

Caracterización, patogenicidad y control químico de *Cladobotryum mycophilum*, agente causal de la telaraña en cultivos de champiñón

Jaime Carrasco, M^a Jesús Navarro y Francisco J. Gea (Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES). E-mail: carraco.jaime@gmail.com; fjgea.cies@dipucuenca.es).

La telaraña del champiñón es una enfermedad de origen fúngico catalogada entre las más comunes y dañinas del cultivo a nivel mundial (Fletcher y Gaze, 2008). Su presencia en cultivos comerciales genera pérdidas de producción, tanto cuantitativas como cualitativas. Es una patología común en España aunque históricamente no había generado problemas de importancia. Sin embargo, en los últimos años (desde 2008) se observó un aumento de la incidencia y severidad de la infección, provocando mermas de rendimiento y preocupación en el sector productivo de Castilla-La Mancha y La Rioja (principales regiones productoras de champiñón).

Con el objetivo de generar conocimiento para combatir y minimizar las pérdidas provocadas por esta enfermedad, desde el Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES) se han realizado diversos trabajos de investigación a través de proyectos nacionales financiados por INIA con fondos FEDER (RTA2010-00011-C02 y E-RTA2014-00004-C02). J. Carrasco realizó un contrato predoctoral FPI-INIA cofinanciado por el Fondo Social Europeo.

Antecedentes y justificación

El aumento de brotes de enfermedad en cultivos españoles de champiñón así como la severidad de los mismos ha motivado un estudio en campo con el objetivo de aportar una perspectiva global sobre el impacto de la enfermedad en los cultivos comerciales. *Cladobotryum dendroides* era la especie históricamente identificada como agente causal de la telaraña en España, aunque son varias las especies del género *Cladobotryum* asociadas con la enfermedad (Grogan y Gaze, 2000). En los últimos años, coincidiendo con el repunte de la patología, en la comarca productora castellano-manchega se ha producido un tránsito progresivo desde los materiales de cobertura tradicionales, de base mineral, hacia materiales tipo turba. En este sentido, se ha evaluado la respuesta agronómica

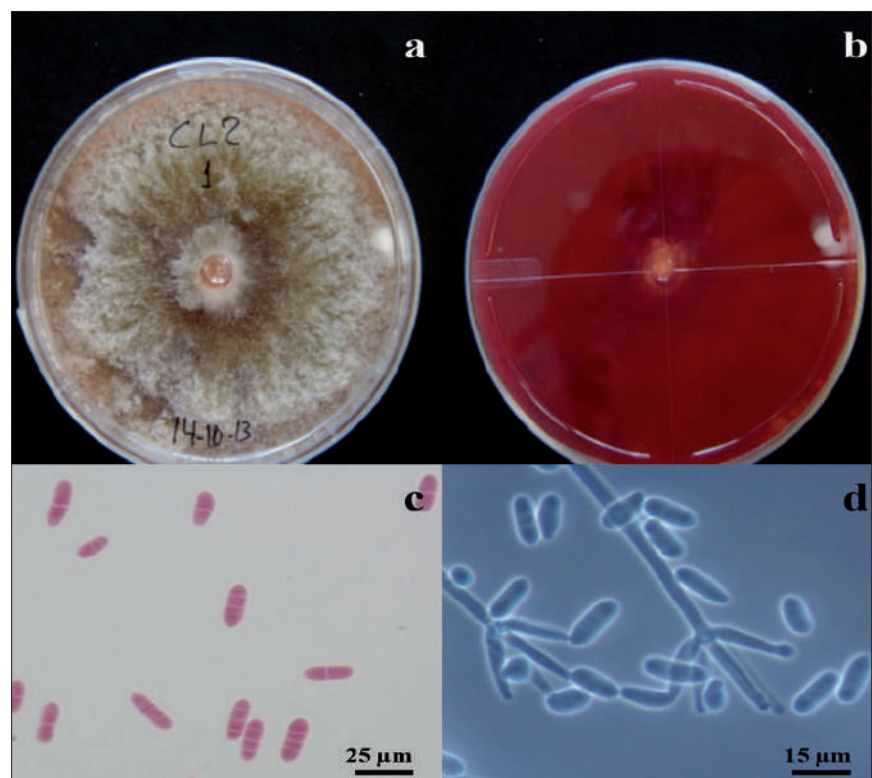


Figura 1. Morfología de *Cladobotryum mycophilum*: a y b) Haz y envés de placas Petri sembradas con el parásito sobre medio PDA (21 días tras la siembra e incubación a 22°C en oscuridad); c) Conidios; d) Conidios y filialides.

