



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS Y MONTES

**ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL DEL
CHANCRO DE LOS *QUERCUS* CAUSADO POR
*BOTRYOSPAHERIA SPP.***

Tesis presentada por M^a de los Angeles Romero Martín,
para optar al grado de Doctor Ingeniero de Montes

Vº Bº

Vº Bº

Fdo: Dr. Antonio Trapero Casas

Fdo: Dra. María Esperanza Sánchez Hernández

TÍTULO: *Etiología, epidemiología y control del chancro de los Quercus
causado por Botryospaheria spp.*

AUTOR: *M^a de los Angeles Romero Martín*

© 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

Córdoba, Marzo de 2012

D. Antonio Trapero Casas, Catedrático de Universidad del Área de Producción Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba, y **Dña. María Esperanza Sánchez Hernández**, Profesora Titular del Área de Producción Vegetal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba, **INFORMAN**

Que el trabajo “Etiología, epidemiología y control del chancro de los *Quercus* causado por *Botryosphaeria* spp”, del que es autora M^a de los Angeles Romero Martín, se ha realizado en el Departamento de Agronomía en el marco de los proyectos de investigación AGL2002-00530, con la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia y AGL2005-07151-CO2-01 con la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación, además del proyecto “Desarrollo de modelos de evaluación de daños producidos por la seca de especies del género *Quercus* en Andalucía” con la financiación de la Junta de Andalucía, todos 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 diversos foros y congresos científicos nacionales e internacionales, dando lugar a las siguientes comunicaciones y publicaciones:

- Romero, M.A., Jiménez, J.J., Sánchez, M.E., Trapero, A. 2006. Evaluación in vitro de productos químicos y biológicos para el control de chancros causados por *Botryosphaeria* spp. en troncos de alcornoques. XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, 18-22 Septiembre, Murcia. pp. 115.
- Romero, M.A., Jiménez, J.J., Sáchez, M.E., Trapero, A. 2006. Evaluation of biological and chemical products to control *Quercus* suber trunk canker caused by *Botryosphaeria* spp. Proc. 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 11-15 June, Rhodes Island, Grecia. pp .353.
- Romero, M.A., Sánchez, J.E., Navarro, R.M., Sánchez, M.E., Trapero, A. 2005. Red andaluza de daños en ecosistemas forestales: enfermedades diagnosticadas en especies forestales en Andalucía. IV Congreso Forestal Español, Zaragoza 26- 30 de septiembre de 2005

- Romero, M.A., Sánchez, J.E., Jiménez, J.J., Sánchez, M.E., Trapero, A. 2005. Estado fitosanitario de los montes andaluces: enfermedades de los *Quercus* en Andalucía. IV Congreso Forestal Español, Zaragoza 26- 30 de septiembre de 2005.
- Gutiérrez, F., Romero, M.A., Sánchez, J.E., Navarro, R., Sánchez, M.E., Trapero, A. 2002. Enfermedades diagnosticadas en especies forestales en Andalucía. XI Congreso Sociedad Española de Fitopatología. 14 al 18 de octubre, Almería.
- Romero, M.A., Venegas, J., Sánchez, M.E., Trapero, A. 2002. Caracterización morfológica de especies de *Botryosphaeria* asociadas con chancros de ramas de *Quercus* spp. XI Congreso Sociedad Española de Fitopatología. 14 al 18 de octubre, Almería.
- Venegas, J., Romero, A., Sánchez, M.E., Trapero, A. 2001. Hongos fitopatógenos asociados a chancros y desecaciones de ramas de *Quercus* en Andalucía. III Congreso Forestal Español, 25-28 Septiembre, Granada. pp. 168-173.
- Sánchez, M.E., Venegas, J., Romero, M.A., Blanco, M.A., Trapero, A. 2001. Fungal canker diseases associated with Mediterranean *Quercus* decline in southern Spain. Proceedings 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 17-20 Septiembre, Évora, Portugal. Pp 64-66.
- Sánchez, M. E., Venegas, J., Romero, M.A., Trapero, A. 2001. Fungal canker associated with Mediterranean *Quercus* decline. Forest Pathology Group Meeting, 3-5 Septiembre, Gregynog, University of Wales, Reino Unido.

Además, como avance de los resultados contenidos en la Tesis Doctoral se ha publicado los siguientes artículos, libros, monografías y capítulos de libro:

Artículos

- Trapero, A., Romero, M.A., Sánchez, J.E., Jiménez, J.J., Sánchez, M.E. 2006. La seca de encinas y alcornoques en Andalucía. San Miguel Información 1: 5 pp.
- Trapero, A., Romero, M.A., Sánchez, J.E., Jiménez, J.J., Sánchez, M.E. 2006. La seca de encinas y alcornoques en Andalucía: decaimiento y enfermedad. Bol. Inf. CIDEU 1: 7-14.
- Romero, M.A., Sánchez, M.E., Trapero, A. 2005. First report of *Botryosphaeria ribis* as a branch dieback pathogen of olive trees in Spain. Plant Disease 89: 208.
- Sánchez, M.E., Venegas, J., Romero, M.A., Phillips, A.J.L., Trapero, A. 2003. El chancro de encinas y alcornoques causado por *Botryosphaeria* spp. en Andalucía. Bol. San. Veg. Plagas 29: 593-612.
- Sánchez, M.E., Venegas, J., Romero, M.A., Phillips, A.J.L., Trapero, A. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. Plant Disease 87: 1515-1521. 2003.

Libros y Monografías

- 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, Rodríguez S. Procesos de Decaimiento Forestal (La Seca). Situación del conocimiento. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. 112 pp (2009) ISBN 978-84-92807-29-1.
- Romero MA, Sánchez ME, Trapero A.. El chancro del tronco del alcornoque causado por *Botryosphaeria* (Chancro de *Diplodia*). Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 6 pp.2009.
- Romero MA, Venegas J, Sánchez ME, Trapero A.. El chancro de ramas de la encina y el alcornoque. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 6 pp. 2009.
- Navarro RM, Fernández P, Trapero A, Caetano P, Romero MA, Sánchez ME, Fernández A, Sánchez I, López G. Los procesos de decaimiento de encinas y alcornoques. Dirección Gral. de Gestión del Medio Natural. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 32 pp. ISBN 84-95785-89-7. 2004.
- Romero MA, Venegas J, Sánchez ME, Trapero A. El chancro de ramas de la encina y el alcornoque. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 6 pp. 2003.
- Romero MA, Sánchez ME, Trapero A. El chancro del tronco del alcornoque causado por *Botryosphaeria* (Chancro de *Diplodia*). Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. 6 pp. 2003.

Capítulos de libros

- Sánchez ME, Romero MA, Trapero A. 2008. Las enfermedades de los *Quercus* en Andalucía. En: Los sistemas de dehesa en el norte de Córdoba. Perspectivas futuras para su conservación. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba- Ayuntamiento de Cardeña. Fernández P, Carbonero MD, Blázquez A (Eds.). pp. 261-294
- Romero MA. 2006. Enfermedades asociadas al decaimiento. En: I Seminario y I Jornada de la seca de la encina y del alcornoque. "La seca", un reto a la investigación. Junta de Andalucía: 51-55. ISBN 84-8474-182-6.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 28 Marzo de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.: Antonio Trapero Casas

Fdo.: María Esperanza Sánchez Hernández

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, Esperanza Sánchez y Antonio Trapero, por su tiempo, paciencia y su inestimable ayuda, sin la cual no hubiera sido posible realizar esta tesis doctoral.

