

Técnicas de laboratorio para la detección de la enfermedad

Salud Orta Cordero

Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal de Huelva

Jornada Técnica sobre la Phytophthora spp (podredumbre radical) en las dehesas, Córdoba 1 octubre 2019

INTRODUCCIÓN: LA SECA

Jornada Técnica sobre la Phytophthora spp (podredumbre radical) en las dehesas, Córdoba 1 octubre 2019

La seca

- En áreas pobladas por *Quercus*, la enfermedad de la "seca" es la principal preocupación a partir de los años 80-90, asociada a grandes periodos de sequía del momento, tanto en árboles aislados como en grupo y se produce también en el resto de Europa.

Se asociaba con defoliación, clorosis de hojas, muerte regresiva de ramas y brotes similares a déficit hídrico, pero los patrones de distribución diferían

- Ha sido atribuida principalmente a complicadas asociaciones en la que intervienen:
 - factores abióticos: variedad de situaciones geográficas, climáticas y culturales que estos árboles toleran, con episodios de lluvias y severas sequías, junto con una utilización excesiva del monte y de la dehesa, así como a la presencia de ataques secundarios de insectos y hongos.
 - Factor biótico: el aislamiento a partir del año 1991 del hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands en las áreas españolas y portuguesas de encinas y alcornoques afectados por la "seca", tanto del suelo como de raíces absorbentes de árboles enfermos.

Jornada Técnica sobre la Phytophthora spp (podredumbre radical) en las dehesas, Córdoba 1 octubre 2019

Manifestación de la enfermedad

Las encinas y alcornoques muestran síntomas de decaimiento de la copa que pueden ser clasificados (COBOS et al, 1993) en:

- a) "decaimiento lento" (slow decline), con una caída gradual de las hojas y la presencia de ramas parcial o totalmente defoliadas.
- b) "muerte súbita" (quick decline), con un rápido secado de las ramas, donde las hojas permanecen un tiempo adheridas y árboles completamente muertos. Las hojas muestran un color amarillento o marrón en las primeras etapas de la desecación.

Estos síntomas, generalmente, son variables de un área a otra pero lo que no se observan, son lesiones corticales en la base del tronco y raíces principales.

Factores que influyen en la enfermedad

- Factores que afectan al vigor de Quercus

Compactación del suelo

Profundidad útil del suelo

Suelos hidromorfos

Laderas, vaguadas..

Presencia de Nitritos
Ganado

Plagas y
otras enfermedades

Factores que influyen en la enfermedad

- Factores que afectan a *P. cinnamomi*

Disponibilidad de agua

T^a óptima entre 24-30°C
Puede hasta 15°C

Lluvia clave en dispersión

ASOCIACIÓN DE *P. cinnamomi* CON LA SECA

- DIFICULTAD PARA DETERMINAR LOS AGENTES INVOLUCRADOS en el debilitamiento. En ocasiones es explicado como el resultado de una enfermedad simple y otras veces se trata de varios factores interactuando, por ello es recomendable el seguimiento de esas parcelas a medio plazo.
- LA ENFERMEDAD SE ENMASCARA; Puede que las condiciones ambientales favorables propicien la recuperación de árboles afectados y enmascare la enfermedad real.
- DIFICULTAD DE AISLAMIENTO: Las prospecciones realizadas en diversos momentos y lugares en encinares y alcornoques, detectan la presencia de árboles afectados por la "seca". Los resultados de los aislamientos suelen ser bajos (alrededor del 12%) en relación con el número de muestras estudiadas (247). Este hecho demuestra que se encuentra muy disperso y altamente influenciado por las condiciones climáticas, particularmente la falta de lluvia. Según Davison and Tay (2005) es precisa la toma de 271 muestras de suelo para asegurar con un 95% de certeza la ausencia del patógeno.