de distintos materiales de cobertura en cultivos de champiñón artificialmente inoculados con el parásito. También se han estudiado los aspectos relativos al control de la enfermedad. Existe un limitado abanico de fungicidas autorizados para combatir la patología en el cultivo, por lo que se requiere un adecuado empleo de los productos disponibles para combatir la telaraña y minimizar los riesgos de aparición de cepas resistentes. En el CIES se ha valorado la eficacia de distintos fungicidas de origen químico y diversos modos de acción para el control de la telaraña.

El agente causal: *Cladobotryum mycophilum*

El estudio de 25 especímenes de *Cladobotryum* spp. aislados a partir de cultivos de champiñón con síntomas de enfermedad en Castilla-La Mancha y la Rioja, concluyó con la identificación morfológica, molecular y filogenética del agente causal de la telaraña en cultivos españoles de champiñón: *Cladobotryum mycophilum* (Carrasco y col., 2016). La detección de esta nueva especie contrasta con la especie históricamente asociada a la enfermedad de la telaraña en cultivos españoles, *Cladobotryum dendroides*. Esta especie parece presentar una mayor agresividad puesto que la telaraña es una enfermedad que no había causado problemas anteriormente, aunque su presencia en los cultivos se considera endémica. *C. mycophilum* se caracteriza por presentar un crecimiento rápido y abundante esporulación, *in vitro* las colonias colorean el medio (PDA) con una intensa tonalidad rojiza, al secretar el pigmento 'aurofusarina', y carecen del olor a alcanfor descrito en bibliografía (Põldmaa, 2011). Los conidios son grandes, hialinos y baciloformes, siendo mayoritariamente monoseptados, las colonias presentan fiálides hialinas, alargadas y subuladas que se caracterizan por tener ápices simples y regulares (Figura 1). En colonias de cierta edad se ha detectado también la presencia de microesclerocios y clamidosporas (estructuras de resistencia y reserva de alimentos). Para la amplificación del ADN de los aislados empleados en el estudio se utilizaron los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4, y las secuencias obtenidas fueron comparadas con las registradas en la base de datos del GenBank mediante búsquedas Megablast. Las cepas de *C. mycophilum* secuenciadas en la investigación han sido también incluidas en la citada base de datos con los siguientes códigos de acceso: JQ004732-37 y KP698960-73 (Gea y

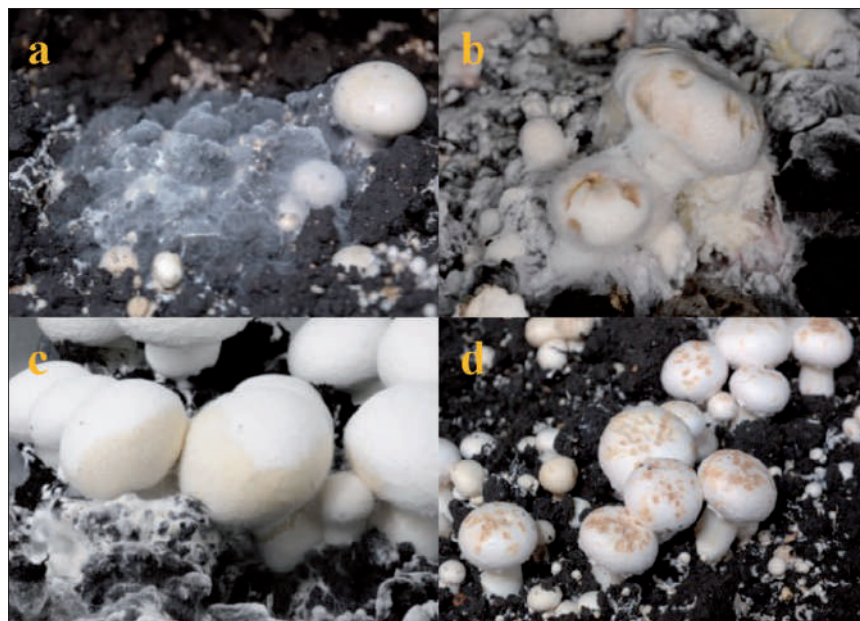


Figura 2. Síntomas de infección por telaraña. a) Micelio fino sobre cobertura y champiñones; b) Masa de esporulación envolviendo champiñones; c) Manchas o decoloraciones amarillo-grisáceas; d) Manchas marrones de borde mal definido.

