5 (22,5)	1,56	No papilado	-	-	HE	A	31,5	Sin patrón	25,5		
<i>P. cactorum</i>	22,5 (36,4)	52,5 (15)	1,36	Papilado	+ ^a	-	HO	P	28,4	Pulverulenta	24,3		
<i>P. citrophthora</i>	20,0 (38,6)	62,5 (15)	1,38	Papilado	-	-	ES	-	-	Estelada	23,6		
<i>P. cryptogea</i>	30 (37,2)	52,5 (20)	1,51	No papilado	-	-	HE	A	26,1	Petaloides	23,1		
<i>P. nicotianae</i>	17,5 (51,7)	70 (12,5)	1,25	Papilado	-	30,7	HE	A	30,15	Estolonífera	29,3		

^a Pedicelo corto (< 5 µm de longitud)

^b HE: Heterotálico; ES: Estéril; HO: Homotálico

^c Anteridios: A = anfígenos; P = Parágenos



Figura 13. Esporangio caduco perteneciente a la especie *P. cactorum*.

Se observaron diferencias en el patrón de crecimiento de las colonias en placa de medio de cultivo PDA entre las distintas especies. *P. citrophthora* presentó un crecimiento tipo estelado, con micelio superficial; *P. cactorum* desarrolló un micelio superficial pulverulento; *P. cambivora* no siguió ningún patrón específico de crecimiento; el crecimiento de *P. cryptogea* fue de tipo petaloide y *P. nicotianae* desarrolló una colonia estolonífera (ERWIN y RIBEIRO, 1996).



Figura 14. Hinchamientos hifales de *P. cambivora*.



Figura 15. Oospora de *P. cactorum*.

Del ADN extraído y mediante la técnica de PCR se amplificó la región ITS una única banda entre 800 y 900 pb en cada aislado. Estos productos de PCR purificados fueron secuenciados. Las secuencias ITS de los aislados se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank mediante el programa BLAST del NCBI (Nacional Center of Biotechnology Information, USA). Los resultados mostraron una semejanza del 100% entre los aislados de *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. cactorum* y *P. cambivora* y las accesiones correspondientes a estas especies incluidas en la base de datos. En el caso de los aislados de *P. cryptogea*, la concordancia fue del 99%.

Frecuencia y distribución de los patógenos

La frecuencia con que se detectó cada uno de los patógenos de forma aislada y conjunta en las parcelas aparece en la Cuadro 3. El patógeno que se aisló con mayor frecuencia fue *A. mellea* representando un 40,6% del total, mientras que *R. necatrix* y *Phytophthora* spp. representaron un 34,4% y un 18,7% respectivamente. En 8 de las parcelas prospectadas no se aisló ningún patógeno, lo que representa un 25% del total. Del total de parcelas muestreadas, más de la mitad (59,4%)



Figura 16. Oospora de superficie ornamentada de *P. cambivora*.

sólo tenían uno de los tres patógenos estudiados, mientras que en el 15,5% de las parcelas prospectadas se aislaron dos o tres patógenos diferentes.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se han caracterizado los síntomas del decaimiento del níspero: clorosis, defoliación, seca de ramas, formación de chancros en la base del tronco, pudrición de raíces con presencia o ausencia de micelio y marchitez. La muerte de árboles ocurrió de forma lenta en árboles de mayor edad o rápidamente en plantones jóvenes.

En el tronco, raíces y/o suelo de los árboles afectados se detectaron los hongos del suelo *Rosellinia necatrix*, *Armillaria mellea* y *Phytophthora* spp., que son patógenos frecuentes en cultivos leñosos. La identificación de estos patógenos se realizó morfológicamente y se utilizaron las técnicas moleculares para confirmar esta identificación.

En el caso de *R. necatrix*, los aislados desarrollaron los hinchamientos hifales característicos de la especie (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2006) y se confirmó molecularmente por el tamaño del producto de PCR obtenido que

Cuadro 3. Distribución de *R. necatrix*, *A. mellea* y *Phytophthora* spp. en las parcelas afectadas.