A todos los miembros de la Unidad de Patología Agroforestal por su consejos y por hacer que mi paso por el laboratorio sea inolvidable.

A Paqui Luque por todos los años y experiencias compartidas.

A los profesores Miguel Ángel Blanco y Javier López por todo lo que me han ayudado desde que empecé a hacer el proyecto final de carrera.

Deseo expresar mi agradecimiento a los organismos que han financiado el desarrollo de las actividades incluidas en este trabajo, en el marco del

A mi familia por todo el apoyo recibido, especialmente a mis padres y a Jose Miguel que siempre me han animado a seguir adelante y me han dado fuerzas para la finalización del trabajo.

Y dedicárselo a mis niños, Patricia y Mario, por ellos, con todo mi cariño y esfuerzo.

RESUMEN

Frecuentemente se han observado chancros en diferentes especies de *Quercus* en Andalucía. En las prospecciones realizadas en ocho zonas de decaimiento de *Quercus* y en 242 puntos de la Red Andaluza de Seguimiento de Daños en Ecosistemas Forestales, se detectó la presencia de áreas alargadas de corteza necrosada en las ramas enfermas. Las especies fúngicas *Botryosphaeria corticola*, *B. iberica* y *B. dothidea* se aislaron consistentemente de estas lesiones. La temperatura óptima de crecimiento de *B. corticola* y *B. dothidea* fue alrededor de 25° C y la de *B. iberica* de 21° C. Con el fin de buscar huéspedes alternativos en las masas de encinas y alcornoques para *Botryosphaeria* se inocularon plantas de *Q. suber*, *Olea europea* var. Picual y *O. europea* var. Gordal, *Q. ilex* y *Q. coccifera* con aislados de *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *Neofusicoccum mediterraneum*. Las plantas de alcornoque, encina y coscoja inoculadas con *B. corticola* mostraron los síntomas observados en campo, siendo la coscoja la que presentó un mayor tamaño de chancro. Para el control de *B. corticola*, agente causal de los chancros en tronco de alcornoques, se ensayaron en dos parcelas, una en Sevilla y otra en Cádiz, un total de 12 productos químicos y biológicos. Después de 4 años de la aplicación de los productos, el Metil Tiofanato fue el que mostró mejores resultados en ambas parcelas, reduciendo significativamente el número y la longitud de los chancros. En ensayos *in vitro*, este producto inhibe el crecimiento micelial de *B. corticola* incluso a dosis muy bajas (1 ppm). El Metil Tiofanato podría ser usado para el control de los chancros del tronco en alcornoque.

SUMMARY

Cankers are frequently observed on declining *Quercus* spp. in southwestern Spain. In surveys carried out in eight declining *Quercus* forest and 242 points of the Red Andaluza de Seguimiento de Daños en Ecosistemas Forestales (RASDEF), strips of necrotic inner bark were common on diseased branches. *Botryosphaeria corticola*, *B. iberica* and *B. dothidea* were consistently isolated from these branches. The optimal temperature for *in vitro* growth of *B. corticola* and *B. dothidea* was above 25° C, and *B. iberica* had about 21° C of optimal temperature. In the search for alternative hosts of *Botryosphaeria* in the forests of *Q. suber* and *Q. ilex*, seedlings of *Q. suber*, *Q. ilex*, *Q. coccifera* and *Olea europea* var. Picual and var. Gordal, were inoculated with isolates of *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* and *Neofusicoccum mediterraneum*. Seedlings of *Q. suber*, *Q. ilex* and *Q. coccifera* inoculated with *B. corticola* developed the same symptoms than observed in the field being, seedlings of *Q. coccifera* which presented the biggest canker sizes. In two field trial plots, one in Seville and the other in Cadiz, 12 products, chemical and biological, were investigated by their effectiveness on cork oak trunks after stripping of their bark, in order to prevent cankering caused by *Botryosphaeria* spp., which produces important losses in cork quality and production. Four year after spraying treatments, Methil Thiophanate appears as the more effective product in both plots, significantly reducing the number and length of bark lesions registered on treated trunks. In *in vitro* experiments these products inhibit the micelial growth of *B. corticola* even at very low doses (1 ppm). Methil Thiophanate could be used as an effective treatment to protect the cork oak trunks.

INDICE GENERAL

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

EL DECAIMIENTO DE ENCINAS Y ALCORNOQUES

EL GÉNERO *BOTRYOSPHAERIA*

1. Clasificación
2. Características morfológicas
3. Anamorfos de *Botryosphaeria*
4. Descripción patogénica
5. Ciclo de patogénesis y epidemiología
6. Control

LAS ESPECIES *Botryosphaeria corticola*, *Botryosphaeria iberica* y *Botryosphaeria dothidea*

1. Botryosphaeria corticola

- 1.1. Descripción micológica
- 1.2. Descripción patogénica

2. Botryosphaeria iberica

- 2.1. Descripción micológica
- 2.2. Descripción patogénica

3. Botryosphaeria dothidea

- 3.1. Descripción micológica
- 3.2. Descripción patogénica

CAPITULO 3. SINTOMATOLOGIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS CHANCROS EN ANDALUCIA

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Introducción

- 1.1. La encina y el alcornoque
- 1.2. Distribución de la encina y el alcornoque

2. Objetivos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Procedencia de las muestras

1.1. Fincas afectadas de Seca

1.2. Puntos de la Red Andaluza de Equilibrios Biológicos sobre Ecosistemas Forestales

2. Toma de muestras

2.1. Fincas afectadas de Seca

2.2. Puntos de la Red Andaluza de Equilibrios Biológicos sobre Ecosistemas Forestales

3. Tratamiento de las muestras en el laboratorio

4. Caracterización e identificación de los aislados

RESULTADOS

1. Origen de los aislados y morfología de las colonias

2. Caracterización e identificación de los aislados

3. Distribución de las especies de *Botryosphaeria* en Andalucía

3.1. Fincas afectadas de Seca

3.2. Puntos de la Red Andaluza de Equilibrios Biológicos sobre Ecosistemas Forestales

DISCUSIÓN

CAPITULO 4. IDENTIFICACION DE HONGOS ASOCIADOS A CHANCROS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Introducción

2. Objetivos

MATERIALES Y METODOS

1. Toma de muestras en parcelas afectadas de Seca

1.1. Localización de las parcelas

1.2. Toma de muestras

2. Tratamiento de las muestras en el laboratorio

3. Caracterización e identificación de los aislados

3.1. Estructuras asexuales

3.2. Estructuras sexuales

4. Determinación de las curvas de crecimiento

RESULTADOS

1. Origen de los aislados y morfología de las colonias

2. Caracterización e identificación de los aislados

2.1. Caracterización de las estructuras asexuales

2.2. Caracterización de las estructuras sexuales

3. Tasa de crecimiento a distintas temperaturas

DISCUSIÓN

CAPITULO 5. GAMA DE HUÉSPEDES DE *DEBOTRYOSPHAERIA*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Introducción

2. Objetivos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Elección de aislados

2. Preparación del inóculo

3. Material vegetal

4. Inoculación

5. Evaluación de infecciones

6. Medida de la severidad de las infecciones

7. Reaislamiento del hongo inoculado

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CAPITULO 6. CONTROL DE *B. corticola* EN TRONCO