col., 2012; Carrasco y col., 2016). Se construyó a su vez el correspondiente árbol filogenético, encuadrándose los aislados españoles en dos clados definidos por diversos especímenes de *C. mycophilum* registrados en el GenBank; Clado I: agrupados con las cepas Y17095, Y17096 (McKay y col., 1999) y JF505112 (Gea y col., 2011); Clado II: agrupados con las cepas AB527074 (Back y col., 2010) y JF693809 (Kim y col., 2012).

La enfermedad

La enfermedad de la telaraña es una patología común del cultivo de champiñón en todos los países productores. Está catalogada entre las cuatro enfermedades de origen fúngico más frecuentes y dañinas para el cultivo. Su aparición en cultivos comerciales de champiñón genera pérdidas cuantitativas y cualitativas. La telaraña coloniza la cobertura reduciendo la superficie de cultivo y provoca una podredumbre húmeda de los carpóforos que encuentra en su camino (Figura 2). Genera también dos tipos de moteado en el sombrero de los champiñones afectando a la calidad del producto (Figura 2), lo que no hace recomendable su comercialización: manchas o decoloraciones amarillo-grisáceas y manchas de color marrón oscuro y borde mal definido con depresiones en la superficie del carpóforo (Adie, 2000). Si la infección se generaliza puede ser necesario acortar el

ciclo de cultivo reduciéndose también el número de floradas a cosechar (Fletcher y Gaze, 2008).

Las esporas de *Cladobotryum* spp. que dan lugar a la infección pueden provenir de los mismos cultivos o de otras fuentes. Los brotes de enfermedad se asocian principalmente con sustratos contaminados o con deficiencias en la higiene de los cultivos. El factor clave atendiendo a la incidencia de la patología en cultivos comerciales de champiñón es la propagación de los conidios dentro de las naves de cultivo (Adie y col., 2006). Si una colonia de esporulación es manipulada o alterada las esporas generadas pasan al aire y se distribuyen por toda la nave de cultivo para formar colonias secundarias aprovechando las corrientes de aire de la instalación. Se recomienda cubrir las manchas de telaraña sobre cobertura o carpóforos inmediatamente después de ser detectadas, empleando un papel o paño grueso y húmedo para evitar la dispersión de los conidios (Pyck y Grogan, 2015).

Con el objetivo de aportar una perspectiva global sobre el impacto de la enfermedad, se muestrearon un total de 13 explotaciones de cultivo comercial de champiñón situadas en 5 poblaciones de la comarca productora de La Manchuela (Castilla-la Mancha) durante un período de 2 años (otoño 2011-verano 2013), para estimar la incidencia y severidad de la telaraña a lo largo del ciclo de cultivo, analizando la estacionalidad de la infección y el material de cobertura empleado por

el cultivador (Carrasco y col., 2016). Se realizaron un total de 507 visitas en cultivos comerciales. La telaraña, detectada en el 32% de las visitas realizadas, es una enfermedad común en el cultivo que puede aparecer en cualquier momento durante el año, aunque su presencia y severidad es mayor en otoño e invierno (44% y 37% de los cultivos muestreados en esas estaciones presentaron síntomas de infección) que en primavera y verano (18% y 28% respectivamente) (Figura 3).

La enfermedad se manifiesta con mayor frecuencia al avanzar el ciclo de cultivo. Los cultivos en tercera flor (56% presentaron infección) manifiestan la enfermedad con mayor frecuencia y severidad que los de segunda (24% de afectados) y primera flor (8%) (Figura 4).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con respecto a la aparición de la enfermedad al analizar los materiales de cobertura evaluados: mineral (cobertura tradicional) o tipo turba. Las propiedades físico-químicas de la turba, especialmente su elevada capacidad de retención de agua, facilitan a priori la germinación de las esporas patógenas; sin embargo, en el muestreo realizado no se detectó una mayor incidencia de la enfermedad en los cultivos con turba, tal vez debido a la mayor tecnificación de las instalaciones que utilizaron este material o al grado de introducción del nuevo material en la zona de producción evaluada. Durante el segundo año de muestreo la presencia de la enfermedad en los cultivos visitados fue considerablemente menor que durante el primero, como consecuencia directa de las recomendaciones de control y manejo de la telaraña, proporcionadas a los cultivadores a lo largo de las sucesivas visitas realizadas.

