



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Evaluación *in vitro* del efecto antagonista asociado a distintos compuestos fungicidas frente a *Diplodia corticola*

ANAND-BABU UPPARA^{1,2}, DALMAU ALBÓ-TIMOR³, E. JORDÁN MUÑOZ-ADALIA^{2,3}, CARLOS COLINAS-GONZÁLEZ^{2,3}

¹Forest Bioengineering Solutions, S.A, Carretera St. Llorenç de Morunys, km.2 Solsona, Catalonia E-25280 Spain, anand.uppara@fbs.cat

²Departament Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida, Av. de l'Alcalde Rovira Roure 191 Lleida, 25198 Spain. carlos.colinas@pvcf.udl.cat

³Centre de Ciència i Tecnologia Forestal de Catalunya (CTFC), Carretera St. Llorenç de Morunys, km.2 Solsona, Catalonia 25280 Spain. jordan.munoz@ctfc.cat

Resumen

El chancro del alcornoque (*Quercus suber* L.), causado por *Botryosphaeria corticola* (*Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque), es un factor conocido por su contribución al declive de los alcornocales en Cataluña, así como en otros enclaves de la región Mediterránea Occidental. En el presente estudio se evalúa la efectividad *in vitro* de ocho fungicidas candidatos en la reducción del crecimiento vegetativo y la esporulación del hongo. Dichos resultados suponen una caracterización preliminar de posibles herramientas eficaces en el tratamiento de la enfermedad del escaldado del alcornoque.

Palabras clave

Botryosphaeria corticola, crecimiento vegetativo, cultivo dual, fitosanitarios.

1. Introducción

El alcornoque (*Quercus suber* L.) es un árbol perteneciente a la familia de las Fagáceas. Se caracteriza por poseer una corteza gruesa, de unos 15 cm, que puede ser extraída sin provocar daños graves al árbol, pues puede regenerarse con el tiempo (Rives et al., 2012). Se considera nativo de la región Mediterránea Occidental y se extiende a lo largo de la Península Ibérica, las costas meridionales de Francia, el oeste de Italia, norte de África, USA y algunas islas en el oeste del Mediterráneo (Luque et al., 2008; Costa et al., 2020). A nivel mundial la superficie ocupada por formaciones forestales de alcornoque alcanza 2.277.700 ha, el 55% de las cuales se concentran en la Península Ibérica. La producción anual media de corcho en esta área es de aproximadamente 245.400 toneladas, lo que supone un 82% de la producción mundial. En Cataluña, las masas forestales que incluyen al alcornoque ocupan 116.000 ha, siendo esta especie dominante en solo 63.000 ha (Rives et al., 2012).

En el sur de España, los alcornocales representan un importante motor económico de la economía rural (Serrano et al., 2015). Múltiples factores bióticos y abióticos han sido relacionados con el declaimiento que el alcornoque viene acusando en estas últimas décadas. Por encima de todos ellos destaca el hongo ascomiceto *Botryosphaeria corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque, (anamorfo: *Diplodia corticola* Phillips, Alves & Luque) causante de la patología comúnmente conocida como escaldado del alcornoque (Luque et al., 2008). *Diplodia corticola*, identificada previamente como *Botryosphaeria stevensii* (anamorfo: *D. mutila*) (Luque et al., 2008; Serrano et al., 2015), ha sido detectada en Andalucía y otras regiones corcheras de España como Cataluña (Luque & Girbal, 1989), así como en otros países de la cuenca Mediterránea como Italia, Portugal, Marruecos y algunas partes de EEUU (Sánchez et al., 2003; Serrano et al., 2015; Muñoz-Adalia y

Colinas, 2021). Desde 1934 es conocida la presencia de este patógeno en Cataluña (Luque & Girbal, 1989).