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. Introducción

2. Objetivos

MATERIALES Y METODOS

1. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de *B. corticola*

1.1. Fungicidas

1.2. Preparación de los medios de cultivo

1.3. Siembra e incubación de los medios de cultivo

1.4. Evaluación del crecimiento

1.5. Análisis de datos

RESULTADOS

1. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de *B. corticola*

2. Eficacia de aplicaciones de fungicidas en alcornocales.

2.1. Ensayo en la finca “Las Navas y El Berrocal” (Sevilla)

2.2. Ensayo en la finca “Valdeinfierno” (Cádiz)

DISCUSIÓN

CAPITULO 7 DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

CAPITULO 8 BIBLIOGRAFIA

CAPITULO 9 ANEJOS

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

INTRODUCCIÓN

Desde hace más de dos décadas se viene observando en Andalucía un progresivo deterioro y muerte de encinas y alcornoques, que se ha denominado Seca o decaimiento de los *Quercus* (Carrasco *et al.*, 2009). Al igual que en los decaimientos de *Quercus* del centro y norte de Europa (Brasier, 1996), se ha asociado un gran número de factores a este decaimiento. Sin embargo, no se puede admitir como factor de decaimiento a cualquier agente biótico o abiótico que actúe deteriorando el árbol. Actualmente se entiende como decaimiento forestal una enfermedad de etiología compleja, con múltiples factores intercambiables en el tiempo y el espacio (Manion, 1991; Carrasco *et al.*, 2009). En el caso del decaimiento de los *Quercus* mediterráneos, dentro de estos factores se encuentran las enfermedades producidas por Oomicetos y hongos como los del género *Botryosphaeria* (Sánchez *et al.* 2010).

El género *Botryosphaeria* incluye especies de distribución cosmopolita, principalmente en zonas de clima templado y tropical (Jacobs y Rehner, 1998; Pavlic *et al.*, 2004). Estos hongos tienen un amplio número de huéspedes y se han descrito como endofitos y parásitos, patógenos oportunistas en muchas especies leñosas (Pavlic *et al.*, 2004).

La enfermedad más importante que causa el género *Botryosphaeria* es la formación de chancros y muerte regresiva de ramas en especies leñosas, tanto forestales como frutales, y en menor medida en matorrales leñosos (von Arx, 1987). De entre las numerosas especies leñosas de interés forestal en las que se han descrito especies de *Botryosphaeria* causantes de chancros, destacan las pertenecientes al género *Quercus* (Luque y Girbal, 1989; Ragazzi *et al.*, 1989; 1997; 1999a; 1999b; 1999c; 2000; Morehart, 1994; Luque y Álvarez, 1997; Luque *et al.*, 1999; 2000; Sánchez *et al.*, 2003).

Las masas de *Quercus*, más concretamente los encinares y alcornocales, son los bosques más representativos de la Península Ibérica seca. Cuando se encuentran bien conservados constituyen uno de los ecosistemas naturales más complejos y maduros del territorio (Blanco *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2006). En estado natural es muy probable que estos ecosistemas forestales presentaran una alta diversidad en el estrato arbóreo, siendo abundantes las formaciones mixtas de distintas especies de *Quercus*, con otras especies leñosas acompañantes como el madroño, el durillo y el labiérnago y, en las

zonas más cálidas, el mirto, la coscoja, el acebuche, el lentisco e incluso, el algarrobo (Blanco *et al.*, 1998). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de cómo se ve afectada esta vegetación acompañante por las especies de *Botryosphaeria* spp. Se ha podido constatar diferentes especies de este género fúngico produciendo chancros en jara pingosa (Sánchez *et al.* 2002) y en coscoja (Tsopelas *et al.*, 2009).

El alcornocal es un sistema forestal en el que ha intervenido la mano del hombre, legándolo hasta nuestros días con unos elevados niveles de conservación y calidad ambiental. El alcornocal puede considerarse un monte generoso, por la multitud y variedad de productos que ofrece. El principal producto del alcornoque es el corcho. Las zonas rurales obtienen de los alcornocales muchos de esos beneficios, no solo económicos. Los daños que puedan aparecer en esas masas de alcornoque pueden perjudicar dichas zonas (Blanco *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2006). Dentro de las plagas y enfermedades que puedan sufrir los alcornoques en el tronco, los chancros son probablemente los que más afectan a la producción de corcho (Junta de Andalucía, 2009).

Hasta el año 2003, se venía usando como una de las medidas de control preventivo de chancros la aplicación de Benomilo tras el descorche. A partir de ese año y por la aplicación de la directiva europea 91/414/CEE, dejó de utilizarse dicho producto. Desde entonces se buscan alternativas en cuanto a la utilización de fungicidas efectivos en el control de la enfermedad. Algunos productos biológicos han dado buenos resultados en laboratorio (Wei-Qun y Michailides, 2001; Xiang-Tian *et al.*, 2011), los cuales deberían ser ensayados en condiciones naturales y comparar su eficacia frente a los productos químicos. Luque *et al.* (2008) realizaron ensayos con productos químicos pulverizados sobre la superficie descorchada, obteniendo buenos resultados con otros productos de la familia de los benzimidazoles (Metil Tiofanato y Carbendazima). El Metil Tiofanato, como materia activa, se encuentra incluido en el Anejo I según la Directiva 2005/52/CE sobre productos fitosanitarios y, está autorizado para su uso agrícola en el control de chancros causados por otras especies de *Botryosphaeria* en cultivos leñosos (Vademecum 2012). Este hecho, junto a los resultados de Luque *et al.* (2007), lo hace un buen candidato para su utilización tras el descorche de los alcornoques en Andalucía.

OBJETIVOS

El objetivo general de la Tesis Doctoral es identificar y caracterizar los chancros en ramas y troncos de las masas de encinas y alcornoques de Andalucía y, el control de los chancros de tronco en alcornoque. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio de la sintomatología, incidencia y distribución de los chancros en las masas de encinas y alcornoques en Andalucía.
2. Identificación y caracterización de las especies de *Botryosphaeria* asociadas a los chancros de encinares y alcornocales.
3. Estudio de huéspedes alternativos de *Botryosphaeria* spp. aisladas de encinas, alcornoques y otras especies acompañantes.
4. Evaluación de fungicidas protectores para el control de *B. corticola* en troncos de alcornoque.

***CAPÍTULO 2. REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA***

1. EL DECAIMIENTO DE ENCINAS Y ALCORNOQUES

Desde la década de los noventa se viene observando en Andalucía un progresivo deterioro y muerte de encinas y alcornoques que se ha denominado Seca o decaimiento de los *Quercus*, que ha dado lugar a la pérdida de un elevado número de árboles, lo que unido a la falta de regeneración, se ha traducido en un ahuecamiento progresivo de las dehesas y, en algunos casos, en la pérdida total del arbolado (García *et al.*, 2008; Carrasco *et al.*, 2009). Sólo en Andalucía occidental mueren miles de encinas cada año a causa del decaimiento (Romero *et al.*, 2007), originando además graves pérdidas en la producción de corcho y bellota, y llevando a un estado de deterioro a las dehesas, monte alcornocal y encinar, que en ocasiones puede resultar irreversible.