	Total	%
Parcelas sólo con <i>R. necatrix</i>	7	21,9
Parcelas sólo con <i>A. mellea</i>	9	28,1
Parcelas sólo con <i>Phytophthora</i> spp.	3	9,4
Parcelas con <i>R. necatrix</i> y <i>A. mellea</i>	2	6,2
Parcelas con <i>R. necatrix</i> y <i>Phytophthora</i> spp.	1	3,1
Parcelas con <i>A. mellea</i> y <i>Phytophthora</i> spp.	1	3,1
Parcelas con <i>R. necatrix</i> , <i>A. mellea</i> y <i>Phytophthora</i> spp.	1	3,1
Total de parcelas con <i>R. necatrix</i>	11	34,4
Total de parcelas con <i>A. mellea</i>	13	40,6
Total de parcelas con <i>Phytophthora</i> spp.	6	18,7
Parcelas donde no se ha aislado ningún patógeno	8	25

coincidió con el descrito por SCHENA *et al.* (2002) como específico para *R. necatrix*.

A. mellea mostró un patrón de crecimiento en medio de cultivo similar al descrito por Pérez-Sierra (2003) y la identificación molecular de los aislados mediante la técnica PCR con los cebadores 0-1 y LR12R y su posterior digestión con el enzima *AluI* identificó a todos los aislados como *A. mellea*, tanto de patrón 1 como de patrón 2 descritos por PÉREZ-SIERRA *et al.* (1999). Esta variación intraespecífica fue también observada por Coetzee *et al.* (2000) tras la observación de diferencias morfológicas, culturales y moleculares. Por otra parte, los estudios de confrontación de los aislados con las cepas haploides de cinco especies de *Armillaria* confirmaron la identificación de éstos como *A. mellea*, al ser capaz de diploidizar únicamente el micelio de esta especie (GUILLAUMIN *et al.*, 1991).

En el caso de *Phytophthora*, se identificaron cinco especies distintas: *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. cambivora*, *P. cactorum* y *P. cryptogea*. En todos los casos, las características de los esporangios de los aislados en cuanto a capacidad, papilación, forma y medidas coincidieron con las descritas por ERWIN y RIBEIRO (1996) para cada una de las especies. Lo mismo ocurrió con el patrón de crecimiento del micelio, la presencia y dimensiones de las clamidosporas y con el carácter homotático o heterotático de las

especies, así como con el tamaño de las oosporas. Finalmente, el estudio molecular de los aislados de cada especie mostró una alta concordancia entre la secuencia de ADN de éstos y las incluidas en la base de datos GenBank. Estudios previos realizados por FRISULLO *et al.*, (1997) en Italia, CHERN *et al.* (1998) y MAN IN `T VELD (2001) en Taiwán, y por ARAGÓN-CABALLERO *et al.* (2006) en Perú, encontraron aislados de *Phytophthora* spp. asociados al decaimiento del níspero. FRISULLO *et al.*, (1997) identificaron estos aislados como *P. cactorum*, CHERN *et al.* (1998) los identificaron como *P. nicotianae*, mientras que MAN IN `T VELD (2001) y ARAGÓN-CABALLERO *et al.* (2006), tras el estudio de sus características morfológicas y el análisis de la secuencia ITS, los identificaron como un híbrido interespecífico de *P. nicotianae* y *P. cactorum*. En nuestro caso, se lograron identificar tres especies de *Phytophthora* que no habían sido anteriormente citadas en níspero: *P. citrophthora*, *P. cambivora* y *P. cryptogea*. Además, al contrario que los aislados de MAN IN `T VELD (2001) y ARAGÓN-CABALLERO *et al.* (2006), las características de los aislados de *P. nicotianae* y *P. cactorum* se correspondían con las descritas por ERWIN y RIBEIRO (1996), para estas especies, no tratándose por tanto, de híbridos interespecíficos.

El estudio de la frecuencia y distribución de los patógenos en las diferentes parcelas

mostró que la especie predominante fue *A. mellea*, seguida de *R. necatrix*, y finalmente *Phytophthora* spp. La menor frecuencia de estos oomicetos puede deberse a las dificultades para el aislamiento de *Phytophthora* tanto de material vegetal como de suelo, muy influenciado por aspectos como la temperatura, las fluctuaciones estacionales o el ciclo biológico del cultivo. De un 25% de las parcelas muestreadas no se consiguió aislar ningún hongo. Este hecho puede ser debido a la dificultad para aislar los patógenos descritos. En otros casos la observación de unos síntomas generales de decaimiento puede no estar asociada a la presencia de patógenos en el suelo, sino a problemas ambientales o de manejo. La detección de un único patógeno ocurrió en un 59,4% del total de parcelas, mientras que únicamente el 15,5% se encontraron dos o tres patógenos a la vez. La baja incidencia de parcelas con detección simultánea de dos o tres especies fúngicas

sugiere que un mismo síntoma aéreo de decaimiento general del árbol podría estar asociado a la presencia en el suelo de diferentes patógenos: *A. mellea*, *R. necatrix* o *Phytophthora* spp., siendo necesario ver otros síntomas en raíces o base del tronco a parte del decaimiento.