La patología suele manifestarse cuando el corcho ha sido retirado del árbol, así como por heridas causadas por la propia actividad de descorche u otros factores bióticos o abióticos. Actualmente, se sabe que el hongo puede colonizar el árbol descorchado al menos en los primeros 35 días tras la pela. Además, las infecciones más tempranas no están directamente asociadas con síntomas más graves o una colonización más rápida por parte del patógeno (Muñoz-Adalia y Colinas, 2021). Las lesiones ocasionadas, se caracterizan por generar una coloración anormal de la corteza de las superficies infectadas, pudiendo adoptar tonos de un marrón oscuro pálido. Pasados de 3-6 meses, se suelen desarrollar áreas necróticas de tamaño variable, acompañadas de una pérdida de la actividad fisiológica de los tejidos subyacentes. Como consecuencia, la corteza puede ser retirada fácilmente. Otros síntomas que se pueden dar según el nivel de afectación del árbol son la marchitez y, en casos extremos, la muerte del árbol. La pérdida del árbol tiende a producirse de uno a tres años después de la detección de los primeros síntomas (Luque y Girbal, 1989). La sintomatología característica consiste en la proliferación de chancros cubiertos de exudaciones en árboles maduros o marchitez y necrosis de la corteza en plántulas (Luque et al., 2008). Esto sucede como resultado de la actividad del hongo, el cual necrosa la capa subero-felodérmica impidiendo la regeneración del corcho. Además, la infección por *D. corticola*, puede favorecer la irrupción de otras infecciones fúngicas y la colonización de insectos, lo que puede desencadenar la muerte del alcornoque.

Hasta el 2004, el Benomilo ($C_{14}H_{18}N_4O_3$) era el agente químico usado en España para prevenir la infección de *D. corticola* en los alcornocales. El método de control se basaba en el rociado del producto sobre la superficie recién descorchada del tronco del árbol. En el 2003, pese a su eficacia como agente regulador del escaldado, el Benomilo fue retirado del listado de pesticidas de la Comisión Europea y su uso fue prohibido (Luque et al., 2008). Desde entonces, se ha probado el potencial controlador de múltiples productos registrados frente a distintos miembros de la familia Botryosphaeriaceae para sustituir al Benomilo. El Carbendazim, el Tebuconazol y el Fluazinam redujeron significativamente la infección en viñedos afectados por *Diplodia seriata* De Not y *Diplodia mutila* N.E. Stevens. El Carbendazim, el Flusilazol, el Tebuconazol i el Tiofanato de Metilo resultaron ser efectivos frente a *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips en viñedos (Serrano et al., 2015; Luque et al., 2008) y obtuvieron resultados prometedores en el norte de España junto a distintos benzimidazoles para controlar *D. corticola*.

2. Objetivos

Evaluar *in vitro* la eficiencia de varios compuestos antifúngicos frente a *D. corticola*.

3. Metodología

Ensayo *in vitro* de agentes fungicidas: Tratamientos:

Para la preparación del ensayo de fungicidas se agregaron cantidades apropiadas de soluciones de trabajo de cada agente antifúngico y se mezclaron completamente con medio PDA 3,9% p/v para lograr la concentración deseada (Tabla 1). Todos los agentes fungicidas se disolvieron y se añadieron a una solución de PDA al 3,9 % p/v (Biokar). Como control se empleó el mismo número de placas que en los tratamientos, en estas placas las diferentes cepas fúngicas crecieron sobre medio PDA.

Tabla 1. Fungicidas usados en los tests in vitro

Ingrediente activo	Fabricante	Concentración (p/v o v/v)
--------------------	------------	---------------------------

Belthalol (0,17%)	PROBELTE	10,7 ml/L
Benomilo (0,1%)	SIGMA ALDRICH	1 g/L
Oligosacárido de Quitosano (1%)	GLENTHAM LIFE SCIENCES LTD	10 g/L
Flusilazol (5x10 ⁻³ %)	SIGMA ALDRICH	5 mg/L
Mekzol (0,5%)	FROSCH	5 ml/L
Tiofanato de Metilo (0,15%)	CERCOBIN-50SC	1,5 ml/L
Tebuconazol (0,005%)	SIGMA ALDRICH	50 mg/L
Vanilina (1%)	MERCH	10 g/L

Tabla 2. Relación de las 4 cepas de *D. corticola* usadas en el ensayo de antagonismo mediante fungicidas.