ASOCIACIÓN DE *P. cinnamomi* CON LA SECA

- PARA INFECTAR LA RAÍZ EL TEJIDO DEBE ESTAR SANO: Su baja capacidad competitiva lo hace un patógeno primario, suele infectar las raíces finas no suberizadas encargadas de la absorción del agua. Posteriormente continua afectando los elementos superiores.
- Posteriormente los tejidos muertos se van descomponiendo por organismos saprofitos
- FACILIDAD DE IDENTIFICACIÓN: Una vez “cazado” el patógeno, el crecimiento in vitro de este hongo produce con rapidez un micelio que presenta numerosas hinchazones en las hifas y clamidosporas (entre otras). Esto es una característica muy señalada que facilita su identificación con pocas posibilidades de error

El género Phytophthora

- El género Phytophthora tiene una distribución mundial y es causante de más del 60% de las enfermedades de raíces finas y del 90% de enfermedades de cuello.
- Esta amplia distribución se debe a factores de dispersión a pequeña y gran escala.
 - Al efecto de animales y de humanos a través de su desplazamiento o excreción, también a acciones antrópicas como el movimiento de tierras asociado a la actividad agrícola o la construcción de carreteras.
 - A los factores ambientales como la escorrentía, la salpicadura de la lluvia, el viento...etc..
 - A gran escala podríamos hablar del movimiento de plantas de un lugar a otro estando infectadas o portando suelo infectado. Los viveros en este sentido han podido jugar un papel muy importante-

El género Phytophthora

- El género Phytophthora pertenece al reino Stramenopila, clase Oomycetos.
- Inicialmente pertenecían al reino Fungi pero posteriormente se han separado puesto que muestran características diferentes, entre ellos su ciclo vital y la composición de sus paredes celulares.

P. cinnamomi: características identificativas

Hifas coralinas, hialinas y aseptadas



Hinchamientos hifales botriosos, con forma esférica, elipsoidal o angular

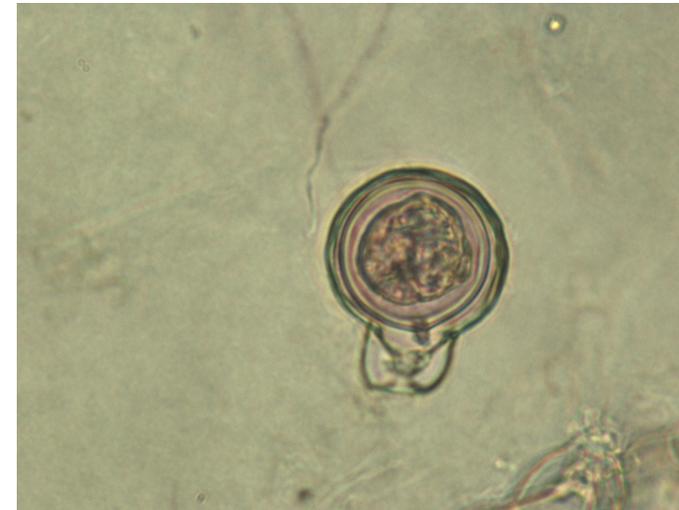


P. cinnamomi: características identificativas

- Es heterotática (precisa talo A1 y A2 para reproducción sexual) y anfigina.
- Estructura reproductiva asexual de resistencia: Clamidospora. Germinación T^a y Humedad óptima.
- Estructura reproductiva asexual: Esporangios no papilados que son las estructuras que liberan las zoosporas, responsables de la diseminación de la enfermedad ya que poseen flagelos que les permiten moverse por el agua libre.

