

La podredumbre radical del pinsapo I: Identificación específica del agente causal

M. E. SÁNCHEZ, N. LUCHI, J. E. SÁNCHEZ, J. J. JIMÉNEZ, A. TRAPERO, P. CAPRETTI

La podredumbre radical causada por *Heterobasidion* es una grave enfermedad que afecta a las masas de *Abies pinsapo* en el sur de España. Para la identificación específica del patógeno que causa esta enfermedad, se recogieron muestras de árboles sintomáticos en siete localizaciones del Parque Natural de la Sierra de las Nieves (Málaga). Los aislados monobasidiospóricos obtenidos se identificaron mediante tests de apareamiento con aislados de referencia de grupo de interesterilidad conocido. Todos los aislados obtenidos de *A. pinsapo* pertenecen al grupo de interesterilidad F, también identificado como la especie *Heterobasidion abietinum*.

M. E. SÁNCHEZ, J. E. SÁNCHEZ, J. J. JIMÉNEZ, A. TRAPERO. Departamento de Agronomía, Patología Agroforestal, Universidad de Córdoba, España.
N. LUCHI, P. CAPRETTI. Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sez. Patologia Vegetale, Università degli Studi di Firenze, Italia.

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

INTRODUCCIÓN

Abies pinsapo Boiss. es una especie autóctona protegida que crece únicamente en las provincias de Málaga y Cádiz. Esta especie de abeto constituye una singularidad botánica de elevado valor ecológico (ARISTA *et al.*, 1997). Por esta razón, las áreas de distribución natural de *A. pinsapo* están declaradas como Parques Naturales protegidos: Sierra de las Nieves, Sierra de Grazalema y Sierra Bermeja. *Abies pinsapo* suele crecer en masas puras, pero ocasionalmente comparte su hábitat con otras especies arbóreas, como *Quercus faginea*, *Q. rotundifolia*, *Pinus halepensis*, *P. pinaster* y *Juniperus oxycedrus* (ARISTA *et al.*, 1997).

Para conocer el estado fitosanitario de *A. pinsapo*, en 2001 se estableció una red de seguimiento de 1 x 1 Km, densificando la Red Europea de Seguimiento de Daños en

los Bosques (MONTROYA y LÓPEZ, 1997, NAVARRO y CALZADO, 2004). En las prospecciones de campo llevadas a cabo en estos ecosistemas en 2002, se localizaron un total de 81 focos de enfermedad, 72 de ellos situados en la Sierra de las Nieves (NAVARRO *et al.*, 2003). En estos focos los árboles mostraban una enfermedad radical que daba lugar a su muerte en pie o bien a su caída en verde como consecuencia de la podredumbre y destrucción de sus raíces de anclaje. En estos árboles caídos y también en tocones antiguos presentes en los focos, se localizaron cuerpos fructíferos identificados como *Heterobasidion annosum* Fr. Bref. *sensu lato* (SÁNCHEZ *et al.*, 2005). Dentro de la especie *Heterobasidion annosum* s l se han descrito en Europa tres grupos de interesterilidad que además muestran una especificidad de huésped más o menos marcada. El grupo de interesterilidad P causa podredumbre radical en

