

Identificación de microorganismos del género *Phytophthora* asociados a especies de *Quercus* sp. y *Pinus* sp., en los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez

José Humberto Calderón Díaz*, María del Carmen Santos Bravo

Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales, Facultad de Agronomía,
Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

*Autor al que se dirige la correspondencia: calderon.2000@gmail.com

Recibido: 30 de septiembre de 2014 / Revisión: 26 de febrero de 2015
Aceptado: 27 de mayo de 2015 / Disponible en línea: 01 de julio de 2015

Resumen

El objetivo principal fue la identificación de microorganismos del género *Phytophthora* que afectan a bosques naturales mixtos y viveros de *Pinus* sp. y *Quercus* sp., con importancia socioeconómica, en los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez. Para el aislamiento de *Phytophthora* se procesaron muestras de suelo y tejido vegetal. En el departamento de Guatemala, del bosque natural se obtuvieron 10 muestras de *Quercus* sp. y 45 de *Pinus* sp., de los viveros se obtuvieron 11 muestras de *Quercus* sp. y 88 de *Pinus* sp. En el departamento de Sacatepéquez se obtuvieron del bosque natural 15 muestras de *Quercus* sp. y 48 de *Pinus* sp.; y en los viveros, 58 muestras de *Pinus* sp. y 25 de *Quercus* sp. Un total de 13 muestras procedentes de los viveros fueron positivas a la presencia de *Phytophthora* sp. en *Pinus maximinoi*, 10 procedentes del departamento de Guatemala, y tres de Sacatepéquez. Referente al tipo de crecimiento de la colonia en medio PDA, se obtuvieron cinco de tipo estolonífero, cinco tipo semipetaloides, una colonia de tipo estelado y dos colonias sin ningún tipo de patrón de crecimiento. Las pruebas de patogenicidad realizadas con la cepa VP16 mostraron alta incidencia y severidad para las especies de *Pinus caribaea*, *P. oocarpa*, *P. pseudostrobus*, *P. maximinoi* y en menor grado en *Pinus tecunumanii*.

Palabras claves: *Phytophthora*, *Pinus*, *Quercus*, incidencia, severidad, patogenicidad

Abstract

The main purpose of this research was to identify microorganism belonging to *Phytophthora* genera which are affecting mixed natural forests and nurseries of *Pinus* sp. and *Quercus* sp. These species have economic and social impact in provinces such as Guatemala and Sacatepéquez. Soil and vegetal tissue were used to isolate *Phytophthora* from natural forest of Guatemala, 45 *Pinus* sp. and 10 *Quercus* sp. were sampled and from nurseries 88 *Pinus* sp. and 11 *Quercus* sp. From Sacatepéquez province, from natural forest system were sampled 48 *Pinus* sp. and 15 *Quercus* sp. From nurseries were sampled 58 *Pinus* sp. and 25 *Quercus* sp. After processing the samples from soil and roots 13 were found positive to *Phytophthora* sp. in *Pinus maximinoi*, 10 from Guatemala and three from Sacatepéquez provinces. The culture of *Phytophthora* sp. on PDA produced two colonies without define form and five stoloniferous, five semipetaloid, one stelade type colonies. VP16 isolate was inoculated in five species of pine for pathogenicity test, causing high percentages of incidence and severity on *Pinus caribaea*, *P. oocarpa*, *P. pseudostrobus* and *P. maximinoi* and low rates of incidence and severity on *Pinus tecunumanii*.

Keywords: *Phytophthora*, *Pinus*, *Quercus*, incidence, severity, pathogenicity



Introducción

Las enfermedades en árboles forestales provocadas por *Phytophthora* han tenido una rápida dispersión en Europa y existe evidencia que su diseminación va desde los viveros forestales a plantaciones naturales o artificiales (Brasier & Jung, 2003). Además, *Phytophthora* ha sido el agente causal de la declinación de *Quercus robur* y *Quercus petraea* en toda Europa (Brasier & Jung, 2003; Jung, Blaschke & Oßwald, 2000; Jung, Cooke, Blaschke, Duncan, & Oßwald 1999; Jung, Hansen, Winton, Oßwald, & Delatour, 2002; Jung et al., 2003).

En bosques de América del Norte y América del Sur, como en otras partes del mundo, *Phytophthora* es conocido como un patógeno devastador. La especie más conocida es *Phytophthora cinnamomi*, sin embargo existen otras especies, de importancia económica, que afecta a otras especies forestales.