Al igual que en los decaimientos de *Quercus* del centro y norte de Europa (Brasier, 1996), se ha asociado un gran número de factores a los decaimientos de *Quercus* en la Península Ibérica. El estado actual del conocimiento acerca de la etiología de la Seca se puede resumir según un modelo con tres grupos de factores implicados: predisponentes, incitantes y contribuyentes (Fernández *et al.*, 2008). El decaimiento implicará al menos a un factor de cada grupo:

Factores predisponentes: Son factores de tipo selvícola (Navarro *et al.*, 2004), caracterizados por el envejecimiento generalizado del arbolado, con pies explotados intensivamente durante periodos de tiempo muy prolongados; compactación del suelo debida a la sobrecarga ganadera; ausencia casi total de regeneración debido al sobrepastoreo o al cultivo, así como al descuido de los propietarios para asegurar un reemplazo adecuado de los pies senescentes o decrepitos; presencia de heridas a causa de malas prácticas culturales (podas excesivas o daños mecánicos al arbolado); acumulación de biomasa por falta de cuidados culturales o por abandono total o parcial del aprovechamiento.

Factores incitantes: Dan lugar a la expresión de los síntomas del decaimiento y son de tipo abiótico, principalmente relacionados con las alteraciones sufridas por el clima en los últimos años (Carrasco *et al.*, 2009). La tendencia a la prolongación de los periodos de sequía estival, con aumento de la temperatura, se refleja en un empeoramiento del estado general de las coberturas vegetales. Estas fluctuaciones climáticas no sólo tienen un efecto directo en el desarrollo y distribución de las especies arbóreas (Sardinero *et al.*, 2000), sino que pueden estimular la actividad de patógenos

asociados al decaimiento (Brasier, 1996) junto con un efecto indirecto en las interacciones planta-patógeno (Brasier y Scott, 1994).

Factores contribuyentes: Son factores de tipo biótico que producen la muerte del árbol sintomático: enfermedades y plagas de insectos. Entre las enfermedades destacan por su gravedad las podredumbres radicales causadas por Oomicetos: *Phytophthora cinnamomi* (Brasier, 1996; Gallego *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003) y *Pythium spiculum* (Romero *et al.*, 2007). Otras enfermedades que también se han asociado al decaimiento de *Quercus* son los chancros causados por distintas especies de género *Botryosphaeria* (Luque *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2003) y el chancro bacteriano causado por *Brenneria* (= *Erwinia*) *quercina* (Biosca *et al.*, 2003). El chancro carbonoso causado por *Biscogniauxia mediterranea* (= *Hypoxylon mediterraneum*) se ha mencionado como factor contribuyente del decaimiento, aunque no parece jugar un papel determinante, actuando como un patógeno secundario sobre los pies afectados por otras enfermedades o que sufren sequías muy severas (Jiménez *et al.*, 2005). También se han asociado al decaimiento plagas de insectos perforadores de ramas y troncos, destacando varias especies de coleópteros de los géneros *Cerambyx* y *Prinobius* (Carrasco *et al.*, 2009).

Actualmente parece claro que lo que se ha denominado Seca de encinas y alcornoques en Andalucía no tiene una única causa ni tampoco es el resultado de la suma de infinidad de ellas. Se deben diferenciar las situaciones en las que el mal estado sanitario del arbolado está asociado a una enfermedad o plaga, frente a otras propias de un decaimiento forestal, entendiendo éste como una enfermedad de etiología compleja, con múltiples factores intercambiables en el espacio y en el tiempo. Es importante recordar que una plaga o una enfermedad siempre va a depender de la existencia de condiciones ambientales favorables, presentes en todo proceso de deterioro sanitario, sin que ello implique la existencia de un proceso de decaimiento (Carrasco *et al.*, 2009).

En España y Portugal las especies más afectadas por los procesos de decaimiento son *Quercus suber* y *Q. ilex* aunque también se ha observado en *Q. pyrenaica*, *Q. faginea*, *Q. canariensis* y *Q. coccifera* (Carrasco *et al.*, 2009). De hecho, el chancro del tronco de alcornoque causado por *Botryosphaeria corticola* se considera como la principal enfermedad causante de la muerte de alcornoques en Cataluña (Luque y Girbal, 1989; Luque *et al.*, 2000).

EL GÉNERO *Botryosphaeria*

1. Clasificación

Muchos han sido los cambios producidos en la taxonomía del género *Botryosphaeria* desde que fue descrito por primera vez en 1863 por Cesati y De Notaris, designando a *B. dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. como la especie tipo (Denman *et al.*, 2000).

Los movimientos de este género por órdenes como *Sphaeriales*, *Dothideales*, *Myriangiales*, *Pseudosphaeriales*, *Pleosporales*... y familias e incluso subfamilias como *Melogrammataceae*, *Pseudosphaeriaceae*, *Botryosphaeriaceae*, *Dothideaceae* han sido constantes desde su aparición. Empleando técnicas moleculares, Schoch *et al.* (2006) describió un nuevo orden: *Botryosphaeriales*, dentro de los *Dothideomycetes*, sin relación con los otros órdenes descritos en esa clase. Por lo tanto, el género *Botryosphaeria* se encuadra, según la clasificación más reciente de Hawksworth *et al.* (2008), dentro del reino *Fungi* de la siguiente manera:

TAXÓN	Hawksworth <i>et al.</i> (2008)
REINO	<i>Fungi</i>
PHYLUM	<i>Ascomycota</i>
CLASE	<i>Dothideomycetes</i>
ORDEN	<i>Botryosphaeriales</i>
FAMILIA	<i>Botryosphaeriaceae</i>
GÉNERO	<i>Botryosphaeria</i>

Por otro lado, en el *Index Fungorum* (<http://indexfungorum.org/>) se recogen los siguientes sinónimos de *Botryosphaeria* (Sivanesan, 1984; Denman *et al.*, 2000):

Amerodothis Theiss. & Syd., *Annl's mycol.* 13(3/4): 295 (1915)

Apomella Syd., *Annl's mycol.* 35(1): 47 (1937)

Caumadothis Petr., *Sydowia* 24(1-6): 276 (1971) [1970]

Coutinia J.V. Almeida & Sousa da Câmara, *Revta agron.*, Lisb. 1: 392 (1903)

Creomelanops Höhn., *Sber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturw. Kl., Abt. 1* 129: 146

(1920)

Cryptosporina Höhn., *Öst. bot. Z.* 55: 54 (1905)

Desmotascus F. Stevens, *Bot. Gaz.* 68: 476 (1919)

Epiphyma Theiss., *Verh. zool.-bot. Ges. Wien* 66: 306 (1916)

Melanops Nitschke ex Fuckel, *Jb. nassau. Ver. Naturk.* 23-24: 225 (1870) [1869-70]

Neodeightonia C. Booth, in Punithalingam, *Mycol. Pap.* 119: 17 (1970) [1969]

Phaeobotryon Theiss. & Syd., *Annl. mycol.* 13(5/6): 664 (1915)

Phaeobotryosphaeria Speg., *Anal. Mus. nac. B. Aires*, Ser. 3 17(10): 120 (1908)

Pyreniella Theiss., *Verh. zool.-bot. Ges. Wien* 66: 371 (1916)

Rostrosphaeria Tehon & E.Y. Daniels, *Mycologia* 19(3): 112 (1927)

Thuemenia Rehm, in Thümen, *Mycoth. Univ.*, cent.: no. 971 (in sched.) (1878)

2. Características morfológicas

Sivanesan (1984) describió el género *Botryosphaeria* constituido únicamente por 12 especies. A finales del siglo pasado, las especies del género *Botryosphaeria* descritas eran 143 (Denman *et al.*, 2000). Actualmente, se aceptan en este género incluso especies de las que solo se conoce el anamorfo y por lo tanto, no se les puede asignar nombres nuevos a los teleomorfos (p. ej. '*Botryosphaeria*'*obtusa*) (Slippers *et al.*, 2007), por lo que se puede considerar que hay descritas unas 193 especies para dicho género.