Patogenicidad de *C. mycophilum*

Se evaluó la patogenicidad de *Cladobotryum mycophilum* inoculando artificialmente un cultivo de *Agaricus bisporus* con diferentes materiales de cobertura tipo turba (Euroveen, Tmix e Infertosa) y mineral (cobertura tradicional). En el ensayo se emplearon dos cabinas de cultivo, una de las cuales fue usada como control sin enfermedad mientras que la segunda fue inoculada con una suspensión conidial de *C. mycophilum* a razón de 10^6 conidios m^{-2} .

La patología se detectó en los bloques inoculados, mientras que los bloques control permanecieron asintomáticos, luego la enfermedad detectada fue consecuencia directa del inóculo aplicado. De entre las coberturas inoculadas, los bloques cu-

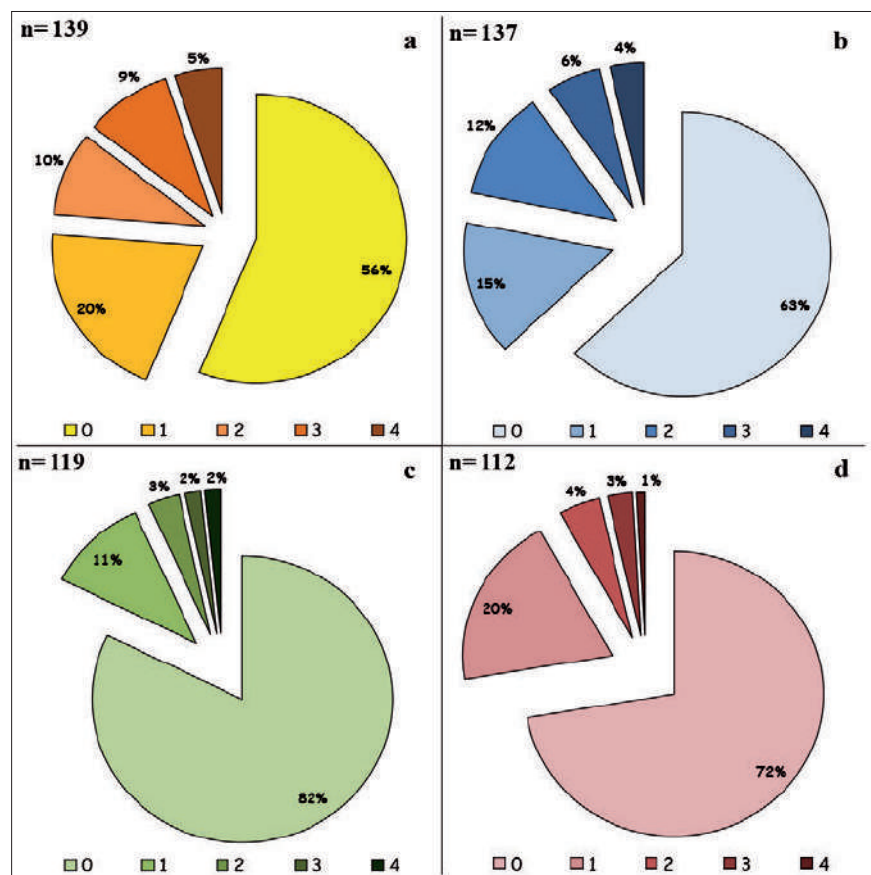


Figura 3. Incidencia y severidad estacional de la infección en cultivos de champiñón. a) Otoño. b) Invierno. c) Primavera. d) Verano. *Escala subjetiva de severidad: 0-No hay infección; 1-Focos puntuales, no más de 5; 2-Focos puntuales, más de 5, hasta un 10% de sacos afectados; 3-Entre un 10-50% de sacos afectados; 4-Más del 50% de sacos afectados. n= N° de visitas por estación.