A pesar de la importancia a nivel mundial de esta enfermedad, muy pocos programas se dedican a la investigación, tanto en América del Norte como en América del Sur (Hansen, 2000). En Guatemala no existe un control de calidad en la producción de plantas forestales, lo cual trae como consecuencia una alta probabilidad de diseminar enfermedades a plantaciones establecidas con materiales contaminados.

El mal del talluelo es un problema en la producción de plántulas forestales de los viveros, asociado a Oomycetos (Singleton, Mihail, & Rush, 1992). En los bosque mixtos de *Pinus* sp. y *Quercus* sp. de los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez se desconoce la presencia de microorganismos del género *Phytophthora*; tampoco existe un control fitosanitario adecuado en la producción de las plántulas forestales de los viveros, los cuales se convierten en fuentes de distribución de enfermedades. Debido a que estas áreas son importantes como fuente de recarga hídrica de mantos freáticos del valle de la Ciudad de Guatemala, es relevante identificar la presencia de microorganismos del género *Phytophthora* en estos bosques mixtos. La investigación se realizó en el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, donde se llevó a cabo el aislamiento del patógeno y las pruebas de patogenicidad.

Materiales y métodos

Las áreas seleccionadas para realizar esta investigación fueron plantaciones de bosques naturales y

artificiales, así como viveros ubicadas en los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez. En el caso de bosques se siguió la metodología empleada en inventarios forestales. Se emplearon mapas de uso de la tierra a escala 1:50000 de los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez para determinar la cobertura de bosque mixto *Quercus* sp., y *Pinus* sp. Para obtener el número de muestras a nivel de bosque natural mixto se empleó el método simple aleatorio con la ecuación Álvarez (1988).

$$n = \frac{z^2 pq}{e^2}$$

Donde:

- n = tamaño de la muestra
- z = 1,645 para un nivel de confianza del 90%
- p = prevalencia esperada (50%)
- q = 1-p
- e = error admitido (5%)

Para la obtención de muestras a nivel de vivero se utilizó el método sistemático de acuerdo a la cantidad y forma de distribución de las plantas. Para el cálculo de plántulas a obtener se utilizó ecuación:

$$n = \frac{Nz^2 \sum N_m S_n^2}{N^2 e^2 + z^2 \sum S_n^2 N_n S_n^2}$$

Donde:

- n = tamaño de la muestra
- z = 1,645 para un nivel de confianza del 90%
- S_n = desviación estándar (0.5)
- e = error admitido (5%)
- N_n = probabilidad de ocurrencia (50%)

Para la identificación de microorganismos del género *Phytophthora* asociados a especies forestales en bosques mixtos y viveros forestales de los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez, se colectaron muestras a nivel de campo y vivero, en forma dirigida, (Álvarez, 1988; French & Hebert, 1980) siguiendo el criterio de asociación de síntomas visibles. El número de muestras fue variable, debido a la cantidad de plantas y forma de distribución de las mismas por vivero. Las muestras se colocaron dentro de una bolsa de polietileno y se procedió a identificar con número de correlativo, especie colectada, localidad y coordenadas geográficas.

A nivel de laboratorio, para el aislamiento de oomicetos se procesaron muestras de suelo y tejido vegetal, utilizando la técnica del cultivo trampa propuesta por Erwin y Ribeiro (1996); para *Phytophthora* y *Pythium*, se utilizó específicamente manzana verde.

El procedimiento empleado fue el siguiente: (1) Aislamiento a partir de tejido vegetal. Se realizó la siembra directa de tejido en medio selectivo que contiene Pimaricina-Ampicilina-Rifampicina-Pentacloro-nitrobenzeno-Himexazol (PARPBH), Jeffers y Martin (1986). (2) Aislamiento a partir de suelo. Se utilizó la técnica del cultivo trampa, en este caso, manzana verde. Re-aislamiento en medio selectivo PARB con himexazol y PARB sin himexazol. (3) Purificación. Se realizó en medio papa dextrosa agar (PDA). (4) Producción de esporangios. Se realizó en medio agar jugo V8® (Erwin & Ribeiro, 1996). Se realizó la medición de esporangios. (5) Conservación de los aislados. En frascos se colocó una mezcla de turba, arena y jugo V8®, selladas con Parafilm y papel aluminio y a temperatura ambiente. La caracterización morfológica se realizó de acuerdo con las características morfológicas de las colonias obtenidas en medio agar harina de maíz, según la morfología del micelio de los esporangios, y de las oosporas. La identificación se efectuó conforme las claves morfológicas de Newhook, Waterhouse y Stamps (1978) y Erwin y Ribeiro (1996).