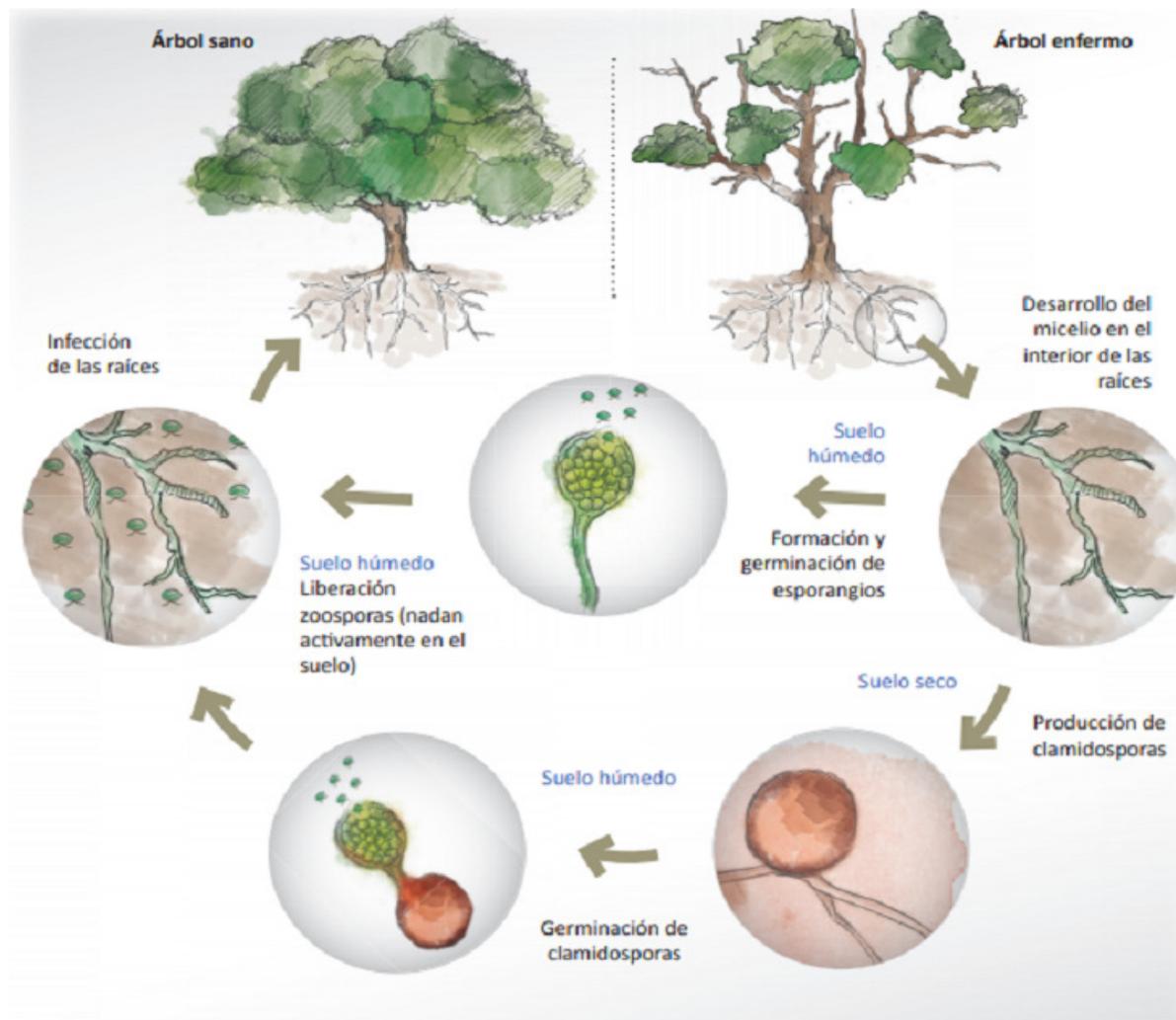


Esporangios no papilados



Oosporas

P. cinnamomi: ciclo de la enfermedad



Jornada Técnica sobre la *Phytophthora* spp (podredumbre radical) en las dehesas, Córdoba 1 octubre 2019

Métodos de diagnóstico en el laboratorio: *P. cinnamomi* y *P. spiculum*

Jornada Técnica sobre la Phytophthora spp (podredumbre radical) en las dehesas, Córdoba 1 octubre 2019

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PHYTOPHTHORA SPP.