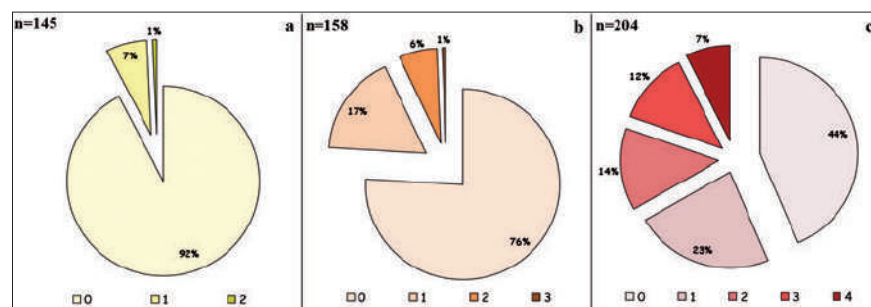


Figura 4. Incidencia y severidad de la infección en cultivos de champiñón a lo largo del ciclo. a) Primera flor. b) Segunda flor. c) Tercera flor. *Escala subjetiva de severidad. n= N° de visitas por estación.

biertos con turba mostraron mayor infección que los de cobertura mineral. La superficie de cultivo colonizada por la enfermedad aumentó al avanzar el ciclo de cultivo (Figura 5). Además, cuanto mayor fue la precocidad de la infección en las coberturas tipo turba, mayor fue el área de cultivo colonizada y mayores fueron las pérdidas de rendimiento registradas. Los descensos de rendimiento producidos

por la enfermedad en las coberturas tipo turba oscilaron entre el 1% y el 13% de la producción final (Tabla 1). La cobertura mineral registró una menor producción, no atribuible a la enfermedad de la telaraña sino a un inadecuado balance hídrico puesto que el manejo del cultivo fue el propio de coberturas tipo turba (Carrasco y col., 2016).



→ Llévate con AIKIDO tu John Deere ←



Modelo Gator XUV 825i



JOHN DEERE

- Por cada litro de **AIKIDO** (en envases de 1 y 5L) consigue un boleto para el sorteo de un John Deere Gator XUV 825i.
- Registra tu boleto en la web www.sorteoaikido.es indicando el número que aparece en el boleto de participación. No se aceptará ningún boleto que no se haya validado en la web del sorteo antes del 14 de Noviembre de 2017.
- El ganador será el boleto cuyo número coincida con el extraído por el Notario, en el sorteo que realizará en la sede sita en C/ Mallent i Meri 32, 1° izquierda, 46980, Paterna, Valencia, el 16 de noviembre de 2017, número que se publicará en la web www.sorteoaikido.es, y en www.sapecagro.es.

Las bases del concurso podrán consultarse en la sección de Archivo Electrónico de Bases de Concursos (ABACO) de la página www.notariado.org.
Para consumos entre el 15 de marzo y el 30 de Octubre de 2017.


SAPEC
AGRO ESPAÑA

Control químico de la enfermedad

Se ha valorado la efectividad y selectividad de cuatro fungicidas (clortalonil, metiltiofanato, procloraz-Mn y tiabendazol) frente a *C. mycophilum* mediante ensayos *in vitro* y en cultivo.

Mediante ensayos en placa, se calculó la dosis media efectiva, ED₅₀ (concentración de fungicida necesaria para inhibir el crecimiento micelial al 50%), de cada uno de los fungicidas así como el índice de selectividad entre patógeno y hospedador (resultado del cociente entre la ED₅₀ calculada para *C. mycophilum* y la calculada para *A. bisporus*, siguiendo la metodología descrita por Chrysai-Tokousbalides y col., 2007). Procloraz-Mn resultó el fungicida más tóxico y selectivo al micelio de *C. mycophilum* (Tabla 2). Se detectaron también en el estudio síntomas de resistencias a los fungicidas tipo bencimidazoles empleados (metiltiofanato y tiabendazol). Clortalonil presentó la peor selectividad (mayor índice de selectividad) entre las sustancias ensayadas, mostrando cierta toxicidad al micelio hospedador.

El control de la telaraña en cultivo mediante fungicidas fue evaluado tratando el cultivo con los fungicidas seleccionados y posteriormente inoculando artificialmente una suspensión conidial de *C. mycophilum* a razón de 10⁶ conidios m⁻². La telaraña se generalizó en la tercera florada en todos los tratamientos. La superficie de cultivo colonizada creció a lo largo del ciclo de cultivo. Una mayor precocidad supuso mayor superficie colonizada por el patógeno. La telaraña provocó descensos de rendimiento de hasta un 17% (Tabla 3).

