



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS Y MONTES

TESIS DOCTORAL

**CONTROL CULTURAL DE LA PODREDUMBRE
RADICAL CAUSADA POR *Phytophthora cinnamomi*
EN DEHESAS DE ENCINA**

María del Perpetuo Socorro Serrano Moral

Directoras

Dra. María Esperanza Sánchez Hernández

Dra. Pilar Fernández Rebollo

Córdoba, febrero de 2012

TÍTULO: Control cultural de la podredumbre radical causada por Phytophthora cinnamomi en dehesas de encina

AUTOR: María del Perpetuo Socorro Serrano Moral

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS Y MONTES

**CONTROL CULTURAL DE LA PODREDUMBRE
RADICAL CAUSADA POR *Phytophthora cinnamomi* EN
DEHESAS DE ENCINA**

Memoria redactada para optar al grado de Doctora con Mención Internacional por la
Universidad de Córdoba, por la Licenciada en Ciencias Ambientales:

María del Perpetuo Socorro Serrano Moral

VºBº

VºBº

Fdo. Dra. María Esperanza Sánchez
Hernández

Fdo. Dra. Pilar Fernández Rebollo

Córdoba, febrero de 2012



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo PAIDI AGR 221 “Silvopascicultura” del Departamento de Ingeniería Forestal y en el Departamento de Agronomía, ambos de la Universidad de Córdoba, a través del contrato laboral financiado por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía mediante el Convenio de colaboración con la Universidad de Córdoba, “*Estudio sobre la afectación del problema de la seca en las explotaciones agroganaderas andaluzas*”. Así mismo, el Proyecto de Investigación AGL2009-12243-C02-01 – “*Métodos culturales y biológicos para el control de Phytophthora cinnamomi en dehesas afectadas por la Seca de los Quercus*” del Ministerio de Ciencia e Innovación, ha cofinanciado la realización del mismo.

Agradezco especialmente al Departamento de Agronomía que me haya permitido hacer uso de sus instalaciones y laboratorios, a la Red de Viveros de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía que nos ha proporcionado el material vegetal utilizado en los experimentos, así como a la Oficina Comarcal Agraria de la Puebla de Guzmán (Huelva) por su inestimable ayuda en los trabajos de campo.

También expreso mi agradecimiento a la Universidad de Córdoba, que me concedió la ayuda financiera para realizar la estancia en el extranjero, al Ministerio de Educación que aportó los fondos necesarios, y principalmente a la Dra. Ana Cristina Coelho, que me acogió en el Centro de Investigación Química del Algarve, de la Universidad del Algarve (Portugal) durante 4 meses. Así como a la Acción FP0801 del Programa COST de la Unión Europea “*Established and emerging Phytophthora: Increasing threats to woodland and forest ecosystems in Europe*” que me ha financiado la asistencia a congresos y a cursos de formación.

Finalmente, quisiera agradecer a la Familia Núñez de Prado y a la Asociación Comité Andaluz de Agricultura Ecológica la concesión de la Mención Especial en la XIII edición de los Premios Andrés Núñez de Prado a la Investigación en la Agricultura y Ganadería Ecológica en el año 2011, por el trabajo titulado “*Métodos de control contra*

Phytophthora cinnamomi en dehesas de producción ecológica” que refleja parte del contenido de esta Tesis.

Por otra parte, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directoras, las profesoras Esperanza Sánchez y Pilar Fernández, a todos mis compañeros del Departamento de Ingeniería Forestal, Ramón, M^a Dolores, Alma, Maite, Félix y Luisa. También a Paqui, Francisco, Luis, Mario, Juan, M^a Carmen, Carlos, María Denis, M^a Ángeles, Paco, Diego, M^a Ángeles, Pedro, Ángela, al profesor Javier López, al resto de miembros del Departamento de Agronomía y especialmente a su director, el profesor Antonio Trapero; a Jonatan, a Paolo, a mis amigos, mis padres, mi hermana, mi hermano, al resto de mi familia y finalmente, a Gabi.

Todos vosotros, de una manera u otra, me habeis acompañado, animado, aconsejado, consolado, y en definitiva, AYUDADO a que esta Tesis Doctoral sea por fin un hecho.

Córdoba, febrero de 2012

Dña. **María Esperanza Sánchez Hernández**, Profesora Titular del Área de Producción Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba y Dña. **Pilar Fernández Rebollo**, Profesora Titular del Área de Ingeniería Agroforestal del Departamento de Ingeniería Forestal de la Universidad de Córdoba, **INFORMAN**

Que el trabajo “Control cultural de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en dehesas de encina” del que es autora **María del Perpetuo Socorro Serrano Moral**, se ha realizado en los Departamentos de Ingeniería Forestal y Agronomía en el marco del convenio “*Estudio sobre la afectación del problema de la seca en las explotaciones agroganaderas Andaluzas*” financiado por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y el proyecto AGL2009-12243-C02-01 – “*Métodos culturales y biológicos para el control de Phytophthora cinnamomi en dehesas afectadas por la Seca de los Quercus*” financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y ambos desarrollados en la Universidad de Córdoba

El trabajo tiene carácter de investigación y reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa como Tesis Doctoral.

Los resultados que se han ido generando se han expuesto y discutido en los foros y congresos científicos nacionales e internacionales que se detallan a continuación:

Comunicaciones presentadas en Congresos Internacionales

1. 5th Working Groups General Meeting of the COST-FPS Action FP0801. Budapest, Hungría (2011). 1 comunicación.
2. 6th IOBC Working Group Meeting on Multitrophic Interactions in Soil. Córdoba, España (2011). 1 comunicación.
3. IOBC-OILB 6th Meeting Integrated Protection in *Quercus* spp. forests. Tempio Pausania, Italia (2010). 2 comunicaciones.
4. II Symposium The oak: Ecology, History, Management and Planning. Suleyman Demirel University, Isparta, Turquía. (2010). 2 comunicaciones.
5. 5th Working Group Meeting (WG4-Management and Control) of the COST-FPS Action FP0801. Viterbo, Italia (2010). 1 comunicación.
6. 2nd Working Group Meetings (WG3 Diagnostics and WG4 Management and Control) of the COST-FPS Action FP0801. Faro, Portugal (2009). 1 comunicación.
7. 9th International Congress of Plant Pathology. Torino, Italia (2008). 1 comunicación.

Comunicaciones presentadas en Congresos y Jornadas Científicas Nacionales

8. II Reunión Científica de Sanidad Forestal. Sociedad Española de Ciencias Forestales. Plasencia, Cáceres (2011). 1 comunicación.
9. XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. Vitoria (2010). 3 comunicaciones.
10. XLVIII Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. Huesca (2009). 1 comunicación.
11. XXV Reunión Anual del Grupo de Trabajo de Forestales, Parques y Jardines. Jaca, Huesca (2008). 1 comunicación.
12. XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. Lugo (2008). 2 comunicaciones.
13. XLVII Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. Córdoba (2008). 1 comunicación.

y han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Artículos publicados en revistas científicas indexadas (SCI, Science Citation Index)

1. **Serrano MS**, Fernández- Rebollo P, Carbonero MD, Sánchez ME. Effect of potassium products in the inhibition of *Phytophthora cinnamomi* infections on *Quercus* roots. **Journal of Phytopathology** (under review, 2012)
2. **Serrano MS**, Fernández P, De Vita P, Sánchez ME. Calcium mineral nutrition increases the tolerance of *Quercus ilex* to *Phytophthora* root disease affecting oak rangelands ecosystems in Spain. **Agroforestry Systems** (under review, submitted in 2011)
3. **Serrano MS**, De Vita P, Fernández-Rebollo P, Sánchez ME. Susceptibility of common herbaceous crops to *Phytophthora cinnamomi* and its influence on *Quercus* root rot in rangelands. **European Journal of Plant Pathology** (accepted, 2012)
4. **Serrano MS**, De Vita P, Carbonero MD, Fernández F, Fernández-Rebollo P, Sánchez ME. Susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* of the commonest morphotypes of Holm oak in southern Spain. **Forest Pathology** (in press, 2012). doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00758.x
5. **Serrano MS**, De Vita P, Fernández P, Sánchez ME. Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Quercus ilex*. **European Journal of Plant Pathology** 132: 271-279 (2012)
6. **Serrano MS**, Fernández P, De Vita P, Carbonero MD, Sánchez ME. The role of yellow lupin (*Lupinus luteus*) in the decline affecting oak agroforestry ecosystems. **Forest Pathology** 41: 382-386 (2011)
7. **Serrano MS**, Fernández P, De Vita P, Carbonero MD, Trapero A, Sánchez ME. *Lupinus luteus*, a new host of *Phytophthora cinnamomi* in Spanish oak-rangelands ecosystems. **European Journal of Plant Pathology** 128: 149-152 (2010)
8. Fernández P, **Serrano MS**, de Vita P, Carbonero MD, Sánchez ME. Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* on *Lupinus luteus* growing in Mediterranean *Quercus* grasslands. **Journal of Plant Pathology** 90: S2.177 (2008)

Artículos publicados en revistas científicas no indexadas y de divulgación científica

9. **Serrano MS**, Fernández P, Sánchez ME. Susceptibilidad a *Phytophthora cinnamomi* de cultivos herbáceos habituales en dehesas y su influencia en la podredumbre radical de los *Quercus*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 37: 251-262 (2011)
10. **Serrano MS**, Fernández P, Sánchez ME. La fertilización cálcica como herramienta de control de la podredumbre radical de encinas en la dehesa. Vida Rural 15/11/2011: 14-19 (2011)
11. **Serrano MS**, De Vita P, Fernández-Rebollo P, Sánchez ME. Control de la podredumbre radical de encinas mediante fertilizantes inorgánicos III: efecto de la aplicación al suelo de fertilizantes cálcicos y potásicos. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 37: 119-127 (2011)
12. **Serrano MS**, De Vita P, Fernández-Rebollo P, Sánchez ME. Control de la podredumbre radical de encinas mediante fertilizantes inorgánicos II: efecto *in vitro* del Ca y el K en la capacidad infectiva de *Phytophthora cinnamomi*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 37: 109-118 (2011)
13. **Serrano MS**, De Vita P, Sánchez ME, Fernández-Rebollo P. Control de la podredumbre radical de encinas mediante fertilizantes inorgánicos I: influencia de la nutrición cálcica y potásica en la tolerancia a la infección por *Phytophthora cinnamomi*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 37: 97-107 (2011)
14. **Serrano MS**, Sánchez ME, de Vita P, Carbonero MD, Trapero A, Fernández Rebollo P. Influencia del cultivo de *Lupinus luteus* en la podredumbre radical de las encinas en dehesas. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 35: 481-490 (2009)
15. **Serrano MS**, Fernández Rebollo P, Carbonero MD, Trapero A, Sánchez ME. La tremosilla (*Lupinus luteus*): un nuevo huésped de *Phytophthora cinnamomi* en las dehesas de Andalucía occidental. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 35: 75-87 (2009)
16. Fernández Rebollo P, Carbonero MD, **Serrano MS**, García A, Vicente M, Trapero A, Sánchez ME. La podredumbre radical de encinas y alcornoques en dehesas y montes. Sólo Cerdo Ibérico 20: 75-85 (2008)

Capítulos de libro

17. Sánchez ME, Serrano MS, De Vita. Enfermedades. En: Manual para el seguimiento del estado sanitario de la vegetación arbórea en la dehesa. Calzado C y Fernández-Rebollo P (Eds.). Consejería de Agricultura y Pesca y Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. pp. 103-140 (2009)

Artículos publicados en Proceedings

18. Serrano MS, De Vita P, Fernández P, Coelho AC, Belbahri L, Sánchez ME. *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium spiculum* as main agents of *Quercus* decline in southern Spain and Portugal. IOBC/wprs Bulletin (2012, in press)
19. Serrano MS, Fernández P, De Vita P, Carbonero MD, Sánchez ME. Soil fertilization as a control strategy against *Quercus* root rot in agroforestry systems. IOBC/wprs Bulletin (2012, in press)

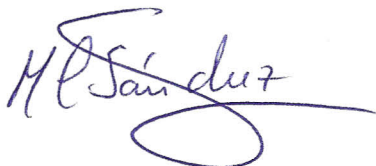
Artículos publicados en Libros de Actas

20. Serrano MS, De Vita P, Fernández P, Sánchez ME. Susceptibilidad a *Phytophthora cinnamomi* de herbáceas cultivadas y su influencia en la podredumbre radical de los *Quercus* en dehesas. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales (en prensa, 2012)
21. Serrano MS, Sánchez ME, de Vita P, Carbonero MD, Trapero A, Fernández Rebollo P. Influencia del cultivo de *Lupinus luteus* L. en la densidad de inóculo de *Phytophthora cinnamomi* en suelos de dehesa. En: La multifuncionalidad de los pastos: producción ganadera sostenible y gestión de los ecosistemas. Actas de la XLVIII Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. Huesca. 15-18 de junio 2009. pp. 605-611. Departamento de Agricultura y Alimentación, Gobierno de Aragón. (2009)
22. Carrasco A, Rodríguez S, Ruiz JM, Serrano MS, Fernández Rebollo P, Vicente M, Carbonero MD, Trapero A, Sánchez ME. Manejo del suelo para el control de *Phytophthora cinnamomi* en dehesas del sur peninsular. Actas de la XXV Reunión Anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines. Dpto. de Medio Ambiente, Gobierno de Aragón. Jaca, Huesca. 18-20 de noviembre. pp. 170-174 (2008)
23. Fernández Rebollo P, Serrano MS, de Vita P, Carbonero MD, Trapero A, Sánchez ME. Susceptibilidad del altramuz amarillo (*Lupinus luteus* L.) a la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. En: Pastos, clave en la gestión de los territorios: Integrando disciplinas. Actas de la XLVII Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. Córdoba. 21-24 de abril 2008. pp. 261-266. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía (2008)

Por todo ello se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, a veintinueve de febrero de dos mil doce

Firma de las directoras



Fdo. María Esperanza Sánchez
Hernández



Fdo. Pilar Fernández Rebollo



Prof. Ana Cristina Coelho
Universidade do Algarve
CIQA-Centro de Química do Algarve
8100-139- Faro-Portugal
Tel. + 351 289 800900 (6129)

e-mail: acoelho@ualg.pt

Faro, 2010

TO WHOM IT MAY CONCERNS

Ms. María del Perpetuo Socorro Serrano Moral, with DNI 26972641N has been working as a pre-doctoral researcher for the European Doctorate consecution in the University of Algarve for four months (from June 1st to September 30th 2010), supervised by Ana Cristina Hurtado de Matos Coelho, professor at the University and investigator at the research centre CIQA (Centro de Investigação em Química do Algarve).

The main topic of research was the study of the molecular identification of the secretome transcripts in the *Q. ilex/Phytophthora cinnamomi* interaction. This work was included in the project "Métodos culturales y biológicos para el control de *Phytophthora cinnamomi* en dehesas afectadas por la Seca de los *Quercus*" (AGL2009-12243-C02-01 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

During her stay María became familiar with molecular methods including bacterial transformation, plasmid DNA extraction and spectrophotometric and electroforetic DNA analysis. The laboratorial work performed included the production of *P. cinnamomi* zoospores and infection of tissue/solid support materials for subsequent RNA extraction.

Collaboration was very fruitful because it allowed the implementation of the first steps of YST technique for the identification of secreted proteins from *P. cinnamomi* during infection.

Prof. Ana cristina Coelho
Responsible of the Research Project

Prof. João Brandão
Responsible of Research Center CIQA
University of Algarve





INFORME DOCTORES INTERNACIONALES TESIS DOCTORAL

REFEREE REPORT ON THE PhD TESIS PRESENTED
IN THE UNIVERSITY OF CÓRDOBA (SPAIN)
BY María Socorro Serrano Moral

TITLE OF THE TESIS:	Cultural control of root rot caused by <i>Phytophthora cinnamomi</i> in Holm oak rangelands
---------------------	---

REFEREE:

Prof./Dr.:	Anna Maria Vettraino				
Position:	Research				
Department:	Department for Innovation in Biological, Agro-food and Forest systems				
Institution:	University of Tuscia				
Address:	S. Camillo de Lellis				
Phone:	+390761357499	Fax	+3907613574 73	E-mail:	vettrain@unitus.it

This thesis meets the requirements for presentation as an oral dissertation	YES	NO
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Rating	Originality	Scientific /technical merit	Planning /methodology
Outstanding	X		
Excellent		X	
Very Good			X
Good			
Sound			
Defficient			

COMMENTS (Please use additional sheets, if necessary):

The results of this thesis well describe the environment of oak stands affected by *P. cinnamomi* in Spain. Highly supporting the excellent scientific approach used for the study, the work establishes a very good benchmark in terms of practical strategies to control the spread of *P. cinnamomi*. Based on studies "in vitro" and "in vivo" Dr. María Socorro Serrano Moral, together with other authors, provided suggestions for the development of Control Integrated Protocols (ICPs). Several tools, as for example the use of limestone amendments and potassium fertilization and the suppression of yellow lupin cultivation in oak rangelands, are recommended to be included in a ICPs. Although further research is needed to better understand some aspects studied, I consider the delivery obtained as this stage as a very important milestone for the scientific community and for the final users of oak stands.

DATE: 2nd-Febru ary, 2012

SIGNATURE: Dr. Anna Maria Vettraino



INFORME DOCTORES INTERNACIONALES TESIS DOCTORAL

REFEREE REPORT ON THE PhD TESIS PRESENTED
IN THE UNIVERSITY OF CORDOBA (SPAIN)
BY María Socorro Serrano Moral

TITLE OF THE THESIS:	Cultural control of root rot caused by <i>Phytophthora cinnamomi</i> in Holm oak rangelands
-----------------------------	---

REFEREE:

Prof./Dr.:	Dr. Walter J. Kaiser		
Position:	Research Plant Pathologist, Retired		
Department:	U.S. Department of Agriculture		
Institution:	Washington State University		
Address:	Pullman, Washington, U.S.A.		
Phone:	(208) 336-1227	Fax: NA	E-mail: Wjkaiser37@yahoo.com

This thesis meets the requirements for presentation as an oral dissertation	YES <input checked="" type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
---	--	--------------------------------

Rating	Originality	Scientific /technical merit	Planning /methodology
Outstanding	X	X	X
Excellent			
Very Good			
Good			
Sound			
Deficient			

COMMENTS (Please use additional sheets, if necessary):

It was a pleasure to read Ms. Serrano's Ph.D. thesis. I found her research to be original and well planned. Her investigations have made a significant contribution to better understanding the causes of the decline of Holm oaks in the rangelands (dehesas) of southwestern Spain. The role played by the oomycete, *Phytophthora cinnamomi*, was especially noteworthy. Ms. Serrano's research is an important contribution to the control of the pathogen by cultural methods. Ms. Serrano is to be commended for having seven manuscripts accepted in various international scientific journals published in English. The information she has provided contributes to the knowledge base regarding the diseases of Holm oak.

DATE: February 17, 2012

SIGNATURE:
Walter J. Kaiser Ph.D.



INFORME DOCTORES INTERNACIONALES TESIS DOCTORAL

REFEREE REPORT ON THE PhD TESIS PRESENTED
IN THE UNIVERSITY OF CÓRDOBA (SPAIN)
BY María Socorro Serrano Moral

TITLE OF THE TESIS:	Cultural control of root rot caused by <i>Phytophthora cinnamomi</i> in Holm oak rangelands
---------------------	---

REFEREE:

Prof./Dr.:	ELENA TURCO		
Position:	administrative		
Department:	ARTEA – Regional Tuscany Agency for Agriculture		
Institution:	Tuscany Regional Government		
Address:	Via San Donato 42/1 – 50127 Firenze - Italy		
Phone:	+39-3382798804	Fax	E-mail: elena.turco70@gmail.com

This thesis meets the requirements for presentation as an oral dissertation	YES <input checked="" type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
---	--	--------------------------------

Rating	Originality	Scientific /technical merit	Planning /methodology
Outstanding			
Excellent			X
Very Good	X	X	
Good			
Sound			
Defficient			

COMMENTS (Please use additional sheets, if necessary):

The thesis is very innovative within the area of forest pathology and forestry management. The methodology and scientific approach here developed are usually applied to orchard trees as well as to sustainable wine-grape growing. Moreover, the results here presented open a new debate on management of “dehesas” ecosystem within the south Spanish economy, representing also a model for further studies for other forest ecosystems. In fact, in these last years diseases control in forest ecosystems is usually reached by genetic improving of hosts tolerance, not easy to apply on oak species. On the contrary, this thesis looks at the problem at the opposite face: to enhance natural growth conditions by an in-depth analysis of the whole oak ecosystem.

The integrated control of root rot in both cork and holm oaks caused by *Phytophthora cinnamoni* is the constant feature among the several published or under review papers on international scientific journal.

DATE: February 18th 2012

SIGNATURE: Elena Turco

RESUMEN

Las explotaciones agrosilvopastorales de dehesa (*montados* en Portugal) constituyen uno de los ecosistemas más característicos de la Península Ibérica. Están constituidas por cinco componentes básicos que se integran manteniendo el equilibrio ecológico del sistema: el estrato arbóreo, principalmente especies del género *Quercus*, los pastos, el matorral, cultivos forrajeros de secano y la ganadería extensiva. La dehesa es ante todo un sistema de producción ecológico, en el que se integra la conservación del arbolado, pastos y matorral, con la producción ganadera. La desestabilización de alguno de los elementos que constituyen la dehesa, y que son la base de su sistema de producción, conlleva importantes daños en el ecosistema; lo que supone, además, la no sostenibilidad del mismo y por lo tanto su abandono.

Desde principios de los años 90 se viene observando un severo decaimiento de los *Quercus* mediterráneos de las dehesas del sur de España y Portugal, originando una elevada mortalidad de encinas y alcornoques. Entre los factores asociados a este decaimiento destaca por su gravedad la podredumbre radical causada por el patógeno de suelo *Phytophthora cinnamomi*. Este oomiceto causa la muerte del arbolado, que según las condiciones ambientales puede ser un proceso de muerte lenta o de muerte súbita (en pocos meses). En ambos casos, los síntomas observados a nivel aéreo son amarillez y/o marchitez foliar, defoliación y muerte regresiva de brotes y ramas (puntiseado) y a nivel radical, necrosis de las raicillas absorbentes o ausencia de las mismas.

Phytophthora cinnamomi es un patógeno de distribución mundial y difícil de controlar debido a su elevado número de huéspedes, su capacidad para sobrevivir en suelos mal drenados y encharcados y hasta profundidades considerables, etc. La naturaleza del patosistema *Quercus/Phytophthora* no permite la utilización de métodos de control legislativos (cuarentenas) o la aplicación masiva de fungicidas, por lo que se debe plantear un sistema de control que integre distintas medidas culturales y/o biológicas, de bajo coste y aptas para la producción ecológica de las dehesas españolas.

En este trabajo se ha estudiado el efecto *in vitro* de varios productos de Ca^{2+} y K^+ (CaO , CaCO_3 , CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaSO_4 , KOH , KNO_3 , KCl , KIO_3 y K_2SO_4) sobre el crecimiento micelial, producción de esporangios y clamidosporas (esporas de resistencia) y germinación de esporangios (producción de zoosporas infectivas) de *P.*

cinnamomi. Aunque ninguno de los productos testados a pH~6 inhibió el crecimiento micelial del patógeno, el CaO, CaCO₃, CaSO₄, KOH y KIO₃ inhibieron de forma eficaz la producción de esporangios, y por lo tanto, la producción de zoosporas de *P. cinnamomi*, si bien no resultan tan efectivos en la inhibición de la germinación de los esporangios ya formados. El CaO, CaCO₃, K₂SO₄ y CaCl₂ inhibieron eficazmente la producción de clamidosporas. También se ha testado el efecto de los compuestos más eficaces en los ensayos *in vitro* (CaO, CaCO₃, CaSO₄, KOH y KIO₃) sobre la densidad de inóculo en suelo y la infectividad de *P. cinnamomi*. Cada producto se añadió a las dosis habitualmente empleadas en las dehesas a suelo infestado con clamidosporas del patógeno. Dos semanas después de la adición de los productos, sólo los compuestos de K⁺ dieron lugar a una disminución significativa de la densidad de clamidosporas viables. En ese momento, los suelos fueron transferidos a macetas donde se plantaron encinas. Las plantas que crecieron en suelo infestado y no tratado mostraron niveles altos de síntomas foliares y radicales, mientras que las plantas que crecieron en suelos infestados tratados con los fertilizantes (excepto el KIO₃), mostraron una reducción significativa de la severidad de síntomas. Estos resultados indican que la aplicación de enmiendas calizas, CaO y CaCO₃ fundamentalmente, aunque también CaSO₄ y KOH a los suelos de dehesa infestados por el patógeno podría constituir un tratamiento efectivo contra la podredumbre radical, reduciendo la incidencia de esta grave enfermedad.

Se ha evaluado el papel de la fertilización cálcica y potásica en la tolerancia de la encina a la podredumbre radical. Para ello se ha testado la susceptibilidad a *P. cinnamomi* de plantones de encina sometidos a una nutrición normal, deficiente en K⁺ y deficiente en Ca²⁺. Las encinas deficientes en K⁺ mostraron niveles de Ca²⁺ superiores a lo normal y se mostraron tolerantes a la enfermedad. La deficiencia en Ca²⁺, sin embargo, no se tradujo en un mayor nivel de K⁺ y además indujo un pobre desarrollo radical, no apreciándose ningún efecto positivo en la resistencia al patógeno. Se concluye que una buena nutrición cálcica puede conferir a las encinas una mayor tolerancia a la enfermedad radical causada por el oomiceto.

También se ha evaluado la susceptibilidad de varios morfotipos de encina (*expansa*, *macrocarpa*, *microcarpa* y *rotundifolia*) y un híbrido *Q. ilex ballota-Q. faginea* a la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi*. No se han encontrado diferencias significativas en la severidad de síntomas radicales entre los distintos morfotipos de

encina. A nivel aéreo se diferencian tres grupos: muy susceptible (*microcarpa*), susceptible (*expansa*) y moderadamente susceptible (*rotundifolia*, *macrocarpa*). El híbrido presentó una severidad de síntomas aéreos y radicales significativamente menor que los morfotipos de encina, por lo que la hibridación de la encina con *Q. faginea* puede ser considerada como una fuente de resistencia a *P. cinnamomi* en futuras estrategias de mejora.

Por otra parte, en la dehesa se realizan cultivos forrajeros de secano para cubrir los períodos de falta de alimento para el ganado, de manera que no sea necesario aportar piensos de producción externa. En dehesas con el arbolado afectado por la enfermedad y en las que se cultivaba el altramuz amarillo, se observó la aparición de rodales de altramuz con síntomas de podredumbre radical. Además *P. cinnamomi* se aisló de las raíces de estas plantas de altramuz. Por ese motivo se ha evaluado la susceptibilidad de los principales cultivos de la dehesa a la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* y su influencia en la epidemiología de la enfermedad radical de la encina.

Mediante inoculaciones artificiales de los cuatro cultivos más frecuentes en la dehesa, trigo, avena, veza y cuatro cultivares distintos de altramuz amarillo: Juno, Cardiga, Nacional y Paris, se obtuvieron aislamientos positivos de *P. cinnamomi* de las raíces de altramuz (sintomático, independientemente del cultivar), y veza (asintomática), pero nunca de las raíces de trigo y avena (asintomáticas). En altramuz y veza *P. cinnamomi* colonizó el interior de las raíces, desarrollando hinchazones hifales y clamidosporas solamente en el altramuz. A partir de ensayos de infección *in vitro* se evaluó el efecto de los cuatro cultivos en la producción de zoosporas de *P. cinnamomi*. Los resultados mostraron que el altramuz es capaz de estimular significativamente la producción de zoosporas, al contrario que la veza, el trigo y la avena. Se demostró que al contrario que el altramuz, la veza no produce incrementos significativos de la densidad y viabilidad de las clamidosporas del patógeno en suelo. La veza crecida en sustrato infestado muestra una severidad de síntomas a nivel aéreo y radical muy leves y significativamente menores que el altramuz infectado. Además, en dehesas que mostraban distinto grado de defoliación del arbolado y en las que se cultivaba altramuz amarillo, el aislamiento y conteo de colonias de *P. cinnamomi* a partir de muestras de suelo ha mostrado la capacidad de esta leguminosa para mantener o incrementar la densidad de inóculo en campo y así favorecer la infección de las encinas. Podemos concluir que el cultivo del

trigo, la avena e incluso de la veza, puede ser una buena alternativa al altramuz en las dehesas afectadas por la podredumbre radical de los *Quercus*.

ABSTRACT

Oak rangeland agroforestry systems (*dehesas* in Spain, *montados* in Portugal) are one of the most characteristic ecosystems of the Iberian Peninsula. These ecosystems consist on five basic integrated components leading to an ecological balance: trees, mainly species of the genus *Quercus*, pasture, shrubs, crops and livestock. *Dehesa* is primarily an ecological production system, which integrates the conservation of woodland, grassland and shrubland with livestock production. The destabilization of one of the basic components of the *dehesa* basic for its productive system, leads to a significant damage to the whole ecosystem, leading to its unsustainability and therefore to its abandonment.

Since the early 90's a severe decline affecting Mediterranean *Quercus* species has been detected in rangelands of southern Spain and Portugal, leading to a high mortality of Holm and cork oak trees. Among the factors associated with decline, the root rot caused by the soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* highlights due to its severity. This oomycete kills trees and, depending on environmental conditions, the disease manifests as a slow decline or a sudden death syndrome. In both situations, symptoms consisted in yellowing and/or crown wilting, defoliation and branch dieback, and at root level, necrosis and loss of feeder roots.

Phytophthora cinnamomi has a worldwide distribution and it is difficult to control because of its high number of plant hosts, its ability to survive in poorly drained or waterlogged soils to large depths, etc. The nature of the *Quercus/Phytophthora* pathosystem does not allow the use of legislative methods for control (quarantines) or the massive application of fungicides, so it should be considered a control system integrating different cultural and/or biological methods, low cost, and suitable for the ecological production of Spanish rangelands.

In this work the *in vitro* effectiveness of different Ca^{2+} and K^+ products (CaO , CaCO_3 , CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaSO_4 , KOH , KNO_3 , KCl , KIO_3 and K_2SO_4) on mycelial growth, sporangial and chlamydospore (resistant spores) production and sporangial germination (production of infective zoospores) of *P. cinnamomi* has been tested. Although none of the products inhibited mycelial growth at $\text{pH} \sim 6$, CaO , CaCO_3 , CaSO_4 , KOH and KIO_3 effectively inhibited the sporangial production of the pathogen and therefore, its

zoospore production, although none of them were as effective in inhibiting the germination of already formed sporangia. CaO, CaCO₃, K₂SO₄ and CaCl₂ effectively inhibited the production of chlamydospores. The effect of the more effective compounds in the *in vitro* experiments (CaO, CaCO₃, CaSO₄, KOH and KIO₃) was also tested for their effect on the inoculum density in the soil and the infectivity of *P. cinnamomi*. Each product was added at the doses commonly used in rangelands to soil infested with chlamydospores of the pathogen. Two weeks after, only K⁺ compounds resulted in a significant decrease of the density of viable chlamydospores. At that time, soils were transferred to pots where Holm oak seedlings were planted. Plants grown in infested and untreated soil showed high levels of foliar and root symptoms, while plants grown in infested and fertilized soils showed a significant reduction in the severity of symptoms, except KIO₃. These results suggest that the application of Ca²⁺ amendments, mainly CaO and CaCO₃, but also CaSO₄ and KOH, to the soil in rangelands affected by the pathogen could be an effective treatment against the root rot, decreasing the incidence of this serious disease.

The role of Ca²⁺ and K⁺ fertilization in the tolerance of Holm oak trees to the root rot has been evaluated, testing the susceptibility to *P. cinnamomi* of oak seedlings with a standard mineral nutrition, deficient in K⁺ or deficient in Ca²⁺. Plants deficient in K⁺ showed Ca²⁺ levels above average and resulted tolerant to the disease. However, Ca²⁺ deficiency did not result in higher levels of K⁺, and also induced a poor root development, without any positive effect on resistance to the pathogen. In conclusion, good Ca²⁺ nutrition may confer to the oak trees a higher tolerance to the root disease caused by the oomycete.

The susceptibility to the root disease of four morphotypes of Holm oak (*expansa*, *macrocarpa*, *microcarpa* and *rotundifolia*) and a natural hybrid *Q. ilex ballota*-*Q. faginea* have been also tested. No significant differences appeared among morphotypes in severity of root symptoms, but severity of foliar symptoms separate the oak morphotypes in three different groups: very susceptible (*microcarpa*), susceptible (*expansa*) and moderately susceptible (*rotundifolia*, *macrocarpa*). The hybrid showed foliar and root symptom severities significantly lower than Holm oak morphotypes. Then, hybridization of Holm oak with *Q. faginea* can be considered as a source of resistance to *P. cinnamomi* in future breeding programs.

Moreover, forage crops are common in rangelands to cover periods of lack of food for livestock, so that no feed from external production was required. In rangelands affected by the disease and cultivated with yellow lupin, foci of lupins with root rot symptoms were observed. In addition, *P. cinnamomi* was isolated from symptomatic lupin roots. Then, the susceptibility to the root rot caused by *P. cinnamomi* of the main herbaceous crops in rangelands (wheat, vetch, oats and yellow lupin) and its influence on the epidemiology of the oak disease was tested.

Artificial inoculations of the most common crops in rangelands, including four different cultivars of yellow lupin: Juno, Cardiga, Nacional and Paris, yielded positive isolation of *P. cinnamomi* from roots of lupins (symptomatic, regardless of the cultivar tested) and vetch (asymptomatic), but never from roots of wheat and oats (asymptomatic). *Phytophthora cinnamomi* colonized lupin and vetch root tissues, developing hyphal swellings and chlamydospores only in lupin roots. The effect of the four crops in the production of zoospores of *P. cinnamomi* was also tested by *in vitro* root inoculation experiments. The results obtained showed that lupin is able to significantly stimulate the production of zoospores, unlike vetch, wheat and oats. Vetch neither produces a significant increase in density and viability of chlamydospores in the soil, unlike lupin.

Vetch grown in infested substrate showed weak foliar and root symptoms, significantly lower than those registered for infected lupin. Additionally, in rangelands cultivated with yellow lupin and showing different degree of tree defoliation, the isolation and counting of *P. cinnamomi* colonies from soil samples showed the ability of this legume to maintain or even increase the inoculum density in the field and thus facilitate the infection of oak trees. In conclusion, the culture of wheat, oats or even vetch could be a good alternative to yellow lupin in rangelands affected by the *Quercus* root disease.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Introducción	1
1. LA DEHESA	3
1.1. Descripción del ecosistema	3
1.2. Descripción de la encina	8
2. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LA ENCINA	11
2.1. Enfermedades foliares: Repilo, Escobas de bruja	11
2.1.1. Repilo.....	11
2.1.2. Escobas de bruja.....	13
2.2. Enfermedades del tronco: Chancro fúngico, Chancro carbonoso, Chancro bacteriano	14
2.2.1. Chancros fúngicos.....	14
2.2.2. Chancro carbonoso.....	16
2.2.3. Chancro bacteriano.....	19
2.3. Enfermedades radicales: Podredumbre radical, Colapso tardío en vivero ..	20
2.3.1. Podredumbre radical.....	20
2.3.2. Colapso tardío de plantones en vivero.....	22
2.4. Decaimiento: la Seca de la encina	23
3. PODREDUMBRE RADICAL CAUSADA POR <i>Phytophthora cinnamomi</i>	25
3.1. El género <i>Phytophthora</i>	27
3.2. <i>Phytophthora cinnamomi</i>	31
3.3. Distribución geográfica y especies susceptibles	35
3.4. Diagnóstico	36
3.5. Epidemiología de la enfermedad	38
4. IMPORTANCIA DE LA PODREDUMBRE RADICAL	41
5. MÉTODOS DE CONTROL APLICABLES A LA PODREDUMBRE RADICAL DE LOS <i>QUERCUS</i> MEDITERRÁNEOS	43
OBJETIVOS	49
CAPÍTULO 2. Control cultural de la podredumbre radical de la encina mediante la aplicación de enmiendas potásicas y cálcicas al suelo	53

2.1. Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to <i>Phytophthora cinnamomi</i> root rot of <i>Quercus ilex</i>	57
2.2. Effect of potassium products in the inhibition of <i>Phytophthora cinnamomi</i> infections on <i>Quercus</i> roots.....	79
CAPÍTULO 3. Influencia de la nutrición cálcica y potásica y del morfotipo de la encina en la tolerancia a la podredumbre radical causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i>	105
3.1. Calcium mineral nutrition increases the tolerance of <i>Quercus ilex</i> to <i>Phytophthora</i> root disease affecting oak rangeland ecosystems in Spain....	109
3.2. Susceptibility to <i>Phytophthora cinnamomi</i> of the commonest morphotypes of Holm oak in southern Spain.....	129
CAPÍTULO 4. Susceptibilidad de las principales especies herbáceas cultivadas en la dehesa a la podredumbre radical causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i> y su influencia en la epidemiología de la enfermedad radical de la encina	139
4.1. <i>Lupinus luteus</i> , a new host of <i>Phytophthora cinnamomi</i> in Spanish oak-rangeland ecosystems.....	143
4.2. The role of yellow lupin (<i>Lupinus luteus</i>) in the decline affecting oak agroforestry ecosystems.....	151
4.3. Susceptibility of common herbaceous crops to <i>Phytophthora cinnamomi</i> and its influence on <i>Quercus</i> root rot in rangelands.....	167
CAPÍTULO 5. Discusión general	187
CAPÍTULO 6. Conclusiones	197
CAPÍTULO 7. Bibliografía	203

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Principales tipos de ganado de la dehesa: a) ovino, b) porcino, c) bovino y d) caprino.....	7
Figura 2.	Dehesa de encina con cultivo de trigo y altramuz en la provincia de Huelva.....	8
Figura 3.	Hojas de encinas afectadas de Repilo causado por <i>Fusicladium quercus-ilicis</i> (Navarro et al., 2008).....	12
Figura 4.	Escobas de bruja en ramas de encina. Izda.) escoba recién formada en primavera, mostrando hojas enanas y cloróticas, dcha.) escoba en verano totalmente defoliada	14
Figura 5.	a) Encina con chancros causados por <i>Botryosphaeria</i> sp. (Romero et al., 2009), b) rama de encina muerta a causa del chancro.....	16
Figura 6.	Chancro carbonoso causado por <i>Biscogniauxia mediterránea</i> en tronco de encina.....	18
Figura 7.	Chancro bacteriano causado por <i>Brenneria quercina</i> en tronco de encina.....	19
Figura 8.	Evolución de los síntomas radicales en brinzales de encina afectados por la podredumbre radical causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i> : podredumbre, necrosis y muerte y destrucción de las raicillas absorbentes.....	21
Figura 9.	Biogeografía de la Seca de los <i>Quercus</i> en Andalucía (Navarro et al., 2004).....	26
Figura 10.	a) Esporangio maduro de <i>Phytophthora cinnamomi</i> , b) esporangio con las zoosporas ya diferenciadas en su interior (Sánchez et al., 2005b).....	32
Figura 11.	Clamidosporas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> producidas en extracto de suelo.....	33
Figura 12.	Hinchazones hifales de <i>Phytophthora cinnamomi</i> : a) hinchazones irregulares (micelio botrioso), b) hinchazones hifales esféricas en racimo (Sánchez et al., 2006).....	33
Figura 13.	Oosporas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Caetano et al., 2009b).....	34
Figura 14.	Mapa de distribución definido por la EPPO para <i>Phytophthora cinnamomi</i> (EPPO, 2011) www.eppo.int	36
Figura 15.	Raíz procedente de una encina con síntomas de podredumbre	

	radical: escasez y necrosis de raicillas absorbentes.....	37
Figura 16.	Síndrome de muerte súbita o apoplejía.....	37
Figura 17.	Evolución del proceso de muerte lenta: defoliación (izda.) y muerte del árbol (dcha.).....	38
Figura 18.	Kit comercial para detectar la presencia de <i>Phytophthora</i> spp.en campo.....	38
Figura 19.	Ciclo de patogénesis de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (Sánchez et al., 2010).....	40
Figura 20.	Zona de vaguada con el arbolado afectado por la podredumbre radical causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i>	41
Figura 21.	Suelo de dehesa compactado por efecto de la sobreexplotación ganadera.....	42
Figura 22.	Tratamiento con fosfito potásico mediante inyección al tronco (Carrasco et al., 2009).....	45
Figura 23.	Efecto del Ca ²⁺ y el K ⁺ en la capacidad infectiva de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	102
Figura 24.	Influencia del contenido de Ca ²⁺ en el desarrollo de la podredumbre radical en plántones de encina.....	126
Figura 25.	Susceptibilidad de distintos morfotipos de encina a <i>Phytophthora cinnamomi</i>	137
Figura 26.	Incidencia de la podredumbre radical causada por <i>Phytophthora cinnamomi</i> en <i>Lupinus luteus</i>	164
Figura 27.	Susceptibilidad a <i>Phytophthora cinnamomi</i> de cultivos herbáceas de la dehesa.....	184



CAPÍTULO 1

Introducción

1. LA DEHESA

1.1. Descripción del ecosistema

Desde que inicialmente se denominara como dehesa al terreno acotado al libre pastoreo de los ganados trashumantes (San Miguel, 1994), su definición ha ido evolucionando hasta la actualidad. En 2005, el Consejo de Gobierno de la Junta de Andalucía aprobó un acuerdo para promover el Pacto Andaluz por la dehesa, en el cual se define como: "*Entendemos por dehesa o sistema adehesado al sistema de uso y gestión de la tierra basado en la explotación principalmente ganadera y también forestal, cinegética y agrícola, de una superficie de pastizal y monte mediterráneo con presencia dispersa de vegetación arbórea, el cual da lugar a un agrosistema en el que la conjunción del manejo agrosilvopastoral propicia importantes valores ambientales como un uso sostenible del territorio, un paisaje equilibrado y una elevada diversidad a distintos niveles de integración*".

En el Libro Verde de la Dehesa, publicado en 2010, se define como: "*Sistema de explotación ganadera y/o cinegética de carácter multifuncional en que al menos el 50% de la superficie está ocupado por pastizal con arbolado adulto disperso productor de bellotas y con una fracción de cabida cubierta entre el 5 y el 60%*" (Pulido y Picardo, 2010).

Tanto a nivel estatal como autonómico se están desarrollando legislaciones específicas para regular el manejo de la dehesa, donde se integran su componente agrícola, forestal, y de conservación.

Los principales componentes de la dehesa son: el arbolado, los pastos, los matorrales y los cultivos (Costa et al., 2006).

- El **arbolado** es el componente más importante de la dehesa, actuando como estabilizador del sistema y productor de recursos (San Miguel, 1994). Su densidad varía según los autores entre 50-60 pies/ha (Fernández y Porras, 1998) o 30-60 pies/ha (Costa et al., 2005) y se encuentra más o menos disperso. Las especies más abundantes pertenecen al género *Quercus*, principalmente la encina (*Quercus ilex* spp. *ballota*) y el alcornoque (*Q. suber*), aunque también podemos

encontrar quejigos (*Q. faginea*) y quejigo andaluz (*Q. canariensis*), fresnos (*Fraxinus angustifolia*) y dehesas de acebuche (*Olea europea* var. *sylvestris*); estas últimas más frecuentes en Andalucía (Costa et al., 2006).

- Los **pastos** de la dehesa constituyen un importante recurso alimenticio para el ganado, sobre todo en primavera. Su composición es muy variada, aunque en general se trata de especies anuales de pequeño porte que tienden a cubrir todo el espacio disponible y normalmente desarrolladas sobre suelos más o menos pobres (Costa et al., 2006). Según la zona donde se desarrolla el pasto podemos hablar de vallicares de siega, en las zonas con mayor humedad edáfica y más fértiles, majadales en zonas más frecuentadas por el ganado, con especies muy adaptadas al pastoreo intenso y pastizales de efímeras en las zonas más pobres.

Los más comunes en Andalucía son los majadales, formados por especies anuales de talla pequeña con alta capacidad productiva y buena calidad bromatológica. Las principales especies asociadas con los majadales son *Poa bulbosa* y *Trifolium subterraneum* (Costa et al., 2006).

- La presencia de **matorrales** depende fundamentalmente de la carga ganadera. El estrato arbustivo normalmente no ocupa más del 50% de la superficie de la dehesa y presenta una altura no superior a 1 m debido al pastoreo. Las especies más abundantes pertenecen al género *Cistus* (jaras), junto con *Lavandula stoechas* (cantueso), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Retama sphaerocarpa* (retama), *Pistacia lentiscus* (lentisco) o *Arbutus unedo* (madroño) (Montoya, 1993; Costa et al., 2006).
- A finales de verano y principios de otoño, la falta de alimento para el ganado se solventa con la siembra de **cultivos** forrajeros de secano, principalmente trigo, avena, cebada, mezcla de trigo y avena, así como veza y altramuza, este último muy utilizado en la zona del Algarve portugués y en el Andévalo onubense, utilizándose para su consumo directo por el ganado durante el verano una vez agostado (Cera, 1986; Costa et al., 2006).

El término dehesa se usa únicamente en España, sin embargo este tipo de ecosistemas los podemos encontrar en otras regiones, como en Portugal, norte de África o California (EEUU).

En la zona sur de Portugal (Alentejo y Algarve) encontramos los *montados*, dehesas generalmente de encinas y alcornoques, aunque predominan las del segundo tipo, compatibilizando el aprovechamiento ganadero con la producción de corcho. De hecho, Portugal es el primer productor mundial de corcho. Según estimaciones de Gonçalves (2000) los montados portugueses ocupan una superficie de unas 1.196.000 ha, de las cuales el 61% aproximadamente son de alcornoque (Costa et al., 2006).

En Marruecos y norte de África, encontramos formaciones de encina y alcornoque con las mismas peculiaridades que las dehesas españolas, distribuidos principalmente por el Riff, el Medio Atlas y el Macizo Central marroquí. Estos ecosistemas están fuertemente aprovechados por el hombre tanto para pastoreo, fundamentalmente caprino, como para la obtención de madera, leña, corcho y otros recursos menores como setas (Costa et al., 2006). En Marruecos existe, además, un sistema de dehesa característico cuya formación predominante es el argán (*Argania spinosa*), especie endémica de la zona y que sirve de freno al avance del desierto (Costa et al., 2006).

Similar a nuestra dehesa es la sabana de la costa oeste de Estados Unidos (California). La vegetación predominante son especies del género *Quercus*, *Q. agrifolia*, *Q. douglasii* o *Q. engelmannii*, junto con pastos. Su principal uso es el ganadero (Costa et al., 2006).

Según datos del MAPA (2008) la superficie adehesada con especies de *Quercus* en España es de 3.515.920 ha, repartidas principalmente por Extremadura y Andalucía, seguidas de Castilla-La Mancha, Castilla y León y Madrid (Pulido y Picardo, 2010).

La superficie de dehesa en la comunidad autónoma extremeña es de 1.237.000-1.428.791 ha, la mayor parte de ellas ocupadas por encinas y en menor medida por alcornoques (Pulido y Picardo, 2010). El aprovechamiento ganadero más extendido es el porcino, seguido del ovino y bovino (Costa et al., 2006). En el año 2010 la superficie ocupada por dehesas en Castilla y León era de 467.759 ha y va en aumento gracias a las medidas adoptadas por el gobierno de la Comunidad Autónoma (Pulido y Picardo, 2010). La principal actividad ganadera es la cría de ganado vacuno y el cerdo ibérico

(Costa et al., 2006). En Castilla La Mancha unas 751.554 ha están ocupadas por territorios adehesados dedicados casi exclusivamente a la cría de ganado ovino (Costa et al., 2006; Pulido y Picardo, 2010). El territorio de dehesa en Madrid ocupa unas 113.051 ha dedicadas al ganado de labor principalmente (Pulido y Picardo, 2010).

La superficie descrita como dehesa en Andalucía varía entre 1.263.143- 981.431 ha si se excluyen las consideradas “dehesas potenciales” cubiertas densamente de matorral (Costa et al., 2006; Pulido y Picardo, 2010). Éstas se sitúan principalmente en las provincias de Córdoba, Sevilla, norte de Jaén, en las sierras de Cádiz y en la Serranía de Ronda en Málaga. Dada su extensión y gran valor social y económico, las dehesas andaluzas se declararon la octava Reserva de la Biosfera de Andalucía en el 2002. De este modo quedan dentro del programa internacional MaB (Hombre y Biosfera) inscribiéndose en su Red Internacional.

La principal especie arbórea presente en las dehesas andaluzas es la encina, seguida de masas mixtas de encina y alcornoque y mezclas con otras especies de *Quercus*, como quejigo y quejigo andaluz y otras especies como el acebuche. También están presentes, aunque con mucha menor abundancia, el rebollo o melojo (*Q. pirenaica*), el pino piñonero (*Pinus pinea*), pino negral (*Pinus pinaster*), fresno (*Fraxinus angustifolia*) y algarrobo (*Ceratonia siliqua*) (Costa et al., 2006). El valor medio de densidad del arbolado en las dehesas andaluzas es de 42 pies/ha (Costa et al., 2006), ajustándose a los valores medios de densidad descritos para tipificar un territorio como dehesa (30-60 pies/ha (Costa et al., 2005)).

La ganadería es la principal actividad productiva de las dehesas andaluzas, principalmente dedicadas al ganado ovino, porcino, bovino y caprino (Figura 1), seguida del aprovechamiento cinegético y forestal, leña y corcho sobre todo. El aprovechamiento apícola y micológico están tomando cada vez mayor relevancia en las dehesas. En la mayor parte de las explotaciones se realiza un aprovechamiento mixto, con distintas actividades productivas simultaneadas, así como distintos tipos de ganado. Sin embargo cuando aparece una única ganadería, las más frecuentes son el ganado vacuno, ovino y porcino por este orden (Costa et al., 2006). La vocación de uso múltiple de la dehesa implica la necesidad de una gestión compleja, lo que constituye una debilidad asociada a su explotación.

Otra actividad productiva que cada vez está adquiriendo mayor importancia en las dehesas andaluzas es el turismo, ligado a los valores naturales de este ecosistema, como la recolección de setas y trufas, espárragos, plantas aromáticas y medicinales, etc. (Pulido y Picardo, 2010).

Figura 1. Principales tipos de ganado de la dehesa: a) ovino, b) porcino, c) bovino y d) caprino



La principal fuente de ingresos de las dehesas la constituye la ganadería y por lo tanto la rentabilidad de la dehesa como empresa no ha estado ajena a todas las crisis que han afectado y afectan a este sector productivo (peste porcina, vacas locas, lengua azul, encarecimiento del precio de los piensos, desplome de los precios de los productos ganaderos, etc.). Además, debido a una débil industria asociada a determinados productos y a la carencia de canales de comercialización adecuados, los costes de oportunidad de los sistemas ganaderos extensivos desarrollados en la dehesa son mayores que los de los sistemas intensivos, situándose en desventaja frente a ellos

(Cerezuela et al., 2008). En muchas situaciones, la rentabilidad de estas explotaciones depende de la percepción de ayudas por parte de las distintas administraciones.

1.2. Descripción de la encina

La encina (Figura 2), *Quercus ilex*, pertenece a la familia *Fagaceae*, subfamilia *Quercoidae*, género *Quercus*, subgénero *Sclerophylloids*, y se caracteriza por su bellota de endocarpo tomentoso, estambres de anteras mucronadas, lampiñas y hojas coriáceas, persistentes, en general pequeñas. La sección *Ilex* se caracteriza por tener bellotas de maduración anual, amparadas por cúpulas de escamas blandas, aplicadas y hojas plurianuales, flexibles, tomentosas, con nervios destacados en el envés y estípulas caducas (López y Sánchez, 1999; Ruiz de la Torre, 2006).

Figura 2. Dehesa de encina con cultivo de trigo y altramuz en la provincia de Huelva



De acuerdo a la descripción dada por Ruiz de la Torre (2006), la encina es un árbol corpulento que puede alcanzar los 25 m de altura. El porte de la encina está muy modificado por la acción directa o indirecta del hombre, aunque en general, comprende una copa amplia, recogida, ovoide-globosa. Su fuste es recto con la corteza no corchosa, dura, gruesa, grisácea, con grietas de color pardo negruzco, alargadas en sentido

vertical. La raíz principal de la encina es axonomorfa y penetrante. En la primera edad no se ramifica, desarrollándose mucho más que el tallo, lo que dificulta considerablemente su trasplante. Posteriormente se ramifica abundantemente para asegurar su anclaje y el aprovisionamiento de agua y nutrientes, mediante la emisión de raíces secundarias de gran vitalidad y fuerza. Algunas de ellas se desarrollan superficialmente (Ruiz de la Torre, 2006).

Las hojas de la encina son simples, alternas, persistentes, con 3-4 años de vida, de orbiculares a oblongolanceoladas, cuneiformes y redondeadas en la base. Miden 2-9 cm de longitud y 1,5-4 cm de anchura. El margen de las hojas jóvenes está aserrado o es dentado-espinoso, pasando posteriormente a ser enteras o dentadas. Su haz es verde azulado oscuro y liso y el envés es verde pálido-grisáceo, con tomento denso y con 7-11 pares de nerviaciones. El peciolo mide 3-11 mm de longitud (López y Sánchez, 1999; Ruiz de la Torre, 2006).

Las flores de la encina son monoicas. Las flores masculinas se agrupan en amentos amarillentos de 3-5 cm de longitud. Se concentran en los ramillos de un año. Esta flor tiene un perianto con 3-5 divisiones subagudas, pubescentes y verdosas; los estambres tienen filamentos lampiños y sus anteras son ovoides y pelosas. Las flores femeninas se desarrollan sobre el brote del año, solitarias o en corto número sobre un pedúnculo tomentoso (López y Sánchez, 1999; Ruiz de la Torre, 2006).