Serían necesarios futuros estudios de patogenicidad de cada una de estas especies en níspero a fin de determinar qué papel juega cada uno de estos patógenos en el desarrollo del síndrome de decaimiento del níspero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Cooperativa de Callosa d'En Sarrià y en especial a Esteban Soler el apoyo para la realización de este estudio y a Olga Aguin Casal de la Estación Fitopatológica "Do Areeiro" el haber cedido los cultivos haploides del género *Armillaria*.

ABSTRACT

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E., A. PÉREZ-SIERRA, L. A. ÁLVAREZ, M. LEÓN, P. ABAD-CAMPOS, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. 2009. Fungal agents detected in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) orchards showing decline symptoms in Alicante province. *Bol. San. Veg. Plagas*, 35: 453-467.

Spain is the first producer of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) in the Mediterranean area and the second world's producer after China. In the last years has been detected an increasing problem characterized by the decline and death of the trees, affecting both new orchards and older ones. The objective of this study was to typify the symptomatology of the disease and determine the causal agents. For this, 31 loquat orchards were surveyed in the area of Callosa d'En Sarrià (Alicante province). Through these observations the syndrome of the disease was characterized as: chlorosis and wilting of leaves joined to the defoliation of the tree and dry of the branches. It was also observed the presence of canker in the base of the trunk and root rot, both sometimes covered by mycelium. Occasionally, gum exudations were produced in the trunk. The death of the trees occurs slowly in older trees or quickly in young ones. The causal agents were identified by morphological and molecular techniques. From the affected orchards the following soilborne fungi were detected: *Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*, *Phytophthora nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. cambivora*, *P. cactorum* and *P. cryptogea*. The main species was *A. mellea* (40.6% of the sampled orchards) followed by *R. necatrix* (34.4%) and *Phytophthora* spp. (18.7%). In more than half of the surveyed orchards (59.4%) only one pathogen was isolated.

Key words: *Armillaria*, *Phytophthora*, *Rosellinia*, soil-borne fungi.