Resultados

En el departamento de Guatemala, en bosques mixtos se obtuvieron 55 muestras: 10 de encino y 45 de pino. En vivero se colectó un total de 99 muestras: 11 de encino y 88 de pino.

En el departamento de Sacatepéquez en bosque mixto se obtuvieron 64 muestras: 15 de encino, 48 de pino y una de ciprés común. En vivero se obtuvieron 83 muestras: 58 de pino y 25 de encino.

En la Tabla 1 se pueden observar las muestras procesadas, solo 13 de ellas fueron positivas, identificándose la presencia de *Phytophthora* sp. De los aislados positivos, 10 fueron de muestras colectadas en viveros localizados en el departamento de Guatemala y tres procedentes de viveros del departamento de Sacatepéquez.

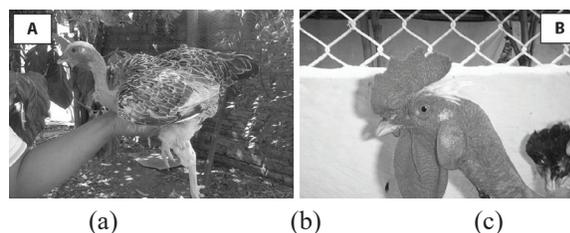


Figura 1. Descripción pictográfica de las características de crecimiento de *Phytophthora* sp. en medio PDA. (a) Semipetaloides, (b) sin patrón y (c) estolonífero.

Tabla 1
Descripción de las características de los aislados de *Phytophthora* sp.

No.	Correlativo	Aislamiento a partir de	Especie forestal	Crecimiento en PDA	Media esporangios V-8	
					Largo (μ)	Ancho (μ)
1	VP08	suelo	<i>P. maximinoi</i>	estolonífero	24.0093	19.3207
2	VP16	suelo	<i>P. maximinoi</i>	estolonífero	12.5853	11.1553
3	VP47	raíz	<i>P. maximinoi</i>	sin patrón	15.949	15.045
4	VP54	raíz	<i>P. maximinoi</i>	semipetaloides	19.2313	17.738
5	VP56	raíz	<i>P. maximinoi</i>	semipetaloides	18.2413	16.438
6	VP58	raíz	<i>P. maximinoi</i>	semipetaloides	15.266	14.069
7	VP62	raíz	<i>P. maximinoi</i>	sin patrón	24.641	20.337
8	VP82	suelo	<i>P. maximinoi</i>	semipetaloides	26.6767	20.3813
9	VP89	raíz	<i>P. maximinoi</i>	semipetaloides	16.58	15.805
10	VP164	raíz	<i>P. maximinoi</i>	estolonífero	29.568	24.3073
11	VP167	raíz	<i>P. maximinoi</i>	estolonífero	47.966	40.4093
12	VP168	raíz	<i>P. maximinoi</i>	estolonífero	18.085	16.596
13	VP170	raíz	<i>P. maximinoi</i>	estelado	16.168	15.5153

La **Tabla 2** muestra valores de incidencia de la cepa VP16 que van desde el 40%, hasta un 80% y una severidad desde 35% a 85% en las especies de pino evaluadas. Se realizaron 50 mediciones (10 plantas de cinco repeticiones).

En general *Phytophthora* sp. afecta el desarrollo del sistema radicular de las plántulas de pino, por lo que reduce el crecimiento y desarrollo de las mismas provocando amarilleamiento y deformación de las plántulas.

Tabla 2
Grado de incidencia y severidad de la cepa VP16 en *P. caribaea*, *P. oocarpa*, *P. pseudostrobus* y *P. maximinoi*.

Cepa	Especie forestal	Incidencia (%)	Severidad (%)
1 VP16	<i>P. maximinoi</i>	80	85
2 VP16	<i>P. oocarpa</i>	70	69
3 VP16	<i>P. tecunumanii</i>	40	30
4 VP16	<i>P. pseudostrobus</i>	75	80
5 VP16	<i>P. caribaea</i>	40	35

Tabla 3
Resultados obtenidos de incidencia y severidad de 13 cepas de *Phytophthora* sp. en *Pinus maximinoi*.

Cepa	Especie forestal	Incidencia (%)	Severidad (%)
1 VP08	<i>P. maximinoi</i>	54	45
2 VP16	<i>P. maximinoi</i>	80	85
3 VP47	<i>P. maximinoi</i>	42	30
4 VP54	<i>P. maximinoi</i>	75	80
5 VP56	<i>P. maximinoi</i>	25	45
6 VP58	<i>P. maximinoi</i>	35	20
7 VP62	<i>P. maximinoi</i>	25	16
8 VP82	<i>P. maximinoi</i>	32	65
9 VP89	<i>P. maximinoi</i>	15	25
10 VP164	<i>P. maximinoi</i>	40	35
11 VP167	<i>P. maximinoi</i>	35	25
12 VP167	<i>P. maximinoi</i>	25	35
13 VP170	<i>P. maximinoi</i>	40	35

En la **Figura 2** se puede observar la reducción del sistema radicular de *P. caribaea*, donde se utilizó la cepa VP16 debido a su alto grado de incidencia y severidad en cinco especies de Pino.