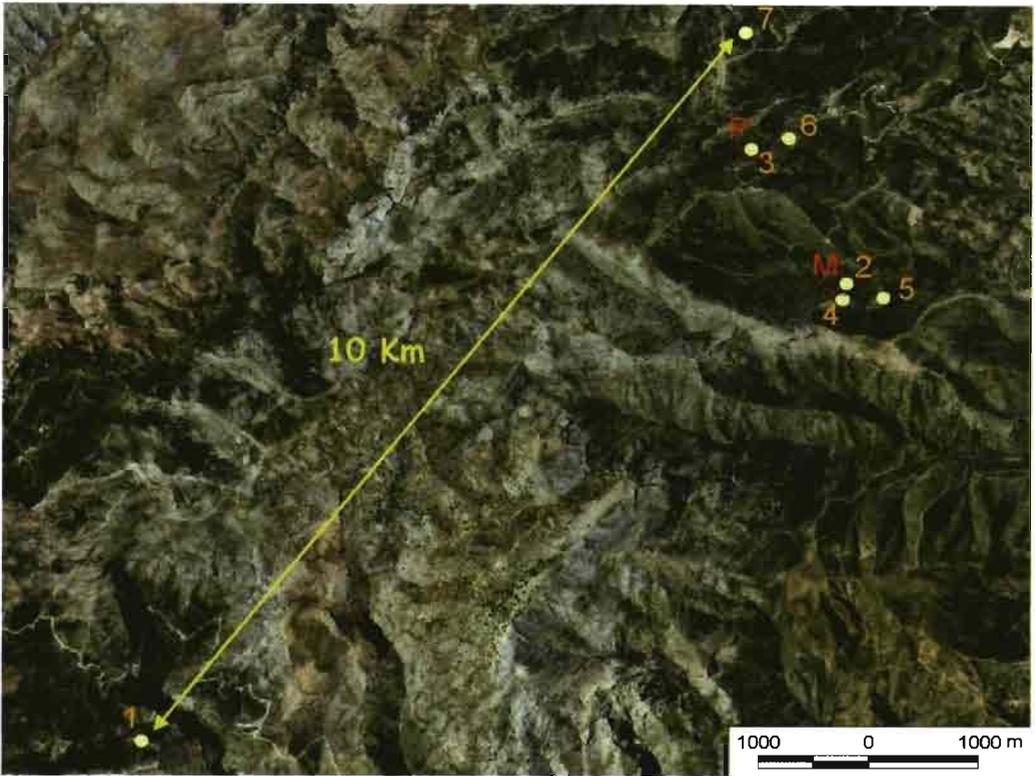


Figura 1. Área prospectada en el Parque Natural de la Sierra de las Nieves. Se encontraron basidiocarpos de *Heterobasidion abietinum* en La Nava (1), Merendero (2), Pozo de la Nieve (3), Gamones (4) y Alhucemal (5). En Puerto Saucillo (6) y La Chaparrera (7), no se localizaron basidiocarpos y el hongo fue aislado de muestras tomadas en árboles sintomáticos.

el género *Pinus*, mientras que el grupo S aparece infectando *Picea* (NIEMELÄ y KORHONEN, 1998). Posteriormente se describió un nuevo grupo de intersterilidad, el F, que en ensayos *in vitro* muestra un cierto grado de compatibilidad sexual con el grupo S y que infecta distintas especies del género *Abies* (CAPRETTI *et al.*, 1990). Estos grupos de intersterilidad han sido recientemente descritos como especies individuales (NIEMELÄ y KORHONEN, 1998).

A pesar de que *H. annosum* es un patógeno muy frecuente que causa podredumbre radical de coníferas en todo el hemisferio norte (KORHONEN *et al.*, 1998), raramente se ha citado en España, aunque recientemente aparece como un factor asociado al decaimiento de *Abies alba* en los Pirineos (CAMARERO, 2000).

Con estos antecedentes y debido a la gravedad creciente de la enfermedad en la Sierra de las Nieves, el objetivo de este trabajo ha sido identificar la especie de *Heterobasidion* que causa la podredumbre radical del pinsapo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de aislados

En el otoño de 2004, el mayor pinsapar de Andalucía, situado en el Parque Natural de la Sierra de las Nieves (Málaga), fue prospectado para localizar la presencia de basidiocarpos de *Heterobasidion* asociados a la podredumbre radical del pinsapo.

Se recorrió un área de aproximadamente 700 ha de pinsapar. Las muestras de *Heterobasidion* se recolectaron en siete localizaciones distintas, separadas entre 1,2 y 10 Km unas de otras y situadas a una altitud de 1000 a 1200 m (Figura 1). Las muestras consistieron en basidiocarpos en cinco de las siete localizaciones, recogiendo en total nueve especímenes de raíces afectadas en árboles desarraigados. En las otras dos localizaciones no se encontraron basidiocarpos y por este motivo se tomaron muestras de madera podrida de la raíz de árboles afectados. La distancia mínima entre muestras individuales varió de 10 a 50 m en las diferentes localizaciones.

Los basidiocarpos fueron mantenidos en frío (5-10° C) en el interior de bolsas de plástico y protegidos de la luz hasta que se indu-

jo la descarga de basidiosporas en el laboratorio. Para ello, trozos limpios de basidiocarpo se colocaron en el extremo de placas de Petri conteniendo el medio de cultivo agar-malta (MA) al 1,5%, de forma que la tapa sujetara el trozo (Figura 2) y la esporada se depositara en la superficie del agar, lo que ocurrió al cabo de 20-30 min de incubación a temperatura ambiente.