REFERENCIAS

- AGUÍN-CASAL, O. 2001. Detección, identificación y control de *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) Kummer en vid. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- ÁLVAREZ, L.A., VICENT, A., GARCÍA-RELLÁN, D., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P., DE LA ROCA, E., BASCÓN, J., ARMENGOL, J., ABAD-CAMPOS, P., ALFARO-LASSALA, A., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2006. Muerte de árboles cítricos causada por ataques de *Phytophthora citrophthora* a ramas principales. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 241-258.
- ARAGÓN-CABALLERO, L., HURTADO-GONZÁLEZ, O.P., FLORES-TORRES J., FIGUEROA C., LAMOUR K.H. 2006. La pudrición radicular del níspero (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) ocasionada por *Phytophthora*. *Fitopatología*, **41**: 25-33.
- BAUMGARTNER, R.K. 2004. Root collar excavation for post-infection control of *Armillaria* root disease of grapevine. *Plant Disease*, **88**: 1234-1240.
- BELTRÁN-PAREDES, C. 2006. *Rosellinia necatrix* Prill. Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales. Ficha 198. MAPA. Madrid.
- CALÍBRESE, F. 2006. Origen de la especie. En: Agustí M., Reig C. y Undurraga P. (eds.) El cultivo del níspero japonés. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile y Universidad Politécnica de Valencia, España, 305 pp.
- CHERN, L.L., ANN, P.J., YOUNG, H.R. 1998. Root and foot rot of loquat in Taiwan caused by *Phytophthora*. *Plant Disease*, **82**: 651-656.
- COETZEE, M.P.A., WINGFIELD, B.D., HARRINGTON, T.C., DALEVI, D., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, M.J. 2000. Geographical diversity of *Armillaria mellea* s. s. based on phylogenetic analysis. *Mycologia*, **92**: 105-113.
- COOKE, D.E.L., DRENTH, A., DUNCAN, J.M., WAGELS, G., BRASIER, C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, **30**: 17-32.
- DUCHESNE, L.C., ANDERSON, J.B. 1990. Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria*. *Mycological Research*, **94**: 266-269.
- ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 562pp.
- FRISULLO, S., CACCIOLA, S.O., PANE, A. 1997. Disseccamenti rameali del nespolo del Giappone causati da *Phytophthora cactorum*. *Informatore Fitopatologico*, **47**: 30-32.
- GULLAUMIN, J.-J., ANDERSON, A.B., KORHONEN, K. 1991. Life cycle, interfertility and biological species. En: Shaw III CG y Kile GA (eds). *Armillaria* root disease. Agriculture handbook. No. 69. Forest Service, USDA, Washington DC.
- HENDRIX, F.F., CAMPBELL, W.A. 1970. Distribution of *Phytophthora* and *Pythium* species in soils in the continental United States. *Canadian Journal of Botany*, **48**: 377-384.
- JEFFERS, S.N., MARTIN, S.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, **70**: 1038-1043.
- LIN, Y.S., DUAN, C.H. 1988. White rot of loquat and its pathogen. *Journal of Agricultural Research of China*, **37**: 305-312.
- MAN IN 'T VELD, W.A. 2001. First report of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum* on loquat in Taiwan. *Plant Disease*, **85**: 98.
- MARTIJN TEN HOOPEN, G., KRAUSS ULRIKE. 2005. Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*: a review. *Crop Protection*, **25**: 89-107.
- MATHERON, M.E., YOUNG, D.J., MATEJKA, J.C. 1988. *Phytophthora* root and crown rot of apple trees in Arizona. *Plant Disease*, **72**: 481-484.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. 2007. Anuario de estadística agroalimentaria 2007. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 366 pp.
- MORRISON, D.J., WILLIAMS, R.E., WHITNEY, R.D. 1991. Infection, disease development, diagnosis and detection. En: Shaw III CG and Kile GA (eds). *Armillaria* root disease. Agriculture handbook. No. 69. Forest Service, USDA, Washington DC.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, R.M. 2006. A review of the biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix*, the cause of white root rot disease of fruit trees and other plants. *Journal of Phytopathology*, **154**: 257-266.
- PÉREZ-SIERRA, A. 2003. Systematics, diagnostics and ecology of the fungal genus *Armillaria*. Doctoral Thesis. School of Biological and Chemical Sciences. University of London.
- PÉREZ-SIERRA, A., WHITEHEAD, D., WHITEHEAD, M. 1999. Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species. *Mycological Research*, **103**: 1621-1636.
- RIZZO, D.M., WHITING, E.C., ELKINS R.B. 1998. Spatial distribution of *Armillaria mellea* in pear orchards. *Plant Disease*, **82**: 1226-1231.
- RUSSELL, P. 1956. A selective medium for the isolation of basidiomycetes. *Nature*, **177**: 1038-1039.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E., MUÑOZ-GARCÍA, M., BRASIL, R.C.M., TRAPERO-CASAS, A. 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. *Plant Disease*, **85**: 411-416.
- SCHENA, L., NIGRO, F., IPPOLITO, A. 2002. Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 355-366.
- SOLER, E., MARTÍNEZ-CALVO, J., YACER, G., BADENES, M.L. 2007. Loquat in Spain: production and marketing. *Acta Horticulturae*, **750**: 45-47.
- SZTEJNBERG, A., FREEMAN, S., CHET, I., KATAN, J. 1987. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and in apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, **71**: 365-369.
- SZTEJNBERG, A., MADAR, Z. 1980. Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white root rot disease in fruit trees. *Plant Disease*, **64**: 662-664.
- VELDMAN, G.M., KLOOTWIJK, J., DE REGT, V.C.H.F., RUDI, R.J. 1981. The primary and secondary struc-

ture of yeast 26S rRNA. *Nucleic Acids Research*, **9**: 6935-6952.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White T.J. (eds). PCR

protocols. A guide to methods and applications (pp 315-322). Academic Press. San Diego. 482 pp.

(Recepción: 19 enero 2009)

(Aceptación: 8 junio 2009)