Las mayoría de las especies fúngicas incluidas en los Dothideomicetes se caracterizan por la formación de ascas en el interior de lóculos estromáticos y la presencia de una doble pared en las ascas (ascas bitunicadas), características principales que presentan las especies incluidas en los antiguos Loculoascomicetos (Alexopoulos y Mims, 1985; von Arx, 1987; Hanlin, 1990; Denman *et al.*, 2000; Schoch, 2007).

Las especies de este género se desarrollan normalmente en el interior del tejido vegetal, donde generan micelio de color gris-verdoso y ascocarpos inmersos, aunque ocasionalmente pueden emerger (von Arx, 1987). Los ascomas o ascocarpos se caracterizan por presentarse dispersos en el tejido vegetal. De color oscuro, pueden ser uni o multiloculados, de cuello corto y ostiolados. El ascoma presenta una pared externa gruesa de naturaleza pseudoparenquimática, formada por células angulares o de textura globosa. Las capas más internas son de color más oscuro y las paredes celulares son aún más gruesas. Al producirse la maduración, el ascoma irrumpe hacia el exterior a través de los tejidos del huésped (Hanlin, 1990).

Según las descripciones más antiguas, estos ascocarpos se constituyen en peritecios uni o multiloculados, dependiendo de la especie (Ainsworth, 1973). Más recientemente, han sido descritos como pseudotecios y, por lo tanto, formados como lóculos estromáticos, a veces con participación de los tejidos del huésped (Reynolds, 1981; Hanlin, 1990).

Las lesiones en el tejido vegetal que generan los ascocarpos llegan a medir hasta 4 mm. En el interior de estos ascocarpos se sitúan las ascas, dirigidas hacia la apertura superior o cuello. Las ascas poseen forma alargada, con la parte apical más ancha. El tamaño del asca varía, según la especie, entre 90 y 160 μm de largo y entre 15 y 35 μm de ancho. Se caracterizan por poseer una doble pared o membrana, recibiendo el nombre de bitunicadas (Sivanesan, 1984, Hanlin, 1990; Denman *et al.*, 2000).

Estas dos capas actúan de forma diferenciada en la maduración de las ascas. La capa más externa es delgada e inextensible, mientras que la más interna es de mayor grosor y extensible. Así, durante la mayor parte de su desarrollo, la capa interna es visiblemente más gruesa, especialmente en el ápice, donde formará el poro por donde serán expulsadas las ascosporas. Con la maduración de las ascosporas, la capa interna, al ser extensible se dilata y por lo tanto pierde grosor. Esto no ocurre por la parte del poro, que continúa siendo más gruesa, lo que permite diferenciar las dos capas aun cuando son visiblemente iguales. En el momento de la expulsión de las ascosporas, la capa más externa se agrieta por el ápice, instante en el cual la capa interna se expande a través de la apertura, llegando a doblar su longitud y, debido a esta expansión, su pared se hace muy delgada. Este es el momento de expulsión de las ascosporas, que se colocan en las proximidades del poro y van saliendo una a una, a veces muy irregularmente (Ainsworth, 1973, Phillips *et al.*, 2005).

Las ascas presentan en su interior ocho ascosporas. Éstas se caracterizan por tener inicialmente un aspecto hialino, aunque en algunas especies se oscurecen al madurar. Tienen forma ovoide o elipsoide, generalmente aseptadas con la parte central más gruesa, y a veces presentan una o dos septas. Su pared generalmente es delgada y lisa, pero en algunas especies aparece granulada o verrugosa. Su tamaño varía según la especie entre 17-50 μm de largo y 3,5-25 μm de ancho (Sivanesan, 1984, Hanlin, 1990; Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2005).

Además de la producción de conidios, los anamorfos del género *Botryosphaeria* tienen también la capacidad de formar espermacias. Éstas se generan en los espermogonios, cuerpos fructíferos que tienen un aspecto similar a los picnidios y con los que, a menudo, han sido confundidos. Frecuentemente, las espermacias han sido descritas como microconidios (Sivanesan, 1984). Las espermacias son las responsables de la aparición de los estados teleomórficos. Son células sexuales de tamaño diminuto. Se desprenden de las hifas sobre las cuales se han formado (espermacióforos) siendo transportadas por insectos, agua o viento, hasta que entran en contacto con las hifas receptoras. Una vez establecido el contacto entre la espermacia y la hifa receptora, se produce la plasmogamia y a partir de ésta, la producción del micelio dicariótico que generará los ascomas o ascocarpos del estado teleomórfico (Alexopoulos y Mims, 1985).

Para que la espermatización tenga lugar son necesarios dos talos fúngicos sexualmente compatibles, lo que, a menudo, dificulta la aparición del estado teleomórfico. Por este motivo, las especies pertenecientes al género *Botryosphaeria* se aíslan muy difícilmente en el medio natural en su estado teleomórfico y, además, las características de los teleomorfos varían muy poco entre las diferentes especies. Por todo esto, a menudo se han identificado únicamente en función de las características de su estado anamórfico, lo que ha originado numerosas confusiones (Hanlin, 1990; Jacobs y Rehner, 1998; Denman *et al.*, 2000).

3. Anamorfos de *Botryosphaeria*

Las especies de *Botryosphaeria* son Dothideomicetes con anamorfos Coelomicetes. Tradicionalmente se incluía a los anamorfos en los géneros *Botryodiplodia*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Macrophoma* y *Sphaeropsis* (Sivanesan, 1984). Posteriormente, *Fusicoccum* fue incluido como anamorfo del género (Sutton, 1980). Otros anamorfos asociados al género *Botryosphaeria* son *Chaetodiplodia*, *Colletotrichella*, *Diplodiella*, *Kabatia*, *Pellionella*, *Placosphaeria*, *Rhynchodiplodia*, *Selenophoma*, *Striodiplodia* y *Strionemadiplodia* (Denman *et al.*, 2000). *Phyllosticta* fue asociado a *Botryosphaeria* por von Arx (1987) y Jacobs y Rehner (1998), pero este género debería ser reservado para anamorfos de *Guignardia* (Sivanesan, 1984; Hanlin, 1990, Denman *et al.*, 2000).