Nº cepa	Huésped	Origen	Fuente
CAA010	<i>Q. suber</i>	Samoa Correia, Portugal	Universidade de Aveiro
CAA007-1	<i>Q. suber</i>	Portugal	Universidade de Aveiro
B2N3	<i>Q. suber</i>	Tordera, España	CTFC
D00041	<i>Q. suber</i>	Arbúcias, España	CTFC

- **Cepas de *D. corticola*:**

Para el ensayo, se emplearon cultivos puros de las distintas cepas de *D. corticola* de las que se dispuso (B2N3 y D00041 (origen: Cataluña), CAA007-1 y CAA010 (origen: Portugal)) (Tabla 2).

- **Procedimiento de inoculación:**

Se colocó un cubo de micelio de 5 mm de arista en el centro de las distintas placas de Petri. Para medir el crecimiento experimentado por las distintas cepas, en la base de las placas se rotularon dos ejes ortogonales (a y b) que pasaban por el centro de las mismas. Se asignaron dos réplicas para cada tratamiento. El crecimiento radial a lo largo de cada eje se midió en intervalos de 48 horas. Se calculó el área (elipse A=πab) cubierta por micelio en cada placa cada dos días empleando los mencionados ejes y se calculó el valor promedio de la tasa de crecimiento diario por muestra al final del ensayo (G). Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente. El periodo de seguimiento de la evolución de las placas se detuvo cuando el 80 % de las placas de control se cubrieron con micelio.

- **Preparación de la suspensión esporal de *D. corticola*:**

Una vez obtenidos los valores para las variables de crecimiento, se procedió a evaluar el efecto de los tratamientos sobre la esporulación. Los tratamientos fueron evaluados habiendo pasado 30 días desde la inoculación. La preparación de la suspensión esporal consistió en verter 1000 µL de una solución de agua destilada con 0,01% v/v Tween 20 sobre el cultivo fúngico y agitar para garantizar la captación de un número de esporas representativo. Posteriormente, se retiraron mediante una micropipeta con punta estéril 10 µL de la suspensión para, utilizando un hemocitómetro, determinar la densidad de esporas/mL bajo el microscopio (Leica DMLB, Leica Microscope Systems). En los casos en que una concentración muy elevada de esporas impedía el correcto conteo de las mismas, se recurrió a diluciones seriadas con agua destilada esterilizada para mejorar la visualización. Se repitió el conteo por celda 6 veces y se usó el promedio resultante.

Análisis estadístico:

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el entorno de programación R (Versión 1.4.1717). Las variaciones de la tasa de crecimiento y la producción media de esporas entre los tratamientos se evaluaron con la prueba ANOVA seguida de una comparación por Prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher como análisis post hoc (<https://www.r-project.org/>) en el paquete "DescTools" (Signorell et al. 2015). La variación en la tasa de esporulación en función del tipo de tratamiento se evaluó utilizando el test de suma de rangos de Kruskal Wallis y el test de Dunn como análisis post-hoc.

Resultados del ensayo con fungicidas:

El crecimiento vegetativo de los controles referentes a las cepas B2N3 y D00041 alcanzó el máximo en >80% de las réplicas al cabo de 4 días. Por otro lado, el crecimiento máximo del 80% de las placas control para el resto de las cepas (CAA010 y CAA007) se registró el día 14.

El test ANOVA aplicado a la variable crecimiento medio (G) mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p\text{-valor}<0.05$). Los fungicidas Belthanol, Benomilo, Tiofanato de Metilo, Vanilina, Tebuconazol y Flusilazol fueron significativamente diferentes al control. El Oligosacárido de Quitosano y el Mekzol no inhibieron significativamente ($p\text{-valor}>0.05$) el crecimiento del micelio en comparación con el control.

Tabla 3: Indicadores de inhibición del crecimiento y producción de esporas entre D. corticola y compuestos fungicidas en PDA después de (14 y 30 respectivamente) días a la concentración óptima.

Tratamiento (mg/L o ml/L)	G (mm ² / día)	S (esporas / mL)
Belthanol (0,17%)	0±0 d	0±0 d
Benomilo (0,1%)	0±0 d	0±0 d
Oligosacárido de Quitosano (1%)	1520±357 b	32x10 ⁶ ±36x10 ⁵ b
Flusilazol (5x10 ⁻³)	27±8 d	19x10 ⁶ ±17x10 ⁵ b
Mekzol (0,5%)	2227±245 b	38x10 ⁶ ±83x10 ⁵ b
Tiofanato de Metilo (0,15%)	0±0 d	0±0 d
Tebuconazol (0,005%)	30±13 c	16x10 ⁶ ±16x10 ⁵ c
Vanilina (1%)	4±3 d	0±0 d
Control	9173±586 a	27x10 ⁶ ±71x10 ⁵ a

Nota: Se muestran valores medios y error estándar. Las letras minúsculas (a-d) muestran diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher ($p\text{-valor} < 0,05$).