Las bellotas son oblongo-cilíndricas, de 2-3 cm de longitud y 1-1,5 cm de anchura. Están recubiertas parcialmente por una cúpula de forma y tamaño variable, con escamas planas y muy apretadas en el exterior y sedosas en el interior. La floración de la encina se produce en abril-mayo y los frutos están maduros en octubre-noviembre del mismo año. Los brinzales comienzan a dar fruto a los 8-10 años de edad (Ruiz de la Torre, 2006).

La encina vive en suelos calizos, silíceos o arenosos y rehúye los terrenos encharcados y muy compactados. Su expansión viene marcada por las precipitaciones, con unas precipitaciones medias límite de 300 mm por año. Las temperaturas medias de enero oscilan entre -3 y 11° C y las de agosto entre 14 y 28° C, pudiendo resistir las temperaturas máximas absolutas más elevadas de la Península (Ruiz de la Torre, 2001). Con estos requisitos, el árbol extiende su área a toda la región mediterránea; Península

Ibérica, Turquía, Marruecos y sur de Francia, siendo el árbol más característico de España. La mayor parte de las dehesas de Extremadura y Andalucía (80% y 67% respecto de la superficie total ocupada por dehesas) presentan a la encina como especie predominante (Ruiz de la Torre, 2006).

La variabilidad genética de la encina es muy elevada, diferenciándose dos subespecies, *Quercus ilex* subsp. *ballota* y *Quercus ilex* subsp. *ilex*, de acuerdo a las características morfológicas de la hoja así como al sabor de la bellota (más dulce para la subespecie *ballota*) (Jiménez et al., 1996; Costa et al., 2005). La subespecie *ilex* requiere humedad y no soporta climas contrastados, distribuyéndose por el noreste de España, sur de Francia y la franja costera italiana; la subespecie *ballota* es menos exigente en humedad, presentando una mayor plasticidad en sus requerimientos ambientales. Esta última se extiende por el suroeste de la península Ibérica (Ruiz de la Torre, 2006). Además, dentro de cada subespecie existe una importante variabilidad genética, incrementada por las numerosas hibridaciones e introgresiones que se producen con otros taxones y, dada su amplia distribución, por las condiciones edafoclimáticas (Jiménez et al., 1996; Vázquez, 1998). Esto ha llevado a definir poblaciones o regiones de procedencia que explican algunas diferencias en el comportamiento de la subespecie. Asimismo, se ha encontrado una alta variabilidad dentro de una misma población (Michaud et al., 1992; Carbonero et al., 2010), por lo que algunos autores han descrito un gran número de morfotipos de encina. Así por ejemplo, Vázquez et al. (1992) y Vázquez (1998), de acuerdo a la morfología de la hoja y a la forma de la bellota y de la cúpula, diferencian los siguientes tipos para la subespecie *ballota*: *avellanaeformis*, *brevicupulata*, *crassicupulata*, *dolichocalyx*, *expansa*, *macrocarpa* y *rotundifolia*, los cuales pueden encontrarse en una misma zona geográfica (Carbonero et al., 2010).

La encina es por lo tanto la especie más característica de la flora española, debido a su amplia distribución por toda la geografía nacional gracias a su gran variabilidad y adaptabilidad.

2. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LA ENCINA

Del buen estado fitosanitario de la encina depende en buena medida la producción de bellota y de ésta, las principales actividades productivas de la dehesa (Fernández-Rebollo y Carbonero, 2008). Sin embargo, para asegurar la conservación del arbolado es necesario en primer lugar conocer cuáles son las principales enfermedades que pueden afectar a la encina, los patógenos que las causan, los síntomas que permiten su diagnóstico y las posibles medidas de control aplicables en la dehesa.

2.1. Enfermedades foliares: Repilo, Escobas de bruja

2.1.1. Repilo

El Repilo de la encina está causado por *Fusicladium quercus-ilicis* (Figura 3), hongo Deuteromiceto, clase Hyphomycetes. Su clasificación taxonómica ha sido revisada en varias ocasiones, clasificándose primeramente en el género *Cycloconium*, posteriormente en *Spilocaea* y más recientemente en *Fusicladium* (Trapero et al., 2010). Este patógeno, al igual que el causante del Repilo del olivo (*Fusicladium oleagineum*), no parece tener fase sexual, aunque diversos estudios indican que podría corresponder al género *Venturia* (Ascomiceto, Pleosporales), por analogías con otras especies del género *Spilocaea* (Trapero et al., 2010).

Es un hongo biotrofo que se desarrolla principalmente bajo la cutícula de los tejidos afectados formando en paralelo a la superficie de la hoja, un entramado de hifas muy delgadas donde se incluyen hifas fértiles con numerosos conidióforos (anélidas) redondeados o ligeramente ovalados, que emergen perforando la cutícula. Los conidios son bicelulares, ovoides o piriformes, rectos o ligeramente arqueados, de color amarillo y con la pared celular gruesa (Navarro et al., 2008).

Esta enfermedad está distribuida principalmente por Italia y España, aunque es posible que se encuentre presente por todo el área mediterránea, coincidiendo con el área de distribución de la encina, única especie de *Quercus* a la que afecta (Trapero et al., 2000). Esta enfermedad ocasiona la caída anticipada de las hojas, por lo que en caso de

ataques muy severos, puede llegar a alterar la resistencia del árbol, especialmente tras largos períodos de sequía. Suele presentarse en árboles aislados (Navarro et al., 2008).

Figura 3. Hojas de encinas afectadas de Repilo causado por *Fusicladium quercus-ilicis* (Navarro et al., 2008)



El síntoma más característico se presenta en el haz de las hojas, donde aparecen unas manchas de color oscuro debido al desarrollo de los conidióforos y conidios bajo la cutícula y tamaño variable. Con frecuencia las manchas aparecen rodeadas por un halo amarillo o se observa clorosis en áreas extensas de las hojas. En años húmedos puede dar lugar a defoliaciones intensas (Trapero et al., 2000; 2010).

La infección se produce por conidios que germinan en la superficie de la hoja, emitiendo un tubo germinativo que penetra a través de la cutícula, degradándola progresivamente y apareciendo la mancha en la superficie de la hoja. Para que la infección tenga lugar es necesaria una elevada humedad y una temperatura de 8 a 24° C (Trapero et al., 2010).

Salvo en casos de ataques muy severos que ocasionen importantes defoliaciones de los árboles afectados, no es necesaria la utilización de fungicidas. Si hubiese que aplicarlos, se recomienda hacerlo antes de los períodos de infección, a final de otoño y principios de invierno y primavera (Trapero et al., 2010).

2.1.2. Escobas de bruja

Las Escobas de bruja están causadas por *Taphrina kruchii*, hongo Ascomiceto, de la clase Hemiascomicetos, orden Thaphrinales, familia Taphrinaceae. El género *Taphrina* se caracteriza por sus ascas libres, no encerradas en cuerpos fructíferos, con ocho ascosporas unicelulares en su interior. La gemación de estas ascosporas, dentro o fuera del asca, da lugar a un gran número de conidios, que actúan como inóculo para producir nuevos ciclos de infección o germinan produciendo micelio que persistirá en el interior de las ramas y ramillas de los árboles afectados (Agrios, 1997).

La enfermedad se halla extendida por Italia, Sicilia, Córcega, Cerdeña, Argelia y España, afectando a *Quercus coccifera* y principalmente a *Q. ilex* (Torres-Juan, 1993). En encinares de Córdoba y Sevilla se han descrito epidemias de gran intensidad, pero parece ser que la virulencia de la enfermedad ha ido disminuyendo (Torres-Juan, 1993).

Taphrina kruchii provoca la brotación de las yemas durmientes y el desarrollo de ramas que se ramifican intensamente (Torres-Juan, 1993) con entrenudos anormalmente cortos. Las hojas de las Escobas muestran enanismo y clorosis y rápidamente se marchitan y caen. Las ramas defoliadas presentan la típica morfología de escoba que da nombre a la enfermedad (Figura 4). Por lo general, la rama de encina afectada vegeta mal y termina por morir desde el punto de inserción de la Escoba hasta el ápice (Torres-Juan 1993).

La infección se produce al germinar los conidios directamente sobre las hojas y brotes verdes de las encinas, o por trozos de micelio que penetran en las encinas sanas al podarlas con herramientas previamente infestadas (Torres-Juan, 1993). Las condiciones más favorables para que se produzca la infección por *T. kruchii* son bajas temperaturas y elevada humedad cuando las yemas son jóvenes y las hojas se están desarrollando, ya que en el período durante el cual los tejidos son jóvenes, la susceptibilidad es mayor (Agrios, 1997).

El principal método de control de las Escobas de bruja en encinares es la poda y destrucción de las ramas enfermas, teniendo en cuenta que las herramientas de poda deben ser desinfectadas antes de cortar nuevas ramas para evitar la dispersión de la enfermedad.

Figura 4. Escobas de bruja en ramas de encina. Izda.) escoba recién formada en primavera, mostrando hojas enanas y cloróticas, dcha.) escoba en verano totalmente defoliada



2.2. Enfermedades del tronco: Chancro fúngico, Chancro carbonoso, Chancro bacteriano

Los chancros son síntomas primarios producidos por la alteración del tejido cortical de la parte hipógina del árbol, normalmente alargados (5 a 20 cm de largo), que ocasionan la necrosis y muerte del tronco o de la rama afectada. Como síntomas secundarios se produce clorosis, empardecimiento y marchitez de las hojas en las ramas afectadas por los chancros, con la posterior defoliación y desecación de las mismas (Sánchez et al., 2003b).

2.2.1. Chancros fúngicos

En la encina los chancros fúngicos más frecuentes están causados por especies del género *Botryosphaeria*, *B. dothidea* (Anamorfo: *Fusicocum aesculi*), *B. corticola* (Anamorfo: *Diplodia corticola*) y *B. iberica* (Anamorfo: *Dothiorella iberica*) (Alves et

al., 2004; Phillips et al., 2005; Romero et al., 2009). El género *Botryosphaeria* pertenece a la división Ascomycota, clase Loculoascomycetes, orden Dothideales, familia *Botryosphaeriaceae*, y produce sus esporas sexuales (ascosporas) en el interior de ascas bitunicadas formadas en el interior de lóculos pseudoteciales (Alves et al., 2004).

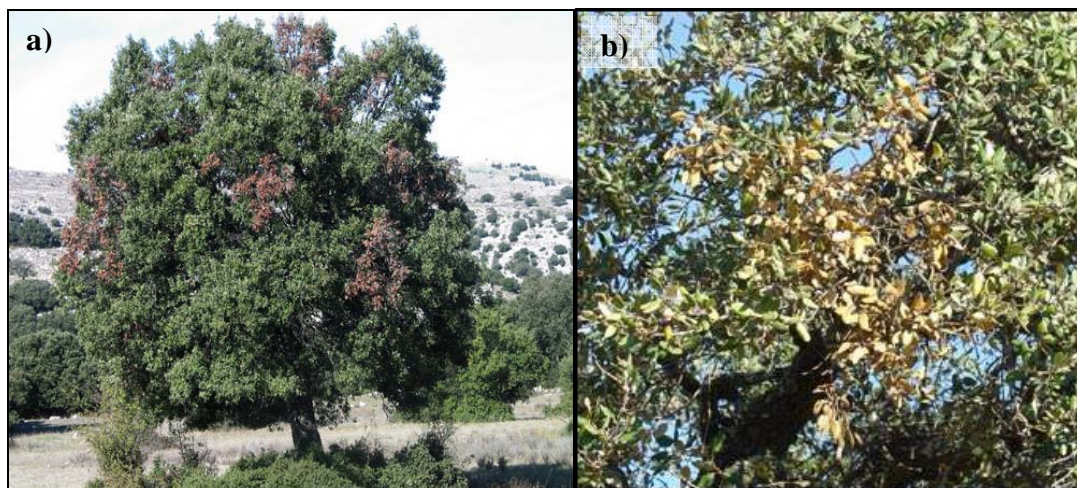
En el estado anamórfico, las tres especies producen picnidios inmersos en el tejido cortical necrosado, en cuerpos fructíferos visibles con lupa como pequeñas pústulas oscuras. Estos picnidios, de forma globosa y paredes gruesas, presentan un ostiolo simple de salida, circular y central. Los conidios que se producen en su interior varían de una especie a otra. Los conidios de *D. corticola* son principalmente hialinos, aseptados, con pared celular lisa y relativamente gruesa, oblonga a cilíndrica y recta con los dos extremos ampliamente redondeados, rara vez llegan a ser marrones y con la edad aparecen septados (Alves et al., 2004). Los conidios de *D. iberica* son rectos, ovoides u oblongos, con ápice obtuso y base truncada, pared celular gruesa, de color marrón oscuro y con una septa central (Phillips et al., 2005). Por último, los conidios de *F. aesculi* son hialinos, lisos, de pared delgada, de fusiformes a elipsoidales, con el ápice subagudo y la base truncada, en su mayoría aseptados, aunque algunos pueden presentar una septa central (Sánchez et al., 2003b).

Los tres patógenos afectan a distintas especies de *Quercus*, así *B. dothidea* afecta a *Q. ilex* y *Q. suber*, causando chancros y muerte de ramas (Figura 5), aunque también se ha descrito en *Q. robur* y *Q. rubra*. *Botryosphaeria corticola* y *B. iberica* causan muerte regresiva de ramillas en *Q. suber* y *Q. ilex*. Las tres especies se asocian al decaimiento de encinas y alcornoques. Los chancros causados por *B. corticola* en el tronco de alcornoques causan importantes pérdidas de producción y calidad del corcho en Andalucía (Sánchez et al., 2003b) y se considera la enfermedad más común causante de muerte de alcornoques en el noreste de España (Luque et al., 2008).

Las infecciones se ven favorecidas por la presencia de heridas, por donde la espora puede penetrar fácilmente e invadir el tejido vivo. En el tejido cortical necrótico se producen nuevos ciclos secundarios de patogénesis, mediante la formación de picnidios y conidios, los cuales se dispersarán principalmente por la lluvia, por lo que el mayor riesgo de infección tiene lugar en otoño y primavera. Además, las infecciones se ven

favorecidas por la presencia de estrés en el arbolado, por eso muchos chancros son frecuentes en masas afectadas de decaimiento o Seca, aunque no en todos los casos. *Botryosphaeria corticola* es capaz de anillar y matar ramas de árboles no debilitados, y es por lo tanto un patógeno primario (Sánchez et al., 2003b).

Figura 5. a) Encina con chancros causados por *Botryosphaeria* sp. (Romero et al., 2009), b) rama de encina muerta a causa del chancro



Las principales medidas de control del chancro son de tipo preventivo: evitar heridas en la corteza, eliminación de ramas infectadas. En el caso del chancro del tronco del alcornoque se puede llevar a cabo un control químico preventivo, mediante la aplicación de benzimidazoles solos o mezclados con derivados cúpricos (Romero et al., 2006; Luque et al., 2008). Su aplicación inmediatamente tras el descorche previene la infección por las distintas especies de *Botryosphaeria* (Romero et al., 2006).

2.2.2. Chancro carbonoso

El chancro carbonoso está causado por *Biscogniauxia mediterranea* (Sinónimo: *Hypoxylon mediterraneum*) (Anamorfo: *Periconiella* sp.). El género *Biscogniauxia* (y el género *Hypoxylon*) pertenece al reino Fungi, división Ascomicotina, orden Xylariales, familia Xylariaceae (Ju et al., 1998). Es un hongo principalmente endófito, asociado al decaimiento de los *Quercus* (Jiménez et al., 2005b).

El estroma carbonoso que se forma en el chancro es plano, elipsoidal, de color negro brillante y presenta el borde engrosado. En su superficie se aprecian unas pequeñas protuberancias que se corresponden con el cuello de los peritecios, que están incluidos en un mismo lóculo compartiendo un canal ostiolar común, a mayor altura que la superficie del estroma (Ju et al., 1998; Jiménez et al., 2005a; 2005b). En el interior de los peritecios se hallan las ascas y los parafisos (hifas estériles) incluidos en una sustancia mucilaginoso. Las ascas contienen ocho ascosporas en disposición uniseriada, hialinas inicialmente y que viran a marrones conforme maduran (Jiménez et al., 2005b). Estas ascosporas son unicelulares, elipsoidales y ligeramente asimétricas respecto al eje longitudinal, sus extremos son redondeados y su anchura variable. Presentan un surco interno longitudinal, por donde se lleva a cabo la emisión del tubo germinativo (Ju et al., 1998).

El estado asexual se corresponde con el tipo *Periconiella* (Ju et al., 1998). Las estructuras de reproducción asexual, conidióforos y conidios, se forman antes que el estroma, bajo la corteza, dando lugar a abultamientos visibles en ramas delgadas debido a la gran acumulación de esporas (Jiménez et al., 2005b). Los conidióforos pueden ser simples o ramificados. Los conidios son elipsoidales (Jiménez et al., 2005b). Los conidióforos formados bajo la corteza solamente pueden salir al exterior en las ramas más delgadas cuando la corteza externa se agrieta. Según Jiménez et al. (2005d) el papel infectivo de los conidios es muy limitado o incluso nulo.

Biscogniauxia mediterranea afecta a un gran número de especies del género *Quercus*, siendo las más susceptibles *Q. cerris*, *Q. suber*, *Q. ilex*, *Q. frainetto* y *Q. pubescens*. Con menor incidencia, afecta también a *Fagus*, *Platanus*, *Populus*, *Castanea*, *Eucaliptus* y *Juglans* (Oliva y Molinas, 1984; Sinclair et al., 1987).

El chancro carbonoso aparece principalmente en árboles debilitados o muertos (Muñoz y Rupérez, 1987; Jiménez et al., 2005b) (Figura 6). El signo más característico de la enfermedad es el estroma carbonoso que se forma en grietas longitudinales de la corteza en los árboles infectados (Jiménez et al., 2005a; 2005b). La zona de la corteza donde se localiza el estroma aparece necrosada, sin embargo el leño subyacente permanece inalterado (Jiménez et al., 2005b). La presencia de exudados oscuros cercanos al

estroma no juega ningún papel en la formación del mismo, ni se asocian necesariamente a la acción de *B. mediterránea* (Jiménez et al., 2005a; 2005b).

Las ascosporas son la principal estructura infectiva y el viento su principal vector de dispersión. Para que se produzca la esporulación es necesario que llueva (Jiménez et al., 2005d). La infección puede tener lugar desde los primeros estadios de desarrollo del huésped, y no es necesaria la presencia de heridas, ni estrés en el árbol. *Biscogniauxia mediterranea* puede vivir como endófito, sin causar síntomas en el huésped durante largos períodos (Jiménez et al., 2005c), pudiendo aumentar su presencia endofítica en los huéspedes con condiciones de estrés hídrico (Collado et al., 2001; Mazzaglia et al., 2001).

Figura 6. Chancro carbonoso causado por *Biscogniauxia mediterránea* en tronco de encina



Tradicionalmente para el control del chancro carbonoso se han recomendado medidas de tipo preventivo como podas sanitarias, sellado de heridas y desinfección de las herramientas de poda (Torres-Juan, 1993). No obstante, el carácter endofítico de *B. mediterranea* hace que estas prácticas no sean suficientes por sí solas. Se deben adoptar,

18

además, otras medidas encaminadas a mantener el vigor de los huéspedes y a la disminución del inóculo, destruyendo los árboles muertos y leñas con carbón (Torres-Juan, 1993).

2.2.3. Chancro bacteriano

El chancro bacteriano de la encina, también llamado chancro sangrante (Figura 7), está causado por *Brenneria quercina*, y también afecta a *Q. pirenaica* en España y a *Quercus agrifolia* y *Q. wislizenii* en California (Biosca et al., 2003; Melgarejo et al., 2010). *Brenneria quercina*, anteriormente clasificada como *Erwinia quercina*, es una bacteria perteneciente a la clase Proteobacteria, familia *Enterobacteriaceae*. Presenta forma bacilar, es gram -, anaerobia facultativa y quimio-heterótrofa.

Figura 7. Chancro bacteriano causado por *Brenneria quercina* en tronco de encina



El síntoma más característico es la aparición de chancros en la corteza que se extienden hacia la parte interior del tronco, de profundidad variable, con necrosis del tejido y abundantes exudaciones (sangrado del tronco). La necrosis se extiende por la corteza interna, pudiendo llegar al centro de las ramas de menor grosor. Los exudados se observan principalmente en primavera y otoño y son de color variable, inicialmente blanco-rojizo-marrón y a medida que pasa el tiempo se va secando y oscureciendo, alcanzando al final un color marrón oscuro casi negro. Los *Quercus* que presentan chancros sangrantes muestran como síntomas secundarios pérdida progresiva de vigor,

reducción del follaje y caída prematura de las hojas. En brotes, frutos y ramas infectados pueden aparecer abundantes exudados de color pardo, constituidos principalmente por masas de bacterias (Biosca et al., 2003; Melgarejo et al., 2010). Frecuentemente se observa en las bellotas un melazo abundante, pegajoso, que aparece debajo del capuchón y que ocasiona una importante caída prematura de los frutos (Biosca et al., 2003). La bacteria se transmite principalmente mediante la lluvia y el viento (Melgarejo et al., 2010) y en algunos casos mediante insectos que al picar a las bellotas las infectan con la bacteria (Pérez-Laorga et al., 2005).

Existe poca información acerca de las medidas de control que podemos llevar a cabo contra el chancro bacteriano en encinas, sin embargo podemos extrapolar algunas de las prácticas empleadas para combatir otros patógenos que causan enfermedades similares, como *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* en olivo (Trapero y Blanco, 2008) o *Erwinia amylovora* en rosáceas o en nogales (Melgarejo et al., 2010). Se debe reducir la fuente de inóculo mediante la eliminación de los tejidos infectados, podándolos, desinfectando las herramientas y eliminando los restos de poda (Trapero y Blanco, 2008). Además se pueden aplicar algunos productos derivados del cobre como el caldo bordelés, que tiene acción bactericida, para proteger las heridas que se puedan producir, y que son zonas de infección (Trapero y Blanco, 2008). Por otro lado, según estudios realizados por Pérez-Laorga et al. (2005), el control de los insectos vectores (*Curculio* sp.) mediante deltametrín, permite reducir considerablemente la tasa de infección de las bellotas y el desarrollo del melazo.

2.3. Enfermedades radicales: Podredumbre radical, Colapso tardío en vivero

2.3.1. Podredumbre radical

Entre los patógenos que podemos encontrar causando podredumbre radical en encina destacan *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium spiculum* (Romero et al., 2007a; Sánchez et al., 2010).

Ambas especies pertenecen al reino Stramenopila o Chromista, clase Oomicetos, orden Phytiales, familia *Phytiaceae*. Las especies afectadas por *Py. spiculum* son

principalmente *Quercus ilex* spp. *ballota*, *Q. suber* y también *Prunus* spp., *Castanea sativa* y *Celtis australis* (Romero et al., 2007a), mientras que *P. cinnamomi* presenta un rango muy amplio de huéspedes, la mayor parte leñosos, aunque también aparecen algunas herbáceas del género *Lupinus* (Erwin y Ribeiro, 1996). Ambas especies se distribuyen por la zona centro-sur de España y sur de Portugal (Romero et al., 2007a).

Los síntomas que observamos en las encinas afectadas por podredumbre radical son similares para ambos patógenos: amarillez y marchitez foliar, defoliación y muerte regresiva de ramas (Sánchez et al., 2002a; Romero et al., 2007a). El sistema radical aparece reducido, con necrosis y muerte de las raicillas absorbentes (Sánchez et al., 2002a; Romero et al., 2007a) (Figura 8). La infección de las raíces por *P. cinnamomi* se produce mediante zoosporas producidas en esporangios, que se dispersan desplazándose por el agua libre del suelo, mientras que en el caso de *Py. spiculum*, los esporangios germinan directamente emitiendo un tubo germinativo capaz de infectar directamente a la raíz susceptible (De Vita et al., 2011b). El encharcamiento periódico del suelo favorece la infección por *P. cinnamomi* (Sánchez et al., 2010) y *Py. spiculum*, aunque no es tan importante para este último (De Vita et al., 2011a).

Figura 8. Evolución de los síntomas radicales en brinzales de encina afectados por la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi*: podredumbre, necrosis y muerte y destrucción de las raicillas absorbentes



Actualmente existe poca información acerca de los métodos de control de la podredumbre radical causada por *Py. spiculum*, sin embargo probablemente se puedan

aplicar los mismos métodos que para *P. cinnamomi*, descritos en el apartado 5 del Capítulo 1.

2.3.2. Colapso tardío de plantones en vivero

Entre las enfermedades de la encina que podemos encontrar en viveros forestales destaca el *damping-off* causado por especies de *Phytophthora* (*P. cinnamomi*, *P. cryptogea* y *P. drechsleri*) y *Cylindrocarpon* (*C. destructans* y *C. didymum*) principalmente (Andicoberry et al., 2001; Sánchez et al., 2002a; 2005a), así como *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. (Torres-Juan, 1993; Giménez et al., 2011), sin embargo estos últimos no causan daños de importancia.

Las especies de *Phytophthora* (Oomycetos) que causan colapso tardío en vivero se ven favorecidas por las condiciones de encharcamiento prolongado de los sustratos de cultivo, que favorecen la dispersión de las zoosporas infectivas (Sánchez et al., 2005a). El género *Cylindrocarpon* (Deuteromicetos), infecta mediante conidios y clamidosporas (Andicoberry et al., 2001; Sánchez et al., 2002b) y aunque el encharcamiento del sustrato también favorece la infección, en este caso no resulta tan determinante como en el caso de *Phytophthora* spp.

Phytophthora spp. y *Cylindrocarpon* spp. afectan a distintas especies de *Quercus* como *Q. ilex*, *Q. suber*, *Q. coccifera* y *Q. faginea* (Sánchez et al., 2002b; Sánchez et al., 2005a).

Los síntomas observados en las plántulas son amarillez y desecación foliar, que comienza por los márgenes y se extiende hacia los nervios centrales, hasta la completa marchitez de las hojas. Estos síntomas se deben principalmente a la falta de absorción de agua debida a la podredumbre de las raicillas absorbentes. En algunos casos se puede producir defoliación de las hojas marchitas, pero en general suelen quedarse prendidas al tallo. El sistema radical de las plántulas afectadas muestra reducción del crecimiento, y necrosis extensas en las raicillas de absorción (Sánchez et al., 2002a; Sánchez et al., 2005a).

Para prevenir estas enfermedades radicales en vivero, principalmente en el caso de *Phytophthora*, debe evitarse la acumulación de agua y el encharcamiento de los sustratos debido a instalaciones inadecuadas, exceso de riego, uso de sustratos poco porosos, etc. (Sánchez et al., 2005a). El cultivo de la encina en vivero debe hacerse con una buena aireación y drenaje, utilizando contenedores, sustratos y semillas libres de patógenos (Sánchez et al., 2010).

2.4. Decaimiento: la Seca de la encina

Desde principios de la década de los 90 se está registrando un severo decaimiento que afecta a las especies de *Quercus* mediterráneos en el suroeste de la Península Ibérica. Este decaimiento, también llamado “Seca”, está provocando una elevada mortalidad de encinas y alcornoques, tanto en ecosistemas naturales como en dehesas (Navarro et al., 2004; Romero et al., 2007b). Esta importante pérdida de arbolado, junto con la falta de regeneración, se está traduciendo en un ahuecamiento progresivo de las dehesas, con pérdida total del arbolado en algunas zonas (García et al., 2008; Carrasco et al., 2009).

En un principio el incremento en la defoliación y muerte de *Quercus* en el sur de España se justificó por la sequía que tuvo lugar a principios de la década de los 90. Sin embargo, la distribución del arbolado afectado, árboles individuales o en focos (Sánchez et al., 2002a; Navarro et al., 2004), junto con la observación de un síndrome de muerte súbita (Brasier, 1996; Sánchez et al., 2002a; 2003a), indicaba que algún o algunos factores bióticos debían estar involucrados en la muerte del arbolado. Comenzó a hablarse de decaimiento de los *Quercus*. En este decaimiento, al igual que en los decaimientos de otras especies de *Quercus* en el centro y norte de Europa (Brasier, 1996), están involucrados un gran número de factores:

- Factores predisponentes. Son factores que actúan a largo plazo sin originar síntomas. En el decaimiento de la encina estos factores son de tipo selvícola (Navarro et al., 2004): la explotación intensiva mediante un turno de poda muy corto, la ausencia de regenerado y el envejecimiento del arbolado, presencia de heridas a causa de malas prácticas selvícolas (podas excesivas, daños mecánicos

al arbolado mediante laboreo), exceso de carga ganadera que produce una elevada compactación del suelo, etc.

- Factores incitantes. Su acción es de corta duración sobre el arbolado ya predispuesto y dan lugar a la expresión de los síntomas de decaimiento (defoliación y puntisecado de ramas). Generalmente son factores de naturaleza abiótica. En el decaimiento de la encina estos factores están relacionados con las variaciones del clima sufridas en los últimos años (Carrasco et al., 2009). La tendencia hacia veranos más secos con aumento de la temperatura estival repercute negativamente en el estado general de las coberturas vegetales, determinando la distribución del arbolado (Sardinero et al., 2000), la actividad de los patógenos asociados, que se pueden ver estimulados por las nuevas condiciones climáticas (Brasier, 1996) y las interacciones planta-patógeno (Brasier y Scott, 1994).
- Factores contribuyentes. Son factores de tipo biótico, enfermedades y plagas de insectos, que actúan en los últimos estados de desarrollo del decaimiento, produciendo la muerte del arbolado. Se han identificado como las más graves las podredumbres radicales causadas por *Phytophthora cinnamomi*. (Brasier, 1996; Gallego et al., 1999; Sánchez et al., 2002a; 2003a) y *Pythium spiculum* (Romero et al., 2007a). Otras enfermedades asociadas al decaimiento son los chancros causados por diferentes especies del género *Botryosphaeria* (Sánchez et al., 2003b; Romero et al., 2005) y los chancros bacterianos causados por *Brenneria quercina* (Biosca et al., 2003). Algunos autores han relacionado al hongo *Biscogniauxia mediterranea*, causante del chancro carbonoso, con el decaimiento, pero actúa como un patógeno secundario sobre árboles ya afectados por otras enfermedades o que sufren sequías severas (Jiménez et al., 2005c).

Dentro de las plagas que actúan como factores contribuyentes del decaimiento, destaca por la importancia de sus daños los insectos perforadores de ramas y troncos, destacando especies de los géneros *Cerambyx* y *Prinobius* (Carrasco et al., 2009).

El decaimiento está presente en buena parte del área de distribución de la encina y el alcornoque, agravándose en el sur de Castilla La Mancha, Extremadura y Andalucía. El decaimiento implicará al menos a un factor de cada uno de los tipos anteriormente descritos. Pero no en todas las zonas afectadas por el decaimiento encontramos asociados los mismos factores. Así se pueden establecer varios sectores en Andalucía en los que las causas del decaimiento difieren (Figura 9). En Andalucía occidental el deterioro y muerte del arbolado se explica mejor como una enfermedad de etiología simple, la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* y *Py. spiculum*, que como el resultado de un enfermedad de etiología compleja (Sánchez et al., 2003a; 2006; Romero et al., 2007a; Carrasco et al., 2009). Por el contrario en la zona norte de Andalucía (Sierra Morena) hay un mayor número de factores implicados, por lo tanto sí se puede hablar de decaimiento, si bien el principal factor asociado sigue siendo la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* (Sánchez et al., 2003a; 2006; Carrasco et al., 2009). En el sur (sierras gaditanas) la hipótesis del decaimiento es también la más plausible, siendo los chancros causados por *Botryosphaeria (Diplodia) corticola* la principal enfermedad asociada (Sánchez et al., 2003a; 2003b; Carrasco et al., 2009), mientras que la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* aparece como secundaria (Sánchez et al., 2003a; 2006). Finalmente en Andalucía oriental los daños que se observan en los *Quercus* se deben principalmente a la sequía, pudiendo incidir algún patógeno puntualmente. El arbolado es capaz de recuperarse de la defoliación cuando se restablece un régimen normal de lluvias (Navarro et al., 2004; Sánchez et al., 2006).

3. PODREDUMBRE RADICAL CAUSADA POR *Phytophthora cinnamomi*

El nombre *Phytophthora*, del griego phytón, "planta" y phthora, "destrucción"; "destructor de plantas", refleja la gravedad e importancia de las enfermedades causadas por las especies pertenecientes a este género. Éstas actúan principalmente como parásitos primarios de raicillas absorbentes, causando podredumbres de raíz, del cuello de la raíz y chancros en el tronco y ramas, tanto en arbustos como en árboles. La primera especie descrita por Anton de Bary en 1876 fue *Phytophthora infestans*, causante del mildiu de la patata que provocó la gran hambruna que azotó Irlanda en el siglo XIX. Hasta la actualidad se han descrito más de 150 especies del género

Phytophthora como patógenos de plantas. Además, según estimaciones realizadas por Brasier (2009) si la tendencia continúa, en la próxima década el número especies de *Phytophthora* fitopatógenas descubiertas será superior a 200.

Figura 9. Biogeografía de la Seca de los *Quercus* en Andalucía (Navarro et al., 2004)



Numerosas especies de *Phytophthora* están involucradas en decaimientos forestales en Europa: *Phytophthora citricola*, *P. cactorum* y *P. cambivora* afectan a hayas (*Fagus sylvatica*) en Centroeuropa (Jung et al., 2005; Jung, 2009); *P. quercina* causa decaimiento en distintas especies del género *Quercus* (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. cerris*, *Q. frainetto*, *Q. pubescens*) en Austria (Balci y Halmschlager, 2003a), en Alemania (Jung et al., 2000), en Italia (Vettraino et al., 2002), Suecia (Jönsson et al., 2003) y Turquía (Balci y Halmschlager, 2003b). *Phytophthora plurivora* está asociada al decaimiento de un gran número de especies arbóreas en Centroeuropa, como alisos (*Alnus glutinosa*, *A. platanoides*), hayas y *Q. robur* principalmente, pero también de otras especies forestales como arces (*Acer platanoides*), abedules (*Betula pendula*) y tilos (*Tilia* spp.) (Jung y Burgess, 2009) y *P. pseudosyringae* está asociada al decaimiento de *F. sylvatica* y *A. glutinosa* en Centroeuropa (Jung et al., 2003).

A principios de la década de los 90 en la zona suroeste y centro de España, Brasier et al. (1993) aislaron a *P. cinnamomi* de la raíz de encinas y alcornoques enfermos y

sugirieron su implicación en el decaimiento en base a los síntomas observados en el arbolado, amarillez de la copa y muerte súbita (Brasier et al., 1993). Esta hipótesis fue confirmada en el sur de la Península Ibérica con el aislamiento consistente de *P. cinnamomi* de raíces enfermas y de la rizosfera de árboles (*Q. ilex* y *Q. suber*) que presentaban síntomas a principios de primavera u otoño (Brasier, 1996; Gallego et al., 1999; Sánchez et al., 2002a; 2006).

3.1. El género *Phytophthora*

El género *Phytophthora* se ha clasificado tradicionalmente en el reino Fungi, subdivisión *Mastigomycotina*, clase *Oomycetes*, orden *Peronosporales*, familia *Pythiaceae* (Ainsworth, 1973). Posteriormente ha sido clasificado en el reino *Stramenopila*, phylum *Oomycota*, clase *Oomycetes*, orden *Pythiales*, familia *Pythiaceae* (Hawksworth et al., 1995). Recientemente, se ha modificado la clasificación de los *Oomycetes*, ubicándolos dentro del super-grupo *Chromalveolata*, primera categoría *Stramenopiles*, segundo grado *Peronosporomycetes* y tercer grado *Peronospora* (Adl et al., 2005). Sin embargo, algunos autores continúan utilizando la clasificación de Hawksworth et al. de 1995 (Rossman y Palm, 2008).

Los oomicetos presentan una serie de características propias que los diferencian de los hongos (Reino Fungi): la mayor parte de su ciclo vital es diploide, mientras que el de los hongos es dicariótico o haploide; sus paredes celulares están compuestas de celulosa y β -glucanos, y no de quitina, y poseen zoosporas biflageladas. Estas características, entre otras, han llevado a excluir a los oomicetos del reino de los hongos, incluyéndolos inicialmente en el reino *Chromista* (Trapero, 1996; García-Jiménez et al., 2010) y posteriormente en el reino *Stramenopila* (Rossman y Palm, 2008).

El género *Phytophthora* se caracteriza por tener un micelio constituido por hifas tubulares ramificadas, de 5 a 8 μm de diámetro, hialinas y cenocíticas (aseptadas). Pueden aparecer septas en cultivos viejos o para separar clamidosporas, esporangios, anteridios y oogonios del resto del micelio. Las hifas pueden ser lisas, nudosas o presentar hinchazones (Erwin y Ribeiro, 1996).

La estructura reproductiva asexual más característica son los esporangios, los cuales se producen en unas hifas especializadas llamadas esporangióforos. Dependiendo de la especie, los esporangióforos pueden ser ramificados o no, pudiendo aparecer ramificaciones de tipo simpodial. Cuando el esporangióforo se ramifica varias veces se llama simpodial compuesto. En otras ocasiones, el esporangióforo crece a partir de la base interior de un esporangio vacío (proliferación interna) o el esporangióforo crece y el nuevo esporangio se desarrolla a cierta distancia del esporangio vacío (proliferación externa). En ambos tipos de proliferación se pueden formar varios esporangios sucesivamente. En el interior de los esporangios se forman las zoosporas.

El tamaño y la forma de los esporangios varía entre especies; esférica, subesférica, ovoide, obovoide, elipsoide, limoniforme (forma de limón), piriforme (forma de pera), etc. (Erwin y Ribeiro, 1996). Otra característica de *Phytophthora* es la caducidad o persistencia del esporangio en el esporangióforo (Waterhouse, 1970). Algunos esporangios presentan papila, esto es, un engrosamiento de la pared celular en el ápice (Stamps et al., 1990) que se disuelve antes de la emergencia de las zoosporas. En función de la presencia y morfología de la papila, los esporangios se clasifican en papilados, semipapilados y no papilados (Erwin y Ribeiro, 1996). Todas estas características presentan valor taxonómico. En la mayoría de las especies, los esporangios germinan en medios acuosos, liberando las zoosporas que se han formado en su interior mediante la formación o no de un tubo germinativo.

Las zoosporas son reniformes (con forma de riñón) y tienen dos flagelos de diferente longitud, uno barbulado y el otro liso, que emergen de la zona cóncava de la zoospora. Estos flagelos les permiten nadar en el agua libre del suelo durante horas y cuando paran de moverse, en pocos minutos se redondean y engrosan su pared celular (Erwin y Ribeiro, 1996). En este estado se denominan quistes. Cuando estos quistes entran en contacto con la raíz de alguna especie susceptible, germinan emitiendo un tubo infectivo.

Otra estructura reproductiva asexual que se observa más frecuentemente en medio líquido, son las clamidosporas. Estas son esféricas o elipsoidales, con la pared celular gruesa y lisa. Al principio son hialinas, pero en ciertos medios se vuelven amarillentas o marrones. El contenido de las clamidosporas es denso y presenta a veces un gran cuerpo

(vacuola) central. Aparecen en posición terminal o intercalar, dependiendo de la especie. Se pueden diferenciar de las hinchazones hifales porque las clamidosporas están siempre delimitadas del resto del micelio por un tabique. Son estructuras de resistencia (Erwin y Ribeiro, 1996).

Otra característica de algunas especies de *Phytophthora* son los engrosamientos o hinchazones hifales, que se pueden observar principalmente en medio líquido. Estos normalmente son intercalares, aunque también pueden ser terminales; no están delimitados por septas transversales; su morfología es variada, globosa o irregular; pueden presentarse aislados, en racimos o formando cadenas. Su contenido celular y la pared son iguales que en las hifas vegetativas (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las estructuras sexuales de *Phytophthora* son el oogonio y el anteridio. El oogonio es normalmente globoso o subgloboso y ocasionalmente piriforme. Son mayoritariamente hialinos, aunque en algunas ocasiones la pigmentación de la pared es amarillenta-marrón. El oogonio y el anteridio están delimitados por una septa. El anteridio se une al oogonio, ocurriendo la meiosis antes de la fertilización. Según el tipo de unión, podemos clasificar al anteridio como paragino: el anteridio crece independientemente y durante el contacto sexual se sitúa en el lateral del oogonio, o anfigino, cuando el oogonio crece a través del anteridio atravesándolo, de forma que el anteridio queda como un cuerpo que rodea el pedúnculo del oogonio.

En el interior del oogonio, fruto de la unión con el anteridio, se forma la oospora. Esta puede ocupar todo el oogonio (plerótica) o ser más pequeña (aplerótica). La oospora posee una pared gruesa, con el ooplasto o cuerpo refringente en el centro y un cuerpo transparente que contiene el núcleo en la parte superior (Erwin y Ribeiro, 1996).

Dentro del género *Phytophthora* podemos encontrar especies homotálicas o autofértiles y especies heterotálicas o autoestériles. Las primeras pueden reproducirse sexualmente a partir de un único talo cuando existen las condiciones ambientales adecuadas. Las especies heterotálicas, por el contrario, necesitan que se pongan en contacto dos talos complementarios de tipo de apareamiento opuesto. Generalmente se denominan a los dos talos complementarios de cada especie A1 y A2.

Las oosporas son esporas de resistencia, pudiendo sobrevivir en el suelo durante largos períodos de tiempo, pero con una capacidad germinativa limitada. La reproducción sexual aporta la posibilidad de variación genética debida a la recombinación, permitiendo una mayor capacidad adaptativa de la especie al medio (Elliot, 1983).

A partir de parámetros morfológicos y fisiológicos como; tipo de anteridios, de esporangios, homotalismo o heterotalismo, etc., se puede dividir a las especies de *Phytophthora* en seis grupos distintos (Waterhouse, 1963; Stamps et al., 1990):

- Grupo I: incluye especies caracterizadas por formar en sustratos sólidos abundantes esporangios con el ápice papilado, con un poro estrecho y normalmente caduco. No presentan proliferación interna. Son especies homotálicas y todos o casi todos los anteridios son paraginos.
- Grupo II: incluye especies cuyos esporangios presentan las mismas características que los del grupo I, sin embargo son especies heterotálicas. Los anteridios son siempre anfiginos.
- Grupo III: está constituido por especies cuyos esporangios presentan una papila no tan desarrollada como en los grupos anteriores. Los esporangios pueden o no ser caducos, pero sin proliferación interna. Son especies homotálicas. Los anteridios son predominantemente paraginos.
- Grupo IV: incluye especies cuyos esporangios presentan las mismas características que los del grupo III, generalmente caducos y sin proliferación interna. Pueden ser heterotálicas u homotálicas, pero los anteridios son predominantemente anfiginos.
- Grupo V: formado por especies con esporangios no papilados, persistentes y que rara vez o nunca se forman en medio sólido. Presentan proliferación interna. Incluye especies homotálicas y todos o la mayoría de los anteridios son anfiginos.
- Grupo VI: incluye especies cuyos esporangios son similares a los del grupo anterior. Son especies normalmente heterotálicas y con todos o la mayoría de los anteridios anfiginos.

3.2. *Phytophthora cinnamomi*

Phytophthora cinnamomi fue descrita por primera vez como el agente causal del chancro en *Cinnamomum burmannii* en Birmania por Rands (1922). Desde entonces, diversos autores, Waterhouse y Waterston (1966), Ho y Zentmeyer (1977), Erwin y Ribeiro (1996) han descrito la morfología, epidemiología, sintomatología, etc. de esta especie coincidiendo en mayor o menor medida en sus resultados. Actualmente, se siguen utilizando estas descripciones para identificar a *P. cinnamomi*. Por ejemplo la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) se basa en los datos aportados por estos autores para describir y catalogar al patógeno (Anon., 2004). También, la base de datos q-bank (www.q-bank.ue, asociada al Ministerio de Economía, Agricultura e Innovación de Holanda y al QBOL (Quarantine Barcoding of Life)) recurre a la descripción de Rands de 1922.

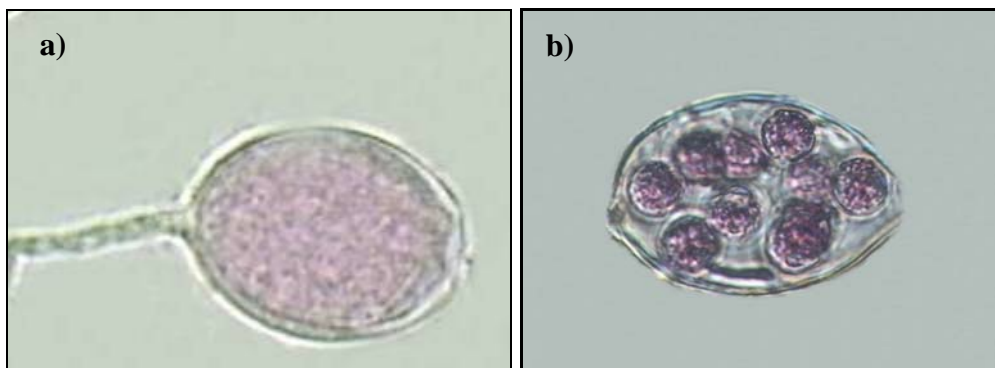
Phytophthora cinnamomi está incluida en el grupo VI de Waterhouse (Waterhouse y Waterston, 1966), es decir, se trata de una especie heterotálica, de esporangios no papilados y anteridios anfiginos.

Los esporangios de *P. cinnamomi* son ovoides, obpiriformes o elipsoides y no papilados (Figura 10). Son redondeados o cónicos en la base, persistentes y se sitúan en posición terminal en el esporangióforo. Muchos de ellos pueden presentar el ápice truncado (Sánchez et al., 2005a). Pueden presentar proliferación interna y externa. Su tamaño medio oscila entre los 86,7 x 36,7 μm descritos por Rands (1922), entre 57 x 33 μm , pudiendo alcanzar los 100 x 40 μm según Waterhouse y Waterston (1966), 75 x 40 μm de acuerdo a las mediciones realizadas por Ho y Zentmeyer (1977) y entre 11-103 x 11-53 μm , según Erwin y Ribeiro (1996). Más recientemente se ha estimado el tamaño medio de los esporangios de aislados de *P. cinnamomi* de origen andaluz en 51,3 x 36 μm con un ratio longitud-anchura de 1,5 (Sánchez et al., 2003a) y entre 40 x 31 μm , con un ratio medio de 1,2 (Sánchez et al., 2005a). Se pueden presentar en esporangióforos aislados o formando ramificaciones simpodiales. Cada esporangio puede liberar entre ocho y 40 zoosporas (Rands, 1922).

Las zoosporas son reniformes y heterocontas, con dos flagelos diferentes entre sí, uno tipo látigo (liso) y otro mastigonemado o barbado (con fibrillas secundarias que le dan un aspecto plumoso). Ambos emergen de la zona cóncava de la zoospora (Rands, 1922;

Erwin y Ribeiro, 1996). Su tamaño oscila entre 11-18 μm , pero una vez que se enquistan su diámetro se reduce a 10-11 μm (Rands, 1922).

Figura 10. a) Esporangio maduro de *Phytophthora cinnamomi*, b) esporangio con las zoosporas ya diferenciadas en su interior (Sánchez et al., 2005b)



Las clamidosporas (Figura 11) se forman abundantemente en los tejidos infectados. Su tamaño medio es de 31-50 μm (Rands, 1922; Erwin y Ribeiro, 1996). Las clamidosporas de *P. cinnamomi* son de forma globosa y en general tienen la pared más delgada que otras especies de *Phytophthora* (Zentmeyer, 1980). Las podemos encontrar en posición terminal o intercalar y en ocasiones formando racimos de tres a 10 clamidosporas.

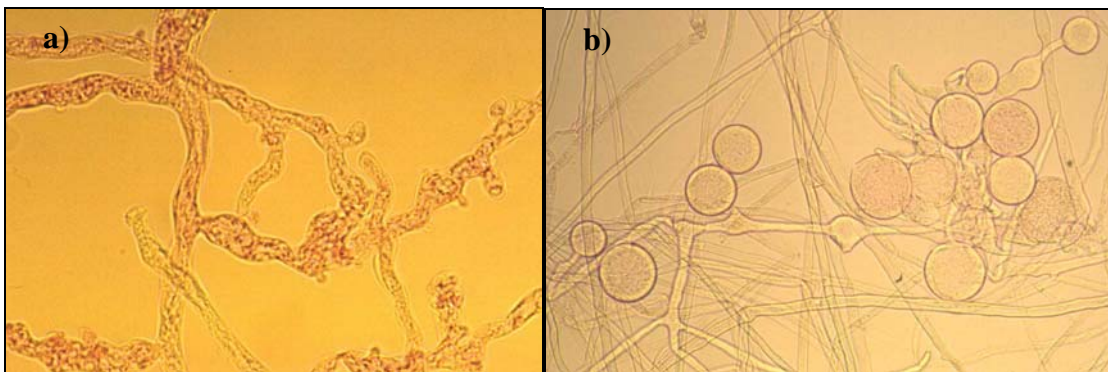
Las hinchazones hifales también son más abundantes que en otras especies. Estas son intercalares o terminales; pueden ser esféricas, elipsoides o angulares y presentarse aisladas o formando cadenas de longitud variable o en forma de racimos (Figura 12).

Las esporas de reproducción sexual, oosporas (Figura 13), se forman a partir de la unión del anteridio y del oogonio. La especie es heterotálica, con dos talos diferentes A1 y A2. El talo A2 presenta una distribución mundial, mientras que el A1 se encuentra restringido a la zona de origen del microorganismo en Papúa Nueva Guinea (Brasier, 1996), por lo que normalmente en condiciones naturales no se producen las oosporas por la unión de los dos talos distintos. No obstante, diversos estudios indican la posibilidad de que se produzcan oosporas a partir de un único talo de *P. cinnamomi* bajo la influencia de exudados radicales de aguacate (Zentmeyer, 1952), ciertas acacias (Jayasekera et al., 2007), en granos de avena (Royle y Hickman, 1964), o mediante la influencia de otros hongos de suelo como *Trichoderma* spp. (Brasier, 1975).

Figura 11. Clamidosporas de *Phytophthora cinnamomi* producidas en extracto de suelo



Figura 12. Hinchazones hifales de *Phytophthora cinnamomi*: a) hinchazones irregulares (micelio botrioso), b) hinchazones hifales esféricas en racimo (Sánchez et al., 2006)



Los anteridios son siempre anfiginos y unicelulares o bicelulares. Según estimaciones realizadas por Sánchez et al. (2005a), el 23% de los anteridios examinados resultaron bicelulares. Los anteridios tienen un tamaño medio que según diversos autores varía entre 14,5-29,1 x 16,6-21,2 μm (Rands, 1922), 21-23 x 17 μm (Waterhouse y Waterston, 1966), 19 x 17 μm según Erwin y Ribeiro (1996) y 13,5-22,5 μm en aislados procedentes de Andalucía (Sánchez et al., 2005a). Los oogonios son redondeados, de hialinos a marrón-amarillentos y con diámetro medio según algunos autores de 21-8 μm (Waterhouse y Waterston, 1966; Erwin y Ribeiro, 1996) y de 36,4-46,4 μm de acuerdo a mediciones realizadas en aislados andaluces de *P. cinnamomi* por Sánchez et al. (2005a). Las oosporas son esféricas, hialinas y pleróticas, con un diámetro de 39,73-44,24 μm según Rands (1922) o de 19-54 μm según otros autores (Erwin y Ribeiro,

1996; Anon., 2004). Su pared celular presenta un grosor de 0-1,4 μm (Rands, 1922) o 3,3-4,3 μm (Sánchez et al., 2005a).