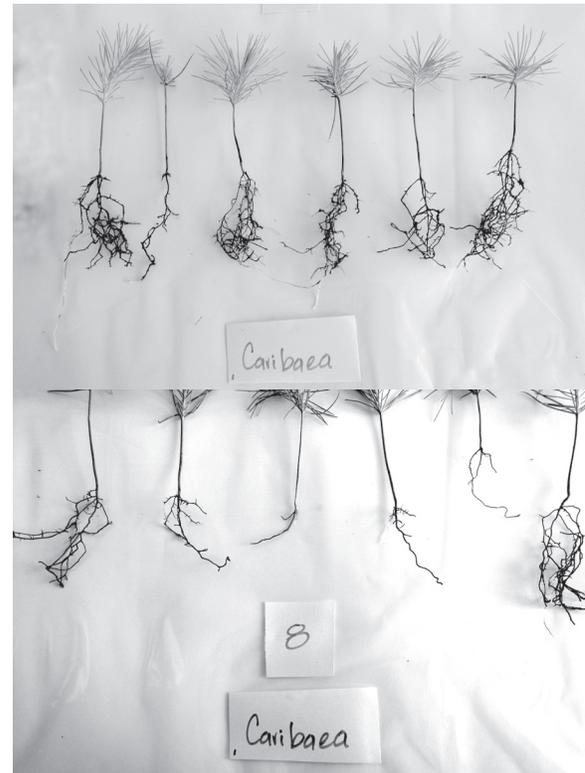


Figura 2. Testigo de *P. caribaea* posee un desarrollo radicular normal comparado con las plántulas afectadas por *Phytophthora* sp.

Discusión

Santos (2011a) reporta que muestras obtenidas en un vivero de Pastores, Sacatepéquez de *Pinus maximinoi* dieron negativo a la presencia de *Phytophthora* sp., aunque las plantas presentaban síntomas característicos provocados por *Phytophthora* sp. como muerte vascular. Aunque en este estudio muestras de raíces de *P. maximinoi* dieron positivo a la presencia de *Phytophthora* sp., lo cual concuerda con resultados obtenidos por González, Velarde y Abad (1979) a nivel de plántulas de pino de seis meses de edad donde aislaron *Phytophthora cinnamomi*. Además Sechi y colaboradores (2014), reportan el aislamiento de especies del género *Phytophthora* a nivel de vivero

en Italia. Sánchez M., Sánchez, Navarro, Fernández y Trapero (2003) reportan también la presencia de *Phytophthora drechsleri* en *Pinus halepensis* a nivel de vivero en España.

Es importante resaltar que Santos (2011b) reporta la presencia de *P. cinnamomi* en *P. maximinoi*, en Tecpán y San Andrés Itzapa lo cual podría tener relevancia debido a que Alvarez (2010) reporta la presencia de *Phytophthora* sp. en *Persea americana*, que es una especie frutal que se cultiva y crece en forma natural, cerca de los bosque mixtos de Guatemala. Así mismo, Santos (2011b) al muestrear plantas de *P. maximinoi* en viveros de Bárcenas, no se detectó la presencia de *Phytophthora* sp., aunque en este estudio se logró el aislamiento de *Phytophthora* sp. en las muestras VP47, VP54, VP56, VP58, VP62, VP82, VP89 y VP170. Estos resultados variables a través del tiempo pueden deberse a la variabilidad en el manejo de los viveros, y otros factores como origen del material que se utiliza como sustrato y la calidad de la procedencia de la semilla de estas especies, también la fuente del agua de riego.

La cepa VP16 utilizada para las pruebas de patogenicidad expresó capacidad de producir severidad y un alto porcentaje de incidencia en *Pinus maximinoi*, especie de la cual fue aislada (Tabla 3); también los niveles incidencia y severidad en *Pinus oocarpa* y *Pinus pseudostrobus* reflejan valores altos, sin embargo presenta valores bajos en la especie de *Pinus tecunumanii*. Es importante resaltar que se evaluó una sola cepa VP16 porque fue la que presentó altos porcentajes de incidencia y severidad, al evaluarla en las cinco especies de pinus (Tabla 2).