Producción de esporas:

Todos los tratamientos y controles se dejaron incubar después de 30 días del día de la inoculación para medir la producción de esporas. Algunos tratamientos no mostraron crecimiento en los tratamientos con fitosanitarios, pero mostraron producción de esporas al comenzar a crecer después del día 14.

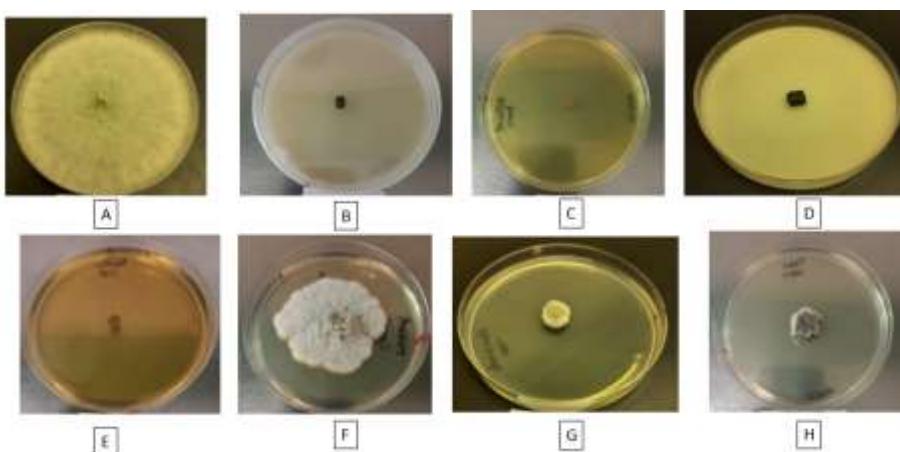


Figura 1. Crecimiento de *D. corticola* en diferentes tratamientos A.Control, B.Benomilo, C.Belthanol, D.Tiofanato de metilo, E.Vainillina, F.Mekzol, G.Flusilazol, H.Tebuconazol.

Al analizar posibles efectos de los tratamientos sobre la esporulación del hongo, solo se detectaron diferencias significativas entre los valores para la variable obtenidos por las distintas cepas (p -valor<0.05).

4. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el Benomilo, el Tiofanato de Metilo, el Belthanol, la Vanilina, el Tebuconazol y el Flusilazol fueron los fungicidas más efectivos para el control de *D. corticola* *in vitro*. El uso de Benomilo fue prohibido en España en abril de 2004 y el Tiofanato de metilo en 2020 según las Directivas Europeas 91/414/EEC, sobre la autorización de productos fitosanitarios para el mercado europeo, y 2002/928/EC (Luque et al., 2008; Muñoz-Adalia et al., 2021). No obstante, se utilizaron Benomilo y Tiofanato de Metilo como controles para comprobar la eficacia de los compuestos fungicidas ensayados en este trabajo.

Así pues, los resultados demuestran que los compuestos Belthanol, Benomilo, Tiofanato de Metilo y Vanilina inhiben el crecimiento del micelio completamente mientras que el Oligosacárido de Quitosano y Mekzol inhibieron el crecimiento del micelio de forma leve (<40 %). El Tebuconazol, por su parte también resultó altamente eficaz *in vitro* al inhibir el crecimiento del micelio en >95%. El Flusilazol resultó asimismo altamente eficaz (inhibición del crecimiento: >95%).