Figura 13. Oosporas de *Phytophthora cinnamomi* (Caetano et al., 2009b)



El rango de temperaturas de crecimiento de *P. cinnamomi* oscila entre los 5-34° C, con unas temperaturas mínimas de 5-15° C, óptimas de 20-32,5° C y máximas de 30-36° C (Anon., 2004). Para los aislados andaluces se han obtenido unas temperaturas óptimas de crecimiento de 24° C, con una temperatura mínima de 7,5° C y máxima de 24,7° C (Sánchez et al., 2005a). Según estudios realizados por Caetano et al. (2009a), en la Península Ibérica se pueden distinguir dos grupos de aislados de *P. cinnamomi* que presentan temperaturas de crecimiento diferentes, y con distinta área de distribución. Un primer grupo presenta temperaturas óptimas de crecimiento de 30,1° C y mínimas de 1,8° C y el segundo grupo muestra temperaturas óptimas de 26,9° C y mínimas de 5,2° C (Caetano et al., 2009a). Estos datos, junto con los obtenidos a partir de la caracterización morfológica y molecular, ha demostrado la existencia de dos poblaciones del patógeno con dos formas distintas de micelio: una población presenta abundantes hinchazones esféricas, principalmente situadas en posición terminal, mientras la otra presenta hinchazones hifales irregulares, ramificaciones botriosas (Sánchez et al., 2003a; 2006; Caetano et al., 2009a). Estas diferencias en la morfología del micelio están asociadas con el origen geográfico de los aislados. Así, un grupo procede de la parte más occidental del área afectada (Huelva y el Algarve portugués), mientras que el otro se aísla de la parte más oriental (sierras de Sevilla, Córdoba y Cádiz) (Caetano et al., 2006; 2009a). Todos estos resultados sugieren una mayor adaptabilidad del primer grupo de aislados, mientras que la limitación de crecimiento

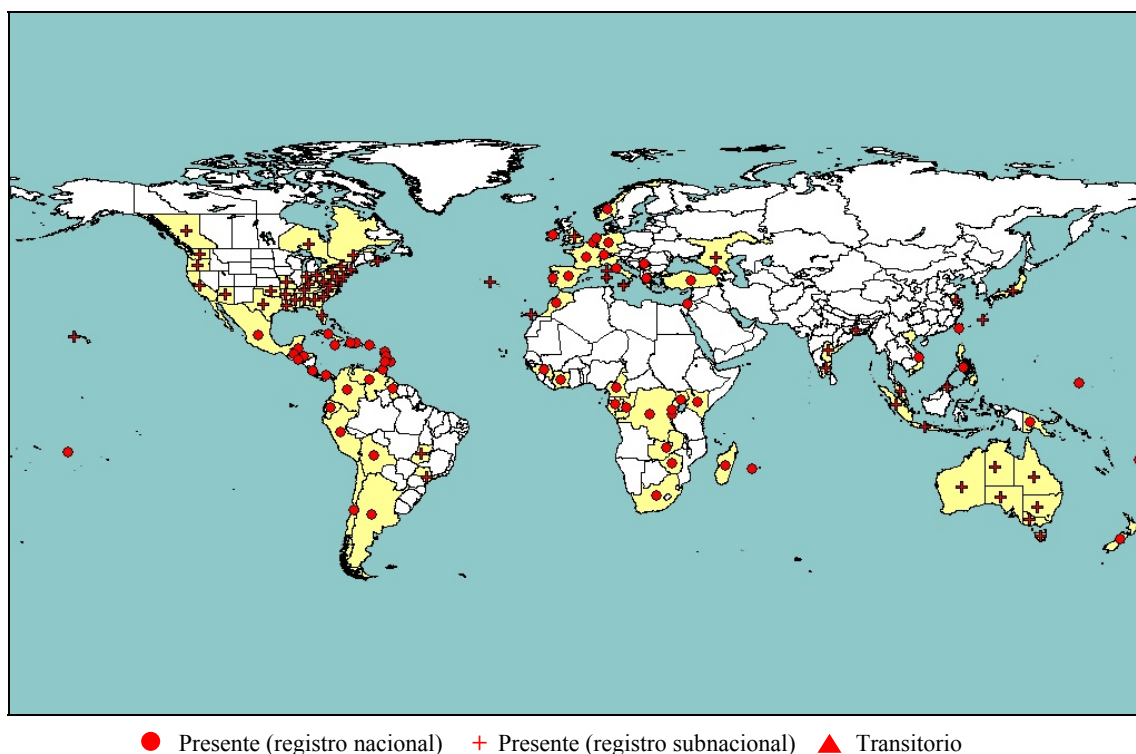
que muestra el segundo grupo a temperaturas bajas justifica las correlaciones obtenidas en Andalucía entre la presencia del patógeno en campo y las temperaturas mínimas registradas en la zona (Sánchez et al., 2003a; Caetano et al., 2006; 2009a). Estos dos grupos se encuentran en los extremos del rango de temperaturas óptimas de crecimiento descritas para *P. cinnamomi*. La caracterización molecular de los aislados mediante el análisis de sus perfiles AFLP también ha mostrado diferencias entre los dos grupos, que se corresponden con poblaciones genéticas distintas (Caetano et al., 2006; 2009a). No se ha podido demostrar ninguna diferencia de patogenicidad entre ellas (Sánchez et al., 2002a).

3.3. Distribución geográfica y especies susceptibles

El origen geográfico de la especie *P. cinnamomi* no está claramente establecido. Fue descrito por primera vez en Indonesia (Sumatra) en 1922. Zentmeyer (1988) sugiere que la especie es originaria del sudeste asiático y sur de África y que durante el siglo XVIII se dispersó a través del Océano Pacífico hasta Latinoamérica (EPPO/CABI (Commonwealth Agricultural Bureaux International), 2011). Sin embargo en 1996, Brasier determinó la zona de origen de *P. cinnamomi* en Papúa Nueva Guinea. Independientemente de la zona de origen del microorganismo, éste presenta en la actualidad una distribución mundial (Figura 14).

Phytophthora cinnamomi presenta una amplia gama de huéspedes con más de 1.000 especies distintas (Zentmeyer, 1983), la mayoría de ellas especies leñosas como *Ananas comosus*, *Castanea dentata*, *C. sativa*, *Chamaecyparis lawsoniana*, *Cinchona* spp., *Cinnamomun* spp., *Erica* spp., *Eucalyptus* spp., *Juglans* spp., *Pinus* spp., *Prunus* spp. y *Quercus* spp. (Erwin y Ribeiro, 1996; Marcais et al., 1996), aunque también afecta a algunas herbáceas, principalmente del género *Lupinus*, como *L. albus* y *L. angustifolius* (Kirby y Grant, 1975; Erwin y Ribeiro, 1996).

Figura 14. Mapa de distribución definido por la EPPO para *Phytophthora cinnamomi* (EPPO, 2011) www.eppo.int



3.4. Diagnóstico

Los síntomas aéreos de los árboles afectados son muy inespecíficos: amarillez y/o marchitez foliar, defoliación, muerte regresiva de brotes y ramas (puntisecado) (Sánchez et al., 2002a). Estos son síntomas secundarios derivados de la falta de absorción de agua en las raicillas absorbentes, las cuales una vez infectadas se necrosan, oscurecen y descascarillan fácilmente (Figura 15). Cuando la infección es muy severa, el árbol afectado se colapsa repentinamente y muere, permaneciendo todas las hojas secas en las ramas, dando lugar a un síndrome de muerte súbita o apoplejía (Figura 16). Sin embargo en otras ocasiones, el proceso de muerte es más lento, puede durar incluso varios años, llamándose síndrome de muerte lenta (Figura 17). Este último se produce más frecuentemente en climas frescos y húmedos (Sánchez et al., 2006). En algunos casos, la infección se extiende a las raíces leñosas y a la base del tronco, produciendo lesiones de color pardo que se observan al retirar la corteza del árbol infectado.

Figura 15. Raíz procedente de una encina con síntomas de podredumbre radical: escasez y necrosis de raicillas absorbentes



El diagnóstico de la enfermedad en campo es difícil, debido a que la sintomatología aérea es muy genérica e inespecífica. Por ello el diagnóstico se basa fundamentalmente en el aislamiento e identificación del patógeno de las raicillas infectadas o del suelo de la rizosfera, mediante el uso de cebos biológicos (Sánchez et al., 2002a; 2003a), mediante la extensión de suspensiones de suelo en medio selectivo (Romero et al., 2007a) o mediante el uso de kits comerciales de detección de *Phytophthora* spp. *in situ* (Figura 18).

Figura 16. Síndrome de muerte súbita o apoplejía



Figura 17. Evolución del proceso de muerte lenta: defoliación (izda.) y muerte del árbol (dcha.)



Figura 18. Kit comercial para detectar la presencia de *Phytophthora* spp. en campo



3.5. Epidemiología de la enfermedad

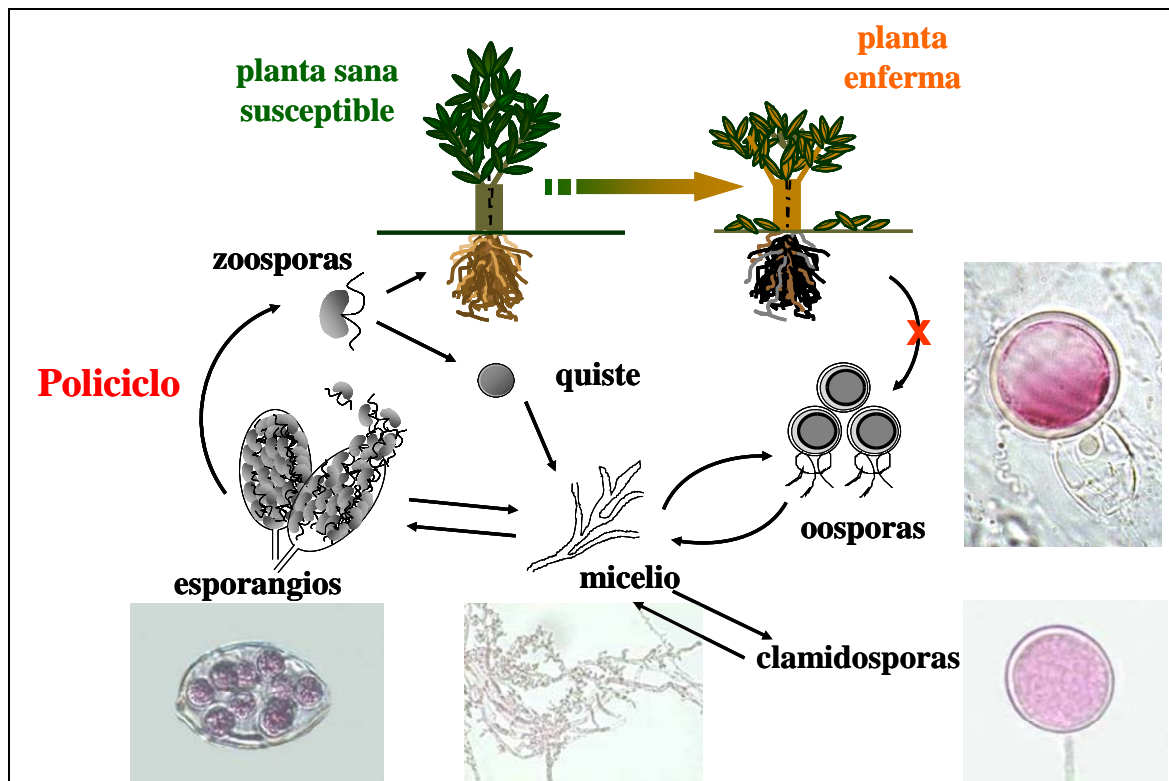
El microorganismo se encuentra en el suelo en forma de estructuras de supervivencia (oosporas y más frecuentemente, clamidosporas) capaces de subsistir durante un tiempo relativamente amplio como propágulos en latencia, aunque habitualmente con densidades de inóculo en suelo relativamente bajas (Figura 19) (Sánchez et al., 2002a; 2003a; 2006; Romero et al., 2007a). Estas esporas germinan produciendo esporangios,

que a su vez germinan emitiendo las zoosporas móviles. Este proceso de germinación tiene lugar cuando hay humedad en el suelo y su temperatura es relativamente alta (~25° C), favoreciéndose además en suelos ácidos. Los aislados andaluces de *P. cinnamomi* pueden crecer en un amplio rango de temperaturas, pero su temperatura óptima oscila entre 26 y 30° C, rango situado en la zona alta de las temperaturas óptimas descritas para la especie (Sánchez et al., 2002a; 2006). Esto sugiere que es un patógeno muy bien adaptado a las altas temperaturas que se registran normalmente en verano en las dehesas andaluzas y que puede existir un nivel muy bajo de competencia entre *P. cinnamomi* y otros patógenos de suelo mejor adaptados a temperaturas más bajas. En concordancia con esto, se ha encontrado también una correlación positiva entre el éxito en el aislamiento de *P. cinnamomi* del suelo y el incremento de las temperaturas mínimas (Sánchez et al., 2003a). La existencia de agua libre facilita la dispersión de las zoosporas, ya que tienen la capacidad de nadar, desplazándose activamente en la película de agua que rodea las partículas del suelo, siendo entonces atraídas químicamente por los exudados radicales de las especies vegetales susceptibles. Cuando infecta al huésped, el oomiceto desarrolla su micelio en el interior de las raíces y se desarrolla rápidamente en sucesivos ciclos de producción de esporangios y esporulación, dando lugar a un aumento de la población del patógeno (Erwin y Ribeiro, 1996) mientras se mantengan las condiciones de saturación hídrica del suelo. Tras la colonización y muerte de las raíces o cuando las condiciones ambientales no son favorables, el patógeno forma nuevas esporas de supervivencia (clamidosporas) que quedan en el suelo como estructuras de resistencia (Erwin y Ribeiro, 1996; Romero et al., 2007a). Las plantas infectadas actúan, por tanto, como fuente de inóculo.

Varios factores favorecen el establecimiento y desarrollo de epidemias de la enfermedad, entre los que destacan:

- *Phytophthora cinnamomi* es capaz de producir un gran número de esporas infectivas cuando el suelo presenta saturación hídrica, lo que le confiere una elevada capacidad para producir enfermedad (Sánchez et al., 2010).
- Las plantas jóvenes con elevadas cantidades de raíces absorbentes son muy susceptibles a la infección por el patógeno, especialmente en suelos encharcados o cuando las raíces presentan daños (Sánchez et al., 2010).

Figura 19. Ciclo de patogénesis de *Phytophthora cinnamomi* (Sánchez et al., 2010)



- Amplia gama de huéspedes del patógeno. La mayoría de ellos especies leñosas, aunque también afecta a algunos cultivos herbáceos, como *Lupinus* spp. (Kirby y Grant, 1975; Erwin y Ribeiro, 1996) y especies silvestres, como *Cistaceae*, *Ericaceae* y *Leguminosae* (Moreira y Martins, 2005), que pueden actuar como reservorio de inóculo o incrementando las esporas de resistencia, potenciando así el desarrollo de las epidemias.
- Las zonas más afectadas se sitúan principalmente en áreas topográficamente bajas (Figura 20), con buena capacidad de retención de agua en el suelo o que son susceptibles de sufrir encharcamientos. En estas zonas la enfermedad se desarrolla muy rápidamente y ocasiona la muerte súbita del arbolado afectado. Esto se debe a que el encharcamiento estacional del suelo estimula la germinación de las clamidosporas, la germinación y la producción de esporangios y la dispersión de las zoosporas. No obstante, los mayores daños se originan en zonas secas, con primaveras lluviosas y veranos y otoños cálidos y secos. En estas condiciones el sistema radical del árbol no es capaz de superar el estrés del déficit hídrico y muere.

Figura 20. Zona de vaguada con el arbolado afectado por la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi*



- Según Carrasco et al. (2009), la diseminación del patógeno se ve favorecida también en suelos pesados y compactos, con baja capacidad de infiltración y que potencian el encharcamiento y la escorrentía (Sánchez et al., 2010). En las dehesas, por un lado, la sobreexplotación ganadera produce un importante incremento de la compactación del suelo (Figura 21) (Fernández et al., 2008) y por otro lado, muchos de los suelos son arcillosos o arenosos con niveles freáticos altos y pH ligeramente ácidos. Estas características favorecen la dispersión del patógeno y la infección del arbolado (Erwin y Ribeiro, 1996; Sánchez et al., 2010).

4. IMPORTANCIA DE LA PODREDUMBRE RADICAL

Según estimaciones de la Comisión de Medio Ambiente y Agricultura del Senado (2010) la cantidad de árboles perdidos por la Seca supera los 500.000 ejemplares, lo que se traduce en una disminución de la productividad media de las explotaciones de dehesa de más de 1 millón de € y una depreciación media de las explotaciones superior al 20%

del valor inicial. Por otra parte, Brasier et al. (1993) establecieron la estrecha relación existente entre el decaimiento que están sufriendo encinas y alcornoques en el sur de la Península Ibérica y la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* (Brasier, 1992; 1996; Brasier et al., 1993). Por lo tanto, buena parte de las pérdidas atribuidas al decaimiento de los *Quercus*, se deben directamente a la acción de *P. cinnamomi* sobre el arbolado.

Figura 21. Suelo de dehesa compactado por efecto de la sobreexplotación ganadera



Sin embargo, *P. cinnamomi* no solo afecta a España y Portugal, ya que es un patógeno ampliamente distribuido. Según datos recogidos por la EPPO/CABI (2011), el impacto económico derivado de la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* es muy elevado, ya que afecta a muchos ecosistemas distintos: causa la enfermedad de la Tinta del castaño (Mansilla et al., 2000; Sánchez et al., 2005b), en Australia se han registrado importantes epidemias causadas por este patógeno en bosques de eucaliptos (Podger et al., 1965; Shearer et al., 2004). El aguacate también se ve afectado por la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi*, ocasionando importantes pérdidas económicas particularmente en California (EEUU), Puerto Rico y Suráfrica (Wager, 1942; Coffey, 1987). Todo lo anterior se suma a los daños que puede ocasionar en zonas de especial

valor ecológico, como el alcornocal de la Reserva Biológica situada en el Parque Nacional de Doñana, el cual sirve de hábitat a numerosas aves acuáticas protegidas, como espátulas o garzas, que pueden ver peligrar su ecosistema por el deterioro del arbolado a causa de la podredumbre radical ocasionada por *P. cinnamomi* y en menor medida, por *Py. spiculum* (De Vita et al., 2011a). Todas estas referencias ponen de manifiesto el grado de importancia de *P. cinnamomi* como patógeno de los *Quercus* mediterráneos en España.

Buena parte de la economía de las zonas rurales del sur de España y Portugal está asociada a la dehesa, con la producción de cerdo ibérico de bellota como una de las principales actividades económicas (Costa et al., 2006). Sin embargo, para la alimentación de este ganado es necesaria una buena producción de bellota, la cual está directamente ligada al vigor y al estado fitosanitario de encinas y alcornoques (Carbonero et al., 2004; Fernández-Rebollo y Carbonero, 2008). Y es precisamente este arbolado el que sufre con mayor intensidad las consecuencias de la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi*. En definitiva, la economía de estas zonas depende totalmente de la conservación del arbolado y por lo tanto, del control que se realice del patógeno que lo está matando.

5. MÉTODOS DE CONTROL APLICABLES A LA PODREDUMBRE RADICAL DE LOS *QUERCUS* MEDITERRÁNEOS

La encina es uno de los pilares básicos de la dehesa, de la que depende en buena medida el alimento del ganado, el estado de los pastos, el control de los matorrales, etc., por lo que es necesaria su conservación. Para esto es imprescindible el mantenimiento de un buen estado fitosanitario, dentro del cual el control de la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* es una pieza clave. Sin embargo, numerosas características convierten a *P. cinnamomi* en un patógeno difícil de controlar (Erwin y Ribeiro, 1996): su amplio número de huéspedes, su capacidad para sobrevivir en plantas asintomáticas, su capacidad para invadir el perfil del suelo hasta profundidades considerables y una rápida capacidad de diseminación en suelos mal drenados o encharcados.

En cultivos agrícolas se utilizan toda una serie de medidas para controlar a este patógeno: higiene en el manejo de viveros, cuarentenas, rotación de cultivos, utilización

de variedades o patrones resistentes; mejora de los drenajes, control químico y control biológico (Ribeiro, 1978). Sin embargo, de acuerdo a la naturaleza del patosistema *Quercus/Phytophthora*, algunas de estas medidas de control, como el establecimiento de cuarentenas, no resultan viables para las dehesas en el momento actual, ya que los suelos están altamente infestados por el patógeno, que además presenta una distribución ubicua en la región (Romero et al., 2007b).

En otros ecosistemas forestales distintos de la dehesa pero afectados también por *P. cinnamomi* se utiliza la aplicación de productos químicos como métodos de control. En Italia, en castaños (*C. sativa*) afectados por la enfermedad de la Tinta causada por *P. cinnamomi* y *P. cambivora* (Gentile et al., 2009) y en Australia en *Banksia grandis* y *Eucalyptus marginata* (Shearer y Fairman, 2007), se usan inyecciones de fosfito potásico (Figura 22). Sin embargo, la aplicación de inyecciones al tronco no parece ser la mejor solución para la dehesa, no sólo por su elevado coste, sino porque podría interferir en su carácter seminatural (Fernández y Porras, 1998). Por lo tanto, se deben implementar sistemas de control integrado en los que se incluyan alternativas de control cultural y/o biológico.

Existen una serie de medidas culturales encaminadas a prevenir la dispersión del patógeno entre las que deben considerarse: evitar la compactación del suelo, producida en muchas dehesas por una alta carga ganadera, y asegurar un buen drenaje para disminuir el encharcamiento del suelo que favorecerá la capacidad de dispersión de *P. cinnamomi* (Sánchez et al., 2010). Según Fernández et al. (2008) en zonas de dehesa afectadas por la enfermedad causada por *P. cinnamomi* se deben destruir los pies infectados, eliminar los tocones y evitar el movimiento del suelo infestado con el calzado, el ganado o la maquinaria, junto con la eliminación del laboreo en las zonas con focos de infección. Además se debe controlar el matorral leñoso (Sánchez et al., 2010).

La búsqueda de suelos supresivos contra *P. cinnamomi* es un método de control cultural potencialmente aplicable en las dehesas. Estos suelos deben cumplir varias características para dificultar el desarrollo del patógeno: altos niveles de Ca^{2+} (frecuentemente 20-25 meq x 100 g⁻¹) y pH de 5,5-6 a 7, de modo que se estimule el desarrollo de microorganismo del suelo antagonistas de *P. cinnamomi* (Broadbent y

Baker, 1974; Linderman y Ribeiro, 1991). En las dehesas es habitual la fertilización para mejorar la producción y composición botánica de los pastos, así como el estado vegetativo y nutritivo del arbolado (Fernández-Rebollo y Carbonero, 2008). En otros cultivos, como el aguacate (*Persea americana*), el tratamiento con sulfato y carbonato cálcico disminuye la susceptibilidad de la planta a *P. cinnamomi* (Duvenhage y Kotzé, 1991). Según estudios realizados por Campanella et al. (2002), la aplicación a un suelo infestado por *Phytophthora nicotianae* de propionato y lactato cálcico disminuye significativamente la densidad de inóculo en el mismo. Por otra parte, se ha demostrado que la aplicación de fertilizantes cálcicos al suelo aumenta los niveles disponibles de este ión, permitiendo una mejor nutrición cálcica de la planta y una mayor tolerancia a la infección por *Phytophthora* spp. (Sugimoto et al., 2007). Además, el mayor nivel de Ca^{2+} en el suelo dificulta el desarrollo de este tipo de patógenos, convirtiendo el sustrato en un suelo supresivo para *Phytophthora* (Linderman y Ribeiro, 1991).

Figura 22. Tratamiento con fosfito potásico mediante inyección al tronco (Carrasco et al., 2009)



Otro método que se puede integrar en el control de *P. cinnamomi* es la aplicación de estiércoles frescos y maduros al suelo, como por ejemplo gallinaza (Aryantha et al.,

2000). El uso de estas enmiendas orgánicas genera antibióticos y metabolitos tóxicos para el patógeno y además aumentan las poblaciones de organismos del suelo antagonistas de *P. cinnamomi*, de forma que limitan la capacidad del patógeno para provocar enfermedad (Linderman, 2003).

La solarización es un método de control físico empleado contra patógenos de suelo normalmente en cultivos agrícolas, pero que también se puede aplicar en la dehesa, especialmente en áreas más o menos reducidas, antes de llevar a cabo una repoblación. Se han obtenido buenos resultados en suelos infestados con *P. cinnamomi*, que previa solarización, se han plantado con aguacates, los cuales durante los 10 años siguientes han presentado mayores porcentajes de supervivencia que sus correspondientes controles (Gallo et al., 2007).

El control biológico basado en la interacción entre el patógeno y organismos antagonistas que dificultan su desarrollo, está ampliamente utilizado como método de control. Por ejemplo, *Trichoderma* y *Gliocladium* spp. se han aplicado contra *P. cactorum* en cultivos de manzana (Smith et al., 1990), *Trichoderma* spp. contra *P. cinnamomi* en cultivos de aguacate (McLeon et al., 1995). *Hypochoytrium catenoides*, *Streptomyces griseoalbus*, *Streptomyces violascens*, *Pseudomonas fluorescens*, son otros hongos de suelo y bacterias antagonistas de *P. cinnamomi* (Erwin y Ribeiro, 1996; Menge, 2000).

Por otra parte, la biofumigación o enterrado en verde de determinados cultivos que producen sustancias tóxicas para el patógeno, es otro método de control que se puede llevar a cabo en la dehesa contra *P. cinnamomi*. Por ejemplo, contra *Verticillium dahliae* en olivo se utilizan varias especies de la familia *Brassicaceae* o *Diplotaxis virgata* (López-Escudero y Mercado, 2011).

El uso de variedades o patrones resistentes a *P. cinnamomi* es una técnica muy utilizada en cultivos forestales, como el castaño (Miranda-Fontaiña et al., 2007) o agrícolas, como el aguacate (Gallo-Llobet et al., 2003) como método de control contra la podredumbre radical y que aunque presenta mayores dificultades en *Quercus*, especialmente en la encina, debido a su amplia variabilidad genética inter e intrapoblacional (Michaud et al., 1992; Vázquez, 1998), también puede ser considerado como un posible método de control en las dehesas afectadas.

Por último, debe controlarse el material vegetal que se produce en vivero y que posteriormente podrá ser trasplantado en dehesas libres del patógeno. El material de vivero debe cultivarse asegurando una buena aireación y drenaje del suelo o de los sustratos empleados para cultivar en contenedores, los cuales también deben estar libres de patógenos (Sánchez et al., 2010). Según datos de Sánchez et al. (2005a), se han detectados casos de muertes de plántulas de encina por *P. cinnamomi* en viveros forestales de Andalucía, favorecidas por su cultivo en sustratos inadecuados y mal drenados.

En conclusión, el control de la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* en las dehesas debe basarse en un sistema de control integrado, donde se contemplen medidas de tipo cultural (fertilización, prácticas agrícolas adecuadas, aplicación de enmiendas orgánicas), métodos de control físicos y biológicos, que en definitiva limiten o impidan la dispersión e infección de las encinas.

La conservación de la dehesa, Reserva de la Biosfera de Andalucía, comienza por la protección de su arbolado.



OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es obtener nuevos conocimientos sobre métodos de control cultural contra la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en dehesas de encina, que permitan establecer estrategias eficaces para el control integrado de la enfermedad.

Los objetivos concretos son:

1. Evaluar la eficacia de nuevos métodos de control basados en la aplicación de enmiendas potásicas y cálcicas al suelo frente a la podredumbre radical de la encina causada por *Phytophthora cinnamomi*.
2. Determinar la influencia de la nutrición cálcica y potásica y del morfotipo de las encinas en la tolerancia a la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi*.
3. Determinar la susceptibilidad a la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* de las principales especies herbáceas cultivadas en la dehesa y su influencia en la epidemiología de la enfermedad radical de la encina.

Los resultados relativos al primer objetivo se recogen en los artículos “*Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to Phytophthora cinnamomi root rot of Quercus ilex. European Journal of Plant Pathology* 132: 271-279 (2012)” y “*Effect of potassium products in the inhibition of Phytophthora cinnamomi infections on Quercus roots. Journal of Phytopathology (under review, 2012)*” del Capítulo 2.

Los resultados correspondientes al segundo objetivo se recoge en los artículos “*Calcium mineral nutrition increases the tolerance of Quercus ilex to Phytophthora root disease affecting oak rangelands ecosystems in Spain. Agroforestry Systems (under review, 2011)*” y “*Susceptibility to Phytophthora cinnamomi of the commonest morphotypes of Holm oak in southern Spain. Forest Pathology (in press, 2012)*. doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00758.x” del Capítulo 3.

Los resultados sobre el objetivo tercero se recogen en los artículos “*Lupinus luteus, a new host of Phytophthora cinnamomi in Spanish oak-rangelands ecosystems. European Journal of Plant Pathology* 128: 149-152 (2010)”, “*The role of yellow lupin (Lupinus luteus) in the decline affecting oak agroforestry ecosystems. Forest Pathology* 41: 382-

386 (2011)”y “*Susceptibility of common herbaceous crops to Phytophthora cinnamomi and its influence on Quercus root rot in rangelands. European Journal of Plant Pathology (accepted, 2012)*” del Capítulo 4.

Información de las revistas en las que se han publicado los artículos que constituyen esta Tesis Doctoral:

Revista: FOREST PATHOLOGY

Nombre abreviado: ISO Forest Pathol.

JCR Forest Pathol

ISSN: 1437-4781

Lengua: multilingüe

País: Alemania

Editorial: Wiley-Blackwell

Dirección: Commerce Place, 350
Main St Malden 02148, MA

Categoría (rango): Forestry (22/54)

Índice de impacto: 0,948

Revista: EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY

Nombre abreviado: ISO Eur. J. Plant Pathol.

JCR Eur J Plant Pathol

ISSN: 0929-1873

Lengua: inglés

País: Holanda

Editorial: Springer

Dirección: Van Godewijkstraat 30,
3311 Gz Dordrecht, Holanda

Categorías (rango): Agronomy (23/75), Plant Sciences (76/188), Horticulture (8/30)

Índice de impacto: 1,575

Revista: JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Nombre abreviado: ISO J. Phytopathol.

JCR J Phytopathol

ISSN: 0931-1785

Lengua: multilingüe

País: Alemania

Editorial: Wiley-Blackwell

Dirección: Commerce Place, 350
Main St Malden 02148, MA

Categoría (rango): Plant Sciences (104/188)

Índice de impacto: 0,937

Revista: AGROFORESTRY SYSTEMS

Nombre abreviado: ISO Agrofor. Syst.

JCR Agroforest Syst

ISSN: 0167-4366

Lengua: inglés

País: Holanda

Editorial: Springer

Dirección: Van Godewijkstraat 30,
3311 Gz Dordrecht, Holanda

Categoría (rango): Agronomy (30/75), Forestry (19/54)

Índice de impacto: 1,183



CAPÍTULO 2

Control cultural de la podredumbre radical de la encina mediante la aplicación de enmiendas potásicas y cálcicas al suelo

En este capítulo se recogen los resultados relativos al Objetivo 1 de esta Tesis Doctoral, en el cual se plantea la evaluación de la eficacia de distintas enmiendas cálcicas y potásicas en la inhibición de la capacidad infectiva de *Phytophthora cinnamomi* en la raíz de encinas, de modo que su aplicación en dehesas pueda contemplarse como parte de un sistema de control integrado de la enfermedad radical.

Los resultados obtenidos se han recogido en dos artículos:

Capítulo 2.1, publicado en el *European Journal of Plant Pathology* 2012, volumen 132, páginas 271-279, con el título

“Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Quercus ilex*”

Autores: **María Socorro Serrano**, Paolo De Vita, Pilar Fernández-Rebollo, María Esperanza Sánchez

Capítulo 2.2, artículo en revisión enviado al *Journal of Phytopathology*, con el título

“Effect of potassium products in the inhibition of *Phytophthora cinnamomi* infections on *Quercus* roots”

Autores: **María Socorro Serrano**, Pilar Fernández-Rebollo, María Dolores Carbonero, María Esperanza Sánchez

2.1

Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Quercus ilex*

María Socorro Serrano, Paolo De Vita, Pilar Fernández-Rebollo, María Esperanza Sánchez Hernández

First, second and fourth authors: Agronomy Department, Agroforest Pathology, University of Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba, Spain.

Third author: Forestry Department, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

Corresponding author: M.E. Sánchez, e-mail: aglsahem@uco.es

Abstract

Based on the observation that the root disease caused by *P. cinnamomi* on *Q. ilex* has a low incidence and severity in soils with medium-high Ca^{2+} content, we studied the ability of Ca^{2+} fertilizers to induce soil suppressiveness to the pathogen. Studies on cultures of *P. cinnamomi* exposed to different Ca^{2+} fertilizers in vitro showed significant inhibition of sporangial, chlamyospore and zoospore production at millimolar concentrations while mycelia growth was mainly unaffected. Experiments performed with artificially infested soil showed that some Ca^{2+} fertilizers induce a significant decrease on chlamyospore viability. Additionally, greenhouse experiments using artificially infested soils showed a significant reduction of foliar and root symptom severities in Holm oak seedlings growing in soils amended with Ca^{2+} fertilizers. We suggest that limestone amendments in oak rangelands could enhance the suppressiveness of soils to *P. cinnamomi*, and it is likely that the inhibition of sporangial production was the main mechanism involved.

Keywords Fertilization . Limestone . Oak decline . Rangelands

Introduction

Among diseases associated with *Quercus* decline in the Iberian Peninsula, one of the most destructive is the root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* (Brasier 1996; Sánchez et al. 2006). *Phytophthora cinnamomi* is an invasive oomycete distributed worldwide causing disease and death of woody species in natural ecosystems and in agricultural crops. It is included in the catalogue of the IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG), 100 of the World's Worst Invasive Alien Species (Lowe et al. 2000), where only five fungal species are present, with *P. cinnamomi* the only oomycete listed. The ability of some soils to suppress the development of plant diseases has been widely recognized (Hornby 1983; Heyman et al. 2007). In semi-natural agroforestry systems such as Holm oak (*Quercus ilex*) rangelands in southern Spain, fungicides or resistance-based control of *Phytophthora* root disease is not easy to apply on a practical level, mainly due to the high costs of massive fungicide applications and the apparent lack of resistance to *P. cinnamomi* in natural populations of *Q. ilex* (Tapias et al. 2006; Navarro et al. 2009). Soil suppressiveness has been described to a wide range of fungal,

bacterial and oomycete pathogens attacking woody plant hosts and in several agricultural (annual) systems, disease suppression has been shown to be of biological origin (Weller et al. 2002). In other cases, mechanisms underlying suppressiveness are described as multifactorial, having a clear chemical component or are not sufficiently understood (Höper and Alabouvette 1996; Heyman et al. 2007). For diseases caused by oomycetes, the contribution of chemical soil factors to suppressiveness seems to be important. Elevated Ca^{2+} levels have been associated with suppression of a range of pathogenic oomycetes (Broadbent and Baker 1974; von Broembsen and Deacon 1997; Heyman et al. 2007). Carbonero et al. (2004) reported a low incidence and severity of Holm oak root disease in soils with medium-high Ca^{2+} content.

The aim of the present work was to study the mechanisms behind Ca-mediated soil suppressiveness to *P. cinnamomi* in Holm oak rangelands. We hypothesize that soil Ca^{2+} content is the main factor involved and this hypothesis was tested by studying the response of the pathogen to Ca^{2+} fertilizers in vitro and in artificially inoculated pot experiments. We also suggest the possibility to enhance soil suppressiveness by limestone amendments as an interesting tool for a better disease control.

Materials and methods

Fungal material

Two *P. cinnamomi* (PE90 and PA25) isolates were used in all experiments. These had previously been isolated from Holm (*Quercus ilex* ssp. *ballota*) and Cork oak (*Quercus suber*) roots, respectively and stored in mineral oil. Each isolate belongs to one of the two morphological and genetic groups described for *P. cinnamomi* isolated from *Quercus* in the south of the Iberian Peninsula (Caetano et al. 2009).

Ca^{2+} fertilizers

In the three in vitro experiments, the following Ca^{2+} fertilizers (analytical grade) were used: CaO (90%, Scharlau), CaCO_3 (98.5%, Panreac), CaCl_2 (2-hidrate, 99%, Panreac), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (4-hidrate, 98%, Panreac) and CaSO_4 (2-hidrate, 98%, Panreac). In the soil based experiments, only CaO, CaCO_3 and CaSO_4 were used.

Effect on mycelial growth

For each Ca^{2+} fertilizer, a stock solution was prepared and aliquots were added to molten ($\sim 45^\circ\text{C}$) Corn Meal Agar medium (CMA) to reach a final concentration of 1.25, 3.75, 7.50 or 15 mM of ion Ca. When the amended media were still warm, the pH of each was measured (CRISON pHmeter, GLP21). Then, a 20 ml per plate of amended CMA was poured into Petri dishes (9 cm diameter). CMA medium free of Ca^{2+} fertilizers was prepared to be used as the control.

Agar plugs (6 mm diameter), taken from the edge of actively growing colonies of both *P. cinnamomi* isolates (colonies were grown for 4 days in the dark at $22\pm 2^\circ\text{C}$ on CA medium [Carrot-Agar 20%, Dhingra and Sinclair 1995]), were placed in the centre of Petri dishes containing amended or control CMA medium. All the plates, including controls, were incubated at 25°C in the dark. Daily, radial growth of the colonies was measured until controls covered the surface of the plates after 4 days of incubation.

For those Ca^{2+} fertilizers that significantly changed the pH of the CMA medium, mycelial growth on neutralized medium was also tested. Media were neutralized by addition of lactic acid until the pH was similar to the control (CMA, $\text{pH}=5.9$). Four replicates (plates) per isolate, Ca^{2+} fertilizer and concentration tested, plus the controls, were prepared.

ANOVA was performed with data of mycelia radial growth (mm) after 3 days of incubation and mean values were compared by the Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1985) for $P\leq 0.05$. Statistix software (Analytical Software, Tallahassee, USA) was used for all the statistical analyses.

Effect on sporangial and chlamydo spores production

To induce sporangial production, a soil extract was prepared as described by Ribeiro (1978) and Ca^{2+} fertilizers were separately added in a concentration of 15 mM of Ca^{2+} to 1 l of soil extract. This concentration is analogous with the usual levels of Ca^{2+} added in rangeland soils when fertilized ($3,000 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaCO}_3$ or $1,500\text{--}1,700 \text{ kg ha}^{-1} \text{ CaO}$, Fernández-Rebollo and Carbonero 2008).

Both *P. cinnamomi* isolates were grown on PA medium (Pea-Agar 2%; Trione 1974) for 4 days at 22°C in the dark. Six mm diameter agar plugs of both isolates, taken from

the margin of the colonies, were placed in the centre of empty Petri dishes (6 cm diameter). Then, the different Ca^{2+} amended or control soil extracts (7 ml per dish) were separately poured in the dishes until the liquid reached the plug edge, without covering it. These plates were incubated at 22°C in the light until sporangial production reached the maximum (50 or 55 h for PE90 and PA25 isolates, respectively). At this time, sporangial and chlamydospore production were evaluated by direct observation under an inverted microscope (Nikkon, magnification $\times 400$) and mature structures counted. Four replicates (plates) per isolate and Ca^{2+} fertilizer tested, plus the control, were prepared. ANOVA was performed with data converted to (number of sporangia or chlamydospores)^{1/2} (Steel and Torrie 1985) and mean values were compared by the Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1985) for $P \leq 0.05$.

Effect on sporangial germination (zoospore production)

Indirect sporangial germination was evaluated as zoospore production. To produce sporangia, both isolates were grown in Petri dishes (9 cm diameter) containing CA medium (Dhingra and Sinclair 1995) for 3 days at 22°C in the dark. At this time, aerial mycelium was collected with a sterile needle and placed on Petri dishes containing pea broth (Trione 1974). Plates were incubated again for 3 days at 22°C in the dark and the mycelium produced transferred to soil extract for 2 additional days and incubated at 22°C under fluorescent light. The new mycelium produced, with mature sporangia, was transferred to Petri dishes (6 cm diameter) containing the same Ca^{2+} amended, and control soil extracts described above. Plates were submitted to a 30 min cold-shock and returned to 22°C for 2 h in order to stimulate zoospore release (Ribeiro 1978). Four replicates (plates) per isolate and Ca^{2+} fertilizer tested, plus the control, were prepared. The average number of zoospores ml^{-1} produced was quantified by counting six aliquots (1 ml) of homogenized soil extract per plate in a Neubauer chamber (0.1 μl).

ANOVA was performed with data converted to (number of zoospores ml^{-1})^{1/2} (Steel and Torrie 1985) and mean values were compared by the Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1985) for $P \leq 0.05$.

Soil experiments

The Ca²⁺ fertilizers tested in soil (CaO, CaCO₃ and CaSO₄) were chosen based on their in vitro effectiveness on the inhibition of *P. cinnamomi* chlamyospore and sporangial production. Soil (sand:peat 1:6 vol.) was infested with the two *P. cinnamomi* isolates. Inoculum consisted of a water suspension of chlamyospores, prepared as described in Sánchez et al. (2002). Briefly, this was obtained by mixing together the same quantity of mycelium from both isolates, to obtain a single suspension of chlamyospores. The inoculum suspension was adjusted to 650 chlamyospores per g of soil (Romero et al. 2007). Ten days after soil infestation, each fertilizer was separately added to the soil at 15 mM of Ca²⁺. Soil infested and untreated (Control 1) and uninfested and untreated (Control 0) were also prepared as controls. Three replicate plastic containers (35×33×14 cm with hermetic lid) (replicates) containing 10 l of soil were prepared per treatment, including the controls. The containers were watered to field capacity and incubated in a growth chamber in the dark at 18– 24° C for 2 weeks. Soil samples were taken weekly from each container using a sterile tube (50 ml vol.). The soil from each tube was separately air dried (2 days at room temperature) and sieved (2 mm pore size). Ten g of homogenized dry soil was then suspended in 100 ml sterilized water-agar (Roko) (0.2%), and shaken. One ml aliquots were taken from the soil-water-agar mix, and plated onto Petri dishes containing 20 ml of NARPH medium (Romero et al. 2007), using a sterile glass spreader to distribute the material over the agar surface. For each soil sample, a total of 20 Petri dishes were prepared. Dishes were incubated at 24°C in the dark for 24 h, and then the agar surface of each plate was washed with sterile water for removal of the soilwater- agar mix. Dishes were re-incubated at 24°C in the dark for another 48 h and the growing colonies were morphologically identified and counted. Inoculum densities were expressed as cfu g⁻¹ (colony forming units per g of dry soil). ANOVA was performed with data converted to [(cfug⁻¹) + 0.5]^{1/2} (Steel and Torrie 1985) and mean values were compared by the Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1985) for P≤0.05.

Plant experiments

Two weeks after fertilizations, soils were transferred to free-draining plastic pots (3.5 l) and Holm oak seedlings 18 months-old were planted (10 pots [replicates] per fertilizer,

each one with 3 l of soil and one plant, plus controls). Pots were gathered in plastic trays without drainage (57×41×9 cm) and placed in an airconditioned greenhouse (25±2°C 12 h and 10±2°C 12 h). To avoid cross contamination, pots inoculated and treated with each Ca²⁺ fertilizer and control pots were placed in separate trays and watered by hand with tap water as required. One week after inoculation, every tray including the controls, was partially filled with tap water as described in Sánchez et al. (2005), maintaining soil flooding for 2 days per week over 8 weeks. After 8 weeks, the severity of foliage and root symptoms was assessed for each plant on a 0–4 scale, according to the percentage of yellow or wilted foliage or root necrosis (0=0% necrotic tissue, 1=10–33%, 2= 34–66%, 3=more than 67%, 4=dead tissue) (Sánchez et al. 2002, 2005; Romero et al. 2007). ANOVA was performed for foliage and root symptom severities, and mean values were compared by the Fisher's LSD test (Steel and Torrie 1985) at P≤0.05. In addition, root segments from inoculated and control plants were washed and plated on NARPH medium for re-isolation of the pathogen.

Results

Effect on mycelial growth

After 4 days of incubation, colonies growing on control plates occupied the entire agar surface. pH of the media amended with the different fertilizers tested varied between pH 5.4 and 11.9 depending on the Ca²⁺ fertilizer and its concentration (Table 1). CaO led to a high pH increase in comparison with non-amended CMA medium (pH=5.9). After neutralization with lactic acid, the pH of this medium amended with different concentrations of CaO was similar to the control (CMA). Average values of radial growth measured after 3 days of incubation are given in Table 2. ANOVA showed significant differences in radial growth depending on *P. cinnamomi* isolate, Ca²⁺ fertilizer added to the agar medium and its concentration. Mycelial growth of PE90 isolate was significantly inhibited by increasing concentrations of CaO, CaO neutralized, CaCO₃ and CaSO₄, but only the highest concentrations of CaO (7.5 and 15 mM) were effective in inhibiting mycelial growth by at least 50% or more. Inhibition of mycelial growth recorded for PA25 isolate was only significant for CaO and CaO neutralized, and only CaO (3.75, 7.5 and 15 mM) inhibited growth by at least 50%.

Table 1 pH of the CMA media amended with the different Ca²⁺ fertilizers and concentrations tested

Concentration (mM Ca ²⁺)	CaO	Ca(NO ₃) ₂	CaCO ₃	CaCl ₂	CaSO ₄
1.25	8.3	5.7	6.6	5.8	5.9
3.75	10.4	5.6	6.5	5.7	5.9
7.50	11.5	5.6	6.7	5.6	5.7
15.00	11.9	5.4	6.9	5.6	5.7

Table 2 Average radial growth (mm) of *P. cinnamomi* isolates measured after 3 days of incubation in CMA medium amended with different concentrations of Ca²⁺ fertilizers. For each row, values with different letters differ significantly according with the Tukey's HSD test

<i>P. cinnamomi</i> isolate	Ca ²⁺ fertilizer	Concentration (mM Ca ²⁺)				
		0,0	1,25	3,75	7,50	15,0
PE90	CaO	29,0 a	25,2 a	19,8 b	7,3 c	5,0 c
	CaO neutralized	27,5 a	26,2 a	25,1 a	21,5 b	21,0 b
	CaCO ₃	29,3 a	29,2 a	25,8 b	25,2 b	24,8 b
	CaCl ₂	28,2	27,7	27,5	26,7	27,7
	Ca(NO ₃) ₂	28,3	28,1	28,5	28,7	27,7
	CaSO ₄	29,6 a	28,7 ab	28,5 ab	27,2 bc	25,9 c
PA25	CaO	28,3 a	22,2 b	11,7 c	6,3 d	4,0 d
	CaO neutralized	26,2 a	24,3 ab	24,2 ab	22,2 b	21,7 b
	CaCO ₃	27,2	25,0	27,9	23,8	23,0
	CaCl ₂	27,3	28,6	28,0	27,0	27,3
	Ca(NO ₃) ₂	27,5	28,8	28,7	29,2	28,8
	CaSO ₄	27,7	27,7	27,8	27,9	26,6

Effect on sporangial and chlamydo spores production

ANOVA showed significant differences in sporangial and chlamydo spore production depending on *P. cinnamomi* isolate and on Ca^{2+} fertilizer added to the soil extract. Sporangial production of both isolates was significantly inhibited by CaO and CaCO_3 , reaching a 100% of inhibition for CaO and near 100% for CaCO_3 (Fig. 1). In contrast, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stimulated sporangial production of PA25 isolate. Although the mean value of sporangia produced by this isolate was not significantly higher when $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ was added to the medium compared with the control (according with the Tukey's test), this fertilizer stimulated its sporangial production more than 50% (Fig. 1).

CaO inhibited chlamydo spore production of both *P. cinnamomi* isolates by 100% (Fig. 2). The number of chlamydo spores produced by PA25 isolate in medium amended with CaCO_3 was also significantly lower than the control, reaching more than 80% inhibition, and the remaining fertilizers were not effective (Fig. 2).

Effect on sporangial germination (zoospore production)

ANOVA showed significant differences in zoospore production (indirect sporangial germination) depending on the Ca^{2+} fertilizer added to the soil extract, but no significant differences were recorded between *P. cinnamomi* isolates. Figure 3 shows that CaCl_2 was the most effective fertilizer inhibiting the production of zoospores, reaching approximately 65% inhibition. Average value of zoospore production in medium amended with CaO was significantly lower than the control, according with the Tukey's tests, but inhibition reached only 35%. The rest of the fertilizers tested were not effective.

Fig. 1 Average values and standard errors of sporangial production of *P. cinnamomi* isolates induced by the Ca²⁺ fertilizers tested. Bars with different letters differ significantly according with the Tukey's HSD test (P≤0.05)

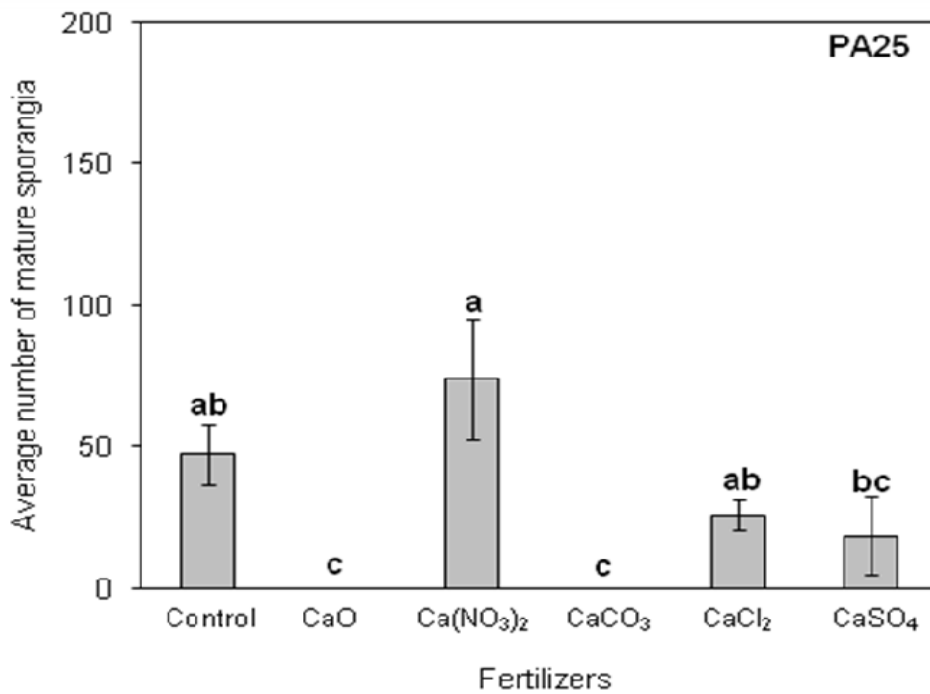
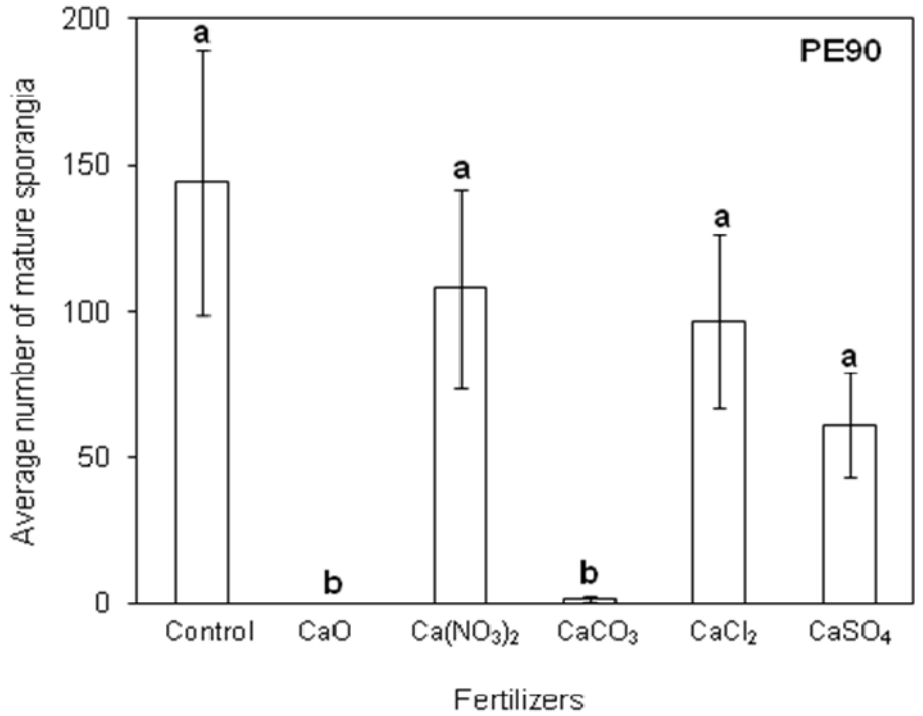


Fig. 2 Average values and standard errors of chlamyospore production of *P. cinnamomi* isolates induced by the Ca²⁺ fertilizers tested. Bars with different letters differ significantly according with the Tukey's HSD test (P≤0.05)

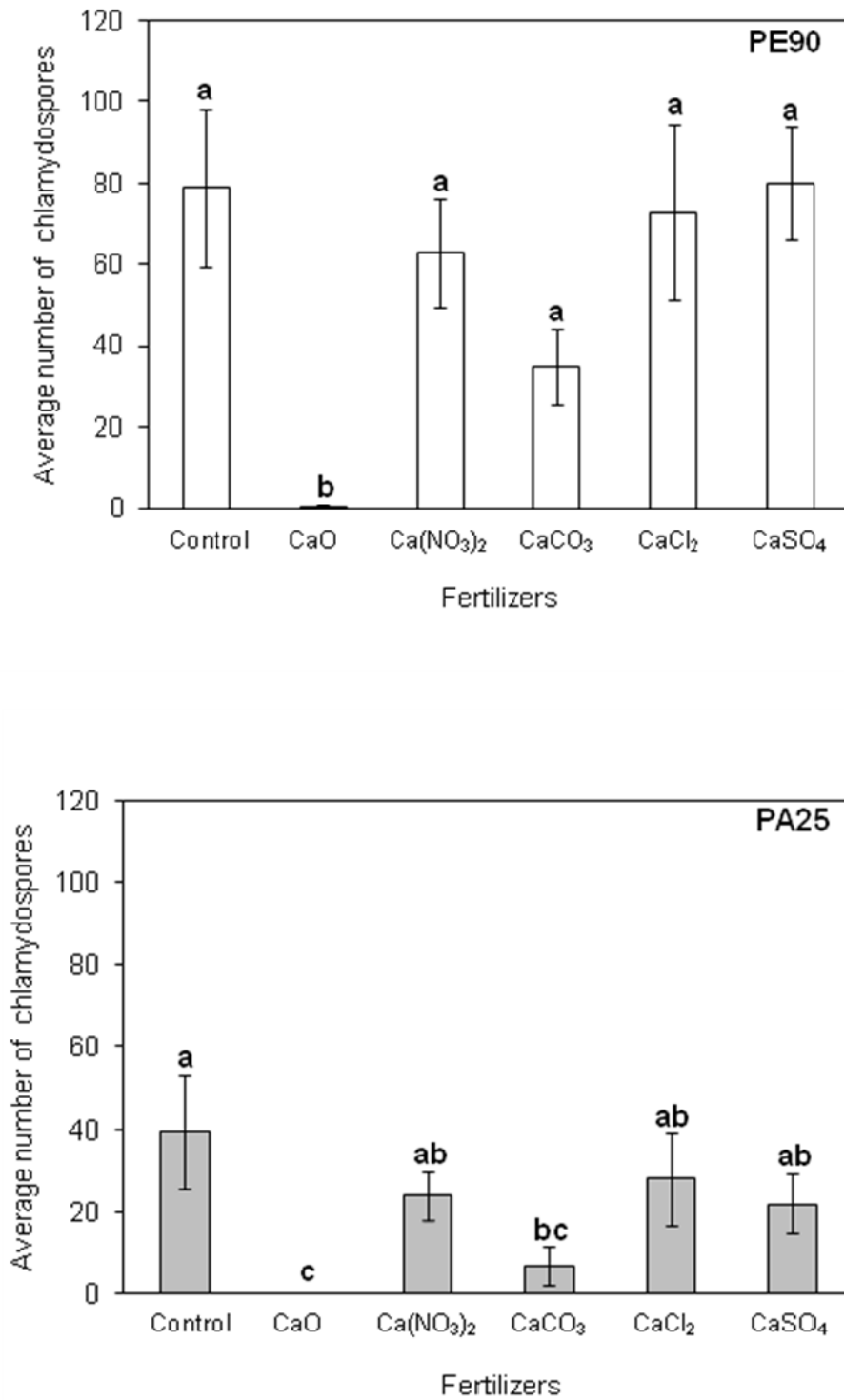
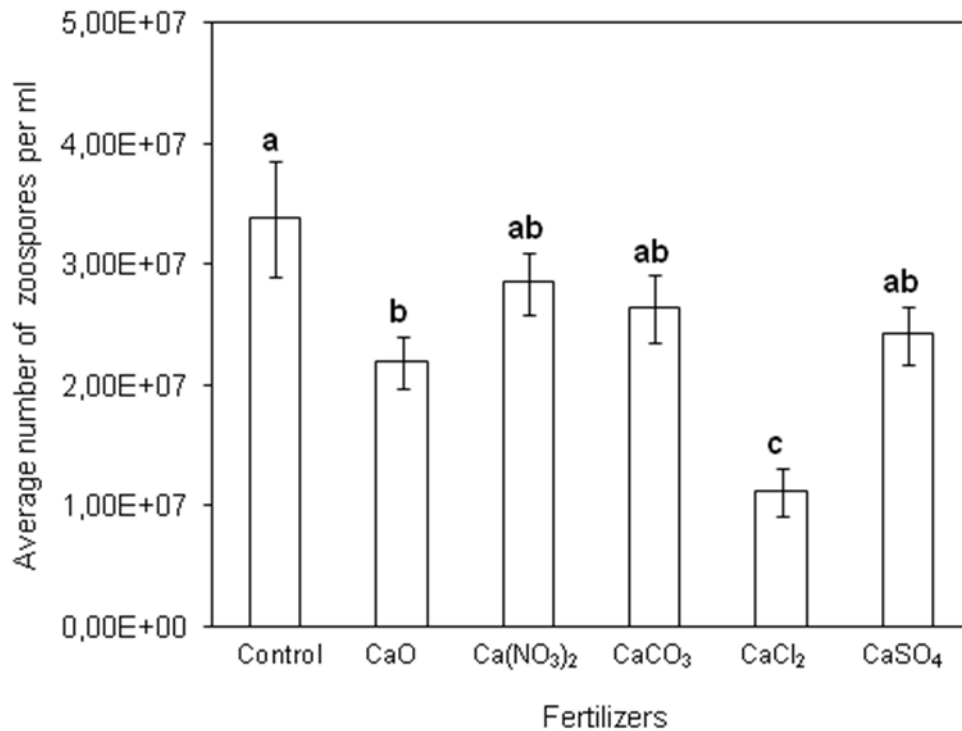


Fig. 3 Average values and standard errors of indirect sporangial germination (zoospore production) of *P. cinnamomi* isolates induced by the Ca^{2+} fertilizers tested. Bars with different letters differ significantly according with the Tukey's HSD test ($P \leq 0.05$)



Soil and plant experiments

One week after treatments, the number of viable colony forming units was significantly higher in soils amended with CaO compared with the soils amended with CaCO₃, but none of the fertilizers tested differed significantly from control soil (Fig. 4). After 2 weeks, no significant differences were recorded among soils, whether amended or not. Comparing densities of viable colony forming units over time, no significant differences were detected for control soil and soil amended with CaO. In contrast, the density of viable colony forming units in comparison with the initial value was significantly lower after 1 week of incubation for soils amended with CaCO₃ and CaSO₄, and only for soils amended with CaSO₄ after 2 week of incubation (Fig. 4).