La superficie de cultivo colonizada en el control sin inocular fue significativa debido a la dispersión conidial desde bloques inoculados. Un control muy pobre se logró en los ensayos mediante el uso de tiabendazol. Metiltiofanato también demostró ser ineficaz. Mientras que los tratamientos de procloraz-Mn fueron los más efectivos para controlar la enfermedad, retrasando la aparición de la misma hasta la tercera flor. Clortalonil registró la menor eficiencia biológica de cultivo entre los tratamientos fungicidas; por lo tanto puede concluirse que la baja especificidad de este producto puede condicionar la producción (Carrasco, 2016).

Conclusiones

Los resultados mostrados en el trabajo, indican que la telaraña, causada por el hongo micoparásito *Cladobotryum mycophilum*, es una enfermedad común en los cultivos españoles de champiñón condicio-

Cobertura	1ª Flor (kg m ⁻²)		2ª Flor (kg m ⁻²)		3ª Flor (kg m ⁻²)		Total (kg m ⁻²)	
	*Control	Inoculada	Control	Inoculada	Control	Inoculada	Control	Inoculada
Euroveen	11.1±1.7	10.9±0.8b ^d	12.3±1.5B	14.6±0.8A	13.9±2.9Aa	7.6±1.9B	37.4±2.6Aa	33.1±1.9B
Tmix	11.5±1.2	10.9±0.9b	12.7±1.1	13.7±1.3	12.3±2.8Aab	7.2±3.1B	36.5±3.3Aab	31.8±3.2B
Infertosa	10.8±0.6B	11.9±0.9Aa	12.8±1.1	13.5±1.2	10.3±3.6b	7.1±3.2	33.9±3.4b	32.5±3.3
Mineral	6.6±1.3	9.9±0.8c	11.6±1.6	6.4±0.8	7.6±1.1c	8.3±3.0	25.8±1.5c	24.6±2.9

*Control: Cabina control. Inoculada: Cabina inoculada. ^aMedia ± SEM (error estándar) ^b Los valores medios seguidos por una misma letra minúscula en una misma columna no presentan diferencias significativas respecto al Test LSD de Fisher (mínima diferencia significativa) para P= 0,05. Para cada florada, comparando la cabina control y la cabina inoculada, los valores medios seguidos por letras mayúsculas diferentes en las filas presentan diferencias significativas respecto al Test LSD de Fisher para P= 0,05. Los valores que presentaban distribución de datos no normal fueron sometidos al Test Kruskal-Wallis para establecer diferencias significativas comparando las medianas con un nivel de confianza del 95,0% (P<0,05).

Tabla 1. Producción (kg m⁻²) y eficiencia biológica (BE, kg dt⁻¹) en los ensayos de patogenicidad.

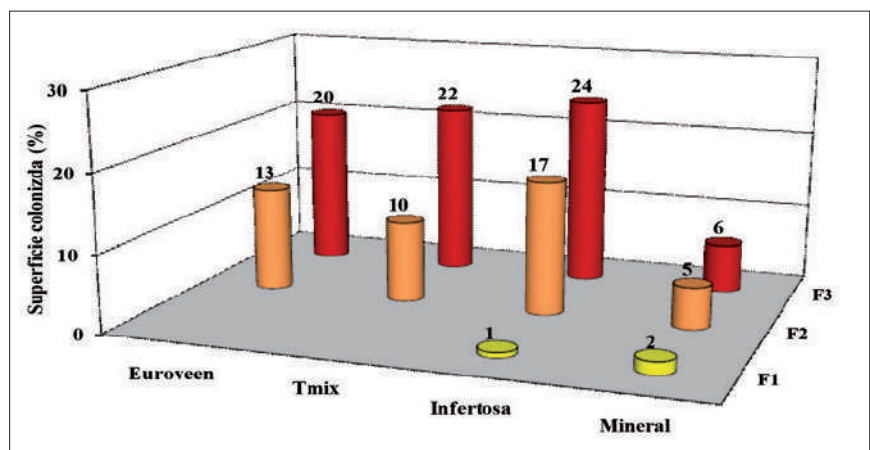


Figura 5. Superficie de cultivo colonizada por telaraña a lo largo del ciclo en las distintas coberturas empleadas (Euroveen, Tmix, Infertosa y Mineral). F1: final primera flor; F2: final segunda flor; F3: final tercera flor.