Los tratamientos de Belthanol, Benomilo, Tiofanato de Metilo y Vanilina inhibieron la producción de esporas en un 100 %, mientras que el Oligosacárido de Quitosano, Mekzol y Flusilazol provocaron reducción en la producción de esporas inferior al 48 %. El Tebuconazol inhibió la producción de esporas en más de un 65%. Para que un tratamiento pueda ser considerado como candidato para ser aplicado en planta en posteriores fases de estudio, se requiere que su grado de inhibición del crecimiento vegetativo sea elevado, similar al aportado por los tratamientos implementados hasta la fecha y, a ser posible, que además reduzca la producción de esporas del hongo de forma drástica, limitando su capacidad de colonización de nuevos hospedantes. Los resultados de este ensayo, en consecuencia, perfilan al Belthanol, Vanilina, Flusilazol como los más prometedores entre los fitosanitarios sintéticos estudiados en el presente trabajo.

En el ensayo con fitosanitarios, los tratamientos con Oligosacárido de Quitosano y Mekzol parecieron estimular la producción de esporas (119 % y 139 % respecto del control).

5. Conclusión

A raíz de la prohibición en España de agentes químicos efectivos de control de *D. corticola* como el Benomilo y el Tiofanato de Metilo estudios como el presente tratan de encontrar alternativas más respetuosas con el medio ambiente basadas en fungicidas sostenibles. En condiciones *in vitro*, los tratamientos de Vanilina, Belthanol y Tebuconazol mostraron una eficiencia en la inhibición del hongo similar a los valores alcanzados por el Benomilo y el Tiofanato de Metilo. No obstante, se espera ampliar los resultados obtenidos *in vitro* por ensayos *in vivo* que validen la eficacia de estos tratamientos en el medio natural.

6. Agradecimientos

A. Uppara es beneficiario de una beca predoctoral industrial en Forest Bioengineering solutions, y el Centro de Ciencia y Tecnología Forestal de Catalunya (CTFC) (referencia: E-25-2020-0115755). Los autores desean expresar su agradecimiento a Andreu Meijer (CTFC) por su contribución en el trabajo de laboratorio. Especial agradecimiento merecen las empresas Probelte S.A.U. (Murcia) y Frosch Chemie (Barcelona) por aportar el fitosanitario Belthanol y los compuestos de Mekzol, respectivamente, para acometer los ensayos realizados. Las cepas fúngicas de origen Portugués empleadas en el estudio fueron cedidas por el equipo de Dr. Artur Alves (Universidade de Aveiro; Portugal).

7. Bibliografía

- ALVES, A., CORREIA, A., LUQUE, J. AND PHILLIPS, A. 2004 *Botryosphaeria corticola*, sp nov on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96, 598–613. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832956>
- LUQUE, J., & GIRBAL, J. (1989). Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *European Journal of Forest Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1989.tb00764.x>
- LUQUE, J., PARLADÉ, J., & PERA, J. (2002). Seasonal changes in susceptibility of *Quercus suber* to *Botryosphaeria stevensii* and *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 51(3), 338-345. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00713.x>
- LUQUE, J., PERA, J., & PARLADÉ, J. (2008). Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria corticola* on cork oak in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology*, 38(3), 147–155. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00526.x>
- MORICCA, S., LINALDEDDU, B. T., GINETTI, B., SCANU, B., FRANCESCHINI, A., & RAGAZZI, A. (2016). Endemic and emerging pathogens threatening cork oak trees: Management options for conserving a unique forest ecosystem. *Plant Disease*, 100(11), 2184–2193. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0408-FE>
- MUÑOZ-ADALIA, E. J., & COLINAS, C. (2021). Susceptibility of cork oak (*Quercus suber*) to canker disease caused by *Diplodia corticola*: when time is of the essence. *New Forests*, 1-11. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11056-020-09829-8>

RIVES, J., FERNANDEZ-RODRIGUEZ, I., GABARRELL, X., & RIERADEVALL, J. (2012). Resources, Conservation, and Recycling Environmental analysis of cork granulate production in Catalonia – Northern Spain. "Resources, Conservation & Recycling," 58, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.11.007>

SÁNCHEZ, M.E., VENEGAS, J., ROMERO, M.A., PHILLIPS, A.J.L. AND TRAPERO, A. 2003 *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. Plant Dis. 87, 1515–1521. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.12.1515>

SIGNORELL A, AHO K, ANDEREGG N et al (2021) DescTools: Tools for Descriptive Statistics. 2021. <https://cran.r-project.org/web/packages/DescTools/DescTools.pdf>