Nine weeks after Holm oaks were planted (8 weeks after the first period of soil flooding), the plants growing in infested and untreated soil (Control 1) showed foliar and root symptoms typical of root diseases associated with *P. cinnamomi*. Crown symptoms included wilting and defoliation, and root symptoms consisted on necrosis and death of feeder roots. Plants growing in uninfested soil (Control 0) showed few symptoms. Plants growing in infested soil amended with the fertilizers (CaO, CaCO₃ or CaSO₄) showed root necrosis too, but both foliar and root symptom severities were significantly lower than those recorded for plants growing in non-amended soil (Control 1) (Fig. 5).

Phytophthora cinnamomi was always re-isolated from necrotic roots taken from plants growing in infested soil, amended or not amended with Ca²⁺ fertilizers, but never from plants growing in uninfested soil (Control 0).

Fig. 4 Average values of viable colony forming units of *P. cinnamomi* in the infested soils over 2 weeks. For each fertilizer tested, values with different letters differ significantly according with the Tukey's HSD test ($P \leq 0.05$)

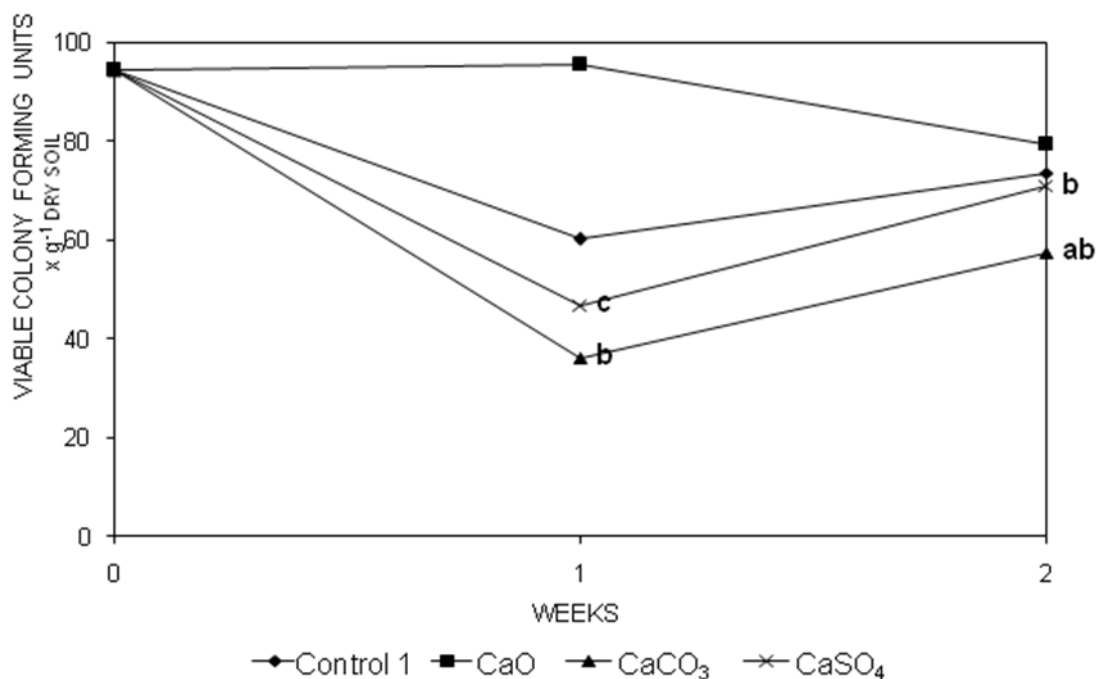
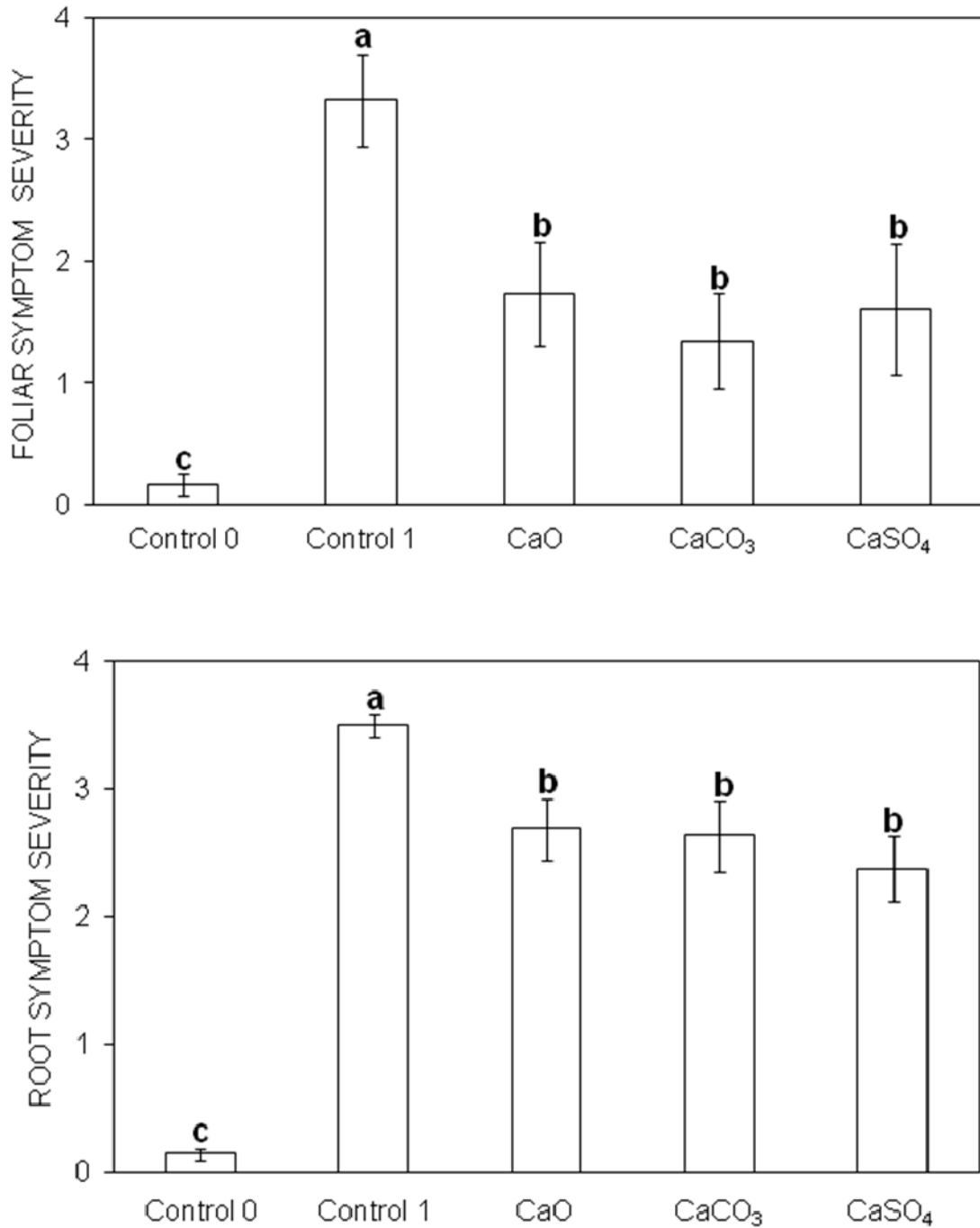


Fig. 5 Average values of foliar (a) and root (b) symptoms and standard errors of plants growing in control and amended soils. Values with different letters differ significantly according with the Fisher's LSD test ($P \leq 0.05$)



Discussion

Quercus ilex rangelands in southern Spain are mainly located in semi-arid areas over acid or neutral soils, poor in nutrients, especially P, N and Ca (Gómez- Gutierrez and Pérez-Fernández 1996; Olea et al. 2005). Calcium fertilizers are sometimes applied in these oak rangelands to enhance the botanical composition and production of grass. In regularly fertilized sites (generally with calcium oxide, carbonate or superphosphate), a low incidence and severity of *Q. ilex* root disease caused by *P. cinnamomi* in comparison with non-fertilized sites has been reported (Carbonero et al. 2004). For some soilborne pathogens, chemical soil factors appear to be important for suppressiveness, and elevated Ca^{2+} levels have been associated with soils suppressive to several oomycete pathogens (von Broembsen and Deacon 1997; Campanella et al. 2002; Heyman et al. 2007) and particularly to *P. cinnamomi* (Broadbent and Baker 1974). Some studies have reported the effect of calcium chemicals on the inhibition of the mycelial growth of several *Phytophthora* spp. Calcium oxide, propionate and carbonate are able to decrease the mycelia growth of *Phytophthora nicotianae* (Campanella et al. 2002), calcium chloride inhibits the mycelia growth of *Phytophthora sojae* and also infection rates on soybean roots (Sugimoto et al. 2005). However, our results suggest that the high ability of CaO to inhibit *P. cinnamomi* mycelial growth is probably due to the marked increase of pH rather than to the direct effect of the Ca^{2+} fertilizer itself. These results agree with studies carried out by Halsall and Forrester (1977), Duvenhage and Kotzé (1991) and Duvenhage et al. (1992).

However, the ability of *P. cinnamomi* to infect *Q. ilex* roots does not depend on its saprophytic growth, but on the ability of soilborne chlamydospores to germinate and produce infective zoospores through sporangial production (Erwin and Ribeiro 1996). In this way, we demonstrated the ability of CaO and CaCO_3 to inhibit sporangial production (near 100%) of both *P. cinnamomi* isolates tested and consequently, to prevent zoospore release. In addition, when sporangia were produced in the presence of CaO or CaCl_2 , these fertilizers also had a direct negative effect on zoospore release. The ability of CaO to decrease zoospore production of *P. nicotianae* has been previously observed by Campanella et al. (2002). von Broembsen and Deacon (1997) reported that CaCl_2 significantly decreases the release of *Phytophthora parasitica* zoospores. For *P. sojae*, low-concentrations of CaCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ in the growth medium induce

zoospore release, while high concentrations of both chemicals produce a significant inhibition (Sugimoto et al. 2005). In other studies on *Aphanomyces*, the application of CaCl_2 or $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ to the culture medium decreases zoospore production, although these produced an increase in mycelial growth (Heyman et al. 2007). However, in our study, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stimulated *P. cinnamomi* sporangial production of one of the isolates tested, but no effect was recorded on mycelial growth. Von Broembsen and Deacon (1997) reported that $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ induced sporangial production in *P. parasitica*, but significantly reduced zoospore mobility, leading to their rapid encystment after their release from sporangia. This effect has been also reported for *P. cinnamomi*. Byrt et al. (1982) demonstrated that Ca^{2+} cation induced *P. cinnamomi* zoospores to encyst and subsequently germinate. For this reason, zoospores are deactivated as infective spores. This point has not been studied in the current study, although it will be taken into account in the future.

References about the effect of Ca^{2+} chemicals on chlamydospore production have not been found in the literature. Our results showed that in vitro CaO is highly effective in inhibiting (100%) chlamydospore production in both *P. cinnamomi* isolates tested, but CaCO_3 was also efficient and inhibited chlamydospore production by 100% for one *P. cinnamomi* isolate and more than 50% for the second isolate tested.

Some authors reported the lack of correspondence between results obtained in vitro and those obtained in vivo (Campanella et al. 2002). However, our trials conducted with Holm oak seedlings planted in soils artificially infested with chlamydospores of *P. cinnamomi* and treated with Ca^{2+} fertilizers, demonstrated the ability of CaO, CaCO_3 and CaSO_4 to significantly reduce foliar and root symptoms, even when only CaCO_3 and CaSO_4 can reduce the viability of chlamydospores in the soil. The reduction observed on the capacity of *P. cinnamomi* to infect oak roots in Ca^{2+} amended soils may possibly be due mainly to the inhibition of sporangial production, leading to a lower number of infective zoospores in the soil. In addition, CaO and CaCO_3 also inhibit the production of new chlamydospores.

Altogether, the results obtained strongly suggest that limestone amendments may represent an effective tool for integrated control of oak root disease in rangelands, through the enhancement of the suppress amendments can prevent or limit new infections of well established mature trees, or they can prevent seedling infections if

applied in the planting holes in the reforestation of rangelands. Further research is needed to confirm the ability of these amendments to enhance soil suppressiveness by long-term field trials in mature oak rangelands.

Acknowledgements We acknowledge Spanish Ministry of Science (AGL2009-00530) and Andalusian Agricultural Council (Junta de Andalucía, Spain) for financial support.

References

- Brasier, C. M. (1996). *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annals of Forest Science*, 53, 347–358.
- Broadbent, P., & Baker, K. F. (1974). Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. *Australasian Journal of Agricultural Research*, 25, 121–137.
- Byrt, P. N., Irving, H. R., & Grant, B. R. (1982). The effect of cations on zoospores of the fungus *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of General Microbiology*, 128, 1189–1198.
- Caetano, P.C.L., Ávila, A., Sánchez, M.E., Trapero, A. & Coelho, A.C. (2009). *Phytophthora cinnamomi* populations on *Quercus* forests from Spain and Portugal. pp. 261–269. In: *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*. (USDA Forest Service. General Technical Report PSW-GTR-221, Albany, CA, USA)
- Campanella, V., Ippolito, A., & Nigro, F. (2002). Activity of calcium salts in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. *Crop Protection*, 21, 751–756.
- Carbonero, M. D., Blázquez, A., & Fernández, P. (2004). Producción de fruto y grado de defoliación como indicadores de vigor en *Quercus ilex* y *Quercus suber*. Influencia de diferentes condiciones edáficas en su evolución. In B. García, A. García, B. Vázquez, & I. Zabalgoeazcoa (Eds.), *Pastos y ganadería extensiva* (pp. 715–720). Salamanca, Spain: CSIC.

- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1995). *Basic plant pathology methods*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Duvenhage, J. A., & Kotzé, J.M. (1991). The influence of calcium on saprophytic growth and pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* and on resistance of avocado to root rot. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 14, 13–14.
- Duvenhage, J. A., Kotzé, J. M., & Maas, E. M. C. (1992). The influence of nitrogen and calcium on mycelial growth and disease severity of *Phytophthora cinnamomi* and the effect of calcium on resistance of avocado to root rot. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 15, 12–14.
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- Fernández-Rebollo, P., & Carbonero, M. D. (2008). La dehesa como hábitat natural para el Cerdo Ibérico. pp. 103–133. In: *El Cerdo Ibérico. Una revisión transversal*. (J. Forero, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía-Fundación Caja Rural del Sur, Sevilla, Spain).
- Gómez-Gutierrez, J. M., & Pérez-Fernández, M. (1996). The dehesas, silvopastoral systems in semiarid Mediterranean regions with poor soils, seasonal climate and extensive utilisation. pp. 55–70 In: *Western European silvopastoral systems*. (INRA Editions, Paris)
- Halsall, D. M., & Forrester, R. I. (1977). Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora zoospores*. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium and iron ions. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 994–1001.
- Heyman, F., Lindahl, B., Persson, L., Wikström, M., & Stenlid, J. (2007). Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2222–2229.
- Höper, H., & Alabouvette, C. (1996). Importance of physical and chemical soil properties in the suppressiveness of soils to plant diseases. *European Journal of Soil Biology*, 32, 41–58.
- Hornby, D. (1983). Suppressiveness of soils. *Annual Review of Phytopathology*, 21, 41–58.

- Lowe, S. J., Browne, M., & Boudjelas, S. (2000). *100 of the world's worst invasive alien species*. Auckland, New Zealand: ISSG Pub.
- Navarro, R. M., Ariza, D., Porras, C., Jorge, I., & Jorrín, J. (2009). Evaluación de la resistencia aparente de individuos de encina a *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 35, 89–97.
- Olea, L., López-Bellido, R. J., & Poblaciones, M. J. (2005). European types of silvopastoral systems in the Mediterranean area: Dehesa. pp. 30–35. In: *Silvopastoralism and sustainable land management* (CAB International, Trowbridge, UK)
- Ribeiro, O. K. (1978). *A Sourcebook of the Genus Phytophthora*. Vaduz, Germany: J. Cramer.
- Romero, M. A., Sánchez, J. E., Jiménez, J. J., Belbahri, L., Trapero, A., Lefort, F., et al. (2007). New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. *Journal of Phytopathology*, 155, 289–295.
- Sánchez, M. E., Caetano, P., Ferraz, J., & Trapero, A. (2002). *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *Forest Pathology*, 32, 5–18.
- Sánchez, M. E., Andicoberry, S., & Trapero, A. (2005). Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *Forest Pathology*, 35, 115–125.
- Sánchez, M. E., Caetano, P., Romero, M. A., Navarro, R. M. & Trapero, A. (2006). *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. pp. 149–154. In: *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. (Brasier, T. Jung & W. Oßwald. The Forest Authority, Farnham, UK)
- Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1985). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Bogotá: McGraw-Hill.
- Sugimoto, T., Aino, M., Sugimoto, M., & Watanabe, K. (2005). Reduction of *Phytophthora* stem rot disease on soybeans by the application of CaCl₂ and Ca (NO₃)₂. *Journal of Phytopathology*, 153, 536–543.
- Tapias, R., Fernández, M., Moreira, A. C., Sánchez, M. E., & Cravador, A. (2006). Posibilidades de la variabilidad genética de encinas y alcornoces en la

conservación y recuperación de bosques amenazados por la "seca". *Boletín Informativo CIDEU*, 1, 45–51.

Trione, E. J. (1974). Sporulation and germination of *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology*, 64, 1531–1533.

von Broembsen, S. L., & Deacon, J. W. (1997). Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solution. *Phytopathology*, 87, 522–528.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 309–348.

2.2

Effect of potassium products in the inhibition of *Phytophthora cinnamomi* infections on *Quercus* roots

María Socorro Serrano, Pilar Fernández-Rebollo, María Dolores Carbonero, María Esperanza Sánchez

First and fourth authors: Agronomy Department, Agroforest Pathology, University of Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba, Spain.

Second and third author: Forestry Department, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

Corresponding author: M.E. Sánchez, e-mail: aglsahem@uco.es

Abstract

We studied the effect of different potassium products (KOH, KNO₃, KCl, KIO₃ and K₂SO₄) in the control of the root disease caused by *Phytophthora cinnamomi* in Holm oaks. Some of these products are usually applied to the soil to increase drought tolerance and also as fertilizers in oak-grassland ecosystems. Mycelial growth and sporangial production of *P. cinnamomi* were effectively inhibited by KOH and KIO₃, while chlamydospore and zoospore production were not affected by any potassium product. In experiments performed in artificially infested soil, the tested K⁺ products induced a decrease in chlamydospore viability greater than 50% compared to the non-amended soil. Moreover, Holm oaks growing in infested soil amended with KOH showed a significant reduction in the severity of foliar and root symptom in comparison with not amended soils. However KIO₃, even when it significantly reduced root symptoms, appeared to be toxic to Holm oaks, leading to crown death. These results suggest that the application of KOH to soils infested by *P. cinnamomi* can prevent or at least limit new infections of oak trees growing in rangelands affected by the root rot and should be an effective tool for the integrated control of the disease affecting Holm oaks.

Keywords: fertilization; Holm oak; oak decline; rangelands; root rot

Introduction

Potassium is an essential mineral nutrient involved in important functions in plants, especially in maintaining cell turgor and in reducing water loss by controlling the opening and closing of stomata (Lindhauer 1985; Arquero et al. 2006; Benloch et al. 2010). Consequently, plants with suitable potassium nutrition are less sensitive to water stress (Fernández-Escobar 2008). The application of potassium fertilizers is used to decrease the effect of drought in potato crops (Khosravifar et al. 2008), sunflower plants (Lindhauer 1985), faba beans (Wahab and Abdalla 1995) and olive orchards (Arquero et al. 2006; Fernández-Escobar 2008; Fernández-Escobar et al. 2009). Furthermore, this element stimulates root growth (Prabhu et al. 2007; Farooq et al. 2009).

Oak-rangeland ecosystems in southern Spain are characterized by a relatively cold and rainy autumn-winter, but very long and dry summers (Bermejo 1994). For this reason, Holm oaks (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) normally suffer 3-4 months of summer drought

with high temperatures and low levels of available water in the soil. Additionally, spring and/or autumn droughts are becoming increasingly frequent in recent years, giving rise to water stress, defoliation and occasionally death of seedlings and even mature trees (Solla et al. 2009). In large areas affected by drought for several years, it was observed that Holm oaks growing in soil with medium-high potassium levels appeared to have less defoliation and a greater ability to recover after a water stress situation than oaks growing in soils poor in potassium (Carbonero et al. 2004). Red oaks (*Quercus rubra*) growing in soils with low levels of K^+ and Ca^{2+} also showed a worse adaptation to drought, higher defoliation and higher mortality than oaks growing in soils with satisfactory levels of these elements (Demchik and Sharpe 2000).

On the other hand, in Spanish oak agroforestry ecosystems, thousands of Holm oaks are dying every year (Romero et al. 2007a) mainly due to a root rot caused by the soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi*, but recurrent droughts are also involved in the decline and mortality of this tree species (Brasier 1996; Sánchez et al. 2006). Prabhu et al. (2007) summarized the effect of potassium in the control of soilborne fungal diseases of different tree crops. In some of them, potassium decreased the severity of symptoms in different pathosystems, such as avocado-*P. cinnamomi*, pineapple-*P. cinnamomi* or banana-*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. However, other studies showed how potassium increased the severity of fungal diseases, for example, in the root rot caused by *Phytophthora* spp. in *Pinus radiata* (Halsall and Forrester 1977). No information exists about the net effect of potassium in the Holm oak-*P. cinnamomi* pathosystem or the role of different potassium products in the life cycle of this soilborne pathogen. Recently, in oak-rangeland ecosystems, it has been demonstrated that some calcium fertilizers increased soil suppressiveness to *P. cinnamomi*, mainly by inhibiting sporangial and chlamydospore production (Serrano et al. 2012). Consequently, the aim of this research was to study the effect of different potassium products in the epidemiology of oak root rot caused by *P. cinnamomi* and their influence in the ability of the pathogen to infect Holm oak roots. These products might be also used to increase the tolerance of Holm oaks to droughts.

Material and Methods

Fungal material

Two *P. cinnamomi* (PE90 and PA25) isolates were used in all experiments. These were previously isolated from Holm and Cork oak (*Q. suber* L.) roots, respectively. Each isolate belonged to one of the two morphological and genetic groups described for *P. cinnamomi* isolated from *Quercus* spp. in the south of the Iberian Peninsula (Caetano et al. 2009).

K⁺ products

In the three *in vitro* experiments, the following K⁺ products (analytical grade) were tested: KOH (90%, Panreac), KNO₃ (99%, Panreac), KCl (99.5%, Carloerba), KIO₃ (99.4%, Panreac) and K₂SO₄ (100%, Panreac). In the soil experiments, only KOH and KIO₃ were used.

Effect on mycelial growth

For each K⁺ product, a stock solution was prepared and aliquots were added to molten (~ 45° C) Corn Meal Agar medium (CMA) to reach a final concentration of 1.25, 3.75, 7.50 or 15 mM of ion K⁺. When the amended media were still warm, the pH of each was measured (CRISON pHmeter, GLP21) (Table 1). Then, 20 ml of amended CMA was poured into Petri dishes (9 cm diameter). CMA medium free of K⁺ products was used as a control.

According to the methodology described in Serrano et al. (2012), agar plugs (6 mm diameter) of both *P. cinnamomi* isolates were placed in the center of Petri dishes containing amended or control CMA medium. All the plates, including controls, were incubated at 25° C in the dark. Daily, radial growth of the colonies was measured until control colonies covered the surface of the plates, in 4 days.

For those products that significantly changed the pH of the CMA medium, mycelial growth on neutralized amended medium was also measured. Media were neutralized by adding lactic acid until reaching a pH similar to the control (CMA, pH= 5.9). Four replicates (plates) per isolate, K⁺ product and concentration tested, plus the controls, were prepared.

ANOVA was performed with data of the mycelial radial growth (mm) after 3 days of incubation, and mean values were compared by Tukey's HSD test (Steel and Torrie

1985) for $P < 0.05$. Statistix software (Analytical Software, Tallahassee, Florida, USA) was used for all the statistical analyses.

Effect on sporangial and chlamyospore production

To induce sporangial production, a soil extract was prepared as described by Ribeiro (1978) and K^+ products were added separately to 1 L of soil extract. The concentration of potassium products tested for inhibition/stimulation of sporangial or chlamyospore production was 1.25 mM K^+ , corresponding to the usual levels of K^+ added in rangeland soils when fertilized (50-75 Kg K_2O ha⁻¹ (González 1984; Fernández-Rebollo and Carbonero 2008)). When the amended soil extracts were ready, the pH of each was measured (CRISON pHmeter, GLP21) (Table 2). Four plates (replicates) per product (control included) and isolate of *P. cinnamomi* (PE90 and PA25) were prepared. Agar plugs (6 mm diameter) of each isolate growing on PA medium (Pea-Agar 2%, Trione 1974) for 4 days at 22° C in the dark, were placed in the center of empty Petri dishes and amended or control soil extracts were poured into the plates without covering the plug (7 ml per dish). All the plates were then incubated at 22° C in the light for 50 and 55h for PE90 and PA25, respectively, when sporangial production reached the maximum in the control soil extract (Serrano et al. 2012). At this time, sporangial and chlamyospore production were evaluated by direct observation under an inverted microscope (Nikon, magnification $\times 400$) and mature structures counted.

ANOVA was performed with data converted to (number of sporangia or chlamyospores)^{1/2} (Steel and Torrie 1985) and mean values were compared by Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1985) for $P < 0.05$.

Effect on sporangial germination (zoospore production)

The same products and concentrations as used in the previous experiment were tested. Indirect germination of *P. cinnamomi* sporangia was evaluated for zoospore production. For induction of sporangial production, the same methodology previously described was used (Serrano et al. 2012). Mycelium was produced by incubation in pea broth (Trione 1974) for 3 days at 22° C in the dark and then the mycelium was transferred to soil extract and incubated at 22° C under fluorescent light for 2 additional days. The new mycelium produced, with mature sporangia, was transferred to Petri dishes (6 cm

diameter) containing the same K^+ amended and control soil extracts described above. Plates were submitted to a 30 min cold-shock and returned to 22° C for 2 h to stimulate zoospore release (Ribeiro 1978). Four plates (replicates) per K^+ product and isolate, plus the controls, were prepared. The average number of zoospores $\times ml^{-1}$ produced was assessed by counting six aliquots (1 ml) of homogenized soil extract per plate in a Neubauer chamber (0.1 μl).

ANOVA was performed with data converted to $(\text{number of zoospores} \times ml^{-1})^{1/2}$ (Steel and Torrie 1985) and mean values were compared by Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1985) for $P < 0.05$.

Soil experiments

Based on the results of *in vitro* experiments, the most effective products that inhibited *P. cinnamomi* sporangial production (KOH and KIO_3) were tested in soil experiments. The substrate (sand:peat 1:6 vol) was infested with an aqueous suspension of chlamydospores of the two isolates of *P. cinnamomi* (650 chlamydospores of both isolates $\times g^{-1}$ dry soil) according to the methodology described in Romero et al. (2007b). Ten days after soil infestation, each product was separately added to the soil at 1.25 mM of K^+ and homogenized. Soil infested and untreated (Control 1) and uninfested and untreated (Control 0) were also prepared as controls. Three plastic containers (35 \times 33 \times 14 cm with hermetic lid) (replicates) containing 10 l of soil were prepared per K^+ treatment and controls. All the containers were watered until field capacity and incubated in a growth-chamber for 2 weeks at 18-24° C in the dark. Weekly, soil samples (50 ml vol. each) were taken and processed in order to quantify the density of viable chlamydospores from the different soils. Ten g of homogenized dry soil were suspended in 100 ml of sterilized water-agar (Roko) (0.2%) and shaken. One ml aliquots were taken from the soil-water-agar mix, and plated onto Petri dishes containing 20 ml of NARPH medium (Romero et al. 2007b), using a sterile bent glass rod to distribute the material over the agar surface. For each soil sample, a total of 20 Petri dishes were prepared. Dishes were incubated at 24° C in the dark for 24 h, and then the agar surface of each plate was washed with sterile water to remove the soil-water-agar mix. Dishes were re-incubated at 24° C in the dark for another 48 h and the growing colonies were morphologically identified and counted. Chlamydospore

viability was expressed as $\text{cfu} \times \text{g}^{-1}$ (colony forming units per g of dry soil). ANOVA was performed with data converted to $[(\text{cfug}^{-1}) + 0.5]^{1/2}$ (Steel and Torrie 1985) and mean values were compared by Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1985) for $P < 0.05$.

Plant experiments

Two weeks after the addition of K^+ products, Holm oak seedlings (18 months-old) were planted in the amended or control soils. Ten pots (replicates) per product, each one with 3 l of soil and one plant were prepared. All the pots were placed in plastic trays without drainage ($57 \times 41 \times 9$ cm) separating treatments in different trays to avoid cross contamination. Pots in trays were incubated in an air-conditioned greenhouse ($25 \pm 2^\circ \text{C}$ for 12h and $10 \pm 2^\circ \text{C}$ for 12h). One week after transplanting, all trays were partially filled with tap water, and the soil flooded for 2 days each week for 8 weeks (Sánchez et al. 2005). At the end of the experiment, severity of foliar and root symptoms were assessed for each plant on a 0-4 scale, according to the percentage of yellowed or wilted foliage and root necrosis (0= 0% necrotic tissue, 1= 10-33%, 2= 34-66%, 3= more than 67%, 4= dead tissue) (Sánchez et al. 2002; 2005; Romero et al. 2007b). ANOVA was performed for foliar and root symptoms and mean values compared by the Tukey's HSD test (Steel and Torrie 1985) at $P < 0.05$. Additionally, segments from inoculated and control roots were plated on NARPH culture medium (Romero et al. 2007b) for re-isolation of the pathogen.

Results

Effect on mycelial growth

Colonies growing on control plates covered the entire agar surface in 4 days. pH of the media amended with the different K^+ product tested varied between pH 5.6 and 11.8 depending on the K^+ product and its concentration (Table 1). KOH produced a marked pH increase in comparison with non-amended CMA medium (pH = 5.9). After neutralization with lactic acid, the pH of the media amended with different concentrations of KOH was similar to the control (CMA). Average values of radial mycelial growth measured after 3 days are given in Table 3. ANOVA showed significant differences in radial growth depending on the *P. cinnamomi* isolate, K^+ product and its concentration. Mycelial growth of PE90 isolate was significantly

inhibited by KIO_3 at all concentrations tested, and also by KOH and KCl at 3.75, 7.50 and 15.0 mM, and neutralized KOH at 7.50 and 15.0 mM. However, only the higher concentrations of KOH (7.50 and 15.0 mM) were effective in inhibiting the mycelial growth by at least 50%. Similar results were obtained for isolate PA25. Its mycelial growth was significantly inhibited by KOH and KIO_3 at all concentrations tested, and also by KNO_3 at 7.50 mM, KCl at 7.50 and 15.0 mM and neutralized KOH at 15.0 mM. Again, only KOH at the highest concentrations tested inhibited the mycelial growth of isolate PA25 by at least 50%.

Table 1 pH of the CMA media amended with the different K^+ products and concentrations tested

Concentration (mM K^+)	KOH	KNO_3	KCl	KIO_3	K_2SO_4
1.25	7.5	5.9	5.8	5.8	5.9
3.75	10.2	5.8	5.8	5.8	5.9
7.50	11.2	5.8	5.8	5.7	5.9
15.00	11.8	5.7	5.6	5.6	6.1

Effect on sporangial and chlamyospore production

pH of the soil extracts amended with the different potassium products tested varied between pH 6.3 and 10.2 depending on the K^+ product (Table 2). ANOVA showed significant differences in sporangial production depending on the isolate of *P. cinnamomi* and on the K^+ product tested. For the PE90 isolate, KOH and KIO_3 were effective in inhibiting sporangial production by at least 50% (90 and 69.5% respectively), but only KOH significantly inhibited sporangial production when compared to the control, according to the Tukey's test (Figure 1). For isolate PA25, all products significantly inhibited sporangial production according to the Tukey test. KOH, KIO_3 and K_2SO_4 inhibited production of sporangia by 70, 83 and 51%, respectively (Figure 1). It is also notable that KNO_3 enhanced sporangial production by about 50% for both *P. cinnamomi* isolates, even when this enhancement was not significant.

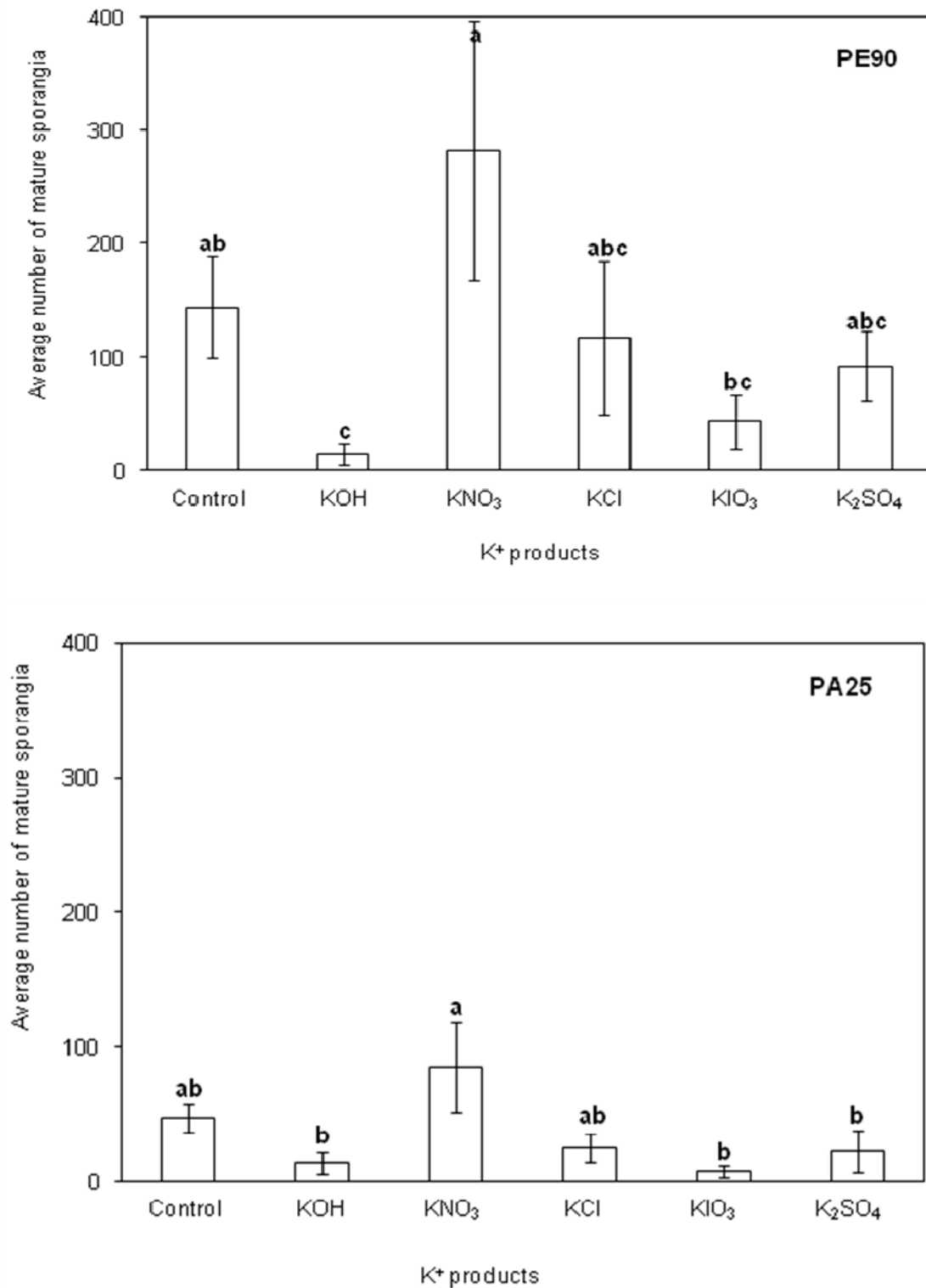
Table 3 Average radial growth (mm) of *P. cinnamomi* isolates measured after 3 days of incubation in CMA medium amended with different concentrations of K⁺ products. For each row, values with different letters differ significantly according with the Tukey's test at P< 0.05

<i>P. cinnamomi</i> isolate	K ⁺ product	Concentration (mM K ⁺)				
		0.0	1.25	3.75	7.50	15.0
PE 90	KOH	28.8 a	27.2 a	20.7 b	8.6 c	2.9 d
	KOH _{neutralized}	26.0 ab	27.5 a	26.1 ab	25.2 b	14.9 c
	KNO ₃	28.5	27.4	25.2	26.5	26.7
	KCl	29.2 ab	31.2 a	26.7 bc	26.3 bc	24.3 c
	KIO ₃	28.5 a	24.7 b	22.9 bc	22.2 bc	20.5 c
	K ₂ SO ₄	28.7	30.1	29.1	29.2	29.4
PA 25	KOH	27.2 a	22.8 b	13.5 c	7.0 d	2.4 e
	KOH _{neutralized}	24.3 a	24.8 a	24.5 a	23.8 a	13.7 b
	KNO ₃	27.2 a	25.7 ab	23.5 ab	23.3 b	24.9 ab
	KCl	27.8 ab	29.2 a	25.0 bc	24.3 c	23.8 c
	KIO ₃	26.7 a	22.2 b	21.1 bc	20.3 c	18.2 d
	K ₂ SO ₄	27.7	26.9	27.7	27.0	26.8

Table 2 pH of the soil extracts amended with the different K⁺ products tested in a concentration of 1.25 mM

Control	KOH	KNO ₃	KCl	KIO ₃	K ₂ SO ₄
6.3	10.2	8.2	6.8	6.6	6.7

Fig. 1 Average values and standard errors of sporangial production of *Phytophthora cinnamomi* isolates induced by the K⁺ products tested. Bars with different letters differ significantly according to the Tukey's test (P < 0.05).



With respect to chlamydospore production, ANOVA showed significant differences between the two *P. cinnamomi* isolates, but for each isolate, K⁺ products did not significantly inhibit chlamydospore production in comparison with the control (Figure 2).

Effect on sporangial germination (zoospore production)

ANOVA did not show differences in zoospore production between the *P. cinnamomi* isolate or the K⁺ product tested. The results obtained for both isolates are shown in Figure 3. Even though every product reduced zoospore release, this inhibition was not significant according to the Tukey's test.

Soil and plant experiments

Two weeks after addition of K⁺ products, the average number of viable colony forming units was inhibited by about 50% in amended soils in comparison to the control soil, but this inhibition was not significantly different among treated soils and the control according to the Tukey's test (Figure 4). Furthermore, the density of viable chlamydospores in each soil did not significantly change for each treatment during the experiment.

Nine weeks after Holm oaks were planted in control or amended soils, the plants growing in infested and untreated soil (Control 1) showed a high level of foliar symptoms (wilting and defoliation) (Figure 5A) and root symptoms (Figure 5B): necrosis and death of feeder roots. Plants growing in uninfested soil (Control 0) showed a very low degree of aerial and radical symptoms, significantly lower than plants in Control 1 (Figure 5A, 5B). The severity of foliar and radical symptoms of plants growing in infested substrates in KOH treated soil were significantly lower than Control 1 plants, but only root symptoms of plants growing in infested soil amended with KIO₃ were significantly lower than Control 1 plants (Figure 5B). These plants exhibited a high level of foliar symptoms atypical of root rot caused by *P. cinnamomi*. Leaves appeared discolored and exhibited only vein necrosis and no defoliation.

Phytophthora cinnamomi was always reisolated from plants growing in infested soil, amended or not amended with potassium products, but never from plants growing in uninfested soil (Control 0)

Fig. 2 Average values and standard errors of chlamyospore production of *Phytophthora cinnamomi* isolates induced by the K⁺ products tested.

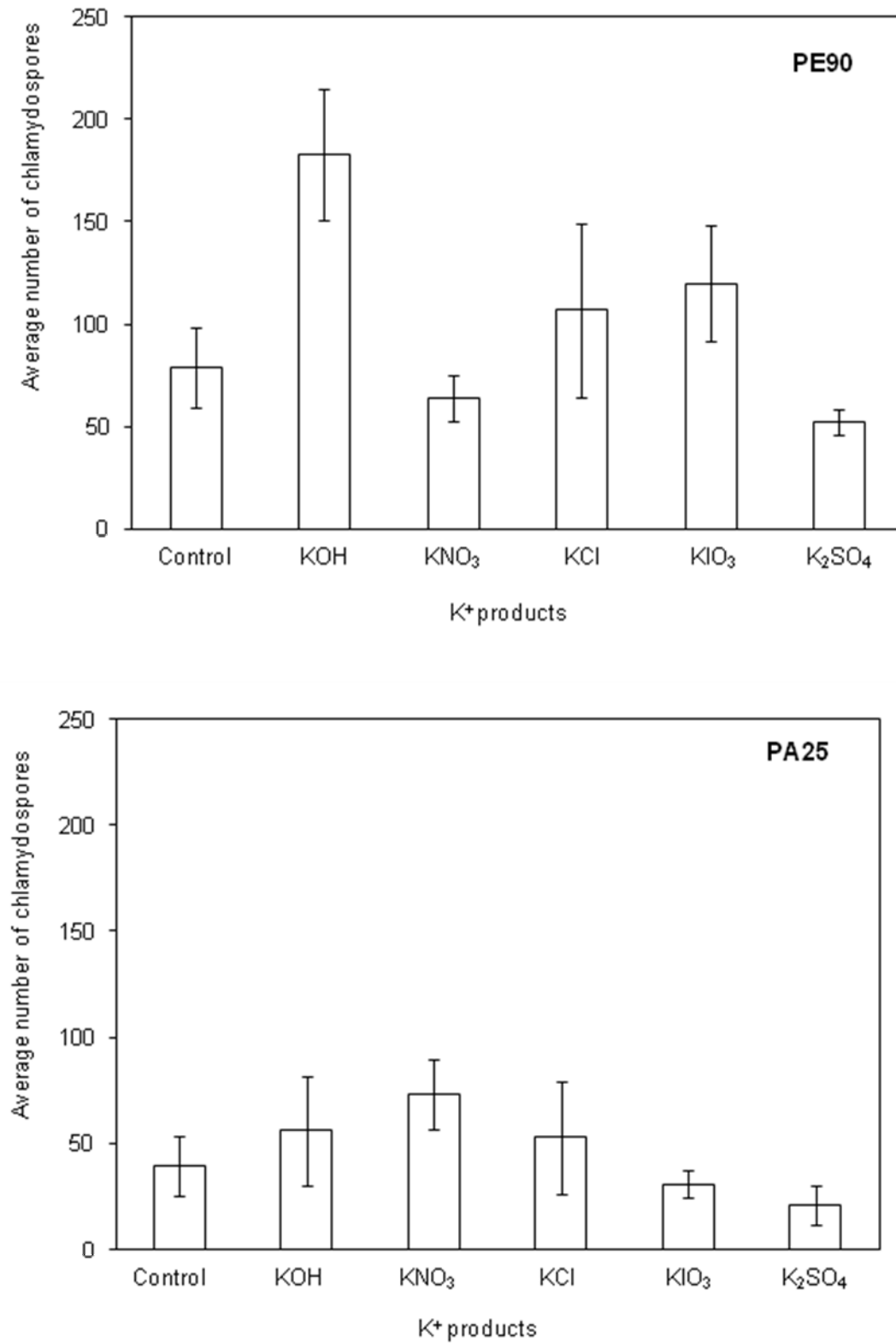


Fig. 3 Average values and standard errors of indirect sporangial germination (zoospore production) of *Phytophthora cinnamomi* isolates induced by the K^+ products tested.

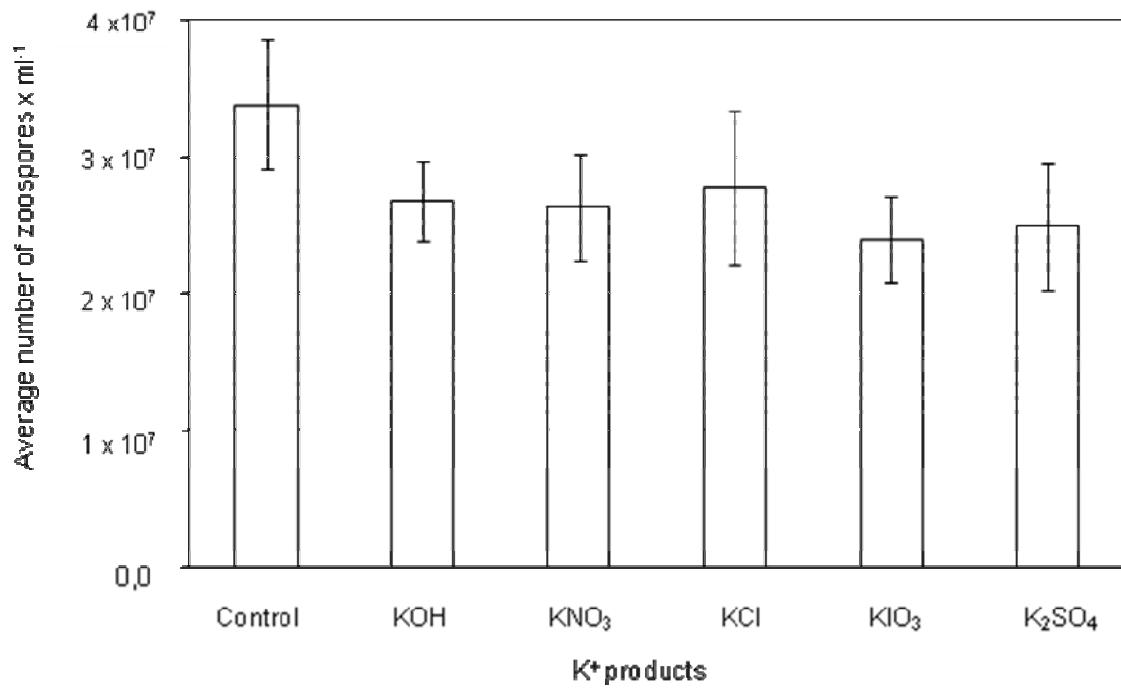


Fig. 4 Average values of viable colony forming units of *Phytophthora cinnamomi* in the infested soils over 2 weeks.

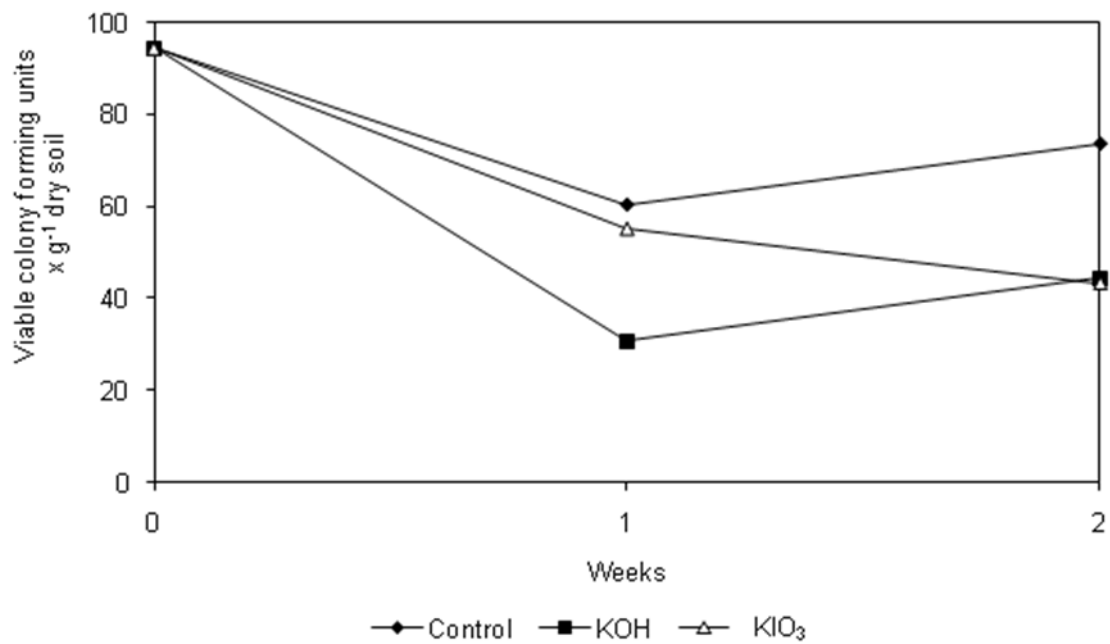
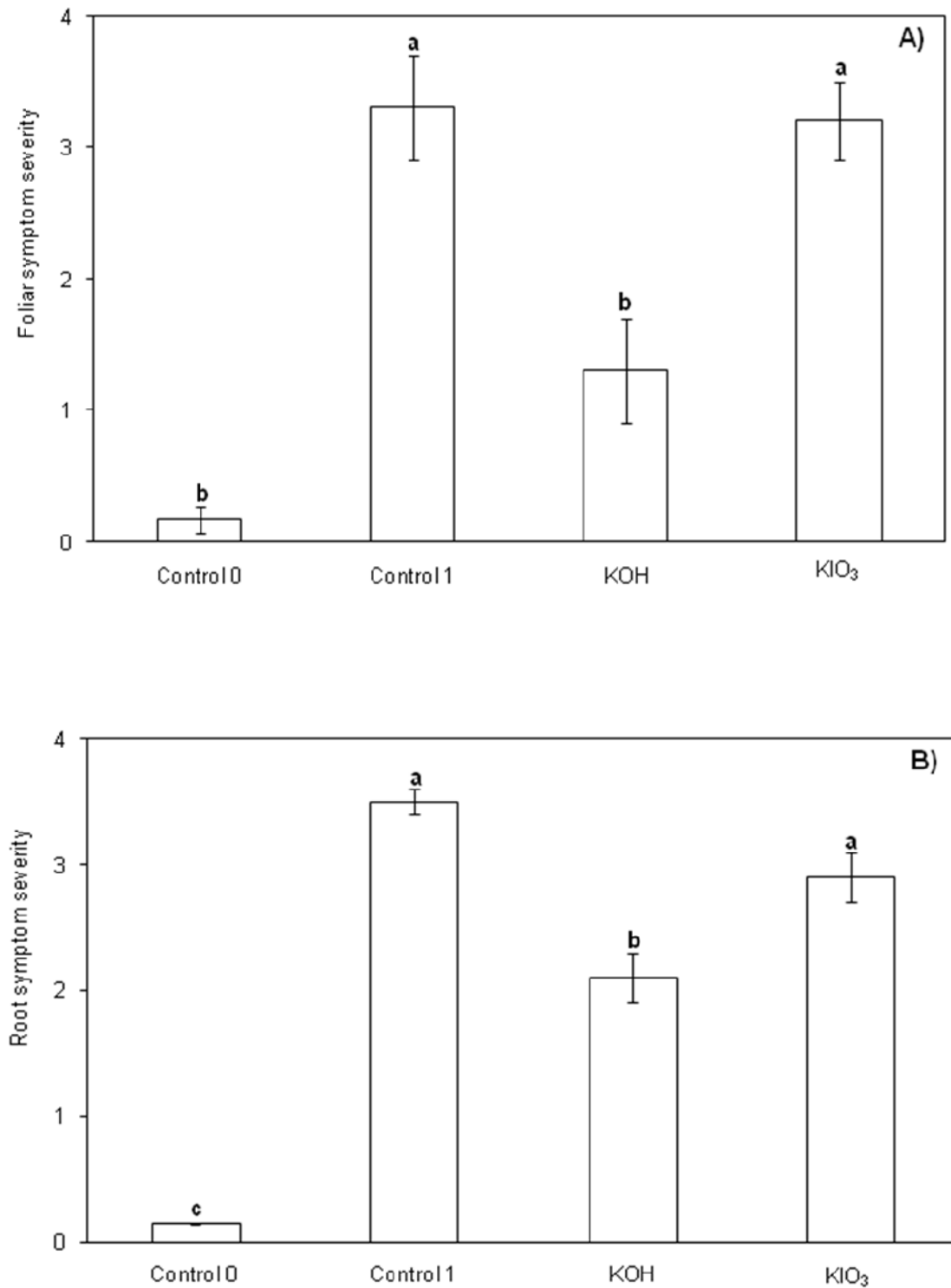


Fig. 5 Average values of foliar (A) and root (B) symptoms and standard errors of plants growing in control and amended soils. Values with different letters differ significantly according to the Tukey's test ($P < 0.05$).