De los 18 géneros de Coelomicetes que habían sido asignados a *Botryosphaeria*, Denman *et al.* (2000) sólo reconocen dos géneros utilizando, además de las características morfológicas, la secuenciación de las regiones ITS del ADN que codifica para el ARN ribosómico: *Diplodia*, anamorfos de conidios de forma elipsoidal pigmentados o hialinos, de pared gruesa, aseptados o con una septa ; y *Fusicoccum*, anamorfos de conidios fusiformes hialinos, de pared delgada y normalmente sin septa (Zhou y Stanosz, 2001). Sin embargo, estos mismos autores reconocen que existen anamorfos, como es el caso de *B. proteae*, con ambos tipos de conidios que podrían ser excluidos del género *Botryosphaeria* (Denman *et al.*, 2000). Algunos autores han continuado distinguiendo al género *Lasiodiplodia* de *Diplodia* por presentar características morfológicas y filogenéticas diferentes (Pavlic *et al.*, 2004). Por otro lado, Phillips *et al.* (2005) reintrodujeron el género *Dothiorella*, que presenta conidios coloreados y septados antes de desprenderse de las células conidiógenas e incluso en algunas especies de este género, el teleomorfo presenta características que no se corresponden con *Botryosphaeria*.

Debido a los géneros relacionados con *Botryosphaeria* que empezaban a surgir y las nuevas metodologías de análisis molecular, Crous *et al.* (2006) realizaron un estudio filogenético de la familia *Botryosphaeriaceae*. Ellos reconocen en esta familia 10 linajes: un clado sin resolver (*Diplodia/Lasiodiplodia/Tiarosporella*), *Botryosphaeria sensu stricto* (anamorfos *Fusicoccum*), *Macrophomina*, *Neoscytalidium*, *Dothidotthia* (anamorfos *Dothiorella*), *Neofusicoccum* (telomorfos tipo *Botryosphaeria*, sinanamorfos tipo *Dichomera*), *Pseudofusicoccum*, *Saccharata* (sinanamorfos tipo *Fusicoccum* y *Diplodia*), '*Botryosphaeria*' *quercus* (anamorfo tipo *Diplodia*) y *Guignardia* (anamorfos *Phyllosticta*). Sin embargo, esta clasificación es muy cerrada para aquellas especies de *Botryosphaeria* en las que no se ha podido observar el teleomorfo. Para estas especies, se ha seguido utilizando el nombre tradicional con comillas, en el caso de que no se hubieran adoptado nombres nuevos (por ejemplo '*Botryosphaeria*' *obtusa*) (Slippers *et al.*, 2007) y, más recientemente, se ha recomendado utilizar el nombre del anamorfo como nombre válido para la especie (por ejemplo *Diplodia seriata*) (Phillips *et al.*, 2007; Moral *et al.*, 2010).

Actualmente, la identificación de anamorfos, teleomorfos y su correspondiente relación se basa tanto en las características morfológicas como en secuenciación de ADN (Slippers *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2007). En morfología sólo se pueden

comparar con especies antiguas que en ocasiones han sido renombradas y para su correcta identificación se basan en el ADN. Actualmente hay gran variedad de secuencias de una misma cadena de ADN que se pueden comparar, o, en otros casos, hay falta de datos de fácil acceso a los investigadores (Slippers *et al.*, 2004). Debido a esto, se están describiendo nuevas especies continuamente. Hay investigadores que se están cuestionando la aparición de tantas especies, y están considerando que el número de especies es menor, que no hay que ser tan minucioso a la hora de comparar secuencias de ADN ni a la hora de describir morfológicamente a una especie de *Botryosphaeria* que se ha encontrado en un huésped diferente a uno ya estudiado; de no ser así, casi se va a considerar que cada huésped va a tener asociado su propia especie de *Botryosphaeria* (Phillips, 2007a).

4. Descripción patogénica

El género *Botryosphaeria* es muy común en las zonas de clima templado y tropical (Jacobs y Rehner, 1998). Se ha descrito como saprófito y ocasionalmente como parásito y endófito en un gran número de huéspedes, la mayoría leñosos, y sobre todo cuando éstos se encuentran predispuestos debido a estrés ambiental, a que han sufrido daños mecánicos o simplemente debido a su elevada susceptibilidad (Sinclair *et al.*, 1987; Denman *et al.*, 2000; Ragazzi *et al.*, 2000). Por ello, a menudo se le describe como parásito de debilidad.

De entre las enfermedades que causa el género *Botryosphaeria*, destacan por encima de todas los chancros y la muerte regresiva de ramas en especies forestales, y en menor medida, en frutales, matorrales leñosos y especies herbáceas (von Arx, 1987). En este sentido, se han señalado diversas especies del género como factores implicados en los procesos de decaimiento de especies forestales (von Arx, 1987; Luque y Álvarez, 1997; Ragazzi *et al.*, 1989; 1997), bien actuando como factores incitantes o como factores contribuyentes, según la terminología de Sinclair (Manion, 1991).

La morfología y severidad de los chancros que ocasionan las especies pertenecientes al género *Botryosphaeria* dependen del huésped, del diámetro de la rama atacada y de la predisposición de la planta. Las lesiones causadas varían desde manchas superficiales y diminutas en las ramas hasta chancros hundidos y rodeados por gruesas capas de callo. La severidad de estos chancros depende del número de lesiones, de la

proximidad entre éstas y del vigor de la planta antes de la infección (Sinclair *et al.*, 1987).

De entre las numerosas especies leñosas de interés forestal en las que se han descrito especies de *Botryosphaeria* causantes de chancros, destacan las pertenecientes al género *Quercus* (Luque y Girbal, 1989; Ragazzi *et al.*, 1989; 1997; 1999a; 1999b; 1999c; 2000; Morehart, 1994; Luque y Álvarez, 1997; Luque *et al.*, 1999; 2000; Turco *et al.*, 2006).

Además de las especies de *Quercus*, son numerosos los géneros en los que *Botryosphaeria* spp. causa chancros, entre los que destacan *Tsuga*, *Larix* (Sivanesan, 1984), *Pseudtsuga*, *Picea* (von Arx, 1987), *Juniperus*, *Cupressus* y *Populus* (Stanosz, 1996; Stanosz *et al.*, 1998).

En matorrales leñosos se han descrito en EE.UU. en gran número de especies (*Arbutus* sp., *Cercis* sp., *Myrica* sp., etc.) causando muerte regresiva de ramas y chancros. Estas muertes son más frecuentes en aquellas especies que han sido plantadas fuera de su hábitat y que por lo tanto se encuentran sometidas a estrés (Brooks y Ferrin, 1994). En nuestro país se ha descrito a este género causando chancro y desecación de ramas en *Cistus ladanifer* (Sánchez *et al.*, 2002).

En frutales también es común encontrar especies del género *Botryosphaeria* como agentes productores de chancros y muerte regresiva de ramas. Entre todos destaca el género *Malus*, en el que se han descrito diferentes especies de *Botryosphaeria* (*Neofusicoccum ribis*, *N. parvum*, *N. australe*, *B. dothidea*, *Diplodia mutila* y '*Botryosphaeria*' *obtusa*) causando chancros y otras enfermedades (Slippers *et al.*, 2007). Produce también daños y pérdidas económicas por la muerte de ramas en *Laburnum x watereri* (Proffer, 1996), *Pyrus* y *Actinidia* (Stanosz *et al.*, 1998; Slippers *et al.*, 2007). También produce gomosis en melocotoneros (Sinclair *et al.*, 1987).

En especies arbustivas de interés agrícola también son numerosas las citas. Así por ejemplo se ha descrito como productor de chancros en *Pistacia* sp. (Swart y Botes, 1995, Moral *et al.*, 2010), en *Vitis* sp. (Sivanesan, 1984; Stanosz *et al.*, 1998; Phillips, 2000; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Gramaje y Armengol, 2011) y en diferentes variedades de olivo (Moral *et al.*, 2010).