Métodos clásicos

Aislamiento de *Phytophthora* en medio de cultivos selectivos a partir de raíces

Detección de propágulos de *Phytophthora* en suelo mediante material vegetal trampa y su aislamiento en medios de cultivo

Métodos modernos

Detección molecular e identificación de especies de *Phytophthora* mediante pirosecuenciación

Detección molecular de *P.cinnamomi* con sonda específica

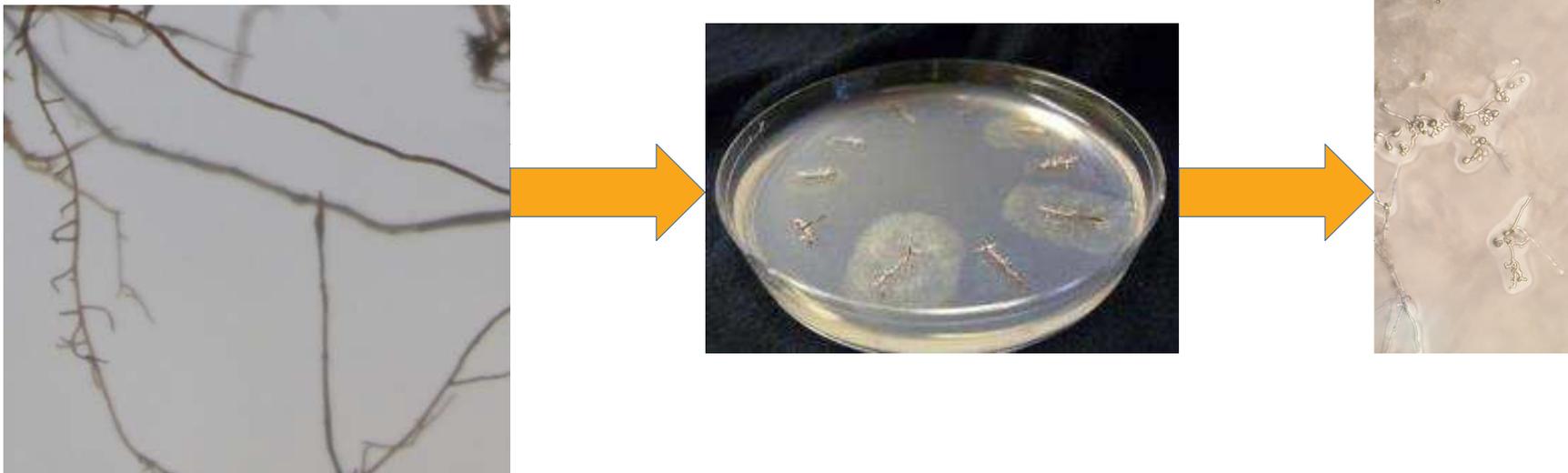
Aislamiento clásico: Protocolo oficial de trabajo

- Puesto a punto por el LPSV Sevilla junto con el laboratorio de patología Agroforestal de la UCO.
- Se trabajó con él durante los años 2013-2016 LIFE biodehesa en los laboratorios de Huelva y Sevilla
- Se ha modificado para ser más operativos de cara a la puesta en marcha del SDS
 1. Aislamiento de raíces
 2. Aislamiento a partir trampas vegetales
 3. Aislamiento a partir de suelo

Aislamiento clásico

1. Aislamiento a partir de raíces

- Seleccionar raicillas finas con síntomas de podredumbre
- Se lavan para quitar el exceso de tierra
- Se siembran en medio específico: PARPH
- Se incuban las placas a 22-25°C durante 4-7 días en cámara
- Se apreciarán las estructuras del micelio citadas anteriormente



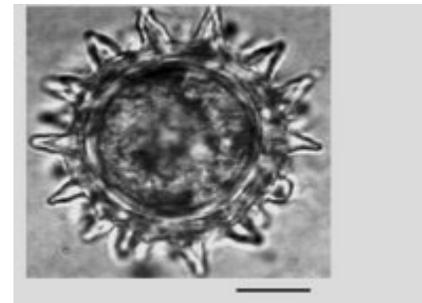
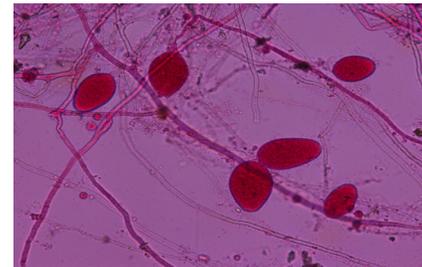
Jornada Técnica sobre la Phytophthora spp (podredumbre radical) en las dehesas, Córdoba 1 octubre 2019