Discussion

Oak rangelands in southern Spain are mainly located in semi-arid areas over acid or neutral soils that are poor in nutrients (Gómez-Gutierrez and Pérez-Fernández 1996, Olea et al. 2005). Potassium fertilizers are sometimes applied in these rangelands to enhance the botanical composition and production of herbaceous vegetation. In regularly fertilized sites (usually with KCl or K₂SO₄, (Labrador et al. 2004; Fernández-Rebollo and Carbonero 2008)), a better efficiency in the use of water by Holm oak in comparison with non fertilized sites has been reported (Carbonero et al. 2004; Fernández-Rebollo and Carbonero 2008). On the other hand, it has been reported in Spanish oak rangelands that Ca²⁺ fertilizers are able to create soils suppressive to *P. cinnamomi*, mainly by inhibiting sporangial production (Serrano et al. 2012). In the present study, the ability of K⁺ products to interfere with crucial stages in the life cycle of the pathogen that limits its ability to infect oak roots, have been tested.

The only effective product that inhibited mycelial growth was KOH, which also caused a large increase in pH with respect to the control. When the agar media were neutralized, the ability of KOH to reduce mycelial growth decreased, but it was still significant at the highest concentrations tested. This inhibitory effect of the cation, even when markedly dependent on an increase in pH, has also been reported for CaO in the inhibition of *P. cinnamomi* mycelial growth (Serrano et al. 2012). However for other pathogens, like *Fusarium solani*, colony growth increased with increasing pH by the addition of potassium nitrate, phosphate or sulfate (Sanogo and Yang 2001). Some authors reported that potassium nitrate was able to inhibit mycelial growth, zoospore release and infection of soybean by *Phytophthora sojae* (Sugimoto et al. 2007). However, our results showed that KNO₃ did not inhibit *P. cinnamomi* mycelial growth and chlamydospore or zoospore production, but even enhanced the production of sporangia. This stimulation of pathogen infectivity mediated by nitrates was previously reported for *F. solani* (Sanogo and Yang 2001), *P. cinnamomi* (Serrano et al. 2012), and *Phytophthora parasitica* (von Broewmbesen and Deacon 1997).

Sporangial production of *P. cinnamomi* was inhibited by KOH and KIO₃, by more than 50%, even when this inhibition was only significant for KOH (90% of inhibition for isolate PE90). However these products did not affect sporangial germination (zoospore

production). KOH lead to a marked increase of pH in the soil extract (10.2) in comparison with the control (6.3), but KIO₃ inhibited sporangial production by 70-80%, depending on the isolate, and did not increase the pH. This fact suggests that the effectiveness of the product is not only due to the pH of the medium, but the product itself must also be involved. Similar results were obtained for Ca²⁺ fertilizers in the inhibition of *P. cinnamomi* sporangial production (Serrano et al. 2012), that are more dependent on the product than on the pH.

Potassium products were not effective in decreasing chlamydospore production and sporangial germination, although KOH and KIO₃ were able to reduce the density of viable chlamydospores in the soil about 50%. Holm oaks growing in soil amended with KOH or KIO₃ showed a significantly lower severity of root symptoms than the control, and KOH also significantly reduced foliar symptoms. The decrease of root rot symptoms caused by potassium products was previously reported in the avocado-*P. cinnamomi* pathosystem (Prabhu et al. 2007). However, in other pathosystems, such as *F. solani*-soybean (Sanogo and Yang 2001), *P. sojae*-soybean (Sujimoto et al. 2007) or *P. parasitica*-citrus (Prabhu et al. 2007), potassium fertilizers often increased the disease severity.

Some authors reported the lack of correspondence between results obtained *in vitro* and those obtained *in vivo* (Campanella et al. 2002). However, our trials conducted with Holm oak seedlings planted in soils artificially infested with chlamydospores of *P. cinnamomi* and treated with K⁺ products, demonstrated the ability of KOH and KIO₃ to significantly reduce root symptoms, even when these products did not significantly affect the viability of chlamydospores in the soil. The reduction observed in the ability of *P. cinnamomi* to infect oak roots in the K⁺ amended soils may possibly be due to the inhibition of sporangial production, the only crucial point in the life cycle of the pathogen clearly interfered by KOH and KIO₃. This significant reduction in the number of sporangia produced by the pathogen could lead to a lower number of infective zoospores in the soil available to infect oak roots.

Additionally, it is remarkable the lack of correspondence between the significantly better status of roots of Holm oaks growing in infested soil amended with KIO₃ compared to the roots of plants growing in unamended infested soil and their poor

crown condition. This fact seems to be a result of some kind of phytotoxicity of iodate to Holm oak. In fact, foliar symptoms recorded (discoloration, vein necrosis and lack of defoliation) were clearly different than typical crown symptoms of root rot: wilting and defoliation.

In conclusion, the results obtained suggest that potassium fertilizers do not have a significant effect on the epidemiology of the root disease caused by *P. cinnamomi* on oaks. However, it has been demonstrated that suitable potassium nutrition allows for a lower incidence of drought stress in *Quercus* (Demchik and Sharpe 2000; Fernández et al. 2005; Fernández-Rebollo and Carbonero 2008). Since potassium fertilizers allow for a better defense of trees against drought by improving their general health status and they do not seem to enhance pathogen incidence or disease severity, potassium fertilization can be recommended for rangelands affected by the pathogen. Additionally, the application of KOH to soils infested by *P. cinnamomi* can prevent or limit new infections in reforestation sites or in mature trees in rangelands affected by the root rot. Consequently, the soil application of KOH should be taken into account as an effective tool for the integrated control of the root disease of Holm oaks. Further research is needed to confirm the ability of this product to enhance soil suppressiveness to *P. cinnamomi* by long-term field trials in mature oak rangelands.

Acknowledgements

We acknowledge the Spanish Ministry of Science (AGL2009-00530) and the Andalusian Agricultural Council (Junta de Andalucía, Spain) for financial support. Thanks to Dr WJ Kaiser for reviewing the English language quality and content of the manuscript.

References

Arquero O, Barranco D, Benlloch M. (2006) Potassium starvation increases stomatal conductance in olive trees. Hortscience 41:433-436.

- Bermejo I. (1994) Conservación de sistemas adehesados. *Agricultura* 738:40-44.
- Brasier CM. (1996) *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann Forest Sci* 53:347-35.
- Benlloch M, Romera J, Cristescu S, Harren F, Fournier JM, Benlloch M. (2010) K⁺ starvation inhibits water-stress-induced stomatal closure via ethylene synthesis in sunflower plants. *J Exp Bot* 61:1139-1145.
- Caetano P, Ávila A, Sánchez ME, Trapero A, Coelho AC. (2009). *Phytophthora cinnamomi* populations on *Quercus* forests from Spain and Portugal. In: *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*. General Technical Report PSW-GTR-221. USDA-Forest Service, pp 261-269.
- Campanella V, Ippolito A, Nigro, F. (2002) Activity of calcium salts in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. *Crop Prot* 21:751-756.
- Carbonero MD, Blázquez A, Fernández- Rebollo P. (2004) Producción de fruto y grado de defoliación como indicadores de vigor en *Quercus ilex* y *Quercus suber*. Influencia de diferentes condiciones edáficas en su evolución. In: García Criado A, Vázquez de Aldana B, Zabalgoceazcoa I (eds) *Pastos y ganadería extensiva*. Salamanca, Spain, CSI, pp 715-720.
- Demchik MC, Sharpe WE. (2000) The effect of soil nutrition, soil acidity and drought on northern red oak (*Quercus rubra* L.) growth and nutrition on Pennsylvania sites with high and low red oak mortality. *Forest Ecol Manag* 136:199-207.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185-212.
- Fernández-Escobar R. (2008) Fertilización. In: Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L (eds) *El cultivo del olivo*. Madrid, Spain, Mundi-Prensa, pp 287- 320.
- Fernández-Escobar R, Parras MA, Navarro C, Arquero O. (2009) Foliar diagnosis as a guide to olive fertilization. *Span J Agric Res* 7:212-223.

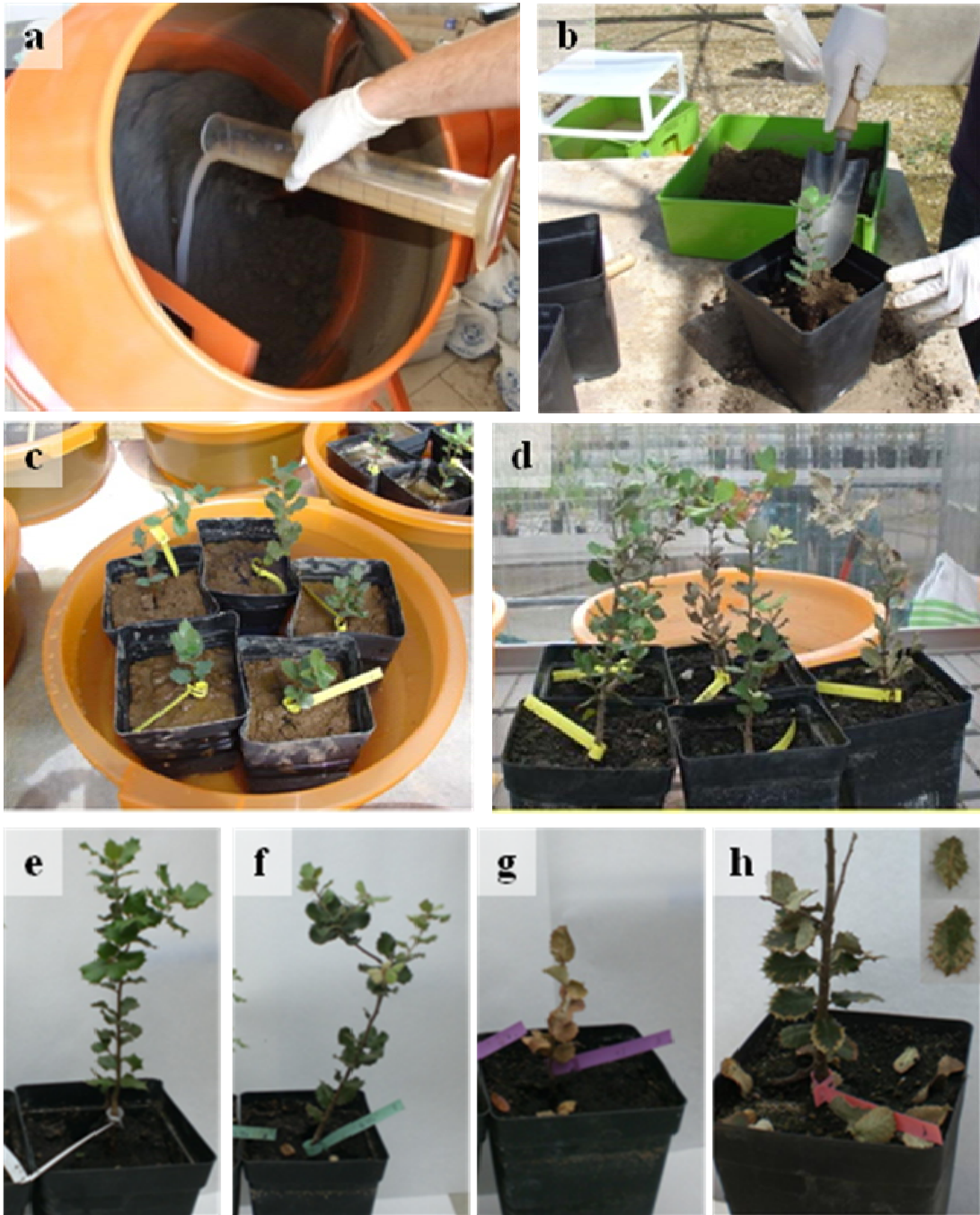
- Fernández-Rebollo P, Carbonero MD, Blázquez A, Navarro R. (2005) Evolución de la defoliación de la copa de encinas en dehesas andaluzas durante el período 2000-2004. In: Proc 4th Congreso Forestal Español, 26 al 30 de septiembre. Zaragoza, Spain, pp 374-381.
- Fernández-Rebollo P, Carbonero MD. (2008) La dehesa como hábitat natural para el Cerdo Ibérico. In: Forero J (ed) El cerdo ibérico. Una revisión transversal. Sevilla, Spain, Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía y Fundación Caja Rural del Sur, pp 103-134.
- Gómez-Gutiérrez JM, Pérez-Fernández M. (1996) The dehesas, silvopastoral systems in semiarid Mediterranean regions with poor soils, seasonal climate and extensive utilisation. In: Etienne M (ed) Western European silvopastoral systems. Paris, France, INRA Editions, pp 55-70.
- González A. (1984) Mejora de pastos en secanos semiáridos de suelos ácidos. Madrid, Spain, Servicio de Extensión Agraria Ministerio de Agricultura.
- Halsall DM, Forrester RI. 1977. Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium and iron ions. Can J Microbiol 23:994-1001.
- Khosravifar S, Yarnia M, Benam MBK, Moghbeli AHH. (2008) Effect of potassium on drought tolerance in potato cv. Agria. J Food Agric Environ 6:236-241.
- Labrador J, Porcuna JL, Reyes JL, Aguirre I. (2004) Conocimientos, técnicas y productos para la agricultura y la ganadería ecológica. Valencia, Spain, Labrador SEAE y MAPA.
- Lindhauer MG. (1985) Influence of K nutrition and drought on water relations and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.). J Plant Nutr Soil Sc 148:654-669.
- Olea L, López-Bellido RJ, Poblaciones MJ. (2005) Europe types of silvopastoral systems in the Mediterranean area: dehesa. In: Mosquera MR, Rigueiro A, McAdam J (eds) Silvopastoralism and Sustainable Land Management. Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI Publishing, pp 30-35.

- Prabhu AS, Fageria NK, Huber DM, Rodrigues FA. (2007) Potassium and Plant Disease. In: Mineral Nutrition and Plant Disease, St. Paul., MN, USA, APS Press, pp 57-78.
- Ribeiro OK. 1978. A sourcebook of the genus *Phytophthora*. Vaduz, Liechtenstein, J Cramer.
- Romero R, Navarro RM, García-Ferrer A. (2007a) Aplicación de ortofotos para la estimación de pérdida de individuos en dehesas de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) afectadas por procesos de decaimiento. Bol San Veg Plagas 33:121-137.
- Romero MA, Sánchez JE, Jiménez JJ, Belbahri L, Trapero A, Lefort F, Sánchez, ME. (2007b) New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. J Phytopathol 155:289-295.
- Sánchez ME, Caetano P, Ferraz J, Trapero A. (2002) *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. For Path 32:5-18.
- Sánchez ME, Andicoberry S, Trapero A. (2005) Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. For Path 35:115-125.
- Sánchez ME, Caetano P, Romero MA, Navarro RM, Trapero A. (2006) *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. In: Brasier C, Jung T, Oßwald W (eds) Progress in Research on *Phytophthora* Diseases of Forest Trees. Farnham, UK, Forest Research, pp 149-154.
- Sanogo S, Yang XB. (2001) Relation of sand content, pH, and potassium and phosphorus nutrition to the development of sudden death syndrome in soybean. Can J Plant Pathol 23:174-180.
- Serrano MS, De Vita P, Fernández-Rebollo P, Sánchez ME. (2012) Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Quercus ilex*. Eur J Plant Pathol 132:271-279.
- Solla A, García L, Pérez A, Cordero A, Cubera E, Moreno G. (2009) Evaluating potassium phosphonate injections for the control of *Quercus ilex* decline in SW

- Spain: implications of low soil contamination by *Phytophthora cinnamomi* and low soil water content on the effectiveness of treatments. *Phytoparasitica* 37:303-316.
- Steel RGD, Torrie JH. (1985) *Bioestadística: principios y procedimientos*. Bogotá, Colombia, Mcgraw-Hill.
- Sugimoto T, Watanabe K, Yoshida S, Aino M, Matsuyama M, Maekawa M, Irie K. (2007) The effects of inorganic elements on the reduction of *Phytophthora* stem rot disease of soybean, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. *J Phytopathol* 155:97-107.
- Trione EJ. (1974) Sporulation and germination of *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology* 64:1531-1533.
- von Broemsen SL, Deacon JW. (1997) Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solution. *Phytopathology* 87:522-528.
- Wahab AMA, Abdalla MH. (1995) The role of potassium fertilizer in nodulation and nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba* L.) plants under drought stress. *Biol Fert Soils* 20:147-150.

Figura 23. Efecto del Ca^{2+} y el K^+ en la capacidad infectiva de *Phytophthora cinnamomi*

a) Infestación del suelo con una suspensión de 650 clamidosporas de *P. cinnamomi* por gramo de suelo. **b)** Transplante de encinas al sustrato infestado con clamidosporas y tratado con 15 mM de CaO. **c)** Plantas de encina creciendo en el sustrato infestado y tratado con CaO sometidas a encharcamiento 2 días por semana. **d)** Plantas de encina creciendo en suelo infestado y tratado durante los 5 días por semana no sometidas a encharcamiento. **e)** Planta de encina creciendo en sustrato no infestado (*Control 0*) con ausencia de síntomas foliares de la podredumbre radical. **f)** Planta de encina creciendo en el sustrato infestado y tratado con CaO mostrando bajos niveles de severidad de síntomas foliares. **g)** Planta de encina creciendo en el sustrato infestado (*Control 1*) con alta severidad de síntomas foliares. **h)** Planta de encina creciendo en suelo tratado con KIO_3 e infestado con clamidosporas de *P. cinnamomi* mostrando síntomas foliares atípicos (fitotoxicidad).





CAPÍTULO 3

Influencia de la nutrición cálcica y potásica y del morfotipo de la encina en la tolerancia a la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi*

En este capítulo se recogen los resultados relativos al Objetivo 2 de esta Tesis Doctoral, en el cual se plantea la evaluación de la influencia de la nutrición cálcica y potásica de la encina en la tolerancia a la enfermedad causada por *P. cinnamomi*, así como la tolerancia a la podredumbre radical de los principales morfotipos de encina presentes en Andalucía

Los resultados obtenidos se han recogido en dos artículos:

Capítulo 3.1, artículo en proceso de revisión en *Agroforestry Systems* con el título

“Calcium mineral nutrition increases the tolerance of *Quercus ilex* to *Phytophthora* root disease affecting oak rangeland ecosystems in Spain”

Autores: **M.S. Serrano**, P. Fernández-Rebollo, P. De Vita, M.E. Sánchez

Capítulo 3.2, publicado *on line (early view)* en *Forest Pathology* 2012 (doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00758.x), con el título

“Susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* of the commonest morphotypes of Holm oak in southern Spain”

Autores: **M.S. Serrano**, P. De Vita, M.D. Carbonero, F. Fernández, P. Fernández-Rebollo and M.E. Sánchez

3.1

Calcium mineral nutrition increases the tolerance of *Quercus ilex* to *Phytophthora* root disease affecting oak rangeland ecosystems in Spain

María Socorro Serrano, Pilar Fernández-Rebollo, Paolo De Vita, María Esperanza Sánchez

First, Third and fourth authors: Agronomy Department, Agroforest Pathology, University of Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba, Spain.

Second author: Forestry Department, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

Corresponding author: M.E. Sánchez, e-mail: aglsahem@uco.es

Agroforestry Systems, 2011 (under review)

Abstract Root rot caused by the soil-borne pathogen *Phytophthora cinnamomi* is leading to significant oak tree mortality in rangeland ecosystems in south western Spain. Susceptibility to *P. cinnamomi* infections of *Q. ilex* seedlings with a standard nutrition, deficient in K^+ , and deficient in Ca^{2+} , was tested. Oaks deficient in K^+ showed high values in Ca^{2+} content and were tolerant to the disease. Nutritional deficiency in Ca^{2+} , however, did not lead to a higher K^+ level in plants and induced poorer root development. In addition, K^+ plant content does not appear to have any effect on pathogen tolerance. Based on these results, we conclude that satisfactory calcium nutrition may confer Holm oaks with a greater tolerance to root disease caused by *P. cinnamomi*. For this reason, limestone supplements are recommended as a measure against root rot caused by *P. cinnamomi* in rangelands in southern Spain, as a good option for control of oak root disease.

Keywords Decline; Holm oak; *P. cinnamomi*; potassium

Introduction

“Dehesa” is the most characteristic and representative agrosilvopastoral system of southern Spain (2.4 million hectares). When referring to pasture types, the Spanish Society for the Study of Grasslands classifies “dehesa” as an area randomly populated by trees with a well-developed herbaceous stratum in which shrubs have been mostly eliminated. Its origin is agriculture (arable land in long rotations) and livestock. Its major products are extensive or semi-extensive livestock, which often feed not only on pasture but also on leaves and fruits from trees (Ferrer et al. 2001).

Holm oak (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp) is the most common tree species growing in “dehesa” ecosystems and its presence is crucial under an ecological and economic point of view (Moreno et al. 2009). As well as increasing farm value, oaks encourage hunting, rural tourism and wood products, enhancing pasture and fruit production. These products have been widely recognized as having different influences on the local economy over time. The Holm oak has experienced a slow but intense selection process, directed by the sweetness and size of its fruit and the proportion of female flowers, explaining why “dehesa” distribution corresponds with the distribution area of sweet acorn-producing Holm oak types. Acorns have long been one of the most valuable products of this kind of woodland, both in terms of human and livestock usage,

and have become of great importance in the “dehesa” in recent years, largely due to the increasing demand for products from Iberian pigs.

Among diseases associated with the decline of *Quercus* in Spain, one of the most destructive is root rot caused by the soil-borne oomycete *Phytophthora cinnamomi* (Brasier et al. 1993; Brasier 1996, Gallego et al. 1999, Sánchez et al. 2002; 2006). *Phytophthora cinnamomi* has a large host range, mainly woody species. However, some herbaceous plants belonging to the genus *Lupinus* usually growing in “dehesa” ecosystems, are also host to *P. cinnamomi* (Erwin and Ribeiro, 1996; Grose and Hainsworth 1992; Serrano et al. 2010).

This oomycete causes great destruction of feeder roots, decreasing the tree's capacity to take up water and nutrients, causing crown symptoms similar to those of drought (Sánchez et al. 2002).

Several characteristics make *P. cinnamomi* difficult to control (Erwin and Ribeiro 1996): its large number of host species, its ability to survive in asymptomatic plants and to occupy the soil profile to high depths as well as its capacity to spread quickly in poorly drained or waterlogged soils (Erwin and Ribeiro 1996; Sánchez et al. 2002).

Different methods used to control *Phytophthora* diseases in agricultural systems unsuitable for agroforestry systems such as oak rangelands (“dehesa”) are: sanitation; establishment of quarantine; crop rotation; resistant tree varieties; drainage and chemical control (Ribeiro 1978). One of the possible control methods of *P. cinnamomi* root rot affecting Holm oaks growing in southern rangelands in Spain could be to develop some tolerance or resistance to *P. cinnamomi* to susceptible oak trees by suitable mineral nutrition.

Although there is no data available about the *Quercus*- *P. cinnamomi* pathosystem, Duvenhage and Kotzé (1991) claim that Ca^{2+} increases the resistance of avocado plants to root rot caused by this pathogen. Good Ca^{2+} nutrition confers resistance to infection (preventive effect) and also decreases host colonization by *P. cinnamomi* once infection has occurred (therapeutic effect). Additionally, in the soya bean-*Phytophthora sojae* pathosystem, plants with high Ca^{2+} content are less susceptible to infection than those deficient in this nutrient (Sugimoto et al. 2005). Similar results were reported for other

pathogens: *Phytophthora parasitica* (von Broemsen and Deacon 1997) and *Phytophthora nicotianae* on citrus (Campanella et al. 2002) and also for *Aphanomyces* pea (Heyman et al. 2007). However, in the *Phytophthora cactorum*-silver birch pathosystem, high concentrations of Ca^{2+} in the trunk are not enough to stop infection (Lilja et al. 2007).

Occasionally, pasture fertilization is conducted in Spanish oak rangeland ecosystems to increase grass production, improving botanical composition and the vegetative and nutritional status of oak trees (Carbonero et al. 2004). It is probable that this fertilization would also be effective in decreasing the symptoms of oak root disease. In fact, it has been reported that oaks infected with *P. cinnamomi* and exhibiting defoliation, recovered their canopy faster when grown in soils with normal to high concentrations of Ca^{2+} and K^+ (Carbonero et al. 2004). These results suggest that good Ca^{2+} and/or K^+ nutrition might be a means of preventing infection by *P. cinnamomi* on oak trees and decrease incidence of disease. The main objective of this study was to consider the influence of Ca^{2+} and K^+ nutrition on tolerance/resistance to root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* on *Quercus ilex*.

Materials and methods

Plant material used in the experiments were Holm oaks (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) *rotundifolia* type (Vázquez et al. 1992). Seedlings were obtained from acorns collected in several rangelands in the province of Córdoba (southern Spain) in December 2007. These acorns were surface sterilized by being dipped in 10% sodium hypochlorite; then rinsed three times in sterile distilled water and placed in plastic trays (57*41*9 cm) containing expanded perlite (Otavi Iberica sLu). Trays were incubated in a growth chamber (14 h light per day, 22° C and 80% humidity) and watered as needed with deionized and distilled water (DDW). Two months later (February 2008), germinated acorns were transferred to quickpot containers (trays of 48*29*18 cm, with 40 containers of 300 cm³ each one) filled with disinfested (washed in 10% sodium hypochlorite, and rinsed three times in sterile DDW) wet vermiculite. Trays were incubated in the open air, under a shaded structure, and watered three times per week with DDW until May 2008 ($12.9 \pm 6.8^\circ \text{C}$ registered in February to $18.6 \pm 6.5^\circ \text{C}$ in May). Three sets of 20 plants each were obtained. From May 2008, each set of plants

was watered with different nutrient solutions. The first set was watered with a solution of standard Ca^{2+} and K^+ concentrations (CaK) (Hoagland solution (Hoagland and Arnon 1950), the second set was watered with a solution with low Ca^{2+} concentration (nCa), and the third one was watered with a nutrient solution with low K^+ concentration (nK) (Table 1).

Table 1 Composition of the mineral solutions used for oak sets nutrition

Compound	Standard mineral solution (Hoagland)	Ca^{2+} deficient solution	K^+ deficient solution
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5 mM	-	5 mM
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5 mM	-	0.5 mM
MgSO_4	2 mM	2 mM	2 mM
KCl	5 mM	-	0.05 mM
NaNO_3	-	5 mM	-
KH_2PO_4	-	1 mM	-
KNO_3	-	5 mM	-
BO_3H_3	25 μM	25 μM	25 μM
MnSO_4	2 μM	2 μM	2 μM
ZnSO_4	2 μM	2 μM	2 μM
CuSO_4	0.5 μM	0.5 μM	0.5 μM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.4 μM	0.4 μM	0.4 μM
Fe-EDDHA	20 μM	20 μM	20 μM

Fifty ml of the corresponding nutrient solution was added weekly to each plant and furthermore, another 50 ml of WDD added twice a week to each plant. All seedlings were incubated under the same shaded structure until July 2008, when temperatures reached high values (36.5° C). At that time, plants were moved to a growth chamber (12 h light per day, 18–24° C), and each plant watered weekly with 50 ml of the correspondent nutrient solution until October 2008 (10 months after acorns were sowed). At that time, seedlings were transferred to individual containers (1L in volume) without drainage, containing disinfested wet vermiculite (washed in 10% sodium hypochlorite, and rinsed three times in sterile DDW). Ten plants per set were then

inoculated with *P. cinnamomi* and the other 10 plants were not inoculated and used as controls. That means 10 replicates (containers with one seedling) per nutrient treatment and presence or absence of pathogen.

Young oaks were inoculated with a zoospore suspension obtained from two isolates of *P. cinnamomi* (PE90 and PA25, obtained from Holm and Cork oak roots respectively). Each isolate belongs to one of the morphological and genetic groups described for *P. cinnamomi* isolated from *Quercus* in the south of Spain (Caetano et al. 2009).

To produce zoospores, both *P. cinnamomi* isolates were plated on Petri dishes containing 20 ml of CA medium (Carrot-Agar 2%, Dhingra and Sinclair 1995) each, and incubated for 4 days at 22° C in the dark. Six mm diameter plugs of both isolates, taken from the margin of the colonies, were placed in the centre of empty Petri dishes (6 cm diameter). A soil extract, prepared as described by Ribeiro (1978), was poured into the dishes until the liquid reached the plug edge (7 ml per dish) (Caetano 2007). These plates were incubated at 25° C in daylight conditions until sporangial production (checked by direct observation under the inverted microscope) reached the maximum (72 h). At this point, plates were submitted to a 20 min cold-shock (4-5° C) and returned to 22° C for 2 h in order to stimulate zoospore release (Ribeiro 1978). The average number of zoospores*ml⁻¹ produced was quantified by counting aliquots (1 ml) of homogenized soil extract per plate in a Neubauer chamber (0.1 µl), and zoospore suspension was adjusted to 2.5*10³ zoospores*ml⁻¹. This concentration has previously been shown to be effective for infection of Holm oak roots (Caetano 2007). One hundred ml of zoospore suspension was added to each container for inoculation (25*10⁵ zoospores per oak plant). One hundred ml of soil extract without zoospores was added to control plants. After inoculation, the plants were watered weekly with 50 ml of the correspondent nutrient solution.

At the end of the experiment (8 weeks after inoculation), when some oak sets showed leaf wilting and/or defoliation, the severity of foliage and root symptoms were assessed for each plant on a scale of 0-4, according to the percentage of wilted foliage or root necrosis (0 = 0-10% symptomatic tissue, 1 = 11-33%, 2 = 34-66%, 3 = more than 67%, 4 = dead tissue) (Sánchez et al. 2002; 2005). Additionally, segments from inoculated

and control roots were plated on selective NARPH media for re-isolation of pathogens (Romero et al. 2007).

Furthermore, Ca^{2+} and K^+ concentrations in the leaves of inoculated and control plants watered with the different nutrient solutions were determined by chemical analyses carried out in the Laboratory of Agriculture of Córdoba (spectrophotometric analysis method to determine Ca^{2+} content and photometric method for K^+ measurement).

Data analysis

Analyses of variance were performed for foliage and root symptom severities and mean values compared by the Fisher's LSD test (Steel and Torrie 1985) for $P < 0.05$. ANOVA was performed for each variable using Statistix software (Analytical Software, Tallahassee, USA).

Results

Ca^{2+} concentrations in the leaves of inoculated and control plants for each set under different nutritional schedule were similar (Fig 1). For oaks watered with the low K^+ solution, both inoculated and control plants, Ca^{2+} concentration in the leaves was markedly higher than in the rest of sets (Fig 1).

K^+ concentration of leaves from oaks under different nutritional schedule are shown in Fig 2. In general, plants watered with the low K^+ solution showed almost half the K^+ concentration than the rest of plants. Seedlings treated with the low Ca^{2+} solution did not show an increase in K^+ concentration (Fig 2).

At the end of the experiment, 8 weeks after inoculation, all inoculated plants showed typical symptoms of *Phytophthora* disease: crown wilting, defoliation, necrosis and death of feeder roots. Average values of crown symptoms may be seen in Fig 3. The variance analysis for aerial symptoms (Table 2) did not show significant differences among mineral nutrition treatments, inoculated or control plants. However, these significant differences existed for root symptoms (Table 3). The comparison of means showed that root damage of inoculated CaK and nK plants (Fig 4) was significantly higher compared with the correspondent control plants. However, inoculated or control nCa plants exhibited high levels of root damage similar to inoculated standard plants

(CaK). It is remarkable that root damage recorded for inoculated plants rich in Ca^{2+} (nK) did not significantly differ compared with control Holm oaks watered with standard nutrition (CaK) neither compared with inoculated standard plants (CaK), reaching intermediate values between both extremes (Fig 4). In addition, control Holm oaks with high levels of Ca^{2+} (nK) had a significantly lower level of root damage than control oaks with standard Ca^{2+} content (CaK).

For all treatments, the pathogen was re-isolated from all inoculated oak roots and never from control roots.

Fig. 1 Ca^{2+} content in leaves (percentage w/w) of inoculated and control oaks submitted to different mineral nutrition. CaK: standard mineral nutrition, nCa: deficient Ca^{2+} nutrition, nK: deficient K^+ nutrition. Vertical bars represent means of 10 replications (oaks)

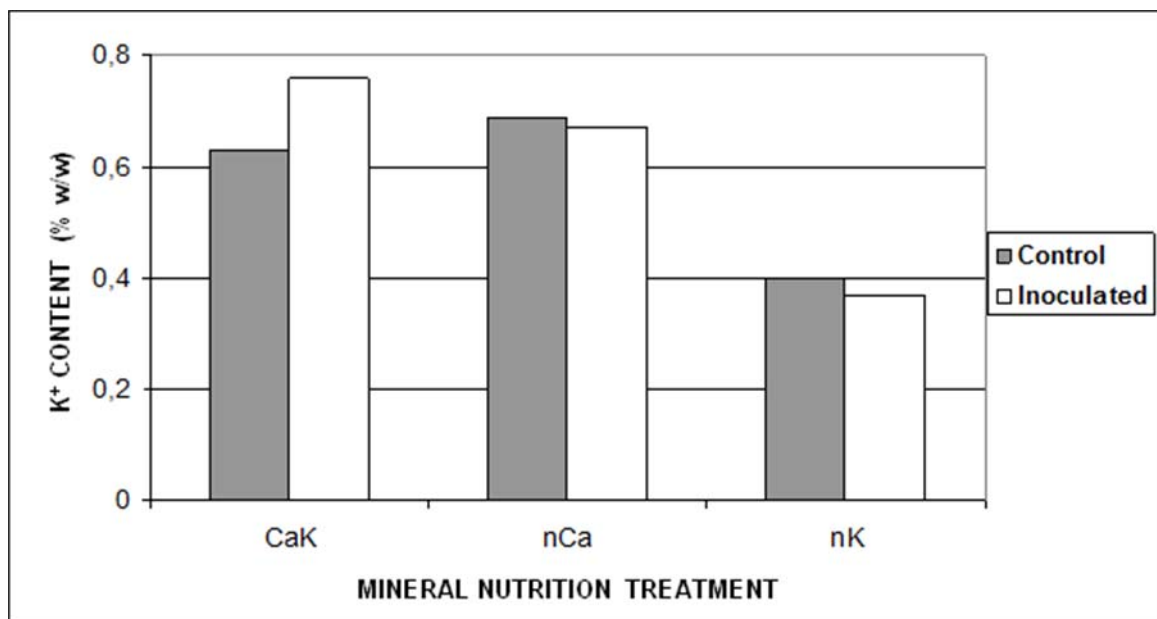


Fig. 2 K^+ content in leaves (percentage w/w) of inoculated and control oaks submitted to different mineral nutrition. CaK: standard mineral nutrition, nCa: deficient Ca^{2+} nutrition, nK: deficient K^+ nutrition. Vertical bars are means of 10 replications (oaks)

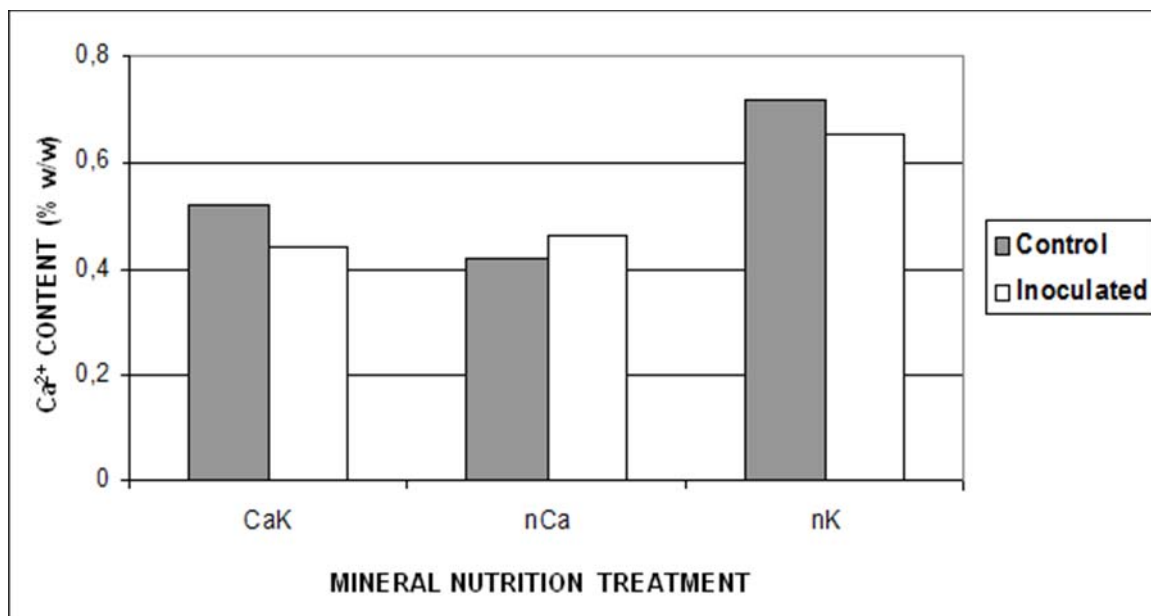


Fig. 3 Average values of foliar symptoms recorded for inoculated and control oaks submitted to different mineral nutrition. CaK: standard mineral nutrition, nCa: deficient Ca^{2+} nutrition, nK: deficient K^+ nutrition. Vertical bars and lines represent means and standard errors of 10 replications (oaks)

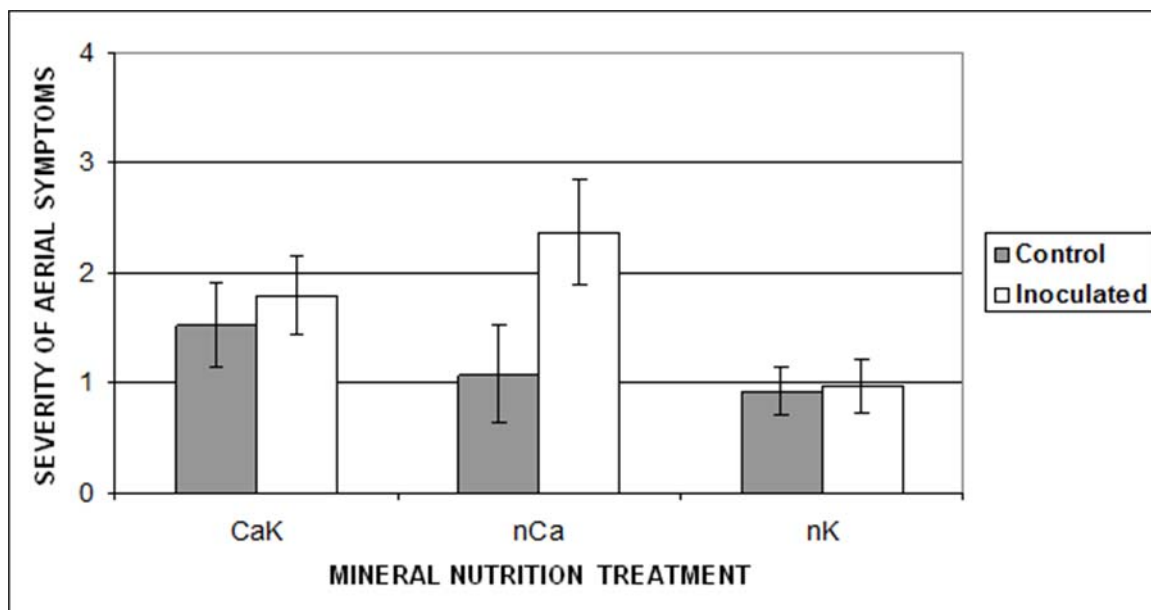


Table 2 Analysis of variance for severity of aerial symptoms

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	2	7.4923	3.74617	2.94	0.0788
Repetition	9	5.2102	0.57891	0.45	0.8867
<i>Phytophthora</i>	1	4.3202	4.32017	3.39	0.0823
Treatment* <i>Phytophthora</i>	2	4.5023	2.25117	1.76	0.1996
Treatment*Repetition	18	28.7543	1.59746	1.25	0.3192
Repetition* <i>Phytophthora</i>	9	16.7382	1.85980	1.46	0.2367

Table 3 Analysis of variance for severity of root symptoms

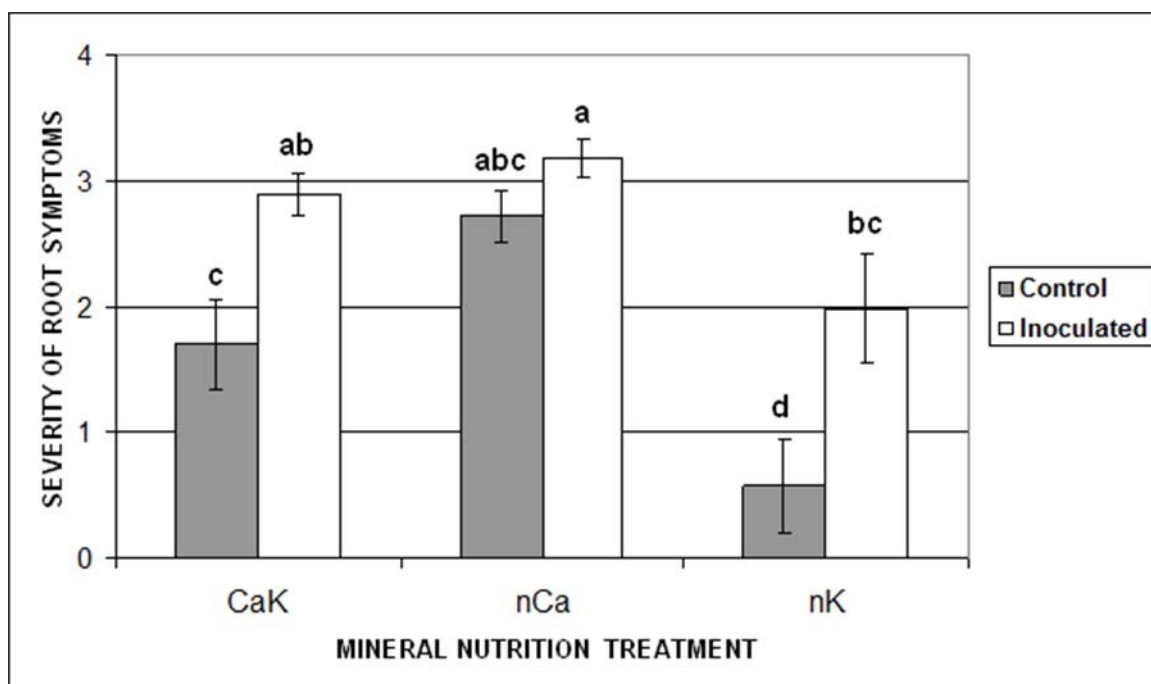
Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	2	28.500	14.2502	11.35	0.0006
Repetition	9	15.451	1.7167	1.37	0.2729
<i>Phytophthora</i>	1	15.606	15.6060	12.43	0.0024
Treatment* <i>Phytophthora</i>	2	2.473	1.2365	12.43	0.3929
Treatment*Repetition	18	16.626	0.9237	0.74	0.7394
Repetition* <i>Phytophthora</i>	9	3.994	0.4438	0.35	0.9429

Discussion

The importance of Ca²⁺ nutrition in resistance to diseases caused by *Phytophthora* spp. has been reported on several hosts including apple tree (*Malus domestica*) (Biggs et al. 1993; Biggs 1999; Chardonnet et al. 2000), avocado (*Persea americana*) (Messenger et al. 2000), *Citrus* spp. (Campanella et al. 2002), and *Vinca* sp. (von Broembsen and Deacon 1997). The importance of Ca²⁺ nutrition has also been reported in other pathosystems, including broccoli (*Brassica oleracea italica*)/ *Plasmodiophora brassicae* (Campbell et al. 1985), carrot (*Daucus carota*)/ *Sclerotium rolfsii* (Punja et al. 1986) and pepper (*Capsicum annuum*) / *Botrytis cinerea* (Elad et al. 1993). Our results indicate that Holm oaks watered with a low level K⁺ solution accumulated more Ca²⁺ than plants watered with a standard nutritive solution and increased tolerance to *P. cinnamomi* root disease.

Rahman and Punja (2007) reported that Ca^{2+} increases the cohesion of the plant cell walls, thus enhancing their resistance to fungal or bacterial pathogen penetration. Based on our results, a higher than standard concentration of Ca^{2+} in Holm oaks might have this effect, leading to a higher tolerance of oak roots to *P. cinnamomi* infection. In addition, regardless of the destructive effect of the pathogen, control Holm oaks with high levels of Ca^{2+} had better root development and a significantly lower level of damage than control oaks with standard Ca^{2+} content. Therefore, Ca^{2+} appears to be an important nutrient for root development in Holm oaks.

Fig. 4 Average values of root symptoms recorded for inoculated and control oaks submitted to different mineral nutrition. CaK: standard mineral nutrition, nCa: deficient Ca^{2+} nutrition, nK: deficient K^+ nutrition. Vertical bars and lines represent means and standard errors of 10 replications (oaks). Bars with the same letter do not differ significantly according to the Fisher's LSD test ($P < 0.05$)



Several studies have reported that K^+ content in plants increases with decreasing Ca^{2+} and Mg^{2+} availability (Marschner 1995; Prabhu et al. 2007). However, although this is true in neutral soils, this does not occur in acid soils (Prabhu et al. 2007), which Spanish oak rangeland (“dehesa”) soil used to be (Olea and SanMiguel-Ayanz 2006). Furthermore, high Ca^{2+} concentration is one of the basic characteristics of soils

suppressive to *P. cinnamomi* (Broadbent and Baker 1974). This study shows that Ca^{2+} deficient Holm oaks did not have higher levels of K^+ concentration than oaks with standard Ca^{2+} levels, and K^+ content does not appear to influence their susceptibility to root infection. Ca^{2+} seems to play an important role in decreasing the severity of root symptoms in inoculated Holm oaks independently of K^+ content. The same effect has been reported in *Citrus* sp. trees (Huber 1991), in which high K^+ and low Ca^{2+} levels in plants lead to the enhancement of brown rot gummosis caused by *Phytophthora parasitica*. A high level of Ca^{2+} also increases the resistance of avocado to *P. cinnamomi* infection (Duvenhage and Kotzé 1991). Equally, the application of a nutrient solution five times richer in Ca^{2+} than K^+ significantly decreases the infection rate of soybeans (*Glycine max*) by *P. sojae* (Sugimoto et al. 2007). Increased resistance might be a result of direct suppression of fungal growth in the plant or might result from the strengthening of plant cell walls, in both cases due to Ca^{2+} , or might result from both factors combined (Duvenhage and Kotzé 1991; Sugimoto et al. 2005; 2007).

Conclusions

Holm oaks with accumulated Ca^{2+} have a higher tolerance to *P. cinnamomi* infection than oaks with standard levels of this nutrient. Consequently, appropriate Ca^{2+} nutrition by the application of limestone amendments to the soil could confer a higher tolerance to root disease caused by *P. cinnamomi* to Holm oaks growing in rangelands. For this reason and regardless of the direct negative effect of Ca^{2+} on the ability of *P. cinnamomi* to produce infective spores (Broadbent and Baker 1974), limestone amendments should be recommended to prevent root rot caused by *P. cinnamomi* in oak rangeland ecosystems in southern Spain.

Acknowledgements

With acknowledgement of the Spanish Ministry of Science (project AGL2009-00530) and Andalusian Agricultural Council (Junta de Andalucía, Spain) for financial support. Thanks to Sarah Knight (British School of Córdoba) for the English revision of the manuscript.