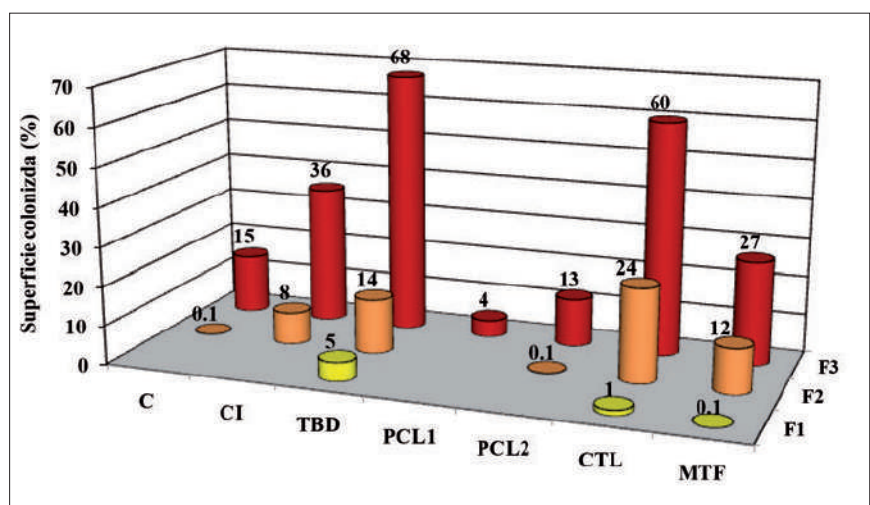


Figura 6. Superficie de cultivo colonizada por telaraña a lo largo del ciclo de cultivo en los distintos tratamientos aplicados. No inoculado: C (Control con agua). Inoculados con enfermedad: CI (Control sin fungicida); TBD (Tiabendazol, 1 g m⁻²); PCL1 (Procloraz-Mn, 0,5 g m⁻²); PCL2 (Procloraz-Mn, 1 g m⁻²); CTL (clortalonil, 2 mL m⁻²); MTF (metiltiofanato, 1 g m⁻²). F1: primera flor; F2: segunda flor; F3: tercera flor.

Fungicida	n ¹	ED ₅₀ (µg ml ⁻¹)		Índice de selectividad
		Media ²	Rango	
Clortalonil	50	0,54±0,24b	0,16-1,23	0,38±0,01d
Metilbolofanato	42	5,29±3,09c	1,73-14,8	0,17±0,02e
Procloraz-Mn	46	0,403±0,02a	0,001-0,11	0,001±0,01a
Triabendazol	42	4,85±1,56c	1,16-7,88	0,01±0,02b

¹Número de valores de ED₅₀ considerados por fungicida.
²Entre los valores medios de ED₅₀ seguidos por una misma letra en las columnas no existen diferencias significativas respecto al Test de Kruskal-Wallis (P>0,05) y al Test Mann-Whitney (Wilcoxon) W (P>0,05) para evaluar diferencias significativas comparando las medianas, con una confianza del 95,0%.

Tabla 2. Valores de ED₅₀ e índices de selectividad patógeno/huésped calculados para *C. mycophilum* frente a los fungicidas evaluados.

Tratamiento	1ª Flor (kg m ⁻²)	2ª Flor (kg m ⁻²)	3ª Flor (kg m ⁻²)	Total (kg m ⁻²)
Control	11,3±1,0ab	10,7±1,9a	7,0±1,6ab	28,9±2,3a
C1	11,0±1,1ab	10,0±1,5a	5,8±2,9ab	26,9±3,7abc
TBD	10,4±0,7b	9,6±1,6ab	4,4±3,5b	24,4±4,8bc
PCT.1	11,5±1,0ab	10,4±1,2a	7,7±1,5a	29,6±1,0a
PCT.2	11,6±1,2ab	7,9±1,2bc	7,0±1,2ab	26,5±2,9abc
CTL	11,1±1,5ab	7,1±2,5c	4,8±3,9ab	23,0±5,9c
MUF	12,0±1,5a	9,3±1,3ab	5,6±3,3ab	26,9±3,1ab

¹Los valores medios seguidos por una misma letra en las columnas no presentan diferencias significativas respecto al Test LSD de Fisher (mínima diferencia significativa) para P = 0,05 y al Test de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas comparando las medianas, con una confianza del 95,0% (P>0,05). C1: Control inoculado, TBD: Triabendazol, PCT.1: Procloraz (una aplicación), PCT.2: Procloraz (dos aplicaciones), C11: Clortalonil, MUF: Metilbolofanato.