Las basidiosporas germinadas se localizaron mediante observación microscópica y se transfirieron individualmente a placas de MA por medio de una aguja estéril. De cada basidiocarpo se obtuvieron entre dos y seis cultivos monobasidiospóricos.

Las muestras de madera podrida se tomaron de árboles en pie que mostraban síntomas de la enfermedad mediante una barrena de Pressler, introduciéndola a la



Figura 2. Obtención de aislados monobasidiospóricos mediante la recolección de la esporada de un trozo de basidiocarpo de *Heterobasidion* en el borde de una placa de Petri conteniendo el medio de cultivo MA al 1,5%.



Figura 3. Toma de muestras de madera podrida de árboles en pie que mostraban síntomas de la enfermedad mediante una barrena de Pressler. Nótase cómo la barrena se introduce a la altura de la línea del suelo en dirección a la raíz.

altura de la línea del suelo en dirección a la raíz (Figura 3). Los cilindros de madera obtenidos se guardaron en tubos de plástico estériles y se mantuvieron en frío y protegidos de la luz hasta su procesamiento en el laboratorio. Para el aislamiento del hongo, los cilindros se desinfectaron superficialmente con etanol, se cortaron en pequeños segmentos y se sembraron en placas de Petri conteniendo el medio BAPS (Bacto-peptona-Agar con PCNB y Estreptomycin; KUHLMAN y HENDRIX, 1962), semiselectivo para *Heterobasidion*. Las colonias fúngicas obtenidas tras la incubación de las placas a 20° C se transfirieron a MA.

Todos los aislados obtenidos se observaron al microscopio (x100) por el reverso de las placas para la eventual observación de uniones en fíbula, características del estado heterocariótico (Figura 4).

Tests de apareamiento

Todos los aislados obtenidos se cruzaron con aislados de referencia homocarióticos de grupo de interesterilidad conocido, representando a las tres especies *H. abietinum* (Niemelä & Korhonen) (grupo F), *H. parviporum* (Niemelä & Korhonen) (grupo S) y *H. annosum* Fr. Bref. *sensu stricto* (grupo P) (NIE-MELÄ y KORHONEN, 1998). Cada aislado pro-

cedente de pinsapo se confrontó individualmente con dos aislados de referencia de cada especie. 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 del aislado de referencia (Figura 5). Las placas se incubaron durante 4 semanas a temperatura ambiente y al cabo de este tiempo se buscó la presencia de fíbulas, indicativo de la presencia de micelio heterocariótico y por tanto de compatibilidad sexual, observando el reverso de las placas al microscopio (x 100). En el caso de aislados procedentes de madera, heterocarióticos en origen, la presencia de fíbulas se verificó en la colonia original del aislado de referencia. Además, en todos los casos se consignaron los cambios ocurridos en la morfología de las colonias tras su heterocariotización así como la formación de barreras miceliales entre colonias en los casos de incompatibilidad sexual.

Los aislados de referencia utilizados aparecen en el Cuadro I y proceden de la micoteca del Departamento de Biotecnología Agraria de la Universidad de Florencia (Italia).

RESULTADOS

La presencia de basidiocarpos de *Heterobasidion* no fue muy frecuente en la zona prospectada. Fueron localizados ocasional-



Figura 4. Uniones en fíbula características del estado heterocariótico presentes en el micelio de *Heterobasidion* (x100).



Figura 5. Test de apareamiento entre aislados de *Heterobasidion* obtenidos de pinsapo y aislados de referencia. a) Aislado AP58 x AP58, b) AP58 x *H. abietinum* FO3164/1, c) AP58 x *H. parviporum* S03245/1, d) AP58 x *H. annosum sensu stricto* P03018/1. Nótese la aparición de barreras de incompatibilidad en c) y d), mientras que en b) el micelio heterocariótico resultante del apareamiento forma una colonia homogénea.

mente en las raíces de árboles desarraigados (Figura 6) o en el interior de raíces o parte basal del tronco podrido de pinsapos enfermos en pie, generalmente cubiertos por residuos vegetales o suelo (Figura 7), por lo que su presencia no resultó evidente. El tamaño de dichos basidiocarpos varió de 1 a 30 cm de diámetro y se encontraron tanto aislados como grupos de 2-3 basidiocarpos.