En cuanto a especies herbáceas, se ha descrito en Poáceas y Cyperáceas (von Arx, 1987), causando pérdidas en maíz (Sivanesan, 1984; von Arx, 1987).

Además de chancros y muerte regresiva, las especies del género *Botryosphaeria* pueden causar otras enfermedades, como la podredumbre del fruto en cítricos, podredumbre y momificación de frutos del membrillo, podredumbre negra en manzanas, manchas foliares en manzanos y podredumbres de las semillas, del sistema radical, del cuello de la raíz y oscurecimiento de la madera en numerosas especies (Sinclair *et al.*, 1987; Moral *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2007).

5. Ciclo de patogénesis y epidemiología

El ciclo de patogénesis de este género de hongos causando chancros en especies leñosas se inicia con las infecciones que tienen lugar a través de conidios o ascosporas (Figura 1). Las estructuras infectivas más comunes son los conidios, que se dispersan fundamentalmente a través de la lluvia. Las infecciones, independientemente del tipo de espora que las origine, se producen generalmente a través de heridas, pero también pueden originarse a través de las lenticelas. A partir de éstas, las lesiones en tallos se producen en pocos días o semanas, aunque puede darse el caso de mantenerse como infecciones latentes durante largos periodos (Sinclair *et al.*, 1987).

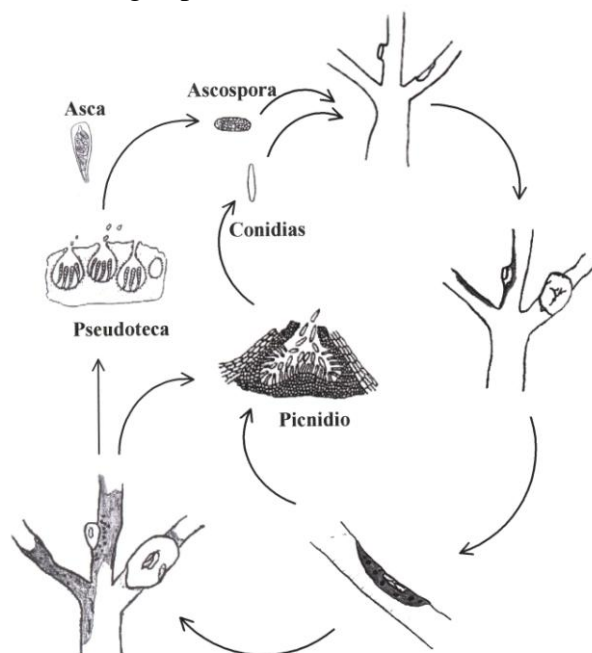


Figura 1. Ciclo de patogénesis de *Botryosphaeria* spp. causando chancros en especies leñosas (Adaptado de Agrios, 2005).

Las lesiones originadas por la colonización de los tejidos del huésped y su importancia varían con el estado vegetativo del huésped y la interacción huésped-

patógeno. Una vez colonizados los tejidos, se inicia la producción de conidios en los picnidios. Estos conidios, con la ayuda de la lluvia, del viento o de la intervención de insectos, son los responsables de la aparición de los ciclos secundarios de la enfermedad. Por otro lado, en los tejidos ya muertos, conjuntamente a la producción de conidios, se generan las estructuras de carácter sexual, que una vez maduras producen las ascosporas infectivas que dan lugar a nuevas infecciones primarias (Manion, 1991).

El establecimiento de las infecciones por parte de este género, de la misma manera que ocurre en la mayoría de los hongos productores de chancros, se ve muy condicionado por el estado del huésped. En este sentido, se ven muy favorecidas por la presencia de estrés (ambiental, nutricional, hídrico, etc.). Por esta razón, estos hongos que atacan generalmente a plantas debilitadas o predispuestas por algún tipo de estrés, son generalmente patógenos poco virulentos, es decir, penetran en la planta a través de heridas o aperturas naturales pero no causan enfermedad mientras la planta se encuentre en buen estado vegetativo (endófitos). La mayoría de estos hongos se comportan como saprófitos en los tejidos dañados o muertos (Schoeneweiss, 1975; 1981; Wene y Schoeneweiss, 1980).

6. Control

Las medidas de control generales para los chancros producidos por *Botryosphaeria* deben ser de tipo preventivo, ya que las medidas curativas una vez presentes las lesiones o establecidas las infecciones se muestran ineficaces. En este sentido, en la mayoría de los casos, el mantenimiento de las plantas vigorosas y no sometidas a ningún tipo de estrés impedirá que se desarrolle la enfermedad, aunque la planta esté infectada. Del mismo modo, es necesario controlar la existencia de heridas puede impedir la extensión de la enfermedad, ya que éstas favorecen su establecimiento. Por esta razón, las heridas mecánicas o de poda deberían ser selladas con algún producto protector. Las ramas afectadas han de ser eliminadas durante los periodos secos de verano o los de reposo invernal, siempre antes de las primeras lluvias de primavera, ya que con éstas se produce la mayor dispersión de las esporas. En aquellas especies de interés agrícola, se optará por la elección de cultivares resistentes en el caso de existir y, en general, las nuevas plantaciones deberán situarse en ambientes favorables para las mismas, para así evitar cualquier tipo de estrés innecesario (Jones, 1986; Maas, 1991; Milholland, 1995).

2. LAS ESPECIES *Botryosphaeria corticola*, *B. iberica* Y *B. dothidea*

Actualmente, las identificaciones y diferenciación entre especies de *Botryosphaeria* se realiza en base a la secuenciación de ADN (Denman *et al.*, 2000; Slippers *et al.*, 2004; 2007; Crous *et al.*, 2006; Schoch *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008), sin embargo, la descripción morfológica se hace necesaria para una correcta identificación de dichas especies en general (Denman *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2008).

2.1. *Botryosphaeria corticola*

2.1.1. Morfología

Este hongo dotideomiceto fue descrito por primera vez en 2004 por Alves *et al.* (2004). Hasta entonces se encontraba erróneamente identificado como *Botryosphaeria stevensii*, el cual pasó a ser el nombre válido para el hongo descrito en 1936 por Stevens como *Physalospora mutila* (Shoemaker, 1964).

Botryosphaeria corticola forma ascocarpos multiloculados, más o menos circulares, en el interior del tejido vegetal del huésped que infecta. Tienen un tamaño de algo más de 1 mm, presentan un color oscuro y aparecen inmersos dentro de la corteza vegetal, aunque posteriormente irrumpen hacia el exterior al madurar (Alves *et al.*, 2004).



Fuente: A.J.L. Phillips



Las paredes del ascoma son gruesas y están constituidas por numerosas filas de células. Las más externas son de pared gruesa y naturaleza pseudoparenquimática. Hacia el interior, nos encontramos primero con células de pared gruesa y color oscuro, y posteriormente con células más pequeñas y de aspecto hialino. Los pseudoparafisos, de un grosor de 2-3 μm , son hialinos, ramificados y septados. El ascoma presenta un ostiolo circular centrado y papilado (Alves *et al.*, 2004).

Las ascas se sitúan en el interior de los ascocarpos. Tienen forma alargada, ensanchándose hacia el ápice, de doble pared, y con una longitud de entre 160-250 μm y una anchura de entre 30-33 μm . En su interior se desarrollan ocho ascosporas (Alves *et al.*, 2004).