La identificación del género *Phytophthora* en plántulas de pino a nivel de vivero en los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez confirman los resultados obtenidos por González y colaboradores (1979), Sechi y colaboradores (2014), Sánchez y colaboradores (2003) y Otrosina y Marx (1975), quienes encontraron especies del género *Phytophthora* a nivel de vivero en diferentes especies de pino, lo cual confirma la importancia que tiene el manejo y control de enfermedades a nivel de viveros en la producción de especies forestales en Guatemala.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Dirección General de Investigación (partida presupuestaria 4.8.63.7.21), en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas de la Usac.

Referencias

- Álvarez, C. (1988). *Tamaño de muestra: Procedimientos usuales para su determinación*. (Tesis de maestría). Colegio de Post-graduados, Chapingo, México.
- Alvarez, G. A. (2010). *Detección y caracterización de especies de Oomycetes asociados a cultivos de exportación en la región central de Guatemala*. (FODECYT No. 2007.01). Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía.
- Brasier, C., & Jung, T. (2003). Progress in understanding *Phytophthora* diseases of trees in Europe. En J. McComb, G. Hardy & I. Tommerup (Eds.), *Phytophthora in forests and natural ecosystems. Proceedings of the Second International Meeting of IUFRO Working Party 7.02.091* (pp. 4–18). Recuperado de <http://forestphytophthoras.org/sites/default/files/proceedings/IUFRO%25202001.pdf>
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.
- French, E. R., & Hebert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica* (Serie Libros Materiales Educativos no. 43). San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- González, V., Velarde, E., & Abad, J. (1979). Chupadera fungosa de *Pinus* spp. en un vivero de Cajamarca (UNTC). *Revista Forestal del Perú*, 9(2), 1-6.
- Hansen, E. M. (2000). *Phytophthora in forests of the Americas*. In E. Hansen & W. Sutton (Eds.), *Phytophthora Diseases of Forest Trees. Proceedings of 1st International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems. International Union of Forestry Research Organizations Working Party 7.02.09. Grants Pass Oregon, August 29 – 3 September 1999* (pp. 23-27). Corvallis, Oregon, USA: Forest Research Laboratory, Oregon State University.
- Jeffers, N. S., & Martin, J. B. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, 70(11), 1038-1043. doi: 10.1094/PD-70-1038

- Jung, T., Blaschke, H., & Oßwald, W. (2000). Involvement of *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology*, 49, 706-718. doi: 10.1046/j.1365-3059.2000.00521.x
- Jung, T., Cooke, D. E., Blaschke, H., Duncan, J. M., & Oßwald, W. (1999). *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research*, 103, 785-98. doi:10.1017/S0953756298007734
- Jung, T., Hansen, E. M., Winton, L., Oßwald, W., & Delatour, C. (2002). Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycological Research*, 106, 397-411. doi:10.1017/S0953756202005622
- Jung, T., Nechwatal, J., Cooke, D. E. L., Hartmann, G., Blaschke, M., Oßwald, W., Duncan, J. M., & Delatour, C. (2003). *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research*, 107, 772-789. doi:10.1017/S0953756203008074
- Newhook, F. J., Waterhouse, G. M., & Stamps, D. J. (1978). *Tabular key to the species of Phytophthora de Bary*. (Mycological Papers, no.143). Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Otrosina, W., & Marx, D. (1975). Populations of *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium spp.* Under shortleaf and loblolly pines in littleleaf disease site. *Phytopathology*, 65, 1224-1229.
- Sánchez, M. E., Sánchez, J. E., Navarro, R. M., Fernández, P., & Traperó, A. (2003). Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Boletín Sanidad Vegetal*, 29(1), 87-108. Recuperado de <http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-29-01-087-108.pdf>
- Santos, M. C. (2011a). *Bioprospección y diversidad de Phytophthora y Pythium asociados a especies forestales de importancia económica en la región central de Guatemala, en fase de viveros*. (FODECYT No. 2009.76). Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía.
- Santos, M. C. (2011b). *Bioprospección de Phytophthora sp. asociado a especies forestales de importancia económica en fase de vivero en la región central de Guatemala* (Tesis licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Guatemala.
- Sechi, C., Seddaiu, S., Linaldeddu, B. T., Franceschini, A., & Scanu, B. (2014). Dieback and mortality of *Pinus radiata* trees in Italy associated with *Phytophthora cryptogea*. *Plant Disease*, 98, 159.
- Singleton, L., Mihail, J., & Rush, C. (Eds.). (1992). *Methods for research on soilborne Phytopathogenic Fungi*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press.