Tabla 3. Producción (kg m⁻²) a lo largo del ciclo de cultivo (tres floradas) en los distintos tratamientos con fungicidas.

nada por la estacionalidad y la etapa del ciclo de cultivo. La patología causa mermas de producción y tiene mayor tendencia a aparecer en coberturas tipo turba. Los brotes de enfermedad localizados sobre la cobertura deben ser tratados tan pronto como se localizan sobre la cobertura cubriendo con papel húmedo las manchas para evitar la liberación de

conidios. Cuando no se tratan correctamente, los conidios se dispersan en los cultivos, generalizando la infección y provocando mayores pérdidas. Aunque procloraz-Mn es el fungicida más eficiente para hacer frente a esta patología, a lo largo del trabajo se ha detectado una potencial amenaza de aparición de cepas resistentes a este fungicida, lo

que exige un manejo adecuado de los productos autorizados. Actualmente los fungicidas autorizados en el cultivo de champiñón en España para combatir la telaraña son: procloraz-Mn, clortalonil (para champiñón con destino exportación a EE.UU) y metrafenona.

BIBLIOGRAFÍA

- Adie, B.; Grogan, H.; Archer, S.; Mills, P. 2006. Temporal and spatial dispersal of *Cladobotryum* conidia in the controlled environment of a mushroom growing room. *Applied and environmental microbiology* 72 (11), 7212-7217.
- Back, C.G.; Kim, Y.H.; Jo, W.S.; Chung, H.; Jung, H.Y. 2010. Cobweb disease on *Agaricus bisporus* caused by *Cladobotryum mycophilum* in Korea. *Journal of General Plant Pathology* 76, 232-235.
- Carrasco, J.; Navarro, M.J.; Santos, M.; Diáñez, F.; Gea, F.J. 2016. Incidence, identification and pathogenicity of *Cladobotryum mycophilum*, causal agent of cobweb disease on *Agaricus bisporus* mushroom crops in Spain. *Annals of Applied Biology* 168 (2), 214-224.
- Carrasco, J. 2016. Estudio de la telaraña del champiñón causada por *Cladobotryum mycophilum* en cultivos españoles. / Study of mushroom cobweb caused by *Cladobotryum mycophilum* in Spanish crops. Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. 138 pp. <https://ruidera.uclm.es/xmlui/handle/10578/9752>.
- Chrysai-Tokousbalides, M.; Kastanias, M.A.; Philippoussis, A.; Diamantopoulou, P. 2007. Selective fungitoxicity of famoxadone, tebuconazole and trifloxystrobin between *Verticillium fungicola* and *Agaricus bisporus*. *Crop Protection* 26 (4), 469-475.
- Gea, F.J.; Navarro, M.J.; Luz, L.M. 2011. First Report of *Cladobotryum mycophilum* causing cobweb on cultivated king oyster mushroom in Spain. *Plant Disease* 95, 1030.
- Gea, F.J.; Navarro, M.J.; Carrasco, J. 2012. First report of cobweb on white button mushroom (*Agaricus bisporus*) in Spain caused by *Cladobotryum mycophilum*. *Plant Disease* 96, 1067.
- Fletcher, J.T.; Gaze, R.H. 2008. Mushroom pest and disease control: a color handbook. Ed. Manson Publishing Ltd. Academic Press, San Diego. 192 pp.
- Grogan, H.M.; Gaze, R.H. 2000. Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. – causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 104 (3), 357-364.
- Kim, M.K.; Lee, Y.H.; Cho, K.M.; Lee, J.Y. 2012. First report of cobweb disease caused by *Cladobotryum mycophilum* on the edible mushroom *Pleurotus eryngii* in Korea. *Plant Disease* 96 (9), 1374.
- McKay, G.J.; Egan, D.; Morris, E.; Scott, C.; Brown, A.E. 1999. Genetic and morphological characterization of *Cladobotryum* species causing cobweb disease of mushrooms. *Applied and environmental microbiology* 65, 606-610.
- Pöldmaa, K. 2011. Tropical species of *Cladobotryum* and *Hypomyces* producing red pigments. *Studies in Mycology* 68, 1-34.
- Pyck, N.; Grogan H. 2015. Fungal diseases of mushrooms and their control. Factsheet 04/15. Mush TV Publications. 6 pp.