References

- Biggs AR (1999) Effects of calcium salts on Apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. Plant Dis 83: 1001-1005
- Biggs AR, Ingle M, Solihati WD (1993) Control of *Alternaria* infection of fruit of apple cultivar Nittany with calcium chloride and fungicides. Plant Dis 77: 976-980
- Brasier CM (1996) *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. Ann Sci For 53: 347-358
- Brasier CM, Robredo F, Ferraz JFP (1993). Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. Plant Pathol 42: 140-145
- Broadbent P, Baker KF (1974) Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. Aus J Agric Res 25: 121-137
- Caetano PCL (2007) Envolvimento de *Phytophthora cinnamomi* no declínio de *Quercus suber* e *Q. rotundifolia*: estudo de influência de factores bióticos e abióticos na progressão da doença. Possibilidades de controlo químico do declínio. Dissertation, University of Algarve, Portugal
- Caetano P, Ávila A, Sánchez ME, Trapero A, Coelho AC (2009) *Phytophthora cinnamomi* populations on *Quercus* forests from Spain and Portugal. In: Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems. USDA-Forest Service. General Technical Report PSW-GTR-221, pp 261-269
- Campbell RN, Greathead AS, Myers DF, de Boer GJ (1985) Factor related to control of clubroot of crucifers in the Salinas Valley of California. Phytopathology 75: 665-670
- Campanella V, Ippolito A, Nigro F (2002) Activity of calcium salts in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. Crop Protect 21: 751–756
- Carbonero MD, Blázquez A, Fernández P (2004) Producción de fruto y grado de defoliación como indicadores de vigor en *Quercus ilex* y *Quercus suber*. Influencia de diferentes condiciones edáficas en su evolución. In: García Criado B, García Ciudad A, Vázquez de Aldana B, Zabalgogeoazcoa I (eds) Pastos y ganadería extensiva. CSIC Salamanca, Spain, pp 715-720

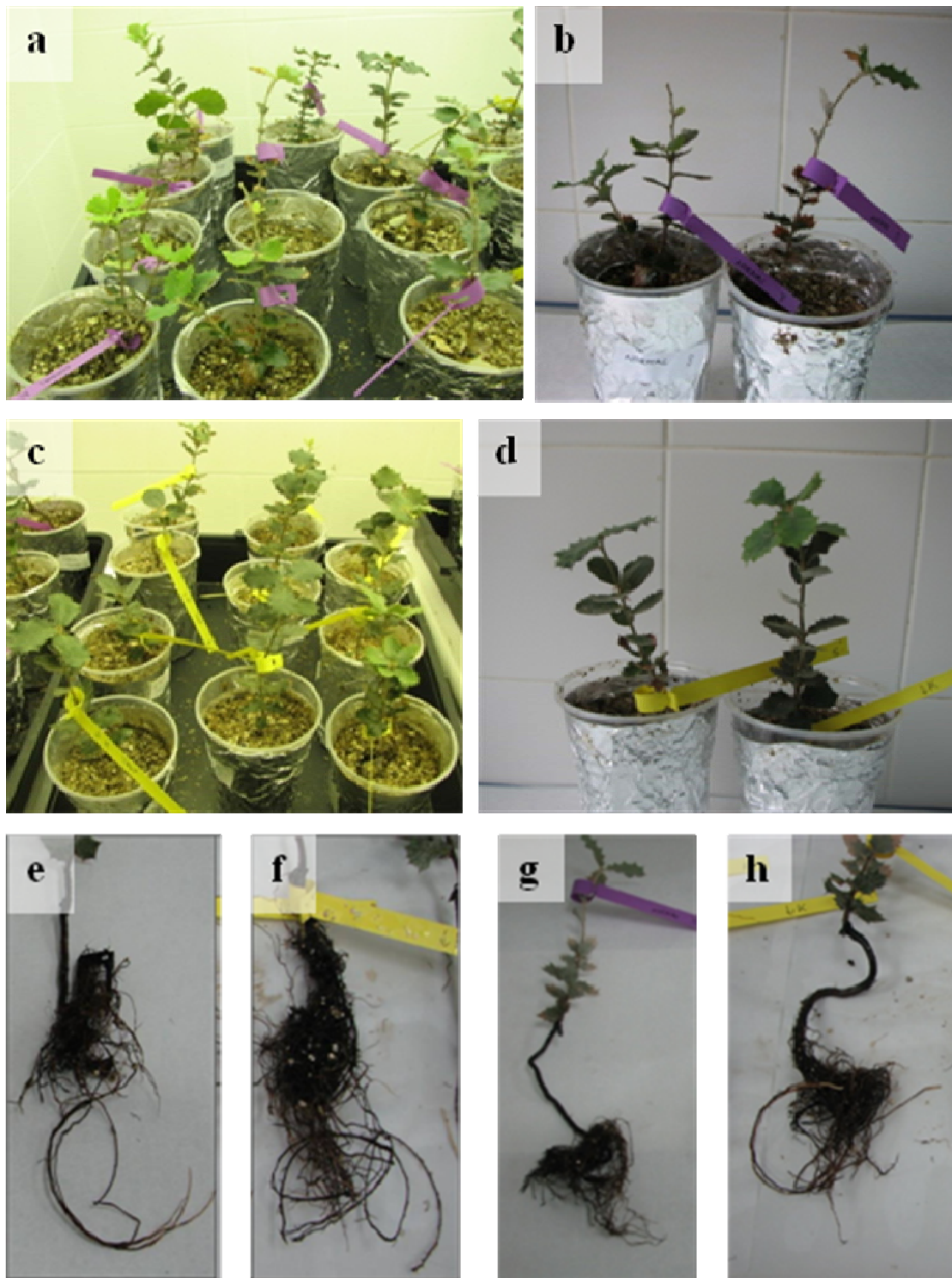
- Chardonnet CO, Sams CE, Trigiano RN, Conway WS (2000) Variability of three isolates of *Botritis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology* 90: 769-774
- Dhingra OD, Sinclair JB (1995) Basic plant pathology methods. CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Duvenhage JA, Kotzé JM (1991) The influence of calcium on saprophytic growth and pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* and on resistance of avocado to root rot. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 14: 13-14
- Elad Y, Yunis H, Volpin H (1993) Effect of nutrition on susceptibility of cucumber, eggplant, and pepper crops to *Botritis cinerea*. *Can J Bot* 71: 602:608
- Erwin DC, Ribeiro OK (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St. Paul, MN, USA
- Ferrer C, SanMiguel A, Olea L (2001) Nomenclator básico de Pastos en España. *Pastos* 31: 7-44
- Gallego FJ, Pérez de Algaba A, Fernández-Escobar R (1999) Etiology of oak decline in Spain. *Eur J For Path* 29: 17-27
- Grose MJ, Hainsworth JM (1992) Soil water extraction, measured by computer-assisted tomography, in seedling *Lupinus angustifolius* cv Yandee when healthy and infected with *Phytophthora cinnamomi*. *J Exp Bot* 43: 121-127
- Heyman F, Lindahl B, Persson L, Wikström M, Stenlid J (2007) Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biol Biochem* 39: 2222- 2229
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water culture methods for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Circular* 347: 1-32
- Huber DM (1991) The use of fertilizers and organic amendments in the control of plant disease. In: *CRC Handbook of Pest Management of Agriculture*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, USA, pp 357-394

- Lilja A, Luoranen J, Rikala R, Heinonen R (2007) The effects of calcium on stem lesions of silver birch seedlings. *For Path* 37: 96-104
- Marschner H (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. Academic Press, London, UK
- Messenger BJ, Menge JA, Pond E (2000) Effects of gypsum soil amendments on avocado growth, soil drainage, and resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Dis* 84: 612-616
- Moreno G, Pulido F (2009) The functioning, management, and persistence of dehesas. In: Rigueiro A, McAdam J, Mosquera R (eds) *Agroforestry in Europe*. Springer, Amsterdam, pp 127-160
- Olea L, SanMiguel-Ayanz A (2006) The Spanish dehesa. A traditional Mediterranean silvopastoral system linking production and nature conservation. *Grassland Sci Eur* 11: 3-13
- Prabhu AS, Fageria NK, Huber DM, Rodrigues FA (2007) Potassium and Plant Disease. In: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp 57-78
- Punja ZK, Carter JD, Campbell GM, Rossell EL (1986) Effects of calcium and nitrogen fertilizers fungicides, and tillage practices on incidence of *Sclerotium rofsii* on processing carrots. *Plant Dis* 70: 819-824
- Rahman M, Punja ZK (2007) Calcium and Plant Disease. In: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp 79-93
- Ribeiro OK (1978) *A sourcebook of the genus Phytophthora*. J Cramer, Vaduz, Germany
- Romero MA, Sánchez JE, Jiménez JJ, Belbahri L, Trapero A, Lefort F, Sánchez ME (2007) New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. *J Phytopathol* 155: 289-295
- Sánchez ME, Caetano P, Ferraz J, Trapero A (2002) *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *For Pathol*. 32: 5-18

- Sánchez ME, Andicoberry S, Trapero A (2005) Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. For Pathol 35: 115-125
- Sánchez ME, Caetano P, Romero MA, Navarro RM, Trapero A (2006) *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. In: Brasier C, Jung T, Oßwald W (eds), Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees. The Forest Authority, Farnham, UK, pp 149-154
- Serrano MS, Fernández P, De Vita P, Carbonero MD, Trapero A, Sánchez ME (2010) *Lupinus luteus*, a new host of *Phytophthora cinnamomi* in Spanish oak-rangelands ecosystems. Eur J Plant Pathol 128: 149-152
- Steel RGD, Torrie JH (1985) Bioestadística: Principios y procedimientos. McGraw-Hill, Bogotá, Colombia.
- Sugimoto T, Aino M, Sugimoto M, Watanabe K (2005) Reduction of *Phytophthora* stem rot disease on soybeans by the application of CaCl₂ and Ca (NO₃)₂. J Phytopathol 153: 536-543
- Sugimoto T, Watanabe K, Yoshida S, Aino M, Matsuyama M, Maekawa M, Irie K (2007) The effects of inorganic elements on the reduction of *Phytophthora* stem rot disease of soybean, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. J Phytopathol 155: 97-107
- Vázquez FM, Espárrago F, López Márquez JA, Jaraquemada F, Pérez MC (1992) Descripción de la especie *Quercus rotundifolia* Lam. y sus formas para Extremadura. Información Técnica Agraria, Serie Agricultura 17. Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura, Mérida, Spain
- von Broemsen SL, Deacon JW (1997) Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solution. Phytopathology 87: 522- 528

Figura 24. Influencia del contenido de Ca^{2+} en el desarrollo de la podredumbre radical en plántones de encina

Encinas con un contenido en Ca^{2+} normal creciendo en medio inerte de vermiculita sin infestar **(a)** e infestado con $2,5 \times 10^3$ zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* $\times \text{ml}^{-1}$ **(b)**, 8 semanas después de la infestación. Encinas con alto contenido en Ca^{2+} creciendo en medio inerte de vermiculita sin infestar **(c)** e infestado con $2,5 \times 10^3$ zoosporas de *P. cinnamomi* $\times \text{ml}^{-1}$ **(d)**, 8 semanas después de la infestación. Nótese como las plantas **(b)** presentan los típicos síntomas foliares de la podredumbre radical que no se observan en **(a)**, **(c)** ni **(d)**. Raíz de encinas testigo sin inocular con un contenido en Ca^{2+} normal **(e)** y con un alto contenido en Ca^{2+} **(f)**. Nótese el mayor desarrollo radical en **(f)**. Raíz de encinas inoculadas con *P. cinnamomi* con un contenido en Ca^{2+} normal **(g)** y con un alto contenido en Ca^{2+} **(h)**. Nótese la mayor pérdida de raicillas absorbentes en **(g)**, en comparación con **(h)**.



3.2

Susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* of the commonest morphotypes of Holm oak in southern Spain

María Socorro Serrano, Paolo De Vita, María Dolores Carbonero, Fabio Fernández, Pilar Fernández-Rebollo, María Esperanza Sánchez

First, second and sixth authors: Agronomy Department, Agroforest Pathology, University of Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba, Spain.
Third, fourth and fifth authors: Forestry Department, University of Córdoba, Córdoba, Spain.
Corresponding author: M.E. Sánchez, e-mail: aglsahem@uco.es

Forest Pathology, 2012 (published on line)
doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00758.x

Summary

The four main morphotypes of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) present in Andalusia (*expansa*, *macrocarpa*, *microcarpa* and *rotundifolia*) were infected with *Phytophthora cinnamomi* to determine their susceptibility to the root pathogen. No large differences were found among the four morphotypes in the infection of roots, which always showed a high degree of necrosis. However, the different responses of the foliage to infection separated the four morphotypes of Holm oak into three groups: very susceptible (*microcarpa*), susceptible (*expansa*) and moderately susceptible (*rotundifolia* and *macrocarpa*). The natural hybrid *Q. ilex ballota*–*Q. faginea* exhibited a low level of root and foliar symptoms when infected with *P. cinnamomi*. *Quercus faginea* could be considered as a source of resistance to *P. cinnamomi* in future breeding programmes.

1 Introduction

Mediterranean *Quercus* spp. are suffering a severe decline, which is causing a high mortality of Holm oaks in western Andalusia (southern Spain). The main disease associated with oak mortality is the root rot caused by the oomycete *Phytophthora cinnamomi* (Sánchez et al. 2002). Two subspecies have been described for Holm oak: *Quercus ilex* subsp. *ilex* and *Quercus ilex* subsp. *ballota*. The subsp. *ilex* is abundant in northern Spain, southern France and coastal Italy. The subsp. *ballota* is more flexible in its environmental requirements and grows in southern Spain and Portugal (Costa et al. 2005). Within each subspecies, there is a high degree of genetic variability that results from a high incidence of hybridization and introgression with other taxa and by adaptation to edaphoclimatic conditions (Vázquez 1998). The existence of different genetic populations has been hypothesized (Carevic et al. 2010). Moreover, a higher variability into the same population has been found (Michaud et al. 1992). Different morphotypes of *Q. ilex* subsp. *ballota* were described based on the morphology and size of the acorn: *avellanaeformis*, *brevicupulata*, *crassicupulata*, *dolichocalyx*, *expansa*, *macrocarpa*, *microcarpa* and *rotundifolia* (Vázquez 1998). As little is known about the susceptibility of Holm oak morphotypes to diseases, the objectives of this study were to evaluate susceptibility of the main morphotypes that occur in Andalusia to *P.*

cinnamomi and to discuss the role they could play in future breeding programmes to reforest sites heavily infested with this pathogen.

2 Material and methods

One-year-old seedlings of *Q. ilex ballota* were obtained from acorns collected from selected trees belonging to the four main morphotypes in Andalusia: *microcarpa*, *macrocarpa*, *rotundifolia* and *expansa*. Additionally, seedlings from a natural hybrid *Q. ilex ballota*–*Q. faginea* were included in the experiment. Seedlings were inoculated with *P. cinnamomi* (isolate PE90). Inoculum consisted of a water suspension of chlamydospores, prepared as described in Sánchez et al. (2002) and adjusted to 2×10^4 chlamydospores $\times \text{ml}^{-1}$ (Romero et al. 2007). Each plant was removed from its container and the root ball inoculated with 50 ml of inoculum (Sánchez et al. 2005). The inoculated plant was then re-potted in plastic pots (3.5 l) containing a mixture of sand–peat (2:1 v/v). Twelve plants (replicates) per oak type were inoculated and two plants served as controls (not inoculated). All the pots were placed in plastic trays (43 x 36 x 15 cm) and incubated in an airconditioned greenhouse ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ during the day and $10 \pm 2^\circ\text{C}$ at night) for 10 weeks. To avoid cross-contamination, pots containing seedlings from the same oak type were placed in separate trays and watered as required. One week after inoculation, all trays, including the controls, were partially filled with tap water to flood the soil for 2 days each week (Sánchez et al. 2005). Severity of crown symptoms (foliar wilting and/or defoliation) was assessed once a week for each plant on a 0–4 scale, according to the percentage of symptomatic foliage (0 = 0–10%, 1 = 11–33%, 2 = 34–66%, 3 = more than 67% and 4 = dead foliage) (Sánchez et al. 2002; Sánchez et al. 2005). At the end of the experiment, the severity of root symptoms was assessed on the same 0–4 scale, according to the percentage of root necrosis (Sánchez et al. 2002; Sánchez et al. 2005). ANOVA was performed with the data, and main values compared using the Tukey's test for $p \leq 0.05$ (Statistix 8.0 software, Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Additionally, segments (3–4 mm long) from inoculated and control roots were plated on NARPH culture medium (Romero et al. 2007) for re-isolation of the pathogen.

3 Results

At the end of the experiment, crown symptoms of foliar wilting and defoliation were recorded. Root symptoms consisted of necrosis and death of feeder roots. ANOVA revealed no significant differences among inoculated plants belonging to the same oak morphotype. The progression of the severity of foliar symptoms over the period of the experiment is shown in Fig. 1. After 1 week of incubation, foliar symptoms of *microcarpa* plants were significantly higher when compared with the other morphotypes and the hybrid. The last evaluation of foliar symptoms (at week 10) separated the plants into three groups: very susceptible (with symptom severities >2 ; *microcarpa*), susceptible (*expansa*) and moderately susceptible (showing severities ≤ 1 ; *macrocarpa*, *rotundifolia* and the hybrid). Values of the severity of root symptoms recorded at the end of the experiment are shown in Fig. 2. All the inoculated plants exhibited root necrosis, and significant differences were only observed at $p \leq 0.07$. Plants of *microcarpa* showed the highest disease values, but they were not significantly different from the other Holm oak types tested. The hybrid, however, exhibited a moderate level of root necrosis that was significantly lower than that of *microcarpa*. Root symptoms separated the oaks in two groups: very susceptible (each morphotype of Holm oak evaluated) and moderately susceptible (hybrid). *Phytophthora cinnamomi* was always re-isolated from roots of all the inoculated plants, but not from control plants.

5 Discussion

Quercus spp. in Andalusia exhibit different degrees of susceptibility to *P. cinnamomi*, with *Q. ilex* being more susceptible to the pathogen than other *Quercus* spp. (Robin et al. 1998; Tuset et al. 2001). Our results showed that roots of the commonest morphotypes of Holm oak in Andalusia are highly susceptible to *P. cinnamomi*, while they exhibit large differences in foliar symptoms. In foci of root disease caused by *P. cinnamomi*, some Holm oak plants survive, and this apparent resistance to infection could be used in breeding programmes to improve the tolerance of the species to the disease. However, data collected in the field should be taken with caution. According to our results, progeny from the crosses between *Q. ilex* and *Q. faginea* (less susceptible to *P. cinnamomi*, Tuset et al. 2001) could be utilized in breeding programmes, as has

occurred with *Castanea sativa* and the Ink Disease caused by *Phytophthora* spp. (Miranda-Fontaiña et al. 2007). Further research is needed to evaluate other morphotypes growing in regions less affected by the disease to improve genetic resistance through intrapopulation crossings.

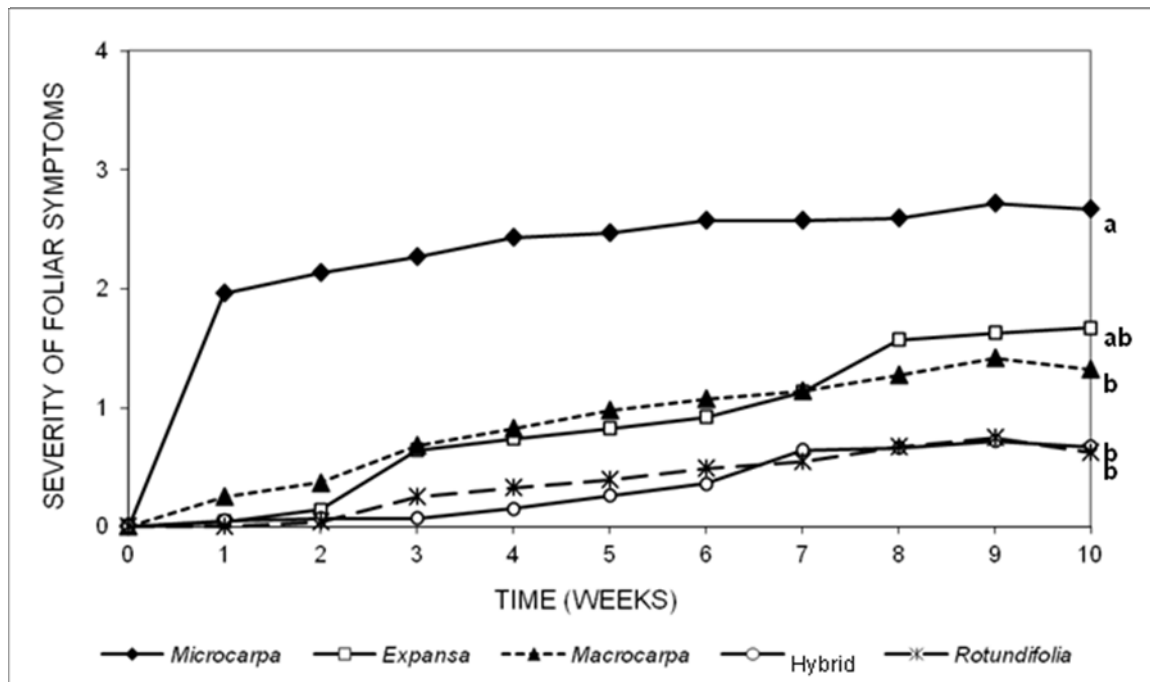


Fig. 1. Average values of foliar symptoms recorded for the morphotypes of Holm oak tested and the hybrid *Q. ilex ballota* x *Q. faginea* along the time. At the last evaluation, values with different letters differ significantly according with the Tukey's HSD test ($P \leq 0.05$)

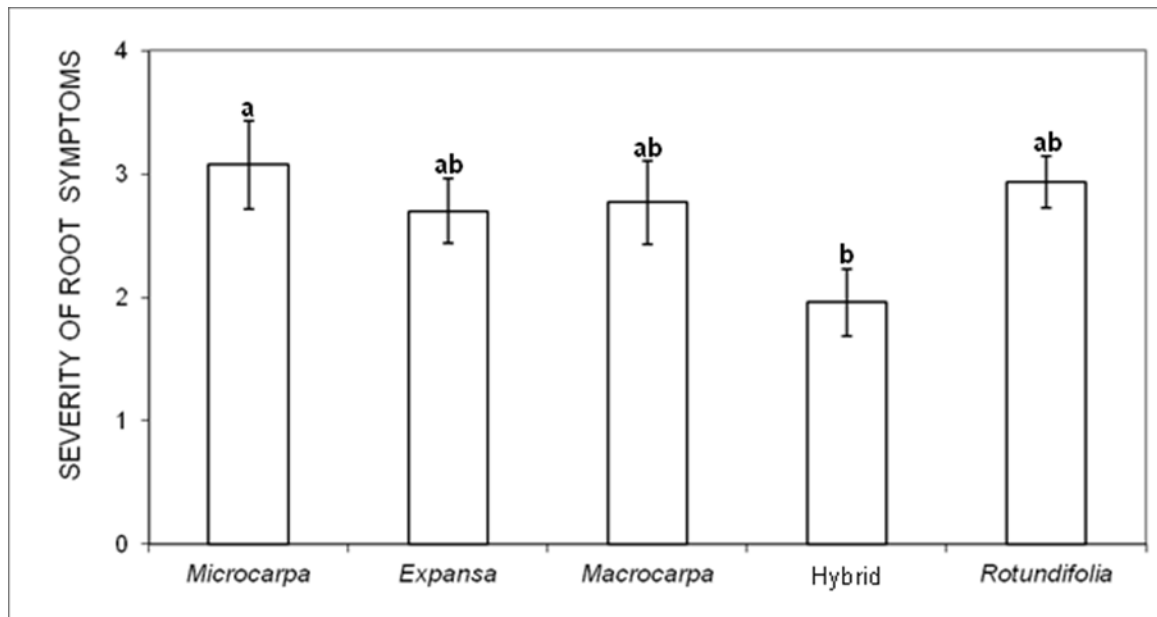


Fig. 2. Average values of root symptoms and standard errors recorded for the morphotypes of Holm oak tested and the hybrid *Q. ilex ballota* x *Q. faginea*. Values with different letters differ significantly according with the Tukey's HSD test ($P \leq 0.07$)

Acknowledgements

We acknowledge the Spanish Ministry of Science (AGL2009-00530) and the Andalusian Agricultural Council (Spain) for financial support. Many thanks to Dr W. J. Kaiser (Agronomy Department, University of Córdoba, Spain) for the critical review of the manuscript.

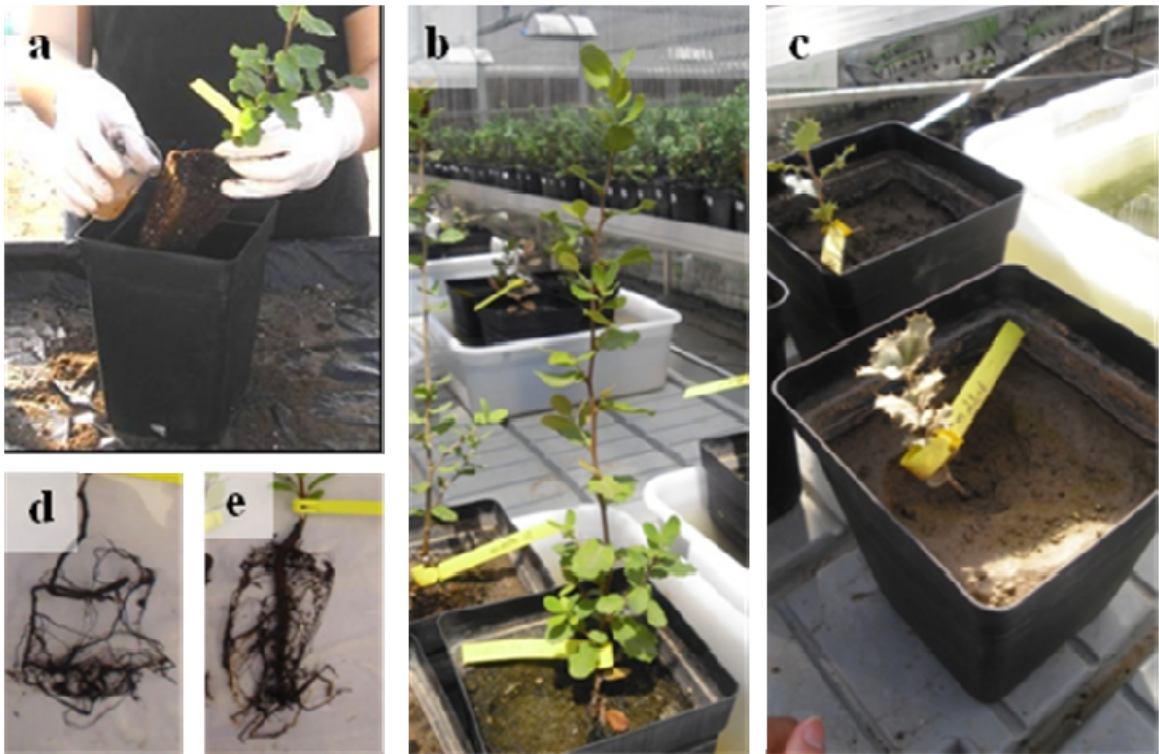
References

- Carevic, F.; Fernández, M.; Alejano, R.; Vázquez-Piqué, J.; Tapias, R.; Corral, E.; Domingo, J., 2010: Plant water relations and edaphoclimatic conditions affecting acorn production in a holm oak (*Quercus ilex* L. ssp. *ballota*) open woodland. *Agroforest. Syst.* **78**, 299–308.
- Costa, M.; Morla, C.; Sainz, H., 2005. *Los Bosques Ibéricos*. Ed. Planeta, Barcelona, Spain. 598 pp.
- Michaud, H.; Lumaret, R.; Romane, F., 1992: Variation in the genetic structure and reproductive biology of holm oak populations. *Vegetation* **99/100**, 107–113.

- Miranda-Fontaiña, M. E.; Fernández-López, J.; Vettraiño, A. M.; Vannini, A., 2007: Resistance of *Castanea* clones to *Phytophthora cinnamomi*: testing and genetic control. *Silvae Genet.* **56**, 1.
- Robin, C.; Desprez-Loustau, M.; Capron, G.; Delatour, C., 1998: First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. *Ann. Sci. For.* **50**, 869–883.
- Romero, M. A.; Sánchez, J. E.; Jiménez, J. J.; Belbahri, L.; Trapero, A.; Lefort, F.; Sánchez, M. E., 2007: New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in south-west Spain and Portugal. *J. Phytopathol.* **155**, 289–295.
- Sánchez, M. E.; Andicoberry, S.; Trapero, A., 2005: Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *For. Path.* **35**, 115–125.
- Sánchez, M. E.; Caetano, P.; Ferraz, J.; Trapero, A., 2002: *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *For. Path.* **32**, 5–18.
- Tuset, J. J.; Cots, F.; Hinarejos, C.; Mira, J. L., 2001: Suspensiones de zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* que causan la “seca” en cinco especies de *Quercus* mediterráneos. *Bol. San. Veg. Plagas* **27**, 103–115.
- Vázquez, F. M., 1998. Semillas del género *Quercus* L. (Biología, ecología y manejo). Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura. Mérida. 235 pp.

Figura 25. Susceptibilidad de distintos morfotipos de encina a *Phytophthora cinnamomi*

a) Inoculación del híbrido *Quercus ilex-Q. faginea* con 50 ml de una suspensión acuosa de 2×10^4 clamidosporas de *P. cinnamomi* ml⁻¹. Híbrido *Q. ilex-Q. faginea* (b) y encina del morfotipo *microcarpa* (c) a las 4 semanas de la inoculación con *P. cinnamomi*. Nótese la ausencia de síntomas foliares de podredumbre radical en (b) y la marchitez foliar presente en (c). d) Raíz de plantón de encina del morfotipo *microcarpa* inoculada con *P. cinnamomi* 10 semanas después de la inoculación. e) Raíz del híbrido *Q. ilex-Q. faginea* inoculado con *P. cinnamomi* 10 semanas después de la inoculación. Nótese la necrosis y ausencia de raicillas absorbentes en (d), pero no en (e).





CAPÍTULO 4

Susceptibilidad de las principales especies herbáceas cultivadas en la dehesa a la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* y su influencia en la epidemiología de la enfermedad radical de la encina

En este capítulo se recogen los resultados relativos al Objetivo 3 de esta Tesis Doctoral, en el cual se plantea evaluar la susceptibilidad de los principales cultivos herbáceos en las dehesas andaluzas a *P. cinnamomi* y su influencia en la epidemiología de la enfermedad radical de las encinas.

Los resultados obtenidos se han recogido en tres artículos:

Capítulo 4.1, publicado en el *European Journal of Plant Pathology* (2010), volumen 128, páginas 149-152, con el título

“*Lupinus luteus*, a new host of *Phytophthora cinnamomi* in Spanish oak-rangeland ecosystems”

Autores: **MS Serrano**, P Fernández-Rebollo, P De Vita, MD Carbonero, A Trapero, ME Sánchez

Capítulo 4.2, publicado en *Forest Pathology* (2011), volumen 41, páginas 382–386, con el título

“The role of yellow lupin (*Lupinus luteus*) in the decline affecting oak agroforestry ecosystems”

Autores: **MS Serrano**, P Fernández-Rebollo, P De Vita, MD Carbonero, ME Sánchez

Capítulo 4.3, aceptado para su publicación en el *European Journal of Plant Pathology*, con el título

“Susceptibility of common herbaceous crops to *Phytophthora cinnamomi* and its influence on *Quercus* root rot in rangelands”

Autores: **María Socorro Serrano**, Paolo De Vita, Pilar Fernández Rebollo, María Esperanza Sánchez

4.1

***Lupinus luteus*, a new host of *Phytophthora cinnamomi* in Spanish oak-rangeland ecosystems**

María Socorro Serrano, Pilar Fernández-Rebollo, Paolo De Vita, María Dolores Carbonero, Antonio Trapero, María Esperanza Sánchez

First, third, fifth and sixth authors: Agronomy Department, Agroforest Pathology, University of Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba, Spain.

Second and fourth authors: Forestry Department, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

Corresponding author: M.E. Sánchez, e-mail: aglsahem@uco.es

Abstract

Phytophthora cinnamomi is an aggressive pathogen on *Lupinus luteus* (yellow lupin), causing root rot, wilting and death of this crop, common in oak-rangeland ecosystems ('dehesas') in south-western Spain. The oomycete, the main cause of *Quercus* decline in the region, was isolated from roots of wilted lupins in the field. Artificial inoculations on four cultivars of *L. luteus* reproduced the symptoms of the disease, both in pre- and post-emergence stages, recovering the pathogen from necrotic roots. These results suggest the potential of yellow lupin as inoculum reservoir for the infection of *Quercus* roots. This is the first report of *P. cinnamomi* as root pathogen of *L. luteus*.

Keywords: Oak decline, *Quercus ilex* ssp. *Ballota*, *Quercus rotundifolia*, Root rot

Introduction

Lupinus luteus L. (yellow lupin) is an annual leguminous plant growing in warm temperate regions. In southern Spain, the culture of yellow lupin is principally concentrated in the western part of the region, being commonly sown in oak-rangeland ecosystems called 'dehesa'. This crop is mainly used for sheep and pig grazing. Additionally, since the early 1990's a severe decline caused by the soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* Rands is affecting *Quercus* species growing in rangelands in southern Spain, causing defoliation, root rot and death of cork oak (*Q. suber* L.) and holm oak (*Q. ilex* L. subsp. *ballota*) (Brasier 1996; Gallego *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2006), killing thousands of trees every year. *Phytophthora cinnamomi* has a large host range, mainly woody species (Erwin and Ribeiro 1996). Among the few herbaceous plants reported as *P. cinnamomi* hosts, there are some belonging to the genus *Lupinus*, such as *L. albus* and *L. angustifolius* (Kirby and Grand 1975; Erwin and Ribeiro 1996). However, no references about *L. luteus* have been found in the literature.

Foci of wilted yellow lupins are frequently observed in 'dehesa' systems suffering oak disease caused by *P. cinnamomi*. Then, the objective of this work was to evaluate the susceptibility of *L. luteus* to *P. cinnamomi* root infection.

Material and methods

Sampling was carried out in spring in four holm oak 'dehesa' ecosystems in southwestern Spain. Three open forests were chosen from those previously studied, with known presence of *P. cinnamomi* infecting oak roots (Romero *et al.* 2007). The fourth site was a recently forested rangeland (10 years-old trees) free of oak root disease. For each site, one focus of diseased lupins was chosen (Table 1). From each focus, 20 plants showing yellowing or wilting were chosen for sampling, those showing complete wilt being excluded from consideration. Lupin roots were carefully washed under running water. Necrotic roots were cut into segments 3–4 mm long with a sterile scalpel, and plated in Petri dishes containing 20 ml of NARPH medium (Nystatin—Ampicillin—Rifamicin—Pentachloronitrobenzene—Hymexazol Cornmeal agar, selective for the genus *Phytophthora*) (Romero *et al.* 2007). For each plant, one or two dishes (depending on availability of roots), each containing six root segments, were prepared and incubated at 22°C in the dark for 4 days. Colonies obtained were transferred to CA (Carrot-Agar) medium (Erwin and Ribeiro 1996), incubated in darkness for 4–6 days at 22°C, and identified by direct observation of characteristically clustered hyphal swellings (Erwin and Ribeiro 1996) under the inverted microscope.

For pathogenicity tests, plant material was obtained from seeds of four cultivars of *L. luteus* ('Cardiga, 'Juno, 'Nacional, 'Paris) and one cultivar of *L. angustifolius*, used as tester because of its known high susceptibility to *P. cinnamomi* root infection (Kirby and Grand 1975; Erwin and Ribeiro 1996). Emergence tests were conducted on seeds washed in 10% sodium hypochlorite, rinsed in sterile distilled water and incubated in wet chambers (12 h light per day, 22°C, 3 days) until the radicle just emerged. Pregerminated seeds were placed in plastic trays containing 8 l of sand-peat (1:1 vol) infested with *P. cinnamomi* chlamydospores in sterile water suspension (isolate PE90), prepared as described in Sánchez *et al.* (2002). Inoculum suspension was adjusted to 2×10^4 chlamydospores ml⁻¹ and 800 ml was added to each tray. Three trays (replicates) with 20 pregerminated seeds each were prepared per cultivar, plus their corresponding three control trays with uninfested soil. Trays were incubated in a growth chamber (12 h light per day, 22°C), watered as needed, and seedling emergence evaluated.

Post-emergence tests were performed with plants obtained from seeds similarly washed and pregerminated but sown in plastic trays containing wet vermiculite and incubated in a growth chamber (12 h light per day, 22°C) for 7 additional days. Twenty 10-day old plants from each cultivar were transferred to plastic trays. Three trays with infested soil prepared as described above, were planted with twenty 10-day old plants per cultivar, plus their corresponding three control trays with uninfested soil. Trays were incubated in a growth chamber (12 h light per day, 18–24°C), with watering as needed. Twenty five days after inoculation, root symptoms were assessed for each plant on a 0–4 scale, according to the percentage of root necrosis recorded (0=0% necrotic tissue, 1=1–33%, 2=34–66%, 3=67–99%, 4=dead plant) (Romero *et al.*, 2007). ANOVA was performed for emergence and root symptom values, considering the cultivar, the presence of *P. cinnamomi* in the soil, and their interaction as factors. Mean values were compared by the Tukey's HSD test for $P < 0.05$ (Steel and Torrie 1985). Segments from inoculated and control roots were plated on NARPH medium for re-isolation of the pathogen.

Results and discussion

Symptoms were similar for diseased lupins in the field and artificially inoculated: yellowing and wilting of leaves leading to general wilt and death. Roots showed extensive necrosis. Colonies obtained from necrotic lupin roots were white coloured, showing a flat or slight petaloid pattern after 4 days growing on CA medium, with abundant, cottony aerial mycelium after 6 days of growth. Subspherical, clustered hyphal swellings, with abundant smooth walled chlamydospores were observed under the inverted microscope. Chlamydospores appeared spherical shape, formed both terminally and intercalary, slightly thick-walled, and 32–40 μm in diameter. These distinctive characteristics correspond with the species *P. cinnamomi* (Erwin and Ribeiro 1996). Percentages of isolation (Table 1) were low, but this is common for *P. cinnamomi* root infections (Brasier 1996; Sánchez *et al.* 2006).

The results of pathogenicity tests in pre-emergence stage are in Table 2. All seeds sown in infested soil exhibited emergence levels significantly lower ($P < 0.05$) than those sown in the absence of *P. cinnamomi*. For seeds sown in infested soil, the cultivar Paris showed a significantly higher emergence value ($P < 0.05$) than the other cultivars.

Table 1 Size of yellow lupin foci and isolation frequencies of *P. cinnamomi* from necrotic roots

Site	Radius (m) of diseased lupin foci	Isolation of <i>P. cinnamomi</i> from lupin roots ^a
1	1	6.5
2	12	7.2
3	7	18.2
4	30	2.8

^a Percentage of root segments yielding a colony when plated on NARPH medium

Table 2 Percentage of emergence of *L. luteus* and *L. angustifolius* seeds sowed in soil infested or uninfested with *P. cinnamomi*

Plant material	Soil	Emergence (%) ± SE	Homogeneous group*
<i>L. luteus</i> cv. Paris	Uninfested	96.7 ± 3.3	a
	Infested	31.7 ± 3.3	b
<i>L. luteus</i> cv. Cardiga	Uninfested	93.3 ± 1.7	a
	Infested	1.7 ± 1.6	c
<i>L. luteus</i> cv. Juno	Uninfested	80.0 ± 5.8	a
	Infested	5.0 ± 2.9	c
<i>L. luteus</i> cv. Nacional	Uninfested	75.0 ± 7.6	a
	Infested	1.7 ± 1.6	c
<i>L. angustifolius</i>	Uninfested	90.0 ± 10.0	a
	Infested	16.7 ± 6.0	b c

*According to Tukey's HSD test (P < 0.05) (Steel and Torrie, 1985)

Post-emergence results are in Table 3. For each cultivar tested, mean values of root symptoms recorded in inoculated soils were significantly higher (P<0.05) than those recorded in their respective controls. Root symptoms obtained for inoculated plants were significantly higher than those recorded for blue lupin for three up the four yellow lupin cultivars tested. Twenty two days after transferring the plants to infested soil, near 20% of yellow lupin plants of each cultivar were dead, rising to more than 80% (root necrosis value=4) at the end of the experiment, 25 days after inoculation. Mortality was lower for blue lupin, rising to 10% (root necrosis value = 4) 25 days after inoculation. *Phytophthora cinnamomi* was consistently re-isolated from necrotic roots of each lupin cultivar growing in infested soil and never from roots of control plants.

Table 3 Average values of root symptoms recorded for *L. luteus* and *L. angustifolius* seedlings growing in soil infested or uninfested with *P. cinnamomi*

Plant material	Soil	Root symptoms \pm SE	Homogeneous group*
<i>L. luteus</i> cv. Paris	Uninfested	0.6 \pm 0.1	e
	Infested	3.7 \pm 0.7	a b
<i>L. luteus</i> cv. Cardiga	Uninfested	1.0 \pm 0.1	c d e
	Infested	3.9 \pm 0.1	a
<i>L. luteus</i> cv. Juno	Uninfested	1.2 \pm 0.2	c d
	Infested	3.8 \pm 0.1	a
<i>L. luteus</i> cv. Nacional	Uninfested	1.2 \pm 0.1	c
	Infested	3.8 \pm 0.1	a
<i>L. angustifolius</i>	Uninfested	0.7 \pm 0.1	d e
	Infested	3.2 \pm 0.1	b

*According to Tukey's HSD test ($P < 0.05$) (Steel and Torrie, 1985)

Yellow lupin resulted highly susceptible to *P. cinnamomi*, even more than blue lupin, used as tester because of its known high susceptibility to the pathogen (Kirby and Grand 1975; Erwin and Ribeiro 1996). These results suggest the potential of yellow lupin to acts as inoculum reservoir and consequently, to favour the infection of *Quercus* roots, as previously reported about weeds for other soilborne pathogens, such as *Verticillium dahliae*-olive (Trapero and Blanco 2004) or *Phytophthora capsici*-vegetables (French-Monar *et al.* 2006). This is the first report of *P. cinnamomi* as root pathogen of yellow lupin.

Acknowledgements

The authors want to thanks D.R. Rose (The Forest Authority, UK) for reviewing the English. This work has been supported by the project AGL2009-12243-C02- 01 and Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía.

References

- Brasier, C. M. (1996). *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annals of Forest Science*, 53, 347–358.

- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul: APS.
- French-Monar, R. D., Jones, J. B., & Roberts, P. D. (2006). Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Disease*, 90, 345–350.
- Gallego, F. J., de Algaba, A. P., & Fernández-Escobar, R. (1999). Etiology of oak decline in Spain. *European Journal of Forest Pathology*, 29, 17–27.
- Kirby, H. W., & Grand, L. F. (1975). Susceptibility of *Pinus strobus* and *Lupinus* spp. to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 65, 693–695.
- Romero, M. A., Sánchez, J. E., Jiménez, J. J., Belbahri, L., Trapero, A., Lefort, F., et al. (2007). New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. *Journal of Phytopathology*, 155, 289–295.
- Sánchez, M. E., Caetano, P., Ferraz, J., & Trapero, A. (2002). *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *Forest Pathology*, 32, 5–18.
- Sánchez, M. E., Caetano, P., Romero, M. A., Navarro, R. M., & Trapero, A. (2006). *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. In C. Brasier, T. Jung, & W. Oßwald (Eds.), *Progress in research on Phytophthora diseases of forest trees* (pp. 149–154). Farnham: Forest Research.
- Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1985). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Bogotá: McGraw-Hill.
- Trapero, A., & Blanco, M. A. (2004). Enfermedades. (In *El cultivo del olivo*) (pp. 557–614). Madrid: Mundi-Prensa.

4.2

The role of yellow lupin (*Lupinus luteus*) in the decline affecting oak agroforestry ecosystems

María Socorro Serrano, Pilar Fernández-Rebollo, Paolo De Vita, M^a Dolores Carbonero, M^a Esperanza Sánchez

First, third and fifth authors: Agronomy Department, Agroforest Pathology, University of Córdoba, Apdo. 3048, 14080 Córdoba, Spain.

Second and fourth authors: Forestry Department, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

Corresponding author: M.E. Sánchez, e-mail: aglsahem@uco.es

Summary

Phytophthora cinnamomi is a soilborne pathogen causing root rot in Mediterranean *Quercus* species growing in ‘dehesa’ rangeland ecosystems. Recently, it has been reported causing wilting and death of *Lupinus luteus* (yellow lupin), a spontaneous plant in southern Spain rangelands, but also frequently sowed for livestock grazing. In soils artificially infested with *P. cinnamomi* chlamydospores and planted with different cultivars of yellow lupin, a significant increase in the density of propagules was detected in comparison with the initial levels of inoculum and with the infested but not planted soil (control). In oak-rangelands in which yellow lupine was planted, isolation and counting of colonies of *P. cinnamomi* from soil samples have shown the ability of this plant to maintain or even increase the inoculum density and thus facilitate the infection of trees. Results suggested that cultivation of yellow lupin in oak-rangeland ecosystems should be avoided whether oak trees are affected by root disease caused by *P. cinnamomi* or not. This leguminous plant can act as an inoculum reservoir or even enhance inoculum soil levels available for oak root infections, exacerbating the oak decline severity in the region.

1 Introduction

Since the early 1990’s, a severe decline is affecting Mediterranean *Quercus* species in southern Spain and Portugal, causing defoliation and death of cork oak (*Q. suber* L.) and holm oak [*Quercus ilex* L. ssp. *Ballota* (Desf.) Samp.] throughout the region (Sánchez *et al.* 2006). Root rot caused by the soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* Rands has been reported as the main cause of decline and death of *Quercus* spp. in the south of the Iberian Peninsula (Brasier 1996; Gallego *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2002, 2006), accompanied by a significant decrease in acorn and cork production. *Phytophthora* disease is killing thousands of trees every year (Sánchez *et al.* 2006; Romero *et al.* 2007a) in oak agroforestry ecosystems called ‘dehesa’ (Linares 2007). The ‘dehesa’ is an open woodland forest ecosystem created and maintained by humans and their livestock. The ‘dehesa’ ecosystem spans an area of 3.2 million ha, covered by cork or holm oak at a density around 20–60 trees ha⁻¹. Monospecific holm oak ‘dehesa’ is more frequent and covers an area of about 820 000 ha in Spain (Carevic *et al.* 2010). Similar systems occur mainly in Portugal, Crete, Sardinia and northern Greece, North

Africa and California. The understory of this oak woodland is composed of a mosaic of grasslands, shrublands and croplands, where cattle, sheep and pigs are extensively bred. Current income from ‘dehesa’ is obtained mainly from livestock and hunting, although other remunerative products are possible (fuelwood, mushrooms and honey). Acorns constitute a valuable food resource for game and non-game wild species, and especially for Iberian pigs, which are fed largely on acorns from *Quercus* trees. These open woodlands are important not only as a source of income, but also because of their ecological and landscape values. ‘Dehesas’ are listed among the habitat types protected under the European Union’s Directive on Habitats.

The holm oak in the ‘dehesa’ are threatened by poor or even non-existent tree regeneration, although the acorn production is many times higher in ‘dehesas’ than in natural holm oak forests (Pulido and Díez 2005), and the dramatic effects of decline caused by *P. cinnamomi* (Sánchez *et al.* 2006).

Some characteristics of *P. cinnamomi* make its control difficult (Erwin and Ribeiro 1996), such as its large host range, consisting mainly of woody species. Among the few herbaceous plants reported as *P. cinnamomi* hosts, there are some belonging to the genus *Lupinus* (Kirby and Grand 1975; Erwin and Ribeiro 1996; Fernández *et al.* 2008). *Lupinus luteus* L. (yellow lupin) is a spontaneous plant in these agroecosystems, but it is also commonly sown in oak rangelands in south-western Spain and southern Portugal, mainly for animal grazing, sometimes in sites with known presence of *P. cinnamomi* in the soil (Romero *et al.* 2007b). In these rangelands, oak trees are suffering *Phytophthora* root rot, and foci of wilted lupin plants have been frequently detected (Fernández *et al.* 2008). The presence of these diseased lupin foci is also common in sites where oaks have disappeared, killed by *P. cinnamomi* (Fernández *et al.* 2008). Artificial inoculations demonstrated the susceptibility of *L. luteus* to *P. cinnamomi*, causing yellowing and wilting of leaves, root rot and death (Fernández *et al.* 2008), the same symptoms observed in the field in lupins infected by *P. cinnamomi*. Based on this background, the main objective of this work was to evaluate the ability of *L. luteus* to modify the pathogen density in the soil to elucidate the possible role that this herbaceous crop can play in the increasing severity of the root rot and oak death caused by the pathogen in these agroforestry ecosystems.

2 Material and methods

2.1 Variation of inoculum density in the soil under controlled conditions

The experiment was performed to evaluate the influence of different *L. luteus* cultivars on *P. cinnamomi* soil inoculum density. Four cultivars of *L. luteus*, ‘Cardiga, ‘Juno, ‘Nacional and ‘Paris, were tested. Seeds were previously washed in 10% sodium hypochlorite, subsequently rinsed in sterile distilled water and incubated in wet chambers with 12 h light per day at 22°C for 3 days, until the radicle just emerged (Caetano 2007). Pre-germinated seeds were sown in plastic trays containing wet vermiculite and incubated in a growth chamber (12 h light x day⁻¹, 22°C) for 7 additional days. Twenty 10-day-old plants from each cultivar were transferred to plastic trays containing 8 l of sand peat (1 : 1 vol) colonized with *P. cinnamomi* (PE90, isolated from holm oak roots and stored in mineral oil) chlamydospores in water suspension, prepared as described in Sánchez *et al.* (2002). The isolate was grown in Petri dishes containing carrot broth (20 ml per plate) at 20°C in darkness. After 1 month of growth, the liquid medium was filtered in sterile conditions. Mycelium obtained was washed, put into sterile water, shaken and mixed for 3 min. Inoculum was adjusted to 1.5×10^4 chlamydospores x ml⁻¹ (Romero *et al.* 2007b), and 800 ml was added to each tray. Three trays (replicates) with 40 plants each were prepared per cultivar. Another three trays containing infested soil without lupin plants were used as control. Trays (15 in total) were incubated in a growth chamber with 12 h photoperiod, 18–24°C and watered as needed. Soil samples were taken weekly, using a sterile plastic tube 2.5 cm in diameter and 12 cm long (50 ml approximately). The soil column obtained from each tray was separately air dried and sieved (2-mm pore size). Dry soil samples were processed by soil extensions on Cornmeal agar–Nystatine–Ampicilline–Rifamicin–Pentachloronitrobenzene–Hymexazol (NARPH) medium as described in Romero *et al.* (2007b). Ten grams of homogenized dry soil was suspended in 200 ml sterilized water–agar (0.2%) and shaken. One milliliter of aliquots were taken from the soil–water–agar mix and plated on Petri dishes containing 20 ml of NARPH medium, using a sterile glass spreader to distribute the material over the agar surface. This dilution was previously shown to produce a countable number of *P. cinnamomi* colonies from soil samples of declining oaks, varying between 30 and 130 propagules per gram of soil (Romero *et al.* 2007b). For each soil sample, a total of 20 Petri dishes were prepared.

Dishes were incubated at 24°C in the dark for 24 h, and then the agar surface of each plate was washed with sterile water, removing the soil–water–agar mix. Dishes were re-incubated at 24°C in darkness for another 48 h. Colonies obtained were identified by direct observation under the inverted microscope by the clustered hyphal swellings typical of *P. cinnamomi* (Erwin and Ribeiro 1996; Sánchez *et al.* 2002; Romero *et al.* 2007b) and counted. Lupin mortality was evaluated daily, and 25 days after inoculation, segments from lupin roots were plated on NARPH medium for re isolation of the pathogen. Inoculum densities were expressed as cfu x g⁻¹ (colony-forming units per gram of dry soil). ANOVA was performed with density data converted to (cfu ⊕ g⁻¹)^{1/2} (Steel and Torrie 1985), and mean values were compared by the Fisher's protected least significant difference (LSD) test (Steel and Torrie 1985) for p < 0.05.

2.2 Variation of inoculum density in the soil under field conditions

To evaluate the influence of *L. luteus* crops on soil inoculum density under field conditions, four holm oak rangelands were chosen in Huelva (south-western Spain). In all four sites, yellow lupin was sown for animal grazing. Three open forests were chosen from those previously studied, because the presence of *P. cinnamomi* in the soil and roots of diseased holm oaks was already known (Romero *et al.* 2007b). The fourth site was a grassland recently forested (10-year-old trees) and free of oak root disease.

One focus of symptomatic lupins was marked in each site, and soil samples were taken at 1-m intervals, beginning in the centre of the focus. A total of 10 samples were taken per focus, covering a radius of 10 m. Chemical soil analysis for the four rangelands was performed at the Agricultural Laboratory (Junta de Andalucía, Spain), including pH determination. The first sampling was carried out in spring, when lupin plants start flowering, and a second one was performed in summer when lupin plants were naturally wilting, in the same marked foci. Each individual soil sample was taken using a sterile plastic tube of 2.5 cm in diameter and 12 cm long (50 ml approximately), and the soil column obtained was processed in the manner described previously for soil samples taken under controlled conditions. Colonies obtained and identified as *P. cinnamomi* were equally counted.

ANOVA was performed to compare inoculum densities among sites in spring or summer. Other ANOVA compared inoculum densities between spring and summer separately for each site. For each ANOVA, data of inoculum densities were converted to $[(\text{cfu} \times \text{g}^{-1}) + 0.5]^{1/2}$ (Steel and Torrie 1985) and mean values compared by the Fisher's protected LSD test for $p < 0.05$ (Steel and Torrie 1985).

3 Results

The colonies obtained in NARPH medium, both from controlled or field experiments, showed subspherical hyphal swellings, mainly in terminal clusters, typical of *P. cinnamomi*. Chlamydo spores were also abundant, smooth walled, spherical in shape, and they were both in terminal and intercalary location. Table 1 shows the average inoculum densities obtained for each yellow lupin cultivar and control soil during the time of the experiment. As expected, ANOVA and comparison of means for the first soil sampling (week 0) showed no significant differences in inoculum density among trays, planted with lupin cultivars or not. However, over the weeks, there was an increase in inoculum density in the trays planted with lupins that was not observed in the control trays. This increase became significant ($p < 0.05$) 4 weeks after soil infestation for all four cultivars in comparison with the control (Table 1). Plant mortality at this time reached more than 80% for the four cultivars tested, rising to 90% for the cv. Paris. *Phytophthora cinnamomi* was re-isolated from necrotic plant roots of each yellow lupin cultivar.

Chemical soil analysis (Table 2) showed a very low level of variation among sites. In field conditions, inoculum densities found in the four sites tested, in both sampling events, are shown in Table 3. Analysis of variance and comparison of means among sites in spring showed that site 1 exhibited an inoculum density significantly lower than the other three sites, but summer density values did not differ among sites.

The comparison of mean values in spring vs. summer for each site appears in Table 3. At sites 1 and 2, inoculum density increased, although the increase was significant only for site 1. In contrast, at sites 3 and 4, inoculum density decreased, but the difference was significant only for site 3.

Table 1 Average values of *P. cinnamomi* density (cfu*g⁻¹) and standard error in soil planted with *L. luteus* and control soil along the time. For Week 4, values with the same letter do not differ significantly according to Fisher's LSD test (P < 0.05) (Steel and Torrie, 1985)

Plant material	Inoculum density in the soil (cfu*g ⁻¹)				
	Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
<i>L. luteus</i> cv. Paris	41.0 ± 11.0	46.0 ± 14.4	124.5 ± 68.4	386.2 ± 127.6	959.7 ± 139.8 a
<i>L. luteus</i> cv. Cardiga	16.5 ± 3.3	67.7 ± 20.4	182.0 ± 40.4	701.3 ± 324.8	754.5 ± 127.6 a
<i>L. luteus</i> cv. Juno	26.2 ± 11.8	44.3 ± 11.6	65.2 ± 13.9	470.5 ± 289.0	310.8 ± 56.2 b
<i>L. luteus</i> cv. Nacional	40.5 ± 7.1	66.5 ± 18.9	114.5 ± 61.7	546.0 ± 90.0	659.8 ± 239.0 a
Control	12.3 ± 1.1	24.5 ± 5.6	21.7 ± 4.5	56.33 ± 5.9	46.8 ± 15.0 c

Table 2 Chemical characteristics of soils where *Lupinus luteus* was suffering the root disease caused by *Phytophthora cinnamomi*.

	Minimum value	Maximum value
pH (water)	5.00	6.00
OM (organic matter) g x kg ⁻¹	27.10	35.20
CEC (cation exchange capacity) (meq x kg ⁻¹)	94.80	125.20
Ca (exchangeable calcium) (meq x kg ⁻¹)	20.03	55.80
K (exchangeable potassium) (meq x kg ⁻¹)	2.20	3.40
Mg (exchangeable magnesium) (meq x kg ⁻¹)	19.90	40.20
Na (exchangeable sodium) (meq x kg ⁻¹)	2.10	2.30
P [available phosphorus (Olsen)] mg x kg ⁻¹	2.10	4.30

4 Discussion

Phytophthora cinnamomi is an aggressive pathogen causing wilting and death in different *L. luteus* cultivars (Fernández *et al.* 2008). The same pathogen also causes severe root rot on Mediterranean *Quercus* species (Brasier 1996; Gallego *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2002, 2006), with which yellow lupin shares habitat in 'dehesa' ecosystems in southern Spain.