Aislamiento clásico

2. Aislamiento a partir de trampas vegetales

A: Trampas de agua con suelo en las cuales se vierte material vegetal tierno (clavellinas, brotes jóvenes de Quercus, etc.): del agua en la que se han lavado las raíces y algo más de tierra y agua, se remueve y el sobrenadante se vierte en placas petri sobre el que se depositan pétalos de clavellina

- Se incuban las placas a 22-25°C durante 4-7 días en cámara y se miran en lupa, se apreciarán los esporangios

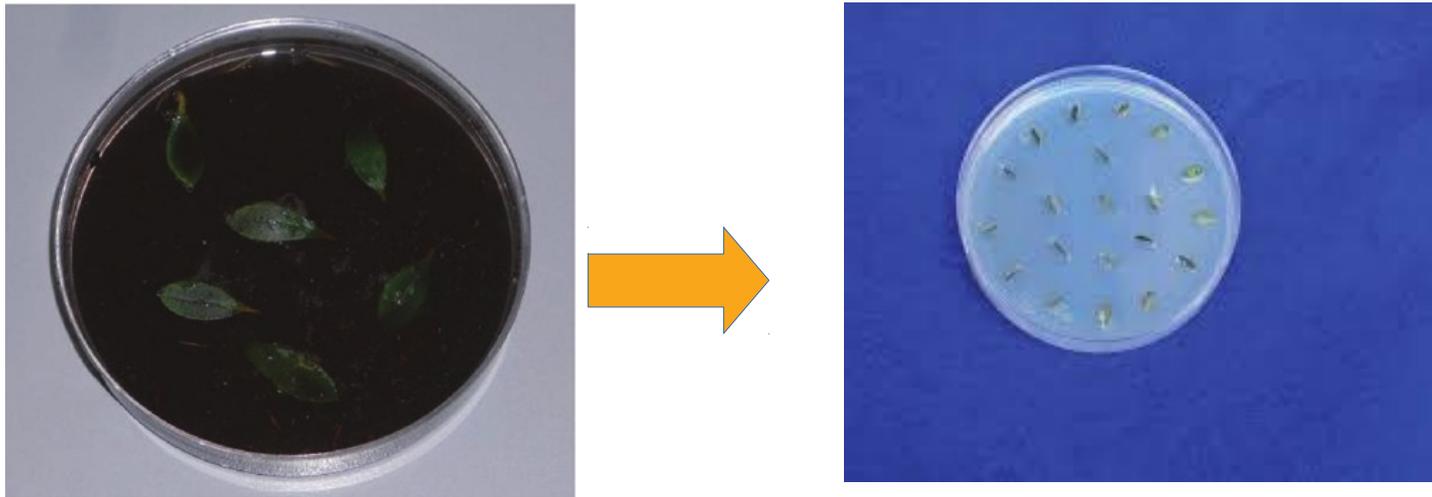


Jornada Técnica sobre la Phytophthora spp (podredumbre radical) en las dehesas, Córdoba 1 octubre 2019

Aislamiento clásico

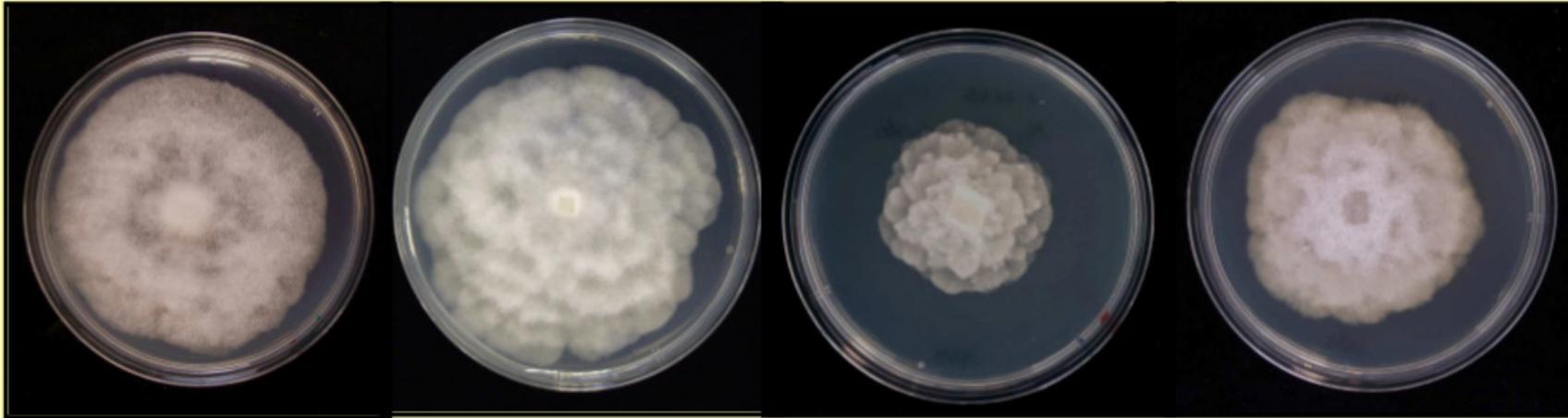
2. Aislamiento a partir de trampas vegetales