Siguiendo la metodología descrita, se obtuvieron un total de 30 cultivos monobasidiospóricos (homocarióticos) procedentes de nueve basidiocarpos, y nueve aislados adicionales procedentes de madera podrida (heterocarióticos).

Tests de apareamiento

Cuando se enfrentaron los aislados homocarióticos obtenidos de *A. pinsapo* con los aislados de referencia de *H. abietinum* (grupo de intersterilidad F) se observó la reacción de compatibilidad en el 95% de los casos (Cuadro 1). A las 4 semanas de incubación se detectó la presencia de micelio heterocariótico mediante la observación de uniones en fíbula, que generalmente aparecieron en ambas colonias originales. En ocasiones se produjo la fusión de las dos colonias homocarióticas, ya indistinguibles, en una sola colonia heterocariótica (Figura 5b). A partir de las 6 semanas de incubación, la



Figura 6. Presencia de basidiocarpos de *Heterobasidion* en las raíces de un pinsapo desarraigado. Obsérvese también la podredumbre de las raíces leñosas.

morfología del micelio heterocariótico cambió, pasando del color blanco original a un color beige o marrón rojizo.

Por otra parte, los aislados homocarióticos aislados de *A. pinsapo* resultaron completamente incompatibles con los aislados de referencia de *H. annosum* s.s. (grupo de interesterilidad P), observándose barreras miceliarias entre ambos aislados enfrentados (Figura 5d), pero resultaron parcialmente compatibles con los aislados de referencia de *H. parviporum* (grupo de interesterilidad S), aunque la frecuencia de aislados que mostraron reacciones compatibles fue bastante baja (6,7 %).

Sin embargo, estas reacciones de compatibilidad con *H. annosum* s.s. y *H. parviporum* fueron más frecuentes al confrontarlos con aislados heterocarióticos procedentes de *A. pinsapo*, como se observó tras la aparición de uniones en fíbula en los aislados de referencia (33 y 25 % respectivamente), si bien no se puede excluir la posibilidad de que el micelio heterocariótico del aislado de *A. pinsapo* hubiese invadido las colonias homocarióticas del aislado de referencia.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos en los tests de apareamiento se concluye que todos los aislados de *Heterobasidion* obtenidos de *A. pin-*



Figura 7. Presencia de basidiocarpos de *Heterobasidion* en el interior de la parte basal del tronco podrido de un pinsapo enfermo, visibles cuando se han retirado residuos vegetales y suelo.

sapo pertenecen al grupo F de interesterilidad recientemente propuesto como la especie *H. abietinum* (NIEMELÄ y KORHONEN, 1998). Los aislados de referencia de *H. abietinum* pasaron al estado heterocariótico en el 95% de los apareamientos realizados con aislados homocarióticos procedentes de *A. pinsapo*, tal y como puso de manifiesto la observación de uniones en fíbula. En el 5% de este tipo de apareamientos la reacción resultó incompatible, probablemente debido a la presencia del mismo alelo de compatibilidad sexual en ambos homocariotes, aunque también pudo deberse a la dificultad de observar las uniones en fíbula.

Heterobasidion parviporum (grupo de interesterilidad S) es una especie estrechamente relacionada con *H. abietinum*. De hecho, las cepas de *H. parviporum* procedentes de áreas geográficas fuera del área de distribución de *H. abietinum*, por ejemplo del

Cuadro 1. Resultados de los tests de apareamiento para la identificación específica de los aislados homocarióticos de *Heterobasidion* procedentes de *Abies pinsapo*. La reacción compatible está basada en la aparición de uniones en fíbula en el aislado de referencia