Table 3 Average soil inoculum densities (cfu*g⁻¹) of *Phytophthora cinnamomi* and standard error from different oak rangelands. For each row (Spring- Summer), values with the same letter do not differ significantly according to Fisher's LSD test (P< 0.05) (Steel and Torrie, 1985)

Site	Inoculum density in the soil (cfu*g ⁻¹)	
	Spring	Summer
1	0.3 ± 0.1 a	13.3 ± 4.6 b
2	6.6 ± 2.9 a	10.8 ± 3.8 a
3	17.4 ± 6.4 a	1.9 ± 0.7 b
4	19.3 ± 5.9 a	9.5 ± 2.6 a

LSD, Least Significant Difference

Under controlled conditions, all the tested cultivars of *L. luteus* were infected by *P. cinnamomi* and inoculum densities in the soil significantly increased in comparison with infested soil without plants, suggesting the ability of this herbaceous crop to multiply the inoculum available in the soil. In field conditions, values of inoculum densities in spring were in the usual range found in soils where oak trees are suffering the root disease, between 10 and 49 cfu x g⁻¹ of dry soil (Romero *et al.* 2007b), with the exception of site 1, where levels of *P. cinnamomi* in soil were very low. Oak trees at site 1 remained asymptomatic in late summer, but, based on the results, it can be predicted that they are at risk from *Phytophthora* root infection, knowing the high values of pathogen density in the soil in summertime. It would be very interesting to follow oak trees health status in this site, especially considering that autumn and winter of 2009–2010 were very wet in the region, leading to soil waterlogging and, as a consequence, favouring pathogen dispersion and tree root infections (Stern *et al.* 1977; Sánchez *et al.* 2002).

From all these results, we can conclude that *L. luteus* crops highly influence the multiplication of the inoculum of *P. cinnamomi* in oak-rangeland systems, enhancing root disease pressure on its woody hosts. This situation has been previously reported for other soilborne pathogens, such as *Verticillium dahliae*. This pathogen has a wide range of woody hosts, including olive, and a high number of herbaceous hosts (solanaceous,

cucurbitaceous, malvaceous, rosaceous, ornamentals and weeds) (Smith *et al.* 1992). Infections of herbaceous hosts, even when asymptomatic, enhance multiplication and dispersal of the pathogen. This situation has been already described for wheat and barley as asymptomatic hosts of *V. dahliae* (Smith *et al.* 1992). For this reason, these horticultural crops are not recommended in olive orchards, and there is a need to maintain good weed control (Blanco-López *et al.* 1994). In other agricultural systems, weeds growing between rows or in the crop margins can also act as alternative hosts. This is the case with *Phytophthora capsici*, which can survive by infecting weeds when there are no horticultural hosts in the fields, or when there are no oospores in the soil (French-Monar *et al.* 2006). In Portugal, some shrub species from the families Ericaceae, Cistaceae and Leguminosae have been reported as *P. cinnamomi* hosts, showing disease symptoms or even death of plants (Moreira and Martins 2005). These spontaneous plants, as *L. luteus*, can increase inoculum production and survival, acting as *P. cinnamomi* reservoirs (Moreira and Martins 2005).

In oak-grassland ecosystems, the presence of resistant spores of *P. cinnamomi* (chlamydospores) produced in infected roots of infected holm and cork oaks (Romero *et al.* 2007b) can provide inoculum for yellow lupin root infection. In the same way, the infection of yellow lupin plants leads to new chlamydospore production in the infected roots, enhancing *P. cinnamomi* inoculum densities in oak-grassland soils where this legume is sown.

Jayasekera *et al.* (2006) reported the behaviour of *P. cinnamomi* as pseudo-homothallic in roots of *Lupinus angustifolius*, producing oospores under the influence of root exudates coming from different varieties of *Acacia pulchella* (Fagaceous shrub endemic in Eucalyptus forests from western Australia, and resistant to *P. cinnamomi* (Jayasekera *et al.* 2006)). At the moment, in south-western Spain, there are no reports of sexual reproduction in *P. cinnamomi*. Nevertheless, the possible presence of oospores in infected roots of herbaceous (lupins included) or shrubs native of ‘dehesa’ forestry ecosystems should be investigated, taking into account that these spores can play an important role in the variability and adaptability of the pathogen in the region. Caetano *et al.* (2009) reported high genetic variability among *P. cinnamomi* individuals isolated from cork and holm oak trees from oak-grassland systems located in southern Spain and Portugal, unusual for a microorganism only reproducing in an asexual way.

Finally, the significant decrease in inoculum density observed in site 3 is remarkable. This oak-grassland system maintains high Iberian pig densities, and fertilization with their manure could have caused the inoculum decrease. Based on these results, we have begun research into the control of oak root rot caused by *P. cinnamomi* using animal manures as biological tools against the pathogen.

The results obtained suggest that cultivation of yellow lupin should be avoided in oak-rangelands affected by *Quercus* root disease caused by *P. cinnamomi*, as this leguminous crop can act as an inoculum reservoir or even enhance soil inoculum levels available for oak root infection, exacerbating oak decline severity in the region. In oak-rangelands not affected by the oak root infection, *L. luteus* crops should also be avoided, because they can favour increases in the initially low levels of inoculum available for tree infections and, consequently, may seriously endanger the already difficult survival of trees in ‘dehesa’ agroforestry ecosystems in south-western Spain.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the Oficina Comarcal Agraria of Puebla de Guzmán (Huelva), for helping us in the field work. This work has been supported by the project AGL2009-12243-C02-01 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain) and Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía (Spain).

References

- Blanco-López, M.A.; Rodríguez Jurado, D.; Jiménez Díaz, R.M., 1994: La verticilosis del olivo. *Agricultura* 746, 777–780.
- Brasier, C.M., 1996: *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. For. Sci.* 53, 347–358.
- Caetano, P.C.L., 2007: Envolvimento de *Phytophthora cinnamomi* no declínio de *Quercus suber* e *Q. rotundifolia*: estudo da influência de factores bióticos e abióticos na progressão da doença. Possibilidades de controlo químico do declínio. Ph.D Dissertation, University of Algarve, Faro, Portugal.

- Caetano, P.; Ávila, A.; Sánchez, M.E.; Trapero, A.; Coelho, A.C., 2009: *Phytophthora cinnamomi* populations on *Quercus* forests from Spain and Portugal. In: *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*. Coord. by Goheen, L.M.; Frankel, S.J. Albany, CA: USDA Forest Service, Technical Report PSW-GTR-221. pp. 261–269.
- Carevic, F.S.; Fernández, M.; Alejano, R.; Vázquez-Piqué, J.; Tapias, R.; Corral, E.; Domingo, J., 2010: Plant water relations and edaphoclimatic conditions affecting acorn production in a holm oak (*Quercus ilex* L. ssp. *ballota*) open woodland. *Agroforest. Syst.* 78, 299–308.
- Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K., 1996: *Phytophthora Diseases Worldwide* St. Paul, MN: APS Press.
- Fernández, P.; Serrano, M.S.; De Vita, P.; Carbonero, M.D.; Sánchez, M.E., 2008: Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* on *Lupinus luteus* growing in Mediterranean *Quercus* grasslands. *J. Plant Pathol.* 90, S2.177.
- French-Monar, R.D.; Jones, J.B.; Roberts, P.D., 2006: Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. *Plant Dis.* 90, 345–350.
- Gallego, F.J.; de Algaba, A.P.; Fernández- Escobar, R., 1999: Etiology of oak decline in Spain. *Eur. J. Forest Pathol.* 29, 17–27.
- Jayasekera, A.U.; McComb, J.A.; Shearer, B.L.; Hardy, G.E.St.J., 2006: In planta selfing and oospore production of *Phytophthora cinnamomi* in presence of *Acacia pulchella*. *Mycol. Res.* 111, 355–362.
- Kirby, H.W.; Grand, L.F., 1975: Susceptibility of *Pinus strobus* and *Lupinus* spp. to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 65, 693–695.
- Linares, A.M., 2007: Forest planning and traditional knowledge in collective woodlands of Spain: The dehesa system. *For. Ecol. Manage.* 249, 71–79.

- Moreira, A.C.; Martins, J.M.S., 2005: Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. For. Pathol. 35, 145–162.
- Pulido, F.J.; Díez, M., 2005: Regeneration of a Mediterranean oak: a whole cycle approach. Eco Science 12, 92–102.
- Romero, R.; Navarro, R.M.; García-Ferrer, A., 2007a: Aplicación de ortofotos para la estimación de pérdida de individuos en dehesas de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) afectadas por procesos de decaimiento. Bol. Sanid. Veg. Plagas 33, 121–137.
- Romero, M.A.; Sánchez, J.E.; Jiménez, J.J.; Belbahri, L.; Trapero, A.; Lefort, F.; Sánchez, M.E., 2007b: New *Pythium* Taxa Causing Root Rot on Mediterranean *Quercus* Species in Southwest Spain and Portugal. J. Phytopathol. 155, 289–295
- Sánchez, M.E.; Caetano, P.; Ferraz, J.; Trapero, A., 2002: *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. For. Pathol. 32, 5–18.
- Sánchez, M.E.; Caetano, P.; Romero, M.A.; Navarro, R.M.; Trapero, A., 2006: *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. In: Progress in Research on *Phytophthora* Diseases of Forest Trees. Ed. by Brasier, C.; Jung, T.; Oßwald, W. Farnham, UK: Forest Research, pp. 149–154.
- Smith, I.M.; Dunez, J.; Lelliott, R.A.; Phillips, D.H.; Archer, S.A., 1992: Manual de enfermedades de las plantas. Madrid: Mundiprensa.
- Steel, R.G.D.; Torrie, J.H., 1985: Bioestadística: Principios y procedimientos. Bogotá: McGraw-Hill.
- Stern, R.E.; Zentmyer, G.A.; Kaufmann, M.R., 1977: Effect to matric potential, soil texture, and soil amendment on root disease caused by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 67, 1495–1500.

Figura 26. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en *Lupinus luteus*

Dehesas de encina en primavera sembradas con altramuz amarillo, donde se llevaron a cabo los muestreos en campo: **a)** Finca 1, repoblación de 10 años de edad, en la que las encinas jóvenes no mostraban síntomas de la enfermedad radical causada por *P. cinnamomi*, **b)** Finca 2 y **c)** Finca 3, con el arbolado mostrando síntomas de podredumbre radical (defoliación y puntisechado de ramas). **d)** Finca 4, oquedal generado por la muerte de las encinas debido a la podredumbre radical. Nótese en las fotografías **(c)** y **(d)** los rodales de altramuces sintomáticos. **e)** Detalle de altramuz amarillo con síntomas de podredumbre radical causada por *P. cinnamomi*: amarillez, marchitez y muerte de la planta. **f)** Parcela experimental situada en el centro del foco de enfermedad en la Finca 3. **g)** Toma de muestras de suelo en verano, con el cultivo ya agostado.



4.3

Susceptibility of common herbaceous crops to *Phytophthora cinnamomi* and its influence on *Quercus* root rot in rangelands

María Socorro Serrano, Pilar Fernández-Rebollo, Paolo De Vita, María Esperanza
Sánchez Hernández

First, third and fourth authors: Agronomy Department, Agroforest Pathology, University of Córdoba,
Apdo. 3048, 14080 Córdoba, Spain.

Second author: Forestry Department, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

Corresponding author: M.E. Sánchez, e-mail: aglsahem@uco.es

Abstract

The susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* of four crops commonly planted in rangeland ecosystems in southern Spain (wheat, oat, vetch, and yellow lupin) has been evaluated. By means of artificial inoculations with the pathogen, positive isolations from infected roots of yellow lupin (symptomatic) and vetch (asymptomatic) were obtained, but never from wheat and oat (asymptomatic). Through *in vitro* infection experiments, it was demonstrated that yellow lupin highly stimulated the production of zoospores of *P. cinnamomi*. Vetch, wheat, and oat did not stimulate zoospore production. Under controlled conditions, only yellow lupin induced an increase in the viability of chlamydospores in the soil. We concluded that the culture of wheat, oat, and vetch in rangelands did not influence the epidemiology of the *Quercus* root disease, even when asymptotically-infected vetch is grown, and they can constitute an alternative to the culture of yellow lupin in rangeland ecosystems affected by *Quercus* root rot.

Key words: Dehesa; Holm oak; Oat; Vetch; Wheat; Yellow lupin

Introduction

The most typical forest ecosystems present in the south of Spain are oak rangelands (“dehesas”) in which livestock is the main productive activity (Costa et al. 2006). Livestock feeding mainly depends on natural grasses, but herbaceous crops are frequently planted to provide food for livestock during the summer. The commonest forage crops in rangeland ecosystems are oat, wheat, oat and vetch, and yellow lupin (Cera, 1986; Costa et al. 2006). The last one was frequently sowed in the 1980s (Cera, 1986).

Holm and Cork oaks are suffering an important decline in rangeland ecosystems leading to high economical and ecological losses. The Commission of Environment and Agriculture of the Spanish Government (2010) estimated an average annual loss of productivity for rangelands due to oak decline at more than 1 million €. The main disease associated with the decline is a root rot caused by the oomycete *Phytophthora cinnamomi* (Brasier, 1996; Sánchez et al. 2002; 2006). Control of the pathogen is difficult, because of its capacity to invade the soil at great depths, its fast dispersion in

waterlogged soils, and its high number of woody hosts (Erwin and Ribeiro, 1996). However, *P. cinnamomi* also infects some herbaceous species, mainly belonging to the genus *Lupinus* (Erwin and Ribeiro, 1996; Serrano et al. 2010).

Several pathogens have been described causing root rot of wheat. *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium graminearum*, and *Bipolaris* spp. cause weakening and general wilting (Wiese, 1987; Murray et al. 2009). *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. produce root rot and damping-off (Wiese, 1987; Murray et al. 2009). According to Larsson and Gerhardson (1990), *Phytophthora cryptogea* causes root rot and death of wheat seedlings and mild symptoms on roots of oat.

On the other hand, the number of described diseases of legumes usually grown in rangelands is quite low. Vetch is very susceptible to parasitic plants of the genus *Orobancha* (*O. aegyptiaca* and *O. crenata*) (Goldwasser et al. 2000). In France, vetch has been described as a host of the oomycete *Aphanomyces euteiches* that causes root rot (Wicker et al. 2001). *Rhizoctonia* spp. can cause root rot in lupins (Allen and Lenné, 1998). In the Spanish rangeland ecosystems, yellow lupins appeared to be very susceptible to root rot caused by *P. cinnamomi* which as a pathogen reservoir for oak root infection (Serrano et al. 2010; 2011a).

The aim of this study has been to evaluate the susceptibility of the main herbaceous crops in Spanish “dehesas” (wheat, oat, and vetch) to *P. cinnamomi* and their influence in the pathogenic cycle of *P. cinnamomi*.

Material and methods

In all the experiments, one isolate of *P. cinnamomi* obtained from roots of Holm oak (PE 90) was used (Sánchez et al. 2003). It came from the fungal collection of the Agronomy Department of the University of Córdoba.

Evaluation of the susceptibility of herbaceous crops to *P. cinnamomi*

Commercial seeds of oat (*Avena sativa* L.), wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Cracklin), vetch (*Vicia sativa* L. cv. BORDA DA-4), and four cultivars of yellow lupin (*Lupinus luteus* L.): Paris, Cardiga, Nacional and Juno (known hosts of *P. cinnamomi* (Serrano et al. 2010; 2011a)) were selected. Plants were obtained according with the methodology

described in Serrano et al. (2010) from seeds disinfested in 10% sodium hypochlorite, rinsed in sterile distilled water and incubated in moist chambers (12 h light per day, 22°C, 3 days) until the radicle just emerged from the seed and at this time, all seeds were planted in trays containing peat. Ten-days old (yellow lupin), 7-days old (vetch) and 5-days old (wheat and oat) plants were transplanted to disinfested plastic trays containing 7 l of infested substrate peat:sand (1:1 vol.). The substrate was infested with an aqueous suspension of chlamydospores of *P. cinnamomi* (Romero et al. 2007) (500 chlamydospores \times ml⁻¹ of soil). For each species or cultivar one tray with 30 plants each was prepared. All the trays were incubated in growth chambers with a 12 h light/dark period, at 24 \pm 2° C (day temperature) and 18 \pm 2° C (night temperature). The substrate was watered to field capacity. After 2 weeks of incubation, samples of rootlets were taken from six plants of each crop for isolation of the pathogen. Segments of roots (3-4 mm long) were washed under running tap water and plated on selective NARPH medium (Romero et al. 2007). Three plates per plant species or cultivar containing six root pieces were prepared and the plates were incubated in a growth chamber for 3-4 days at 22° C in the dark. The fungal colonies were identified by direct observation of characteristically clustered hyphal swellings of *P. cinnamomi* (Erwin and Ribeiro, 1996) under an inverted compound microscope and counted. Isolation was expressed as percentage of infected root segments yielding one colony from the total number of root segments plated. From the first positive isolation for any crop, samples were taken weekly. Moreover, presence or absence of aerial symptoms (wilting and defoliation) or radical lesions in the plants were recorded.

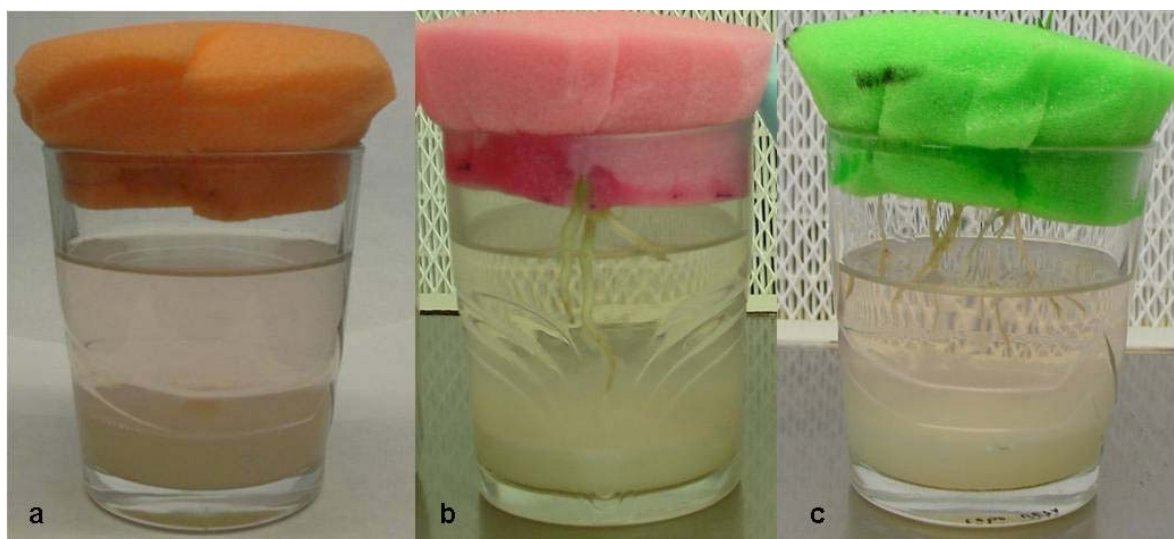
At the end of the experiment, histologically thin sections of infected roots of vetch and lupin were made and stained with an aqueous solution of toluidine blue (0.05%) for observations under the compound microscope and to check for *P. cinnamomi* infection of the roots.

Effect of the crops on *P. cinnamomi* zoospore production

The ability of the crops to stimulate zoospore release of *P. cinnamomi* was evaluated by *in vitro* experiments. The isolate of *P. cinnamomi* was plated in Petri dishes containing CA medium (Carrot-Agar 20%, Dhingra and Sinclair, 1995) and incubated for 3 days at 22° C in the dark. Six mm diameter agar plugs from the margin of the colonies were

placed in the center of sterilized glass beakers (250 ml vol.) containing 35 ml of PA medium (Pea-Agar 20%, Trione, 1974). The beakers were incubated for 3 days at 22° C in the dark. At that time, 125 ml of sterilized saline solution MSS (Chen and Zentmeyer, 1970) were poured in to each beakers to stimulate sporangial production. Young plantlets of each species (wheat, oat, vetch, and yellow lupin cv. Juno) were grown from seeds sowed in moist chambers for 7 days according to the methodology described in Serrano et al. (2010). The plantlets were clamped in 40 mm-thick sterilized polyurethane plugs acting as lids for the beakers, leading to the immersion of the rootlets into the liquid (Fig. 1). Six beakers with four to six plantlets each were prepared per plant species (24-36 plants) and other six containers without plants (controls) were also prepared. All the beakers were incubated in the dark at 22° C for 50 h, time required for germination of *P. cinnamomi* sporangia (Serrano et al. 2011b). After the incubation period, the production of zoospores was counted in a Neubauer chamber (0.1 µl of MSS solution).

Figure 1. Quantification of zoospore production of *P. cinnamomi*: a) Control glass beaker without plants, b) glass beaker planted with yellow lupin, and c) beaker planted with vetch.



ANOVA was performed with data converted to $(\text{number of zoospores ml}^{-1})^{1/2}$ (Steel and Torrie, 1985) and mean values were compared by Fisher's LSD test (Steel and Torrie, 1985) for $P < 0.05$. Statistix software was used for statistical analyses (Analytical Software, Tallahassee, USA).

Effect of the legumes on the viability of *P. cinnamomi* chlamydospores

The effect of vetch and yellow lupin on the viability of *P. cinnamomi* chlamydospores in the soil was evaluated. Furthermore, the susceptibility to root rot of each legume was compared. Ten or 7 days-old plants of yellow lupin and vetch, respectively produced according to the same methodology described above were planted in trays containing 8 l of infested peat. For soil infestation, an aqueous suspension of chlamydospores of *P. cinnamomi* (10^3 chlamydospores \times ml $^{-1}$ of soil) was added (Romero et al. 2007). For each species, three trays (repetitions) were prepared with 20 plants each, plus three additional trays per plant species containing uninfested soil. Another three trays containing infested soil but without plants served as controls. All the trays were incubated in growth chambers with 12 h light/dark at 20-24° C. The substrate was watered with tap water to field capacity. Soil humidity was maintained until the end of the experiment, 5 weeks later.

Weekly, soil samples were taken from each tray using a sterile tube (50 ml vol.). Soil columns were air dried separately (2 days at room temperature) and sieved (2 mm pore size). Ten g of homogenised dry soil were suspended in 200 ml sterilized water-agar (0.2%) and shaken. One ml aliquots of the soil-water-agar mix were placed in Petri dishes containing 20 ml of NARPH medium (Romero et al. 2007), using a bent sterile glass rod to distribute the material over the agar surface. For each soil sample, a total of 20 Petri dishes were prepared. Dishes were incubated at 24° C in the dark for 24 h, and then the agar surface of each plate was washed with sterile water, removing the soil-water-agar mix. Dishes were incubated at 24° C in the dark for another 48 h and colonies identified by morphological characteristics and counted as described above. Densities of viable chlamydospores were expressed as colony forming units per g of dry soil (cfu \times g $^{-1}$).

At the end of the experiment, the severity of foliage and root symptoms was assessed for each plant on a 0–4 scale, according to the percentage of yellow or wilted foliage or root necrosis (0=0% necrotic tissue, 1=10–33%, 2= 34–66%, 3=more than 67%, 4=dead tissue) (Serrano et al. 2010).

ANOVA was performed with the chlamyospore data converted to $(\text{cfu} \times \text{g}^{-1})^{1/2}$ (Steel and Torrie, 1985) and also for the severity of foliage and root symptoms, and mean values were compared by Fisher's test (Steel and Torrie, 1985) for $P < 0.05$.

At the end of the experiment, the roots of plants growing in infested or non-infested soil were plated on NARPH agar medium for re-isolation of the pathogen.

Results

Evaluation of the susceptibility of herbaceous crops to *P. cinnamomi*

Percentages of isolation of *P. cinnamomi* from roots of the different crops after 6 weeks of incubation are shown in Table 1. From the second week, positive isolation of *P. cinnamomi* was obtained from every cultivar of yellow lupin, continuing until the fifth week of incubation. After 4 weeks, the pathogen was also isolated from vetch roots, but never from roots of wheat or oat.

Table 1. Average values of *P. cinnamomi* isolation from roots of the plants growing in infested soil over time. Figures are percentages of root segments yielding one colony when plated in NARPH agar medium with respect to the total number of root segments plated.

Crops	Time (weeks)				
	2	3	4	5	6
Wheat	0.0	-	0.0	-	0.0
Oat	0.0	-	0.0	-	0.0
Vetch	0.0	-	22.2	16.7	22.2
cv. Paris	33.3	22.2	33.3	33.3	-
Yellow lupin	88.9	16.7	16.7	44.4	-
cv. Nacional	33.3	0.0	27.8	16.7	-
cv. Juno	1.1	25.0	16.7	-	-

After 2 weeks, aerial symptoms (yellowing and wilting) of root disease were observed in the four cultivars of yellow lupin which increased with time. At the fifth week, the mortality of yellow lupin was about 95-100%, regardless of the cultivar. However, aerial or root symptoms were never observed in the other plant species, including vetch.

In the histological sections, the cellular structure of yellow lupin roots appeared disorganized, showing a high degree of colonization by *P. cinnamomi*. A large number of hyphal swellings and chlamydozoospores were observed. On the other hand, vetch roots appeared intact even when showing a high degree of hyphal colonization, but hyphal swellings or chlamydozoospores were never observed.

Effect of the crops on *P. cinnamomi* zoospore production

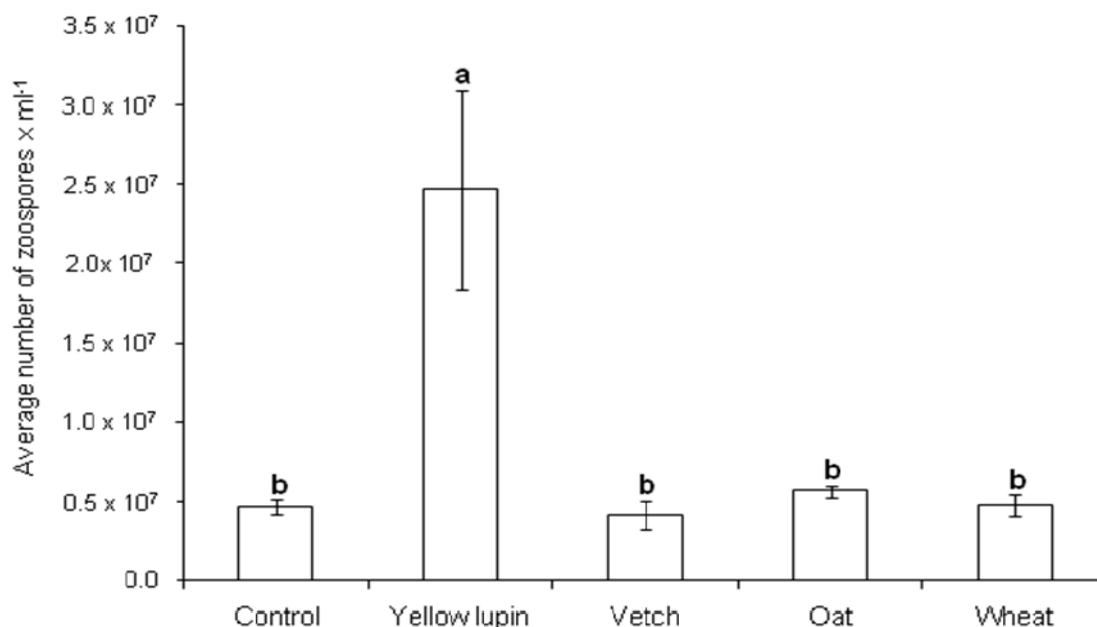
The average values of zoospore production for each plant species tested are shown in Figure 2. Yellow lupin stimulates the production of infective spores of *P. cinnamomi* significantly more than the rest of the plant species and the control treatment without plants. Vetch, oat and wheat did not differ in the production of zoospores in comparison with the control.

Effect of the legumes on the viability of *P. cinnamomi* chlamydozoospores

The density of viable chlamydozoospores present in the infested soils at weekly intervals is shown in Figure 3. The production of viable chlamydozoospores showed the same pattern in the control soil (without plants) and in planted soils, although the viable chlamydozoospore density is significantly higher in soils with yellow lupin than in the other plant species, from the second week until the end of the experiment. At week five, the density of viable chlamydozoospores in soil with yellow lupin increased significantly in comparison with week 0, while the initial and final densities of chlamydozoospores in soil with vetch and the control soil did not differ.

For both legume species, foliar symptoms of disease consisted of yellowing and wilting. Figure 4A shows the average values of aerial symptoms registered for the two legume species growing in infested or uninfested soils. Plants of yellow lupin growing in infested soil showed a severity of foliar symptoms significantly higher than plants growing in uninfested soil. The severity of aerial symptoms of vetch was not significantly different between infested or uninfested soil.

Figure 2. Average values and standard errors of indirect sporangial germination (zoospore production) of *Phytophthora cinnamomi* induced by plants tested and control without plants. Bars with different letters differ significantly according to Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



Symptoms observed in lupin roots consisted of extensive necrosis of the root systems, while the roots of vetch showed a few brown lesions. Lupins growing in soil infested with *P. cinnamomi* showed significantly higher values of root symptoms than lupins growing in uninfested soil (Fig. 4B). Vetch plants in infested soil showed a low level of necrotic lesions, but significantly higher than vetch growing in uninfested soil. When the experiment ended, mortality of lupin plants growing in the infested substrate was almost 100%, whereas only a slight but significant decrease in growth was observed in vetch planted in infested soil in comparison with vetch in uninfested soil (Fig. 5).

Phytophthora cinnamomi was re-isolated from the roots of yellow lupin and vetch growing in infested soil but never from the control plants.

Figure 3. Average values of viable chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi* ($\text{cfu} \times \text{g}^{-1}$) in the infested soils over 5 weeks of incubation. For each plant species tested, values with different letters significantly differed over time according to Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

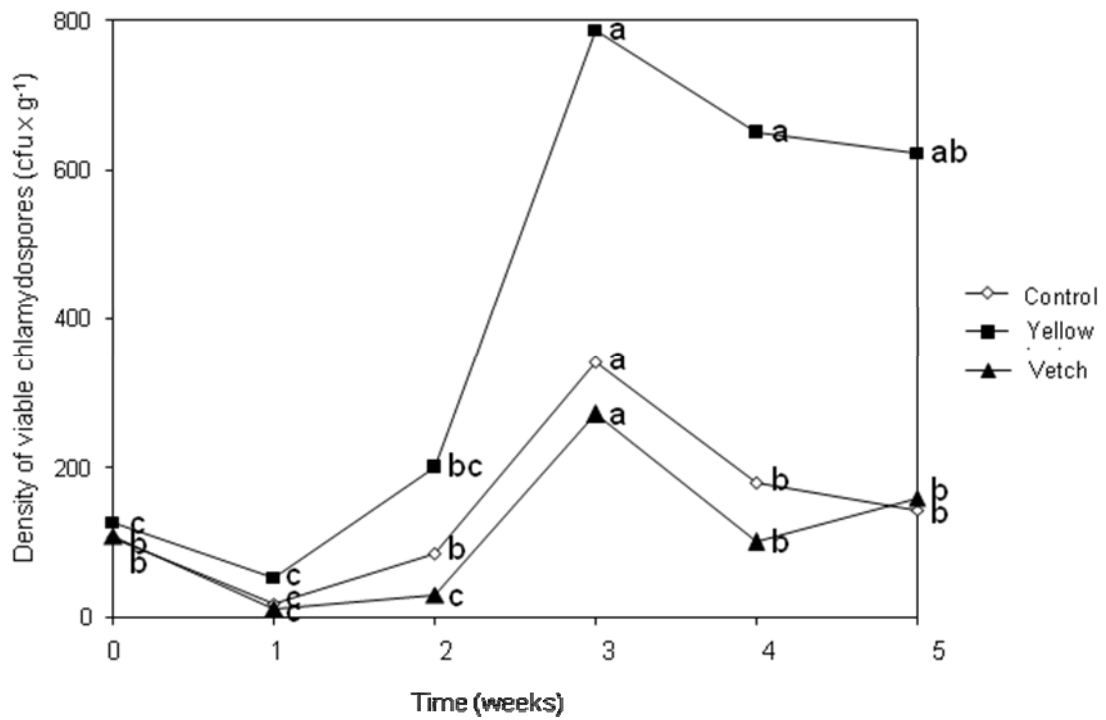


Figure 4. Average values of foliar (a) and root (b) symptoms and standard errors of legumes growing in soil infested with *Phytophthora cinnamomi* and uninfested soil. Values with different letter significantly differed according to Fisher's LSD test ($P < 0.05$).

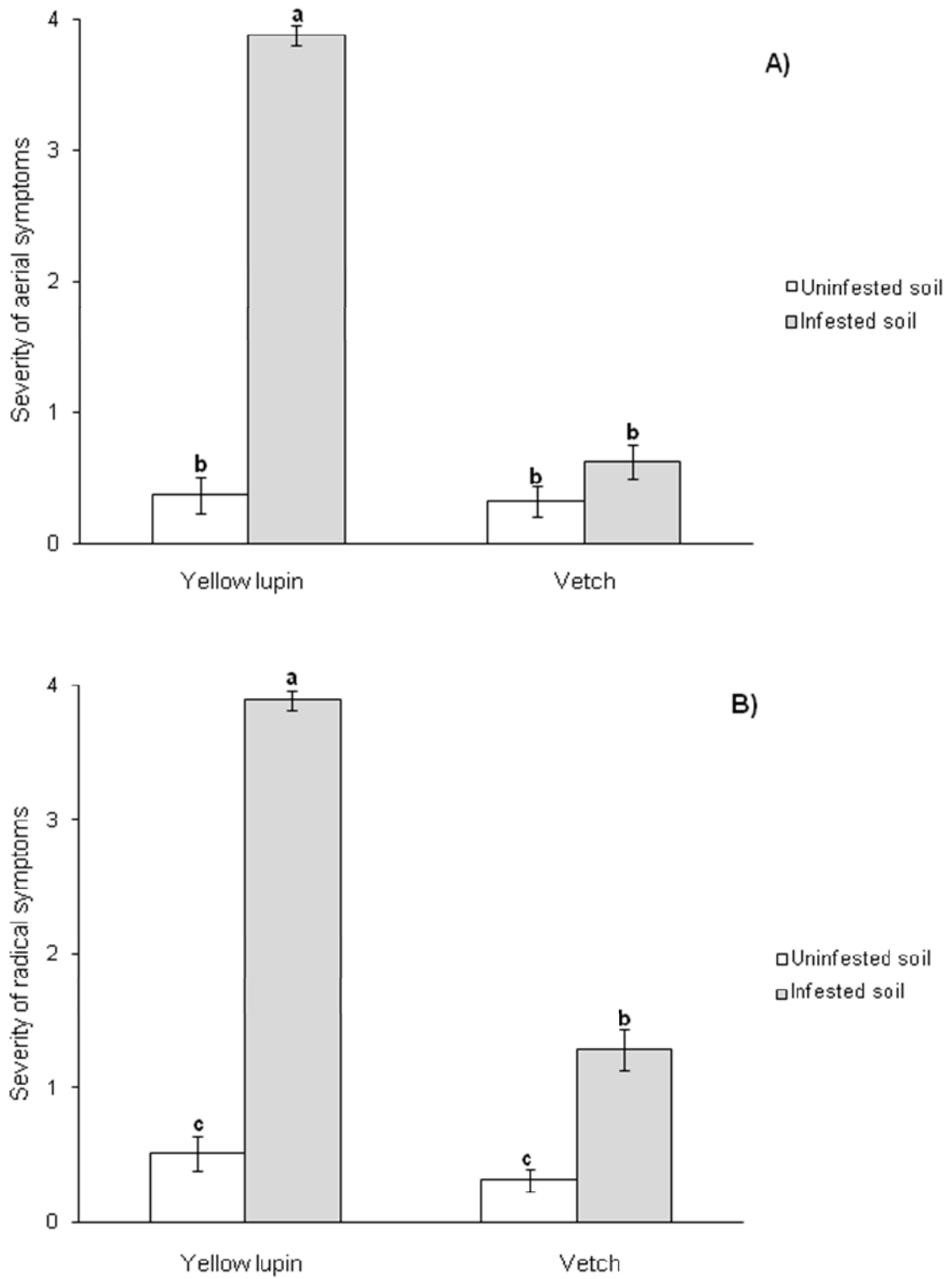
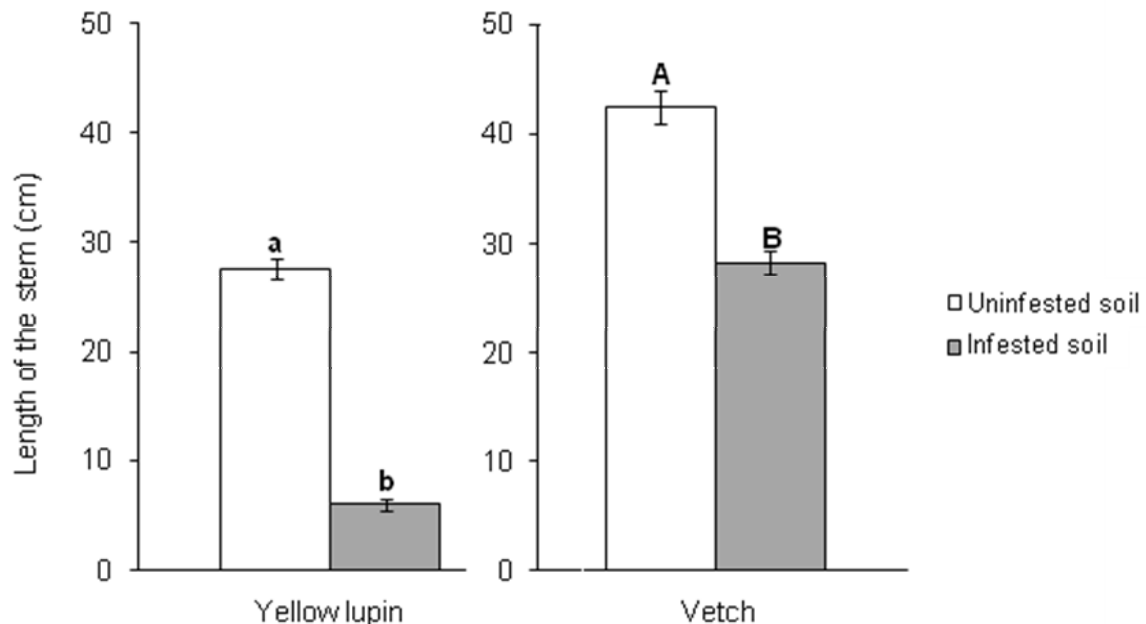


Figure 5. Average values of length of the stem and standard errors of legumes growing in soil infested with *Phytophthora cinnamomi* and uninfested soil. For each plant species, values with different letter significantly differed according to Fisher's LSD test ($P < 0.05$).



Discussion

Foci of wheat, vetch or oat plants with symptoms of root disease were never found in our observations in rangeland ecosystems affected by root rot caused by *P. cinnamomi* in southern Spain, unlike that for yellow lupin (Serrano et al. 2010). Wheat, vetch and oat do not seem to be hosts of *P. cinnamomi*. However, some cultivated grasses, like oat, barley, corn, wheat, and some weeds (*Bromus* spp., *Hordeum murinum*, *Aster squamatus*, *Avena sterilis*, *Echinochloa crus-galli*, and *Ecballium elaterium*) are asymptomatic hosts of different fungi that are pathogenic on cultivated trees and other crops (Pegg and Brady 2002; Cabeza and Bejarano 2010; Sánchez-Márquez et al. 2011). These asymptomatic herbaceous hosts stimulate the proliferation of the pathogen, acting as an inoculum reservoir, and consequently influencing the epidemiology of the root disease (Cabeza and Bejarano 2010). According to our results, wheat and oat are not susceptible to *P. cinnamomi*, since aerial and radical symptoms were never observed in plants growing in infested soil, and the microorganism was never isolated from their roots. Additionally, the roots of these cereals did not increase the production of

zoospores of *P. cinnamomi*. Braithwaite et al. (1998) described a similar situation for species of the same genus, *P. cryptogea*, *P. gonapodyides* and *P. megasperma* that were not pathogenic on wheat and oat. According to Larsson and Gerhardson (1990) however, *P. cryptogea* causes disease on roots of wheat and oat in Sweden. In conclusion, these crops would not influence the epidemiology of root rot of *Quercus* spp. in rangelands, since they do not stimulate the proliferation of the pathogen and do not enhance the dispersion of its infective propagules.

Plants of vetch growing in infested soil did not show aerial symptoms of disease; although some root lesions and a slight decrease of growth were recorded. In addition, *P. cinnamomi* was isolated from roots of vetch, but the presence of chlamydospores in roots was not observed. *Phytophthora cinnamomi* could not be described as pathogenic on vetch, even though the microorganism could infect its roots. In fact, even under controlled conditions favorable for disease development only a very low level of symptoms developed. Probably, this is the reason why symptomatic foci of vetch were never observed in field conditions, although oaks growing in the same sites were infected by *P. cinnamomi*. This situation was previously described by Rodríguez-Morcillo et al. (2000; 2002) for Verticillium wilt of cotton and olive trees caused by *Verticillium dahliae*. The fungus is a weak pathogen on garlic, onion, and rape and decreases slightly the growth of these crops when present in infested olive orchards, but these herbaceous crops remained asymptomatic and did not influence the epidemiology of the disease.

Yellow lupin is very susceptible to *P. cinnamomi* and foci of infected lupins are common in rangelands (Serrano et al. 2010; 2011a). This study, however, suggests that lupin crops could increase the viability of chlamydospores in the soil and also induce the production of zoospores that could infect oak roots.

Therefore, vetch would constitute a good legume alternative to yellow lupin in oak-rangeland ecosystems affected by root rot caused by *P. cinnamomi*, planted alone or mixed with wheat or oat that are not susceptible to *P. cinnamomi*. These options may not influence the epidemiology of the oak disease.

Acknowledgements

We acknowledge the Spanish Ministry of Science (project AGL2009-00530) and the Andalusian Agricultural Council (Junta de Andalucía, Spain) for financial support. Many thanks to Dr. W. J. Kaiser (Present address: Agronomy Department, University of Córdoba, Spain) for the critical review of the manuscript.

References

- Allen, D. J. & Lenné, J. M. (Eds). (1998). *The Pathology of Food and Pasture Legumes*. (Wallingford, UK: CAB International)
- Braithwaite, M., Alexander, B. J. R. & Adams, R. L. M. (1998). *Nationwide survey of pests and diseases of cereal and grass seed crops in New Zealand. 2. Fungi and Bacteria*. Proceedings of 51st New Zealand Plant Protection Conference, 51, 51-59
- Brasier, C. M. (1996). *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annals of Forest Science*, 53, 347-358
- Cabeza, E. & Bejarano, J. (2010). Influencia de las cubiertas vegetales sobre la epidemiología y control de las enfermedades del olivo. (In: *Aspectos agronómicos y medioambientales de la agricultura de conservación* (pp. 165-175). Madrid: Eumedia- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino)
- Cera, F. (1986). *El altramuz amarillo (“tramusilla”) su cultivo y aprovechamiento en el Andévalo onubense*. Monografías nº 3. (Sevilla: Dirección General de Investigación y Extensión Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía)
- Chen, D. W. & Zentmyer, G. A. (1970). Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia*, 62, 397–402
- Comisión de Agricultura y Medio Ambiente del Senado. (2010). *Informe de la ponencia del Senado sobre la protección del ecosistema de la dehesa*. (www.senado.es/legis9/publicaciones/pdf/senado/bocg/I0553.PDF)

- Costa, J. C. Martín, A. Fernández, P. & Estirado, M. (2006). *Dehesas de Andalucía. Caracterización ambiental*. (Sevilla: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía)
- Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1995). *Basic Plant Pathology Methods*. (Boca Raton, Fl.: CRC Press)
- Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. (St. Paul, MN.: APS Press)
- Goldwasser, Y., Plkhine, D., Ljeifield, Y., Zamski, E. & Rubin, B. (2000). The differential susceptibility of vetch (*Vicia* spp.) to *Orobanche aegyptiaca*: Anatomical studies. *Annals of Botany*, 85, 257-262
- Larsson, M. & Gerhandson, B. (1990). Isolates of *Phytophthora cryptogea* pathogenic to wheat and some other crop plants. *Journal of Phytopathology*, 129, 303-315
- Murray, T. D., Parry, D. W. & Cattlin, N. D. (2009). *A Colour Handbook of Diseases of Small Grain Cereals Crops*. (London, UK: Manson Publishing).
- Pegg, G. F. & Brady, B. L. (2002). *Verticillium wilts*. (UK: CAB International)
- Rodríguez Morcillo, V., Bejarano Alcázar, J. & Jiménez Díaz, R. M. (2000). Importancia de especies cultivadas en la supervivencia de patotipos de *Verticillium dahliae* que infectan algodónero y olivo en Andalucía. (Paper presented at X Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, Valencia, Spain)
- Rodríguez Morcillo, V., Bejarano Alcázar, J. & Jiménez Díaz, R. M. (2002). Gama de plantas huésped de los patotipos de *Verticillium dahliae* que infectan algodónero y olivo en Andalucía. (Paper presented at XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, Almería, Spain)
- Romero, M. A., Sánchez, J. E., Jiménez, J. J., Belbhari, L., Trapero, A., Lefort, F. & Sánchez, M. E. (2007). New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. *Journal of Phytopathology*, 155, 289-295
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J. & Trapero, A. (2002). *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology*, 32, 5-18
- Sánchez, M.E., Sánchez, J.E., Navarro, R.M., Fernández, P. & Trapero, A. (2003). Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 29, 87-108

- Sánchez, M.E., Caetano, P., Romero, M.A., Navarro, R.M. & Trapero, A. (2006). *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. (In: C. Brasier, T. Jung, W. Oßwald (Eds.), *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. (pp. 149-154). Farnham, UK: Forest Research)
- Sánchez-Márquez, S., Bills, G.F., Herrero, N. & Zabalgoeazcoa, I. (2011). Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology* (in press). doi:10.1016/j.funeco.2010.12.001
- Serrano, M.S., Fernández Rebollo, P., De Vita, P., Carbonero, M.D., Trapero, A. & Sánchez, M.E. (2010). *Lupinus luteus*, a new host of *Phytophthora cinnamomi* in Spanish oakrangeland ecosystems. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 149–152
- Serrano, M.S., Fernández Rebollo, P., De Vita, P., Carbonero, M.D., Trapero, A. & Sánchez, M.E. (2011a). The role of yellow lupin (*Lupinus luteus*) in the decline affecting oak agroforestry ecosystems. *Forest Pathology*, 41, 382–386
- Serrano, M.S., De Vita, P., Fernández-Rebollo, P. & Sánchez, M.E. (2011b). Calcium fertilizers induce soil suppressiveness to *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Quercus ilex*. *European Journal of Plant Pathology* (in press). DOI 10.1007/s10658-011-9871-6
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. (1985). *Bioestadística: principios y procedimientos*. (Bogotá: Mcgraw-Hill)
- Trione, E.J. (1974). Sporulation and germination of *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology*, 64, 1531-1533
- Wicker, E., Hullé, M. & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50, 433-442
- Wiese, M.V. (1987). *Compendium of Wheat Diseases* (2nd edition). (St Paul, MN: APS Press)

Figura 27. Susceptibilidad a *Phytophthora cinnamomi* de cultivos herbáceos de la dehesa

a) Planta de altramuz crecida en sustrato sin infestar durante 3 semanas. **b)** Planta de altramuz crecida en sustrato infestado con 2×10^4 clamidosporas de *P. cinnamomi* $\times \text{ml}^{-1}$ durante 3 semanas. Nótese la presencia de síntomas de podredumbre radical a nivel aéreo y radical en **(b)**, pero no en **(a)**. Plantas de altramuz creciendo en sustrato sin infestar **(c)** e infestado **(d)** a las 5 semanas de incubación. Nótese el elevado porcentaje de mortalidad en **(d)** con respecto a **(c)**. **e)** Bandejas con plantas de trigo y avena asintomáticas creciendo en sustrato infestado con 500 clamidosporas de *P. cinnamomi* $\times \text{ml}^{-1}$ de suelo, a las 6 semanas de incubación. Plantas de veza en sustrato sin infestar **(f)** e infestado con 10^3 clamidosporas de *P. cinnamomi* $\times \text{ml}^{-1}$ de suelo **(g)** al cabo de 5 semanas de incubación. Nótese la reducción del crecimiento en **(g)** con respecto a **(f)**. Corte longitudinal de raíz de altramuz **(h)** y veza **(i)** infectadas con *P. cinnamomi* y teñidas con azul de toluidina al 0,05%. ($\times 400$). Nótese cómo la raíz de altramuz muestra una estructura celular muy desorganizada y con abundante presencia de clamidosporas e hinchazones hifales **(h)**, al contrario de lo observado en raíz de veza **(i)**, que conserva una estructura celular intacta a pesar de la colonización por el patógeno, que no presenta clamidosporas ni hinchazones hifales.





CAPÍTULO 5

Discusión general

Numerosos estudios ponen de manifiesto la importancia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* como principal factor implicado en el decaimiento de los *Quercus* en las dehesas del suroeste peninsular (Brasier, 1996; Gallego et al., 1999; Sánchez et al., 2002a; 2003b). Este patógeno provoca la necrosis de las raicillas absorbentes de encinas y alcornoques limitando su capacidad de absorción de agua y nutrientes y causando finalmente su muerte (Erwin y Ribeiro, 1996; Sánchez et al., 2002a). El sistema productivo de la dehesa tiene como base principal al arbolado, sobre todo la encina (San Miguel, 1994; Costa et al., 2006), sin embargo el decaimiento y elevado número de muertes del arbolado ocasionado por esta enfermedad radical está poniendo en peligro la sostenibilidad de la dehesa en algunas zonas de Andalucía. Es necesario, por lo tanto, el establecimiento de un sistema de control de la podredumbre causada por *P. cinnamomi* adaptado a la dehesa.

El control de cualquier patógeno debe establecerse atendiendo a su ciclo de patogénesis y a la epidemiología de la enfermedad. En los suelos de dehesa, *P. cinnamomi* se encuentra como esporas de resistencia (clamidosporas) capaces de sobrevivir durante un tiempo relativamente amplio como propágulos en latencia, aunque habitualmente con densidades de inóculo en suelo relativamente bajas (Sánchez et al., 2002a; 2006; Romero et al., 2007a). Cuando las condiciones ambientales son adecuadas, es decir, cuando hay humedad en el suelo y temperaturas relativamente altas (~25° C), las clamidosporas germinan, produciendo esporangios, que a su vez germinarán emitiendo zoosporas infectivas móviles. Estas pueden desplazarse activamente en la película de agua que rodea a las partículas del suelo, siendo atraídas por los exudados radicales de las plantas susceptibles (Erwin y Ribeiro, 1996). Una vez que se ha producido la infección de la raíz a partir de la germinación de las zoosporas enquistadas que han emitido el tubo germinativo, el patógeno desarrolla su micelio en el interior de la raíz y rápidamente tendrán lugar ciclos secundarios de infección mediante la producción de nuevos esporangios y zoosporas, hasta que las condiciones ambientales sean desfavorables, momento en el cual, se formarán de nuevo clamidosporas de resistencia (Erwin y Ribeiro, 1996; Romero et al., 2007a). *Phytophthora cinnamomi* puede también sobrevivir en el suelo como micelio, pero su capacidad saprofítica es muy limitada (Sánchez et al., 2010).

La fertilización es una práctica habitual en la dehesa para mejorar la composición botánica del pasto. Debido a que estos suelos que en general son ácidos y con bajo contenido en materia orgánica, requieren un aporte extra de nutrientes, fundamentalmente de P (Costa et al., 2005; Fernández-Rebollo y Carbonero, 2008; Fernández et al., 2008) para la producción de pasto. En este trabajo se busca redirigir esta fertilización que ya se aplica en la dehesa hacia la protección del arbolado. Previamente, se había observado que la aplicación al suelo de fertilizantes cálcicos parecía disminuir la incidencia y severidad del decaimiento de las encinas en comparación con zonas no fertilizadas (Fernández-Rebollo y Carbonero, 2008). Para algunos patógenos, las propiedades químicas del suelo, en especial su contenido en Ca^{2+} , le caracterizan como supresivo o no para dicho patógeno. Para muchos oomicetos, incluido *P. cinnamomi*, los elevados niveles de Ca^{2+} en el suelo dificultan su desarrollo (Broadbent y Baker, 1974; von Broembsen y Deacon, 1997; Campanella et al., 2002; Heyman et al., 2007).

A partir de estas premisas, el primer paso para controlar la infección por *P. cinnamomi* es evitar la producción y germinación de las clamidosporas. Nuestros resultados indican que el producto más efectivo en la inhibición de la producción de clamidosporas del patógeno es el CaO (~100%), seguido del CaCO_3 , KSO_4 y CaCl_2 . La viabilidad de las clamidosporas no se ve limitada por la aplicación al suelo de CaO y CaCO_3 , mientras que KOH y KIO_3 sí inhibieron su germinación, aunque no significativamente.