- B: Trampas de filodios de eucalipto: Se toma un peso concreto de suelo en un volumen de agua y se deposita en vasos de plástico.
- Se cortan trozos de filodio de eucalipto de 4-5 mm y se depositan encima
 - Se incuban las placas a 22-25°C durante 4 días en cámara y se siembran en una placa (a continuación se actúa igual que las raíces)

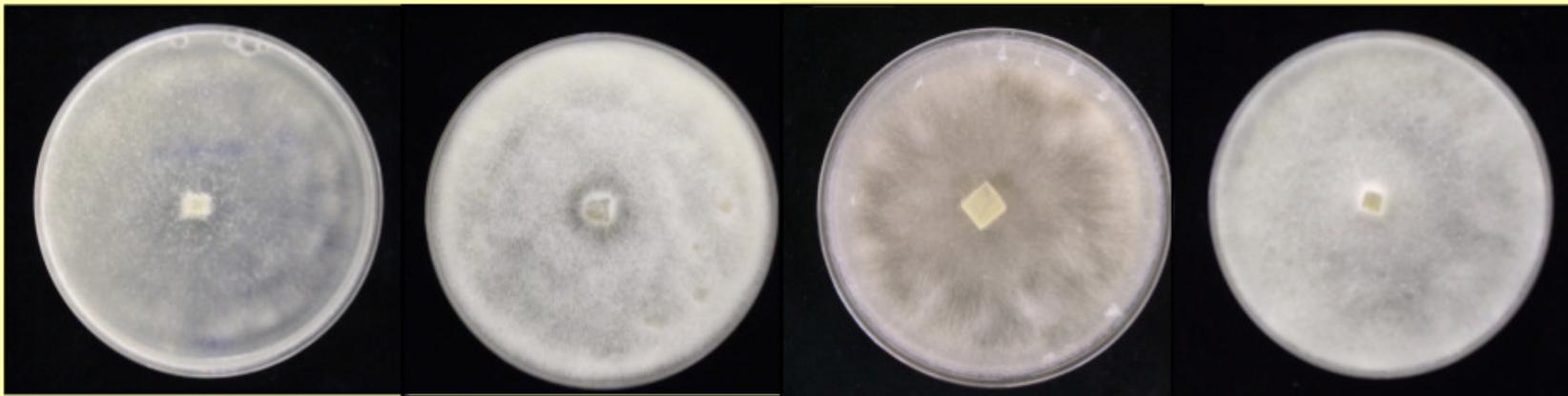


Jornada Técnica sobre la Phytophthora spp (podredumbre radical) en las dehesas, Córdoba 1 octubre 2019

Phytophthora



Pythium



Aislamiento clásico: Dificultad de aislamiento

Estudio realizado junto al L.P.S.V. Sevilla (J. Páez y J.M. Vega) 2012-2015

333 muestras entre Huelva y Sevilla

1. Se obtuvieron 39 positivos, el 82% de aislamientos *P. cinnamomi* (el resto *P. megasperma*)
2. De éstos positivos, el 25% se detectó en raíces
3. La época más favorable para el muestreo son otoño y final de invierno-primavera, siempre en función climatología
4. El aislamiento de las raíces fue superior a la detección usando trampas de manzanas (20%), eucalipto (20%) y Quercus (20%). Estas trampas se comportan de forma similar.