Aislado de <i>A. pinsapo</i>	Aislados de referencia						
	<i>H. abietinum</i>		<i>H. parviporum</i>			<i>H. annosum s.s.</i>	
	F031 64/1	F03193/ 1	S03245/ 1	S98036/ 3	P98040/ 2	P03018/ 1	P04261 1/1
AP1	+	+	-	+	-	-	nt
AP2	+	+	-	-	-	-	nt
AP3	+	+	-	-	nt	-	-
AP58	+	+	-	-	-	-	nt
AP59	+	+	-	-	-	-	nt
AP60	+	+	-	-	-	-	nt
AP63	+	+	-	-	-	-	nt
AP70	-	+	-	-	-	-	nt
AP74	+	+	-	-	-	-	nt
AP76	-	+	-	-	-	-	nt
AP77	+	+	-	-	-	-	nt
AP78	+	+	-	-	-	-	nt
AP80	+	+	-	-	-	-	nt
AP81	+	+	-	-	-	-	nt
AP82	+	+	-	-	-	-	nt
AP83	+	+	-	-	-	-	nt
AP84	+	+	+	+	-	-	nt
AP85	+	+	-	-	-	-	nt
AP86	+	+	-	-	-	-	nt
AP88	+	+	-	-	-	-	nt
AP89	+	+	-	-	-	-	nt
AP90	+	+	-	-	-	-	nt
AP91	-	+	-	-	-	-	nt
AP93	+	+	-	-	-	-	nt
AP94	+	+	-	+	-	-	nt
AP96	-	+	-	-	-	-	nt
AP98	+	+	-	-	-	-	nt
AP108	+	+	-	+	-	-	nt
AP116	+	+	-	-	-	-	nt
AP117	+	+	-	-	-	-	nt
Nº de apareamientos	60		60			60	
Reacción compatible (%)	95.0		6,7			0,0	

Aislados de referencia: *H. abietinum* F03164/1 (Trentino, Italia). F03193/1 (Trentino, Italia); *H. parviporum* S03245/1 (Trentino, Italia) S98036/3 (Hämeenlinna, Finlandia); *H. annosum s.s.* P98040/2 (Voronezh, Rusia). P03018/1 (Loppi, Finlandia), P04261/1 (Toscana, Italia).

+ : presencia de uniones en fíbula, - : ausencia de uniones en fíbula, nt: no testado

norte de Europa o este de Asia, muestran una frecuencia de compatibilidad sexual muy alta con cepas de *H. abietinum* en experimentos de laboratorio (70-98%) (DAI *et al.*, 2003). Sin embargo, la frecuencia de compatibilidad sexual entre *H. abietinum* y cepas de *H. parviporum* procedentes de Europa central y los Alpes es más baja, aunque aún relativamente alta, de alrededor del 25% (CAPRETTI *et al.*, 1990). Comparando con estas cifras, el grado de compatibilidad sexual de las cepas homocarióticas de *H. abietinum* procedentes del sur de España aparecen significativamente más bajas, de sólo el 6,7% (Cuadro 1). También se había observado previamente un bajo nivel de compatibilidad sexual entre *H. abietinum* y *H. annosum* ss (CAPRETTI *et al.*, 1990). Sin embargo, nuestros aislados de referencia de *H. annosum* ss resultaron totalmente incompatibles con los aislados homocarióticos de *H. abietinum* de *A. pinsapo*. Sí se observaron algunas reacciones compatibles con los aislados heterocarióticos de *H. abietinum*, pero estas observaciones también pueden ser el resultado de la posibilidad, no descartable totalmente, de que las hifas del heterocarión hubieran crecido hacia la colonia del aislado de referencia, mezclándose con él.

La distribución de *H. abietinum* está determinada por la distribución de sus especies huéspedes del género *Abies* presentes en Europa central y meridional y en Asia Menor, aunque el hongo se ha encontrado ocasionalmente parasitando raíces de árboles pertenecientes a otros géneros (CAPRETTI, 1998, KORHONEN *et al.*, 1998). Entre las especies de *Abies* nativas de estas regiones, *H. abietinum* se describió en por primera vez parasitando a *A. alba* en diferentes zonas de su área de distribución. También se ha citado en *A. cephalonica* y *A. borisii-regis* en Gre-

cia, y en *A. nordmanniana* spp. *bornmülleriana*, *A. nordmanniana* ssp. *equi-trojani* y *A. cilicica* en Turquía (TSOPELAS y KORHONEN, 1996, KORHONEN y DAI, 2005, DOGMUS-LEHTIJARVI *et al.*, 2006).

Los bosques de *A. pinsapo* presentes en el sur de España son únicos en Europa. Ocupan un área muy reducida y excepcionalmente húmeda, habiéndose desarrollado durante milenios como una comunidad vegetal aislada, rodeada del bosque esclerófilo mediterráneo típico del sur de España. Es muy probable que también la población local de *H. abietinum* haya permanecido aislada de otras poblaciones del hongo. Consecuentemente las relaciones entre *A. pinsapo* y *H. abietinum* constituyen un caso de estudio fitopatológico muy interesante. Actualmente estamos abordando la caracterización de aislados de *Heterobasidion* procedentes de pinsapo mediante técnicas moleculares y su comparación con aislados procedentes de otras poblaciones europeas del hongo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la ayuda prestada al personal del Parque Natural de la Sierra de las Nieves (Málaga), especialmente a J. L. Quintanilla. También queremos agradecer la colaboración de C. Calzado (Universidad de Córdoba). El trabajo de campo ha sido financiado por un convenio suscrito entre la Universidad de Córdoba y la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. La estancia de M. E. Sánchez en Florencia, Italia, fue financiada por una beca de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. Por último, agradecemos al Dr K. Korhonen la revisión crítica del manuscrito.