A partir de las clamidosporas ya formadas, el siguiente punto de control es evitar la producción de los esporangios y su germinación, es decir, la producción de zoosporas infectivas. Según Campanella et al. (2002) el óxido y el propionato cálcico disminuyen la producción de zoosporas de *P. nicotianae*. Para *P. cinnamomi* hemos comprobado que la disminución en la producción de zoosporas infectivas mediada por el óxido y el carbonato cálcico se debe más a la inhibición de la producción de esporangios, que resulta muy efectiva ($\approx 100\%$) que a un efecto directo sobre su germinación. Según von Broemsem y Deacon (1997) el CaCl_2 reduce significativamente la liberación de esporas infectivas de *Phytophthora parasitica*, a pesar de que genera una mayor producción de esporangios. Nuestros resultados indican el mismo efecto para el CaCl_2 en *P. cinnamomi*, inhibiendo la liberación de zoosporas y además, al contrario de lo observado por von Broemsem y Deacon (1997), también inhibe la producción de

esporangios, aunque en este caso la inhibición no alcance el 50%. Para *Phytophthora sojae*, bajas concentraciones (0,4-1 mM) de CaCl_2 y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en el medio de cultivo inducen la liberación de zoosporas, mientras que concentraciones mayores de estos mismos compuestos (20-30 mM), la inhiben (Sugimoto et al., 2005). Según estudios realizados por Heyman et al. (2007) en *Aphanomyces*, la aplicación de CaCO_3 , CaSO_4 , CaCl_2 y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ al medio de cultivo disminuye la concentración de zoosporas del microorganismo. Sin embargo, nuestros resultados indican un efecto estimulador de la producción de esporangios para los nitratos cálcico y potásico. von Broemsem y Deacon (1997) observaron que para *P. parasitica*, aunque el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ induce una mayor producción de esporangios, reduce significativamente la movilidad de las zoosporas, produciendo un rápido enquistamiento de las mismas al liberarse de los esporangios y por tanto, las desactiva como estructuras infectivas. Aunque este punto no ha sido estudiado en este trabajo, es una cuestión a considerar en futuras investigaciones.

Aunque la capacidad de *P. cinnamomi* para sobrevivir como micelio en el suelo es limitada (Sánchez et al., 2010), diversos estudios han demostrado el efecto del Ca^{2+} en la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora* spp. Así, el óxido, propionato y carbonato cálcico inhiben el crecimiento micelial de *P. nicotianae* (Campanella et al., 2002), lo mismo que el CaCl_2 y el KNO_3 para *P. sojae*, que además disminuye los niveles de infección en soja (Sugimoto et al., 2005). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la capacidad del CaO y KOH para inhibir el crecimiento micelial se debe más al incremento del pH del medio de cultivo que al efecto directo de los iones Ca^{2+} o K^+ , e incluso algunos de los compuestos ensayados a bajas concentraciones (CaCl_2 , KCl , K_2SO_4 y CaO y KOH neutralizados) y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a cualquier concentración, estimulan el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Halsall y Forrester (1977), Duvenhage y Kotzé (1991) y Duvenhage et al. (1992).

En este trabajo se observó una disminución de la infectividad de *P. cinnamomi* en las encinas que crecieron en suelos tratados con CaO y CaCO_3 . Este efecto se debió probablemente a la inhibición que estos compuestos ejercen sobre la germinación de las clamidosporas para producir esporangios y/o la germinación de los esporangios, lo que supone una menor producción de zoosporas infectivas. Iguales resultados se han obtenido para el CaSO_4 y KOH , aunque este último compuesto puede resultar más

difícil de aplicar en la dehesa. Resultados similares obtiene Campanella et al. (2002) en suelos tratados con distintos productos cálcicos (sulfato, propionato, óxido, lactato, nitrato, cloruro). A pesar de tener un nivel de propágulos infectivos en suelo elevados, el grado de infectividad en planta es menor que en los suelos no tratados.

En esta Tesis Doctoral se han establecido los primeros pasos para la aplicación en la dehesa de métodos de control cultural contra la podredumbre radical basados en la aplicación de enmiendas cálcicas al suelo a concentraciones habituales cuando se trata de reducir la acidez de los suelos de las dehesas. Además, estos productos son aplicables en las dehesas reguladas por la normativa de producción ecológica (Reglamento del Consejo de la Unión Europea N° 834/2007, 28 de junio de 2007). Sin embargo aún quedan muchos factores por determinar, tales como el período más adecuado de aplicación, otoño o primavera, una única dosis o varias; superficie de aplicación, si es necesario cubrir toda la superficie de la dehesa o únicamente hacer el tratamiento bajo la copa del arbolado; así como el modo de aplicación, en cobertera o enterrado, etc. Por lo tanto, aún quedan varios aspectos por estudiar, especialmente derivados de la aplicación de estos productos directamente en campo.

Además, en la dehesa es frecuente realizar repoblaciones a partir de plantones de encina producidos en vivero. El estado nutricional de estos plantones puede ser determinante para su posterior supervivencia en campo. De hecho numerosos autores han remarcado la importancia de una buena nutrición cálcica en el control de enfermedades causadas por distintas especies de *Phytophthora*, en manzano (Biggs et al., 1993; Biggs, 1999; Chardonnet et al., 2000), aguacate (Messenger et al., 2000), cítricos (Campanella et al., 2002) o vinca (von Broembsen y Deacon, 1997). Lo mismo ocurre para otros patosistemas: brécol / *Plasmodiophora brassicae* (Campbell et al., 1985), zanahoria / *Sclerotium rolfsii* (Punja et al., 1986) o pimiento / *Botrytis cinerea* (Elad et al., 1993). Rahman y Punja (2007) establecieron que la presencia de iones Ca^{2+} aumenta la cohesión de las paredes celulares vegetales, aumentando la resistencia de las mismas a la penetración de patógenos fúngicos y bacterianos. A raíz de nuestros resultados se puede inferir que una mayor concentración de Ca^{2+} en encinas puede tener un efecto similar y traducirse en una mayor tolerancia a la infección. En general, el contenido medio de Ca^{2+} en las plantas es del orden de 1-3 kg por 100 kg de materia seca, y se localiza fundamentalmente en las hojas y en los tallos (Demarty et al., 1984). Sin

embargo, con independencia de la resistencia que confiere frente al efecto destructivo del patógeno, hemos comprobado que las encinas con un alto nivel de Ca^{2+} presentan un mejor desarrollo radical que las plantas testigo sometidas a una nutrición estándar, poniendo de manifiesto que el Ca^{2+} es un elemento importante para un buen desarrollo radical en las encinas. Diversos estudios han mostrado que la disponibilidad de K^+ en planta aumenta por la disminución en la absorción de Ca^{2+} (Marschner, 1995; Prabhu et al., 2007), aunque en este trabajo las encinas deficientes en Ca^{2+} no presentaron concentraciones de K^+ superiores a las plantas testigo sometidas a nutrición normal, si bien el contenido en K^+ no parece que tenga influencia en la susceptibilidad a la infección. En la disminución de la severidad de los síntomas radicales de la enfermedad ha jugado un papel fundamental el alto contenido en Ca^{2+} , independientemente de la concentración de K^+ presente en las encinas. Efectos similares se han encontrado en otros patosistemas: cítricos-*P. parasitica* (Huber, 1991), aguacate-*P. cinnamomi* (Duvenhage y Kotzé, 1991) o soja-*P. sojae* (Sugimoto et al., 2007). El aumento en la tolerancia al patógeno pudo ser debido a una interferencia directa de los iones de Ca^{2+} sobre el desarrollo del patógeno en la planta o al refuerzo de la pared celular vegetal, al mejorar las propiedades físicas de la misma, o a ambos factores (Duvenhage y Kotzé, 1991; Sugimoto et al., 2005; 2007).

Por otra parte, la importante variabilidad genética de la encina y el alcornoque (Michaud et al., 1992; Coelho et al., 2006) puede estar implicada en la supervivencia de algunos individuos de las dos especies en focos donde la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* resulta muy severa. Esta alta variabilidad puede ser aprovechada para la mejora genética en la búsqueda de tolerancia/resistencia a *Phytophthora* (Tapias et al., 2006; Navarro et al., 2009). Sin embargo, nuestros resultados muestran que los distintos morfotipos de encina comunes en Andalucía que se han evaluado no presentan grandes diferencias de susceptibilidad frente a *P. cinnamomi*. Además, según diversos estudios, la encina es mucho más susceptible a *P. cinnamomi* que otras especies de *Quercus* (Robin et al., 1998; Moreira et al., 1999; Tuset et al., 2001; Maurel et al., 2001; Sánchez et al., 2002a). *Quercus suber*, *Q. faginea* y *Q. petraea* necesitan suspensiones de zoosporas 10 veces más elevadas que la encina para mostrar síntomas de la enfermedad (Tuset et al., 1996; 2001). La mayor resistencia del quejigo a *P. cinnamomi* (Tuset et al., 2001) podría explicar que los híbridos de esta especie con la encina también hayan

resultado menos susceptibles al patógeno. Estos resultados abren nuevas posibilidades para la restauración de dehesas afectadas por la enfermedad mediante la plantación de individuos pertenecientes a morfotipos moderadamente susceptibles, o de híbridos de encina con otras especies de *Quercus* menos susceptibles a *P. cinnamomi*, que podrían actuar como fuente de genes de resistencia. Sin embargo, aún queda mucho trabajo por hacer: es necesario ampliar el rango de morfotipos e híbridos testados frente a *P. cinnamomi*, estudiando también la influencia de los parentales y el modo de reproducir su resistencia/tolerancia en las siguientes generaciones de encina o de sus híbridos.

El cultivo de cereales (avena, trigo y triticale) y leguminosas (veza y altramuz amarillo) es otra práctica muy empleada en este ecosistema, principalmente para alimentar al ganado en épocas de falta de pasto natural (Costa et al., 2006). Sin embargo, la presencia de rodales de plantas marchitas de *Lupinus luteus* (altramuz amarillo) con síntomas de podredumbre radical en las dehesas onubenses pone en entredicho su cultivo. El aislamiento de *P. cinnamomi* a partir de raíces sintomáticas de altramuz resultó positivo en todas las fincas analizadas. Si bien los porcentajes de aislamiento no fueron muy altos, esta situación es normal con este tipo de patógenos, y especialmente en el caso de *P. cinnamomi* (Brasier, 1996; Sánchez et al., 2002a; 2005a; 2006). El altramuz amarillo, al igual que otras especies de *Lupinus* (Kirby y Grand, 1975; Erwin y Ribeiro, 1996), ha mostrado ser altamente susceptible a *P. cinnamomi*, siendo capaz de estimular significativamente la producción y supervivencia de esporas de resistencia y de zoosporas infectivas del patógeno, con independencia del cultivar ensayado, sumándose así al escaso número de especies herbáceas huéspedes de este patógeno. En este sentido, el presente trabajo constituye la primera referencia de *P. cinnamomi* como patógeno radical de *L. luteus*.

Además, en los muestreos realizados en dehesas sembradas con altramuz amarillo, se constató que a partir de distintos niveles de densidad de inóculo en el suelo entre fincas en los muestreos de primavera, en correspondencia con el grado de defoliación del arbolado, se pasó tras el agostamiento del cultivo a valores de densidad que se sitúan en los niveles habituales descritos cuando el arbolado sufre la enfermedad radical, entre 7 y 18 ufc x g⁻¹ de suelo seco. Estos niveles de inóculo en suelo se sitúan dentro del orden de magnitud descrito de densidad de inóculo de *P. cinnamomi* en suelos de dehesa de encina que sufren podredumbre radical (Rodríguez et al., 2004; Romero et al., 2007a).

Por lo tanto, podemos concluir que el cultivo del altramuz amarillo en la dehesa estimula la multiplicación y viabilidad del inóculo disponible para la infección de las encinas. Resultados similares obtiene de Andrés (1991), Smith et al. (1992), Blanco López et al. (1994) y Trapero y Blanco (2008) para el patosistema *Verticillium dahliae*-olivo y distintos huéspedes herbáceos: solanáceas, cucurbitáceas, malváceas, rosáceas, ornamentales y malas hierbas. Sin embargo, no se han encontrado indicios que hagan sospechar que otros cultivos habituales en la dehesa (trigo, avena y veza) estén sufriendo algún tipo de podredumbre radical. De hecho, nuestras propias observaciones indican que, con la excepción del altramuz, el resto de cultivos no presentan ningún tipo de síntoma visible de la enfermedad radical ni se tiene noticia de la existencia de focos de enfermedad en estos cultivos habituales en las dehesas andaluzas. Este punto se confirmó mediante inoculaciones artificiales de plantas de trigo, avena y veza, que no mostraron síntomas de podredumbre radical, salvo una ligera disminución del crecimiento en la leguminosa. Además, *P. cinnamomi* no se aisló de las raíces de los cereales, pero sí de la veza. A pesar de la presencia del patógeno colonizando las raíces de la veza, no se apreciaron síntomas de podredumbre radical en las plantas que crecieron en sustrato infestado con *P. cinnamomi*, sus exudados radicales no estimularon la producción y viabilidad de las clamidosporas ni la producción de zoosporas infectivas. En consecuencia, la veza ha resultado ser un huésped asintomático que no influye en la epidemiología de la enfermedad causada por *P. cinnamomi* en el arbolado, ni favorece su desarrollo. Además, el trigo y la avena no sólo no estimularon la producción de zoosporas de *P. cinnamomi*, sino que incluso la inhibieron ligeramente, por lo que, unido a la ausencia de infección radical en estos cereales, se puede afirmar que el trigo y la avena no son huéspedes de *P. cinnamomi* ni influyen en la epidemiología de la enfermedad. Una situación similar se da con otras especies del género: *P. cryptogea*, *P. gonapodyides* y *P. megasperma*, que no resultan patógenas para el trigo ni la avena (Braithwaite et al., 1998), aunque según Larsson y Gerhardson (1990), *P. cryptogea* sí causa enfermedad radical en trigo y avena en Suecia.

Los resultados obtenidos constituyen los primeros fundamentos para la selección de los cultivos más adecuados para la dehesa. Sin embargo, según estudios realizados por Sánchez-Márquez et al. (2011), numerosas gramíneas silvestres son huéspedes asintomáticos de distintos hongos patógenos. Para la Verticilosis del olivo y el algodón

causado por *V. dahliae*, se ha demostrado que el patógeno puede colonizar las raíces de diversas gramíneas cultivadas (avena, cebada, maíz, sorgo y trigo), y también de numerosas malas hierbas (*Bromus* spp., *Hordeum murinum*, *Aster squamatus*, *Avena sterilis*, *Echinochloa crus-galli*, *Echallium elaterium*, etc.) (Pegg y Brady, 2002; Cabeza y Bejarano, 2010) que pueden actuar como huéspedes asintomáticos de *V. dahliae*, y por lo tanto influir en la epidemiología de la enfermedad favoreciendo la multiplicación del patógeno. Se hace necesario ampliar el rango de herbáceas testadas frente a *P. cinnamomi*, especialmente malas hierbas presentes en la dehesa, que podrían ser huéspedes asintomáticos y actuar como reservorios del patógeno poniendo en riesgo la supervivencia del arbolado y todo lo que depende de éste.

En esta Tesis Doctoral se establece un punto de partida para el desarrollo de un sistema de control integrado frente a la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* en la dehesa, siendo necesario continuar estos trabajos para ampliar y concretar determinados aspectos básicos para asegurar su eficacia, los cuales se han ido comentando anteriormente. Del mismo modo, sería necesario testar todos estos métodos de control frente a *Pythium spiculum*, patógeno implicado también en la podredumbre radical que afecta a las encinas y alcornoques de las dehesas andaluzas (Romero et al., 2007a; Jiménez et al., 2008).

Un sistema de control integrado y adaptado a la dehesa es el único modo de conservar este ecosistema, permitiendo no sólo disfrutarlo en el presente, sino extender su legado ecológico, económico y cultural hacia el futuro.



CAPÍTULO 6

Conclusiones

1. La aplicación al suelo de enmiendas calizas inhibe la producción y germinación de esporangios, así como la producción de clamidosporas del patógeno y como consecuencia, disminuye la tasa de infección y la sintomatología de la enfermedad radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en encinas (Serrano et al., 2012. European Journal of Plant Pathology 132, 271-279).
2. La aplicación de KOH al suelo disminuye la tasa de infección de *P. cinnamomi* en raíz de encinas, disminuyendo significativamente la producción de esporangios, aunque no inhiba la producción de clamidosporas del patógeno (Serrano et al., 2012. Journal of Phytopathology –under review-).
3. Las encinas con una buena nutrición cálcica presentan una mayor tolerancia a la infección por *P. cinnamomi* (Serrano et al., 2011. Agroforestry Systems –under review-).
4. No se han encontrado diferencias significativas en susceptibilidad a *P. cinnamomi* entre los distintos morfotipos de encina presentes en Andalucía, si bien el morfotipo *Microcarpa* resulta más susceptible que el resto (Serrano et al., 2012. Forest Pathology, doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00758.x).
5. Las especies de *Quercus* que pueden hibridar con la encina y que son más tolerantes a *P. cinnamomi*, deben tenerse en cuenta como parentales en futuros programas de mejora contra la enfermedad radical (Serrano et al., 2012. Forest Pathology, doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00758.x).
6. *Lupinus luteus* (altramuz amarillo) es susceptible a *P. cinnamomi*, estimulando además la producción de zoosporas infectivas y aumentando la capacidad germinativa de las esporas de resistencia presentes en el suelo infestado (Serrano et al., 2010. European Journal of Plant Pathology 128, 149-152).
7. El altramuz amarillo actúa como reservorio de *P. cinnamomi*, manteniendo o incluso aumentando la densidad de clamidosporas viables para causar infección al arbolado en campo (Serrano et al., 2011. Forest Pathology 41, 382–386).
8. *Vicia sativa* (veza) es un huésped asintomático de *P. cinnamomi* y aunque el patógeno es capaz de infectar sus raíces, al no inducir la producción de

zoosporas ni la geminación de las clamidosporas, no influye en la epidemiología de la enfermedad radical de la encina (Serrano et al., 2012 *European Journal of Plant Pathology* –accepted-).

9. *Triticum aestivum* (trigo) y *Avena sativa* (avena) no son huéspedes de *P. cinnamomi* y además no estimulan la producción de zoosporas, por lo que no influyen en la epidemiología de la enfermedad radical de la encina (Serrano et al., 2012. *European Journal of Plant Pathology* –accepted-).
10. El cultivo del altramuz amarillo en las dehesas favorece el establecimiento y desarrollo de la enfermedad radical causada por *P. cinnamomi* en el arbolado. El cultivo de trigo, avena y veza constituye una buena alternativa (Serrano et al., 2011. *Forest Pathology* 41, 382–386; Serrano et al., 2012. *European Journal of Plant Pathology* –accepted-).

Todas estas actuaciones (aplicación de enmiendas inorgánicas al suelo, mantenimiento de una adecuada nutrición cálcica del arbolado, uso de morfotipos más tolerantes al patógeno y elección adecuada de cultivos en la dehesa) constituyen una importante aportación hacia un sistema de control integrado de la podredumbre radical causada por *P. cinammomi*, adaptada a la dehesa y a su sistema de producción ecológica, de manera que se consiga la conservación de la encina, elemento base de la sostenibilidad de este ecosistema.

1. Soil application of calcium amendments inhibits sporangial production and germination, together with chlamyospore production and, consequently decreases the infection rate and symptomatology of the root disease caused by *P. cinnamomi* in Holm oaks (Serrano et al., 2012. European Journal of Plant Pathology 132, 271-279).
2. Soil application of KOH decreases the infection rate of Holm oak roots, reducing significantly sporangial production, but does not inhibit the production of chlamyospores of the pathogen (Serrano et al., 2012. Journal of Phytopathology –under review-).
3. Holm oaks with good calcium nutrition have a higher tolerance to *P. cinnamomi* infection (Serrano et al., 2011. Agroforestry Systems –under review-).
4. No significant differences in susceptibility to *P. cinnamomi* were found among the different Holm oak morphotypes present in Andalusia, although *Microcarpa* morphotype resulted more susceptible than the others (Serrano et al., 2012. Forest Pathology, doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00758.x).
5. *Quercus* species able to hybridize with Holm oak and more tolerant to *P. cinnamomi* should be considered as genitors in future breeding programs against the root disease (Serrano et al., 2012. Forest Pathology, doi: 10.1111/j.1439-0329.2011.00758.x).
6. *Lupinus luteus* (yellow lupin) is susceptible to *P. cinnamomi*, also encouraging the production of infective zoospores and increasing germination of resistant spores present in the infested soil (Serrano et al., 2010. European Journal of Plant Pathology 128, 149-152).
7. Yellow lupin acts as a reservoir of *P. cinnamomi*, maintaining or even increasing the density of viable chlamyospores to cause tree infection in the field (Serrano et al., 2011. Forest Pathology 41, 382–386).
8. *Vicia sativa* (vetch) is an asymptomatic host of *P. cinnamomi* and although the pathogen is able to infect its roots, not induce zoospore production neither chlamyospore germination and, consequently did not influence the

epidemiology of the Holm oak root disease (Serrano et al., 2012 European Journal of Plant Pathology –accepted-).

9. *Triticum aestivum* (wheat) and *Avena sativa* (oat) are not hosts of *P. cinnamomi* and they do not stimulate zoospore production, so these crops do not influence the epidemiology of the Holm oak root disease (Serrano et al., 2012. European Journal of Plant Pathology –accepted-).
10. The culture of yellow lupin in Holm oak rangelands ecosystems favours the establishment and development of the root disease caused by *P. cinnamomi* in the trees. The culture of wheat, oat or vetch appears as a good alternative (Serrano et al., 2011. Forest Pathology 41, 382–386; Serrano et al., 2012. European Journal of Plant Pathology –accepted-).

All these measures (soil application of inorganic amendments, maintenance of a suitable calcium nutrition of trees, use of morphotypes more tolerant to the pathogen, and choosing of appropriate crops for oak rangeland ecosystems) is an important contribution towards an integrated control system against the root rot caused by *P. cinnamomi*, adapted to the oak rangeland and its system of ecological production, in order to achieve the conservation of Holm oak, basic element for the sustainability of this ecosystem.



CAPÍTULO 7

Bibliografía

- ADL SM, SIMPSON AGB, FARMER MA, ANDERSEN RA, ANDERSON OR, BARTA JR, BOWSER SS, BRUGEROLLE G, FENSOME RA, FREDERICQ S, JAMES TY, KARPOV S, KUGRENS P, KRUG J, LANE CE, LEWIS LA, LODGE J, LYNN DH, MANN D G, MCCOURT RM, MENDOZA L, MOESTRUP Ø, MOZLEY-STANDRIDGE SE, NERAD TA, SHEARER CA, SMIRNOV AV, SPEIGEL FW, TAYLOR MFJR. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52, 399-451.
- AGRIOS GN. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, CA. 635 pp.
- AINSWORTH GC. 1973. *The fungi. An advanced treatise*. Vol. IV. Academic Press, NY. 621 pp.
- ALVES A, CORREA A, LUQUE J, PHILLIPS A. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov on *Quercus species*, with notes and description of *Botryosphaeria stevenssi* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96, 598-613.
- ANDICOBERRY S, LORA F, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2001. Etiología de las podredumbres radicales de plántulas de *Quercus* spp y *Pinus halepensis* en viveros forestales de Andalucía. *Actas del III Congreso Forestal Español*, Granada. pp. 153-158.
- ANONYMOUS 2004. Diagnostic protocols for regular pests. *Phytophthora cinnamomi*. EPPO Bulletin, 34, 201-207.
- ARYANTHA IP, CROSS R, GUEST DI. 2000. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures. *Phytopathology*, 90, 775-782.
- BALCI Y, HALMSCHLAGER E. 2003a. Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. *Forest Pathology*, 33, 157-174.
- BALCI Y, HALMSCHLAGER E. 2003b. *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. *Plant Pathology*, 52, 694-702.
- BIGGS AR. 1999. Effects of calcium salts on Apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Disease*, 83, 1001-1005.

- BIGGS AR, INGLE M, SOLIHATI WD. 1993. Control of *Alternaria* infection of fruit of apple cultivar Nittany with calcium chloride and fungicides. *Plant. Disease*, 77, 976-980.
- BIOSCA EG, GONZÁLEZ R, LÓPEZ-LÓPEZ MJ, SORIA S, MONTON C, PÉREZ-LAORGA E, LÓPEZ MM. 2003. Isolation and characterization of *Brenneria quercina*, causal agent for bark canker and drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. *Phytopathology*, 35, 485-492.
- BLANCO-LÓPEZ MA, RODRÍGUEZ JURADO D, JIMÉNEZ DÍAZ RM. 1994. La verticilosis del olivo. *Agricultura*, 746, 777-780.
- BRAITHWAITE M, ALEXANDER BJR, ADAMS RLM. 1998. Nationwide survey of pests and diseases of cereal and grass seed crops in New Zealand. 2. Fungi and Bacteria. *Proceedings of 51st New Zealand Plant Protection Conference*, 51, 51-59.
- BRASIER CM. 1975. Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma*. II Ecological implications. *New Phytologist*, 74, 195-198.
- BRASIER CM. 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature*, 360, 539.
- BRASIER CM. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annals of Forest Science*, 53, 347-35.
- BRASIER CM. 2009. *Phytophthora* Biodiversity: How many *Phytophthora* species are there? En: *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*. USDA Forest Service General Technical Report PSW-GTR-221, Albany, CA. pp. 101-115.
- BRASIER CM, JUNG T. 2006. Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe. En: *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. Forest Research, Farnham. pp. 5-16.
- BRASIER CM, SCOTT J. 1994. European oak decline and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *EPPO Bulletin*, 24, 221-232.
- BRASIER CM, ROBREDO F, FERRAZ JFP. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, 42, 140-145.

- BROADBENT P, BAKER KF. 1974. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. *Australasian Journal of Agricultural Research*, 25, 121-137.
- CABEZA E, BEJARANO J. 2010. Influencia de las cubiertas vegetales sobre la epidemiología y control de las enfermedades del olivo. En: *Aspectos agronómicos y medioambientales de la agricultura de conservación*. Eumedia-Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid. pp. 165-175.
- CAETANO P, ÁVILA A, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A, COELHO AC. 2006. Molecular characterization of *Phytophthora cinnamomi* populations causing root rot on Mediterranean *Quercus* species. Proceedings of the 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Rodas, Grecia. pp. 297-299.
- CAETANO P, ÁVILA A, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A, COELHO AC. 2009a. *Phytophthora cinnamomi* populations on *Quercus* forests from Spain and Portugal. En: *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*. USDA Forest Service General Technical Report PSW-GTR-221, Albany, CA. pp. 261-269.
- CAETANO P, SÁNCHEZ JE, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2009b. Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, 8 pp.
- CAMPANELLA V, IPPOLITO A, NIGRO, F. 2002. Activity of calcium salts in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. *Crop Protection*, 21, 751-756.
- CAMPBELL RN, GREATHEAD AS, MYERS DF, DE BOER GJ. 1985. Factor related to control of clubroot of crucifers in the Salinas Valley of California. *Phytopathology*, 75, 665-670.
- CARBONERO MD, BLÁZQUEZ A, FERNÁNDEZ P. 2004. Producción de fruto y grado de defoliación como indicadores de vigor en *Quercus ilex* y *Quercus suber*. Influencia de diferentes condiciones edáficas en su evolución. En: *Pastos y ganadería extensiva*. CSIC, Salamanca. pp. 715-720.
- CARBONERO MUÑOZ M.D, CRISPÍN MURILLO I, GARCÍA MORENO A, FERNÁNDEZ REBOLLO P. 2010. Influencia de los factores ambientales en la productividad de bellota de encina en la comarca de los Pedroches (Córdoba). En: *Pastos: fuente*

natural de energía, Ed. Área de Publicaciones de la Universidad de León y SEEP. León. 475-480.

CARRASCO A, FERNÁNDEZ A, TRAPERO A, LÓPEZ G, SÁNCHEZ I, RUIZ JM, JIMÉNEZ JJ, DOMÍNGUEZ L, ROMERO MA, CARBONERO MD, SÁNCHEZ ME, CAETANO P, GIL P, FERNÁNDEZ P, NAVARRO RM, SÁNCHEZ R, RAPOSO R AND RODRÍGUEZ S. 2009. Procesos de Decaimiento Forestal (La Seca). Situación del conocimiento. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Córdoba. 110 pp.

CERA F. 1986. El altramuz amarillo (“tramusilla”) su cultivo y aprovechamiento en el Andévalo onubense. Monografías nº 3. Dirección General de Investigación y Extensión Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla. 97 pp.

CEREZUELA P, GONZÁLEZ DE TÁNAGO A, GUZMAN JR, SAN MIGUEL MP. 2008. Caracterización socioeconómica de la dehesa de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla. 437 pp.

CHARDONNET CO, SAMS CE, TRIGIANO RN, CONWAY WS. 2000. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology*, 90, 769-774.

COELHO AC, LIMA MB, NEVES D, CRAVADOR A. 2006. Genetic Diversity of Two Evergreen Oaks [*Quercus suber* (L.) and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (Lam.)] in Portugal using AFLP Markers. *Silvae Genetica* 5, 105-118.

COFFEY MD. 1987. *Phytophthora* root rot of avocado: An integrated approach to control in California. *Plant Disease*, 71, 1046-1052.

COLLADO J, PLATAS G, PELÁEZ F. 2001. Identification of an endophytic *Nodulisporium* sp. from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. *Mycologia*, 93, 875-886.

COMISIÓN DE AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE DEL SENADO. 2010. Informe de la ponencia del Senado sobre la protección del ecosistema de la dehesa. (www.senado.es/legis9/publicaciones/pdf/senado/bocg/I0553.PDF)

- COSTA M, MORLA C, SAINZ H (Eds). 2005. Los bosques ibéricos: una interpretación geobotánica. Ed. Planeta, Barcelona. 598 pp.
- COSTA JC, MARTÍN A, FERNÁNDEZ P, ESTIRADO M. 2006. Dehesas de Andalucía. Caracterización ambiental. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 294 pp.
- DE ANDRÉS F. 1991. Enfermedades y plagas del olivo. Riquelme y Vargas Ediciones, Jaén. 646 pp.
- DE VITA P, RAMO C, GARCÍA LV, SERRANO MS, APONTE C, BELBAHRI L, SÁNCHEZ ME. 2011a. Involvement of oomycete in the decline affecting Cork oaks at Doñana Biological Reserve (south-western Spain). *Forest Pathology* (in press).
- DE VITA P, SERRANO MS, BELBAHRI L, GARCÍA LV, RAMO C, SÁNCHEZ ME. 2011b. Germination of hyphal bodies of *Pythium spiculum* isolated from declining cork oaks at Doñana National Park (Spain). *Phytopathology Mediteranea*, 50, 478-481.
- DEMARTY M, MORVAN C, THELLIER M. 1984. Calcium and the cell wall. *Plant Cell and Environment*, 7, 441-448.
- DUVENHAGE J A, KOTZÉ JM. 1991. The influence of calcium on saprophytic growth and pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* and on resistance of avocado to root rot. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 14, 13-14.
- DUVENHAGE JA, KOTZÉ JM, MAAS EMC. 1992. The influence of nitrogen and calcium on mycelial growth and disease severity of *Phytophthora cinnamomi* and the effect of calcium on resistance of avocado to root rot. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 15, 12-14.
- ELAD Y, YUNIS H, VOLPIN H. 1993. Effect of nutrition on susceptibility of cucumber, eggplant, and pepper crops to *Botritis cinerea*. *Canadian Journal of Botany*, 71, 602-608.
- ELLIOT CG. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. En: *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. APS Press, St. Paul, MN. pp. 71-80.
- EPPO. 2011. PQR-EPPO database on quarantine pests (available online) (www.eppo.int)

- EPP/CABI. 2011. Data sheets on Quarantine Pests. *Phytophthora cinnamomi*. (www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Phytophthora_cinnamomi/PHYTCN_ds.pdf)
- ERWIN DC, RIBEIRO OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St. Paul, MN. 562 pp.
- FERNÁNDEZ P, PORRAS C. 1998. La dehesa. Algunos aspectos para la regeneración del arbolado. Informaciones técnicas 58/98. Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Servicio de Publicaciones y Divulgación. Sevilla. 42 pp.
- FERNÁNDEZ-REBOLLO P, CARBONERO MD. 2008. La dehesa como hábitat natural para el Cerdo Ibérico. En: *El Cerdo Ibérico. Una revisión transversal*. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía-Fundación Caja Rural del Sur, Sevilla. pp. 103-133.
- FERNÁNDEZ P, CARBONERO MD, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2008. ¿Cómo manejar las explotaciones afectadas por decaimiento forestal?. *Europa Cork*, 36, 40-46.
- GALLEGO FJ, PÉREZ DE ALGABA A, FERNÁNDEZ-ESCOBAR R. 1999. Etiology of oak decline in Spain. *European Journal of Forest Pathology*, 29, 17-27.
- GALLO-LLOBET L, SILVERIO F, RODRÍGUEZ A, DOMÍNGUEZ C, PÉREZ S, DÍAZ S. 2003. Evaluación en campo de patrones clonales de aguacate de raza mexicana y antillana tolerante-resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Proceedings V World Avocado Congress*, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla. pp. 573-578.
- GALLO L, SILVERIO F, RODRÍGUEZ-PÉREZ AM. 2007. Thermal sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* and long-term effectiveness of soil solarisation to control avocado root rot. *Annals of Applied Biology*, 150, 65-73.
- GARCÍA A, CALZADO C, ESCUÍN S, GUERRERO JE, FERNÁNDEZ-REBOLLO P, GONZÁLEZ MP. 2008. Detección de cambios en la cobertura del arbolado en dehesas mediante imágenes Landsat-TM y modelos lineales de mezclas espectrales. En: *Pastos, clave en la gestión de los territorios: Integrando disciplinas*. Córdoba. pp. 567-574.

- GARCÍA-JIMÉNEZ J, MONTE E, TRAPERO A. 2010. Los hongos y oomicetos fitopatógenos. En: *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos*. Sociedad Española de Fitopatología-Phytoma, Valencia. pp. 23-50.
- GENTILE S, VALENTINO D, TAMIETTI G. 2009. Control of ink disease by trunk injection of potassium phosphite. *Journal of Plant Pathology*, 91, 565-571
- GIMÉNEZ A, PIAZZA S, PÉREZ-SIERRA A, LEÓN M, ABAD-CAMPOS P. 2011. Identificación de especies de *Phytophthora* y otros patógenos en viveros forestales de la comunidad valenciana. II Reunión Científica de Sanidad Forestal. Sociedad Española de Ciencias Forestales, Plasencia. 1 pp.
- HALSALL DM, FORRESTER RI. 1977. Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium and iron ions. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 994-1001.
- HAWKSWORTH DL, KIRK PM, SUTTON BC, PEGLER DM. 1995. Dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford. 616 pp.
- HEYMAN F, LINDAHL B, PERSSON L, WIKSTRÖM M, STENLID J. 2007. Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2222-2229.
- HO HH, ZENTMYER A. 1977. Morphology of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia*, 69, 701-713.
- HUBER DM. 1991. The use of fertilizers and organic amendments in the control of plant disease. En: *CRC Handbook of Pest Management of Agriculture*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 357-394.
- JAYASEKERA AU, MCCOMB JA, SHEARER BL, HARDY GESTJ. 2007. In planta selfing and oospore production of *Phytophthora cinnamomi* in presence of *Acacia pulchella*. *Mycological Research*, 111, 355-362.
- JIMÉNEZ JJ, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2005a. El Chancro Carbonoso de la encina y el alcornoque. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 6 pp.

- JIMÉNEZ JJ, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2005b. El Chancro Carbonoso de *Quercus* I: Distribución y caracterización del agente causal. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 31, 549-562.
- JIMÉNEZ JJ, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2005c. El Chancro Carbonoso de *Quercus* II: Patogenicidad de *Biscogiauxia mediterranea*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 31, 563-575.
- JIMÉNEZ JJ, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2005d. El Chancro Carbonoso de *Quercus* III: Dispersión de ascosporas del agente causal. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 31, 577-585.
- JIMÉNEZ MP, DÍAZ-FERNÁNDEZ PM, IGLESIAS S, DE TUERO M, GIL L. 1996. Las regiones de procedencia de *Quercus ilex* L. en España. Ed. ICONA, Madrid. 87 pp.
- JIMÉNEZ JJ, SÁNCHEZ JE, ROMERO MA, BELBAHRI L, TRAPERO A, LEFORT F, SÁNCHEZ ME. 2008. Pathogenicity of *Pythium spiculum* and *Pythium sterilum* on feeder roots of *Quercus rotundifolia*. Plant Pathology, 57, 369.
- JÖNSSON U, LUNDBERG L, SONESSON K, JUNG T. 2003. First records of soilborne *Phytophthora* species in Swedish oak forests. Forest Pathology, 33, 175-179.
- JU YM, ROGERS JD, SAN MARTÍN F, GRANMO A. 1998. The genus *Biscogniauxia*. Mycotaxon, 66, 1-98.
- JUNG T. 2009. Beech decline in Central Europe driven by the interaction between *Phytophthora* infections and climatic extremes. Forest Pathology, 39, 73-94.
- JUNG T, BLASCHKE H, OBWALD 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.
- JUNG T, BURGESS TI. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. Persoonia, 22, 95-110.
- JUNG T, NECHWATAL J, COOKE DEL, HARTMANN G, BLASCHKE M, OBWALD WF, 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.
- JUNG T, HUDLER GW, JENSEN-TRACY SL, GRIFFITHS HM, FLEISCHMANN F, OßWALD W. 2005. Involvement of *Phytophthora* spp. in the decline of European beech in Europe and the USA. *Mycologist*, 19, 159-166.
- KIRBY H W, GRAND LF. 1975. Susceptibility of *Pinus strobus* and *Lupinus* spp. to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 65, 693-695.
- LARSSON M, GERHANDSON B. 1990. Isolates of *Phytophthora cryptogea* pathogenic to wheat and some other crop plants. *Journal of Phytopathology*, 129, 303-315.
- LINDERMAN RG. 2003. Biological control options for *Phytophthora* species. Sudden Oak Death Online Symposium. www.apsnet.org/online/SOD (websites of The American Phytopathological Society). Doi: 10.1094/SOD-2003-BL.
- LINDERMAN RG, RIBEIRO OK. 1991. Chemical and biological control of *Phytophthora* species in woody plants. En: *Phytophthora*. Cambridge University Press, Sydney. pp. 399-410.
- LÓPEZ LILLO A, SÁNCHEZ DE LORENZO CÁCERES JM. 1999. Árboles en España: Manual de Identificación. Mundi Prensa. Madrid. 643 pp.
- LÓPEZ-ESCUADERO FJ, MERCADO J. 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil*, 344, 1-50.
- 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, 147-155.
- MANSILLA JP, PÉREZ R, PINTOS C, SALINERO C, IGLESIAS C. 2000. Plagas y enfermedades del castaño en Galicia. Xunta de Galicia, Consellería de Agricultura, Ganadería e Política Agroalimentaria, Santiago de Compostela. 129 pp.
- MARCAIS B, DUPUIS F, DESPREZLOUSTAU ML. 1996. Susceptibility of the *Quercus rubra* root system to *Phytophthora cinnamomi*. Comparison with chestnut and other oak species. *European Journal of Forest Pathology*, 26, 133-143.

- MARSCHNER H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. London, UK, Academic Press. 889 pp.
- MAUREL M, ROBIN C, CAPDEVIELLE X, LOUSTAU D, DESPREZ-LOUSTAU ML. 2001. Effects of variable root damage caused by *Phytophthora cinnamomi* on water relations of chestnut saplings. *Annals of Forest Science*, 58, 639-651.
- MAZZAGLIA A, LIBRANDI I, VANNINI A, ANSELMINI N. 2001. Endophytic incidence of *Biscogniauxia mediterranea* in asymptomatic oak trees. Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Andalus Academic Publishing, Redondo, Portugal. pp. 291-293.
- MCLEOD A, LABUSCHAGNE N, KOTZÉ JM. 1995. Evaluation of *Trichoderma* for Biological Control of Avocado Root Rot in Bark Medium Artificially Infested with *Phytophthora cinnamomi*. South African Avocado Growers' Association Yearbook, 18, 32-37.
- MELGAREJO P, GARCÍA JIMÉNEZ J, JORDÁ MC, LÓPEZ MM, ANDRÉS MF, DURAN-VILA N. 2010. Patógenos de plantas descritos en España. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Madrid. 858 pp.
- MENGE JA. 2000. Non-fungal control strategies for *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocado. Department of Plant Pathology, University of California, Riverside CA 92521.
- (www.avocadosource.com/Journals/AUSNZ/AUSNZ_2001/1063p016.pdf)
- MESSENGER BJ, MENGE JA, POND E. 2000. Effects of gypsum soil amendments on avocado growth, soil drainage, and resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease*, 84, 612-616.
- MICHAUD H, LUMARET R, ROMANE F. 1992. Variation in the genetic structure and reproductive biology of holm oak populations. *Vegetation*, 99/100, 107-113.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. 2008. Diagnóstico de las Dehesas Ibéricas Mediterráneas. Madrid. 766 pp.
- MIRANDA-FONTAÍÑA ME, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, VETTRAINO AM, VANNINI A. 2007. Resistance of *Castanea* Clones to *Phytophthora cinnamomi*: Testing and Genetic Control. *Silvae Genetica*, 56, 1, 11-21.

- MONTOYA JM. 1993. Encinas y encinares. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 131pp.
- MOREIRA AC, MARTINS JMS. 2005. Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal. *Forest Pathology*, 35, 145-162.
- MOREIRA AC, FERRAZ JFP, CLEGG J. 1999. The involvement of *Phytophthora cinnamomi* in cork and holm oak decline in Portugal. En: *Phytophthoras in forest and wildland ecosystems*. Grants Pass, Oregon. pp. 132-135.
- MUÑOZ MC, RUPÉREZ A. 1987. La patología de la encina (*Quercus ilex* L.) en España. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 13, 203-212.
- NAVARRO RM, FERNÁNDEZ P, TRAPERO A, CAETANO P, ROMERO MA, SÁNCHEZ ME, FERNÁNDEZ A, SÁNCHEZ I, LÓPEZ G. 2004. Los procesos de Decaimiento de Encinas y Alcornoques. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 32 pp.
- NAVARRO R, ROCA LF, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2008. La roña o “repilo” de la encina. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 5 pp.
- NAVARRO RM, ARIZA D, PORRAS C, JORGE I, JORRIN J. 2009. Evaluación de la resistencia aparente de individuos de encina a *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 35, 89-97.
- OLEA L, LÓPEZ-BELLIDO RJ, POBLACIONES MJ. 2005. Europe types of silvopastoral systems in the Mediterranean area: dehesa. En: *Silvopastoralism and Sustainable Land Management*. CABI Publishing. Trowbridge. pp. 30-35.
- OLIVA M, MOLINAS MLL. 1984. Incidencia de *Hypoxylon mediterraneum* en los alcornocales gerundenses. *Boletín de la Estación Central de Ecología*, 25, 9-16.
- PACTO ANDALUZ POR LA DEHESA. 2006. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. 78. Consejería de la Presidencia. Junta de Andalucía.
- PEGG GF, BRADY BL. 2002. *Verticillium* wilts. CAB International, Trowbridge. 552 pp.
- PÉREZ-LAORGA E, GIMÉNEZ A, IBÁÑEZ R, GONZÁLEZ-BIOSCA E, LÓPEZ-GONZÁLEZ MM. 2005. Ensayo de control de *Curculio elephas* en bellotas de encina (*Quercus ilex*). Actas del 4th Congreso Forestal Español, Zaragoza, España. pp. 368-377.

- PHILLIPS A, ALVES A, CORREA A, LUQUE J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97, 513-529.
- PODGER FD, DOEPEL DR, ZENTMYER GA. 1965. Association of *Phytophthora cinnamomi* with a disease of *Eucalyptus marginata* forest in Western Australia. *Plant Disease Reporter*, 49, 943-947.
- PRABHU AS, FAGERIA NK, HUBER DM, RODRIGUES FA. 2007. Potassium and Plant Disease. En: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St. Paul. MN, pp. 57-78.
- PULIDO F, PICARDO A (coord.). 2010. Libro Verde de la Dehesa. Documento para el debate hacia una Estrategia Ibérica de gestión. Consejería de Agricultura y Pesca. 48 pp.
www.uco.es/integraldehesa/images/stories/doc/Jornadas/libro_verde_dehesa.pdf
- PUNJA ZK, CARTER JD, CAMPBELL GM, ROSSELL EL. 1986 Effects of calcium and nitrogen fertilizers, fungicides, and tillage practices on incidence of *Sclerotium rolfsii* on processing carrots. *Plant Disease*, 70, 819-824.
- RAHMAN M, PUNJA ZK. 2007. Calcium and Plant Disease. En: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St. Paul. MN, pp. 79-93.
- RANDS RO. 1922. Stripe canker of cinnamon caused by *Phytophthora cinnamomi* n.sp. *Mededelingen van het Instituut voor plantenziekten. Buitenzorg*, 53 pp.
- REGLAMENTO DEL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA N° 834/2007 (28 de junio de 2007). *Diario Oficial de la Unión Europea* 20.7.2007.
- RIBEIRO OK. 1978. A sourcebook of the genus *Phytophthora*. J Cramer, Vaduz, Liechtenstein. 417 pp.
- ROBIN C, DESPREZ-LOUSTAU M, CAPRON G, DELATOUR C. 1998. First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. *Annals of Forest Science*, 50, 869-883.
- RODRÍGUEZ M, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2004. Desarrollo de un método eficaz para la cuantificación de *Phytophthora cinnamomi* en muestras de suelo. XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. Lloret de Mar. pp. 210.

- ROMERO MA, SÁNCHEZ JE, JIMÉNEZ JJ, SÁNCHEZ ME AND TRAPERO A. 2005. Estado fitosanitario de los montes andaluces: enfermedades de los *Quercus* en Andalucía. Actas del IV Congreso Forestal Español. Zaragoza. pp. 370-377.
- ROMERO MA, JIMÉNEZ JJ, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2006. Evaluation of biological and chemical products to control *Quercus suber* trunk canker caused by *Botryosphaeria* spp. 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Rodas, Grecia. pp. 353-355.
- ROMERO MA, SÁNCHEZ JE, JIMÉNEZ JJ, BELBAHRI L, TRAPERO A, LEFORT F, SÁNCHEZ ME. 2007a. New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in south-west Spain and Portugal. Journal of Phytopathology, 155, 289-295.
- ROMERO R, NAVARRO RM, GARCÍA-FERRER A. 2007b. Aplicación de ortofotos para la estimación de pérdida de individuos en dehesas de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) afectadas por procesos de decaimiento. Boletín Sanidad Vegetal Plagas, 33, 121-137.
- ROMERO MA, VENEGAS J, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2009. El chancro de ramas de la encina y el alcornoque. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 4 pp.
- ROSSMAN AY, PALM ME. 2008. Systematics of plant pathogenic fungi: Why it matters. Plant Disease, 92, 1376-1386.
- ROYLE DJ, HICKMAN CJ. 1964. Observations on *Phytophthora cinnamomi*. Canadian Journal of Botany, 42, 311-318.
- RUIZ DE LA TORRE. 2001. Árboles y arbustos de la España peninsular. Fundación Conde del Valle de Salazar, Madrid. 512 pp.
- RUIZ DE LA TORRE. 2006. Flora Mayor. Ministerio de Medio Ambiente. Parques Nacionales, Madrid. 1756 pp.
- SAN MIGUEL, 1994. La dehesa española. Origen, tipología, características y gestión. Fundación Conde del Valle de Salazar, Madrid. 96 pp.
- SÁNCHEZ ME, CAETANO P, FERRAZ J, TRAPERO A. 2002a. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. Forest Pathology, 32, 5-18.

- SÁNCHEZ ME, LORA F, TRAPERO A. 2002b. First Report of *Cylindrocarpon destructans* as a Root Pathogen of Mediterranean *Quercus* Species in Spain. *Plant Disease*, 86, 693.
- SÁNCHEZ ME, SÁNCHEZ JE, NAVARRO RM, FERNÁNDEZ P, TRAPERO A. 2003a. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 29, 87-108.
- SÁNCHEZ ME, VENEGAS J AND ROMERO MA. 2003b. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease*, 87, 1515-1521.
- SÁNCHEZ ME, ANDICOBERRY S, TRAPERO A. 2005a. Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *Forest Pathology*, 35, 115-125.
- SÁNCHEZ JE, SÁNCHEZ ME, TRAPERO A. 2005b. La tinta del castaño. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 6 pp.
- SÁNCHEZ ME, CAETANO P, ROMERO MA, NAVARRO RM, TRAPERO A. 2006. *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. En: *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. Forest Research, Farnham. pp. 149-154.
- SÁNCHEZ ME, FERNÁNDEZ-REBOLLO P, TRAPERO A. 2010. Podredumbre radical de la encina y el alcornoque. En: *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado*. Phytoma, Valencia. pp. 135-147.
- SÁNCHEZ-MÁRQUEZ S, BILLS GF, HERRERO N, ZABALGOGAZCOA I. 2011. Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology* (en prensa, doi:10.1016/j.funeco.2010.12.001)
- SARDINERO S, FERNÁNDEZ CANCIO A, PEREIRA Y, MANRIQUE E. 2000. Oak decline and vegetation dynamics in Southwestern Spain. INIA Report of Research Project 1FD97-0911-C3-1. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid. 10 pp.
- SHEARER BL, FAIRMAN RG. 2007. A stem injection of phosphite protects *Banksia* species and *Eucalyptus marginata* from *Phytophthora cinnamomi* for at least four years. *Australasian Plant Pathology*, 36, 78-86.

- SHEARER BL, CRANE, CE, COCHRANE A. 2004. Quantification of the susceptibility of the native flora of the South-West Botanical Province, Western Australia, to *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany*, 52, 435-443.
- SINCLAIR WA, LYON HH, JOHNSON WT. 1987. Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press, Ithaca, NY. 574 pp.
- SMITH VL, WILCOX WF, HARMAN GE. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of Apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Disease Control and Pest Management*, 80, 880-885.
- SMITH IM, DUNEZ J, LELLIOTT RA, PHILLIPS DH, ARCHER SA. (eds.).1992. Manual de enfermedades de las plantas. Mundi – Prensa, Madrid. 671 pp.
- STAMPS DT, WATERHOUSE GM, NEWHOOK FJ, HALL GS. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. CAB International, Kew. 28 pp.
- SUGIMOTO T, AINO M, SUGIMOTO M, WATANABE K. 2005. Reduction of *Phytophthora* stem rot disease on soybeans by the application of CaCl₂ and Ca (NO₃)₂. *Journal of Phytopathology*, 153, 536-543.
- SUGIMOTO T, WATANABE K, YOSHIDA S, AINO M, MATSUYAMA M, MAEKAWA M, IRIE K. 2007. The effects of inorganic elements on the reduction of *Phytophthora* stem rot disease of soybean, the growth rate and zoospore release of *Phytophthora sojae*. *Journal of Phytopathology*, 155, 97-107.
- TAPIAS R, FERNÁNDEZ M, MOREIRA AC, SÁNCHEZ ME, CRAVADOR A. 2006. Posibilidades de la variabilidad genética de encinas y alcornoques en la conservación y recuperación de bosques amenazados por la “seca”. *Boletín informativo CIDEU*, 1, 45-51.
- TORRES-JUAN J. 1993. Patología Forestal. Mundi-Prensa, Madrid. 270 pp.
- TRAPERO A. 1996. Los hongos fitopatógenos. En: *Patología Vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología- Phytoma, Valencia. pp. 713-738.
- TRAPERO A, BLANCO MA. 2008. Enfermedades. En: *El cultivo del olivo*. Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 595-656.

- TRAPERO A, SÁNCHEZ ME, PÉREZ DE ALGABA A, ROMERO MA, NAVARRO N, VARO R, GUTIÉRREZ J. 2000. Enfermedades de especies forestales en Andalucía. *Agricultura*, 821, 822-824.
- TRAPERO A, VIRUEGA JR, LÓPEZ-DONCEL LM, SEGURA R, ALSALIMIYA M, MORAL J, ROCA LF. 2010. Repilo del olivo. En: *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado*. Phytoma, Valencia. pp. 267-296.
- TUSET JJ, HINAREJOS C, MIRA JL, COBOS JM. 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 22, 491-499.
- TUSET JJ, COTS F, HINAREJOS C, MIRA JL. 2001. Suspensiones de zoosporas de *Phytophthora cinnamomi* que causan la “seca” en cinco especies de *Quercus* mediterráneos. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 27, 103-115.
- VÁZQUEZ FM. 1998. Semillas del género *Quercus* L. (Biología, ecología y manejo). Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de Extremadura, Mérida. 235 pp.
- VÁZQUEZ FM, ESPÁRRAGO F, LÓPEZ MÁRQUEZ JA, JARAQUEMADA F, PÉREZ MC. 1992. Descripción de la especie *Quercus rotundifolia* Lam. y sus formas para Extremadura. Colección Información Técnica Agraria. Serie Agricultura 17. Consejería de Agricultura y Comercio, Junta de la Junta de Extremadura, Mérida. 23 pp.
- VETTRAINO AM, BARZANTI GP, BIANCO MC, RAGAZZI A, P CAPRETTI P, PAOLETTI E, LUISI N, ANSELMINI N, VANNINI A. 2002. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *Forest Pathology*, 32, 19-28.
- VON BROEMSEN SL, DEACON JW. 1997. Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solution. *Phytopathology*, 87, 522-528.
- WAGER VA. 1942. *Phytophthora cinnamomi* and wet soil in relation to the dying-back of avocado trees. *Higardia*, 14, 519-532.

-
- WATERHOUSE GM. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. CMI Mycological Papers 92, Kew. 22 pp.
- WATERHOUSE GM. 1970. The genus *Phytophthora* de Bary. CMI, Kew. 59 pp.
- WATERHOUSE GM, WATERSTON JM. 1966. Description of pathogenic fungi and bacteria n° 113. *Phytophthora cinnamomi*. CAB International, Wallingford. 2 pp.
- ZENTMYER GA. 1952. A substance stimulating sexual reproduction in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 42, 24.
- ZENTMYER GA. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the disease it causes. Monograph 10. APS Press, St. Paul, MN. 96 pp.
- ZENTMYER GA. 1983. The world of *Phytophthora*. En: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. APS Press, St. Paul, MN. pp. 1-8.
- ZENTMYER GA. 1988. Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. *Transaction of the British Mycological Society*, 91, 367-378.