Aislamiento moderno: Secuenciación

1. Identificación molecular de los aislados. Se suele usar en el caso en el que ya se tiene el aislado pero no se observan características morfológicas conocidas
 - Extracción de ADN de cultivos puros (*Phytophthora* o *Pythium*)
 - Amplificación de la región del ITS del ADN ribosomal
 - Secuenciación de los productos de amplificación
 - Comparación con las secuencias depositadas en la base de datos Genbank

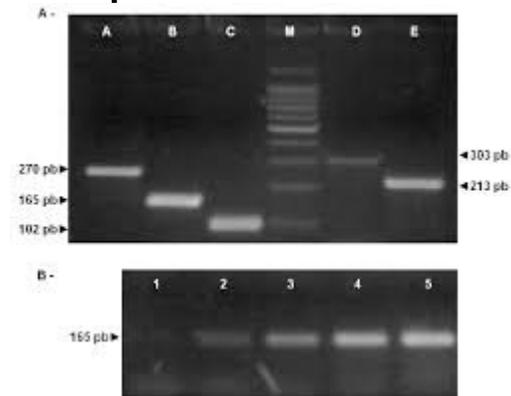
Aislamiento moderno: PCR convencional

2. Detección molecular de *Phytophthora spp.* de las raíces de la encina por PCR convencional

- Extracción del ADN mediante un kit directamente de la raíz.

50 mg.

- Amplificación de la región del ITS del ADN ribosomal y posterior electroforesis para comprobar la presencia de *Phytophthora spp.* en estas muestras.



Aislamiento moderno: PCR tiempo real

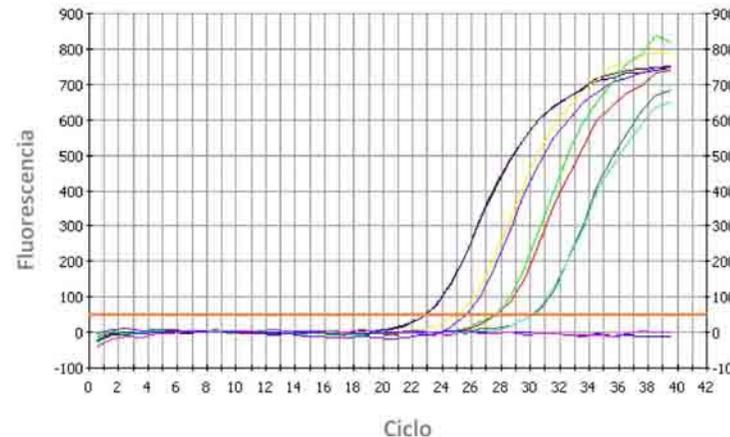
3. Detección molecular de *Phytophthora cinnamomi* de las raíces/suelo/trampas vegetales de la encina por PCR en tiempo real

- Extracción del ADN mediante un kit directamente del material vegetal. 50 mg.
- Utilización de una sonda específica para comprobar la presencia de *Phytophthora cinnamomi* en estas muestras.
- Actualmente se está trabajando en ello mediante el Proyecto Prodehesa montado.

Aislamiento moderno: Aún no establecido

Se han hecho pruebas:

- Trampas de clavel
- Trampas de eucalipto
- Raíces
- Suelo



Existe coherencia entre las muestras positivas por métodos clásicos y las que han resultado positivas mediante PCR RT.

Ventajas e inconveniente

	Clásico	PCR
Económico	Sí	No
Validado	Sí	No
Rápido	No	Sí
Sensible	No	Sí
Tecnificación	No	Sí

A landscape photograph featuring a field of vibrant yellow flowers in the foreground and middle ground. Several olive trees with dark trunks and green foliage are scattered throughout the scene. A large, thick tree branch hangs down from the top right corner. The sky is bright and slightly overcast. A semi-transparent green grid overlay is positioned behind the text.

Gracias por vuestra atención