ABSTRACT

SÁNCHEZ M. E., N. LUCHI, J. E. SÁNCHEZ, J. J. JIMÉNEZ, A. TRAPERO, P. CAPRETTI. 2007. **Root rot of *Abies pinsapo*: Specific identification of the causal agent.** *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 527-535.

Abies pinsapo is an endemic fir species occurring only in a small area in southernmost Spain. Natural stands of this tree are frequently attacked by *Heterobasidion*

root rot. To identify the *Heterobasidion* species causing the disease, pure cultures of the fungus were isolated from symptomatic trees in seven localities in Sierra de las Nieves Natural Park and identified by pairing tests. All the *Heterobasidion* specimens collected proved to belong to the intersterility group F, also considered as the species *Heterobasidion abietinum*.

Key words: *Abies pinsapo*, *Heterobasidion abietinum*, *Heterobasidion annosum*, natural ecosystem, protected species.

REFERENCIAS

- ARISTA M., HERRERA F. J., TALAVERA S. 1997. Biología del pinsapo. Sevilla, Spain: Publicaciones de la Consejería de Medio Ambiente.
- CAMARERO J. J. 2000. El decaimiento del abeto en los Pirineos. *Medio Ambiente Aragón*, 4: 18-20.
- 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., KORHONEN K., MUGNAI L., ROMAGNOLI C. 1990. An intersterility group of *Heterobasidion annosum* specialized to *Abies alba*. *Eur. J. For. Path.*, 20: 231-240.
- DAI Y.C., VAINIO E. J., HANTULA J., NIEMELA T., KORHONEN K. 2003. Investigations on *Heterobasidion annosum* s.lat. in central and eastern Asia with the aid of mating tests and DNA fingerprinting. *For. Path.*, 33: 269-286.
- DOG MUS-LEHTIJARVI H. T., LEHTIJARVI A., KORHONEN K. 2006. *Heterobasidion abietinum* on *Abies* species in western Turkey. *For. Path.*, 36: 280-286.
- KORHONEN K., DAI Y. C. 2005. Genetically identified taxa of *Heterobasidion* and their distribution in Eurasia. In: Proc. 11th Int. Conf. Root and Butt Rots, Poznan, Poland, 16-22 August 2004, IUFRO. Ed. Manka M, Lakomy P. The August Ciezuowski, Agricultural University, Poznan, pp. 57-63.
- 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 F. F. 1962. A selective medium for the isolation of *Fomes annosus*. *Phytopathology*, 52: 1310-1312.
- MONTOYA R., LÓPEZ M. 1997. La Red Europea de Seguimiento de Daños en los Bosques (Nivel I). España, 1986-1997. Madrid, Spain: Publicaciones del Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente.
- NAVARRO R. M., CALZADO C. 2004. Establecimiento de una red de equilibrios biológicos en ecosistemas con presencia de pinsapo (*Abies pinsapo* Boiss.) en Andalucía. *Pirineos*, 158-159: 107-125.
- NAVARRO R. M., CALZADO C., SÁNCHEZ M. E., LÓPEZ J., TRAPER A. 2003. Censo de focos de *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. en ecosistemas de pinsapo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 581-592.
- NIEMELÄ T., KORHONEN K. 1998. Taxonomy of the Genus *Heterobasidion*. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A eds. *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, pp. 27-33.
- SÁNCHEZ M. E., CAPRETTI P., CALZADO C., NAVARRO R., TRAPER 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 Ciezuowski, Agricultural University, Poznan, pp. 220-223.
- TSOPELAS P., KORHONEN K. 1996. Host and distribution of the intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in the highlands of Greece. *Eur. J. For. Path.*, 26: 4-11.

(Recepción: 18 octubre 2007)

(Aceptación: 19 noviembre 2007)