Fuente: A.J.L. Phillips

(Alves *et al.*, 2004).

Las ascosporas son normalmente unicelulares, hialinas, aunque ocasionalmente con la edad adquieren un color marrón pálido y una o dos septas. Presentan pared celular lisa, sus forma varía entre fusiforme a romboide, siendo más anchas hacia la mitad. Sus dimensiones aproximadas varían entre los (28,2) 33,6-37,7 (40,6) μm de longitud y los (12,0) 14,6-15,3 (18,8) μm de anchura

El estado asexual o anamorfo de *B. corticola* se ha descrito como perteneciente al género *Diplodia*, concretamente a la especie *Diplodia corticola*, citada por primera vez en 2004 (Alves *et al.*, 2004).

Los picnidios se desarrollan individualmente o bien agregados. Suelen encontrarse inmersos en el tejido vegetal, de color marrón oscuro a negro, de forma más o menos circular, con un diámetro aproximado de 1 mm, mutiloculados y de paredes gruesas. Estas paredes están compuestas por tres capas de células; la más externa es de color marrón oscuro, pared gruesa y con células poliédricas, la intermedia también de color marrón oscuro y células de pared delgada, y la capa más interna formada por células de pared delgada e hialinas. El ostiolo del picnidio es papilado, circular y central. Los conidióforos se reducen a las células conidiógenas. Las células



Fuente: A.J.L. Phillips

conidiógenas son holoblásticas, solitarias o en grupos, indeterminadas, de forma cilíndrica, hialinas, de pared lisa y la producción de conidios es apical. La proliferación puede ser en el mismo punto dando lugar a un engrosamiento redondeado, o percurrente en la que se forma uno o dos collaretes (Alves *et al.*, 2004).

Los conidios presentan unas dimensiones aproximadas de (23,7)29,6-30,3(46,1) x (9,1)13,4-13,8(20,5) μm . Son hialinos, unicelulares, con forma oblonga a cilíndrica, con membranas gruesas, lisas y redondeadas en el ápice, algunas veces pueden presentar una



Fuente: A.J.L. Phillips

gútula alargada central en el citoplasma, el cual tiene aspecto granular. El conidio maduro puede poseer una septa y un color marrón oscuro (Alves *et al.*, 2004).

La forma del conidio es el parámetro más utilizado para distinguir esta especie de otras del mismo género. Para ello se usa la relación Longitud/Anchura del conidio. Para la especie que nos ocupa esta relación L/A es de $2,2 \pm 0,3$ (Shoemaker, 1964; Alves *et al.*, 2004).

Las colonias de *D. corticola* en medio de crecimiento PDA son de color marrón oliváceo muy oscuro con micelio aéreo denso. Presentan unos diámetros entre 33-44 mm después de 4 días creciendo a 25° C en oscuridad. El rango de temperaturas a las que crece oscila entre 5° C de mínima y 35° C de máxima, observándose un crecimiento óptimo entre 20-25° C (Alves *et al.*, 2004; Phillips, 2007b).

1.1.2. Patogenicidad

La especie *B. corticola* es considerada como uno de los factores contribuyentes del decaimiento de *Quercus* en España, Italia, Marruecos y Portugal. Se encuentra asociada a la formación de chancros en troncos de alcornoque, en diferentes zonas de España (Andalucía y Cataluña) y, en chancros de ramas de *Quercus* en Europa y California (Alves *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2007a; Carrasco *et al.*, 2009; Tsopelas *et al.*, 2009; Lynch *et al.*, 2010). Recientemente, ha sido descrita en España, México y California causando chancros en vid (Úrbez-Torres *et al.*, 2010; Candolfi-Arbello *et al.*, 2011; Pintos *et al.*, 2011).

Los chancros causados por este hongo en ramas aparecen como zonas alargadas necróticas, que se hacen más visibles al retirar la corteza externa (Carrasco *et al.*, 2009; Tsopelas *et al.*, 2009). Si se observan en el tronco, aparecen a veces asociados a las marcas de descorche y se caracterizan por presentarse como abultamientos en el corcho, con una grieta central que deja al descubierto la casca necrosada y un desarrollo muy pobre del corcho que queda circundando por los abultamientos. El área afectada adquiere un aspecto aplanado que puede hacer perder la forma cilíndrica normal del fuste. En ocasiones la superficie afectada es muy extensa que incluso puede llegar a anillar el tronco causando la muerte del árbol (Luque *et al.*, 2000; Carrasco *et al.*, 2009).

2.2. *Botryosphaeria iberica*

2.2.1. Morfología

Se trata de un dotideomiceto descrito por Phillips *et al.* (2005) (Phillips *et al.*, 2008), tras haber sido identificado previamente como *Otthia spiraeae* (Fuckel) Fuckel (Booth, 1958). Denman *et al.* (2000) consideró este género sinónimo de *Botryosphaeria*.



Fuente: A.J.L. Phillips

estructuras suelen ser multiloculares, de forma globosa, con ostiolo circular y papilado. Las ascas se encuentran fijadas en la base interior de los ascomas, rodeadas por pseudoparafisos hialinos, septados y con una leve constricción en la septa. Las ascas son cilíndricas-claviformes, bitunicadas, de pared delgada en su longitud y con un engrosamiento de la misma en el ápice, siendo el tamaño de las mismas de 100-125 × 18-25 μm (Sivanesan, 1984; von Arx, 1987; Phillips *et al.*, 2005; Phillips, 2007c).

En el interior de las ascas se encuentran (4) 8 ascosporas, dispuestas irregularmente en dos filas. Su forma varía de oblonga a fusiforme u ovalada, de color marrón oscuro, con (0) 1 septa y observándose en esa zona una suave contracción, la célula apical presenta por debajo de la mitad un ensanche. Estas ascosporas muestran una pared celular moderadamente gruesa y con la parte interior ligeramente granulosa o lisa. Las dimensiones aproximadas oscilan entre (17,8)22,5-23,7(29,2) μm de longitud y (8,7)10,0-10,4(12,3) μm de anchura (Phillips *et al.*, 2005; Phillips, 2007c).



Fuente: A.J.L. Phillips

El estado sexual o anamorfo de *B. iberica* es *Dothiorella iberica*. El género *Dothiorella*, que había sido considerado sinónimo de *Fusicocum* y posteriormente de *Diplodia*, fue restituido por Phillips *et al.* (2005). Este género incluye anamorfos de

especies del género *Botryosphaeria* con conidios de color oscuro y septados, que presentan estas características antes de desprenderse de las células conidiógenas (Phillips *et al.*, 2008).

Los picnidios del estado anamórfico se encuentran solitarios embebidos en un estroma negro globoso. Los conidióforos se reducen a células conidiógenas que revisten el interior del picnidio. Estas células conidiógenas son holoblásticas y de aspecto hialino, subcilíndricas, con proliferación densa de células paralela a las paredes del picnidio o raramente con proliferación percurrente, formando indistintamente uno o dos collaretes (Phillips *et al.*, 2005).



Fuente: A.J.L. Phillips

Los conidios se caracterizan por ser lisos, de pared gruesa, septados y de color marrón; con forma generalmente ovoide, de ápice redondeado y base truncada. Se puede observar en la zona de la septa una suave contracción. Las dimensiones aproximadas de estos conidios oscilan entre (17,2)23-23,4(28,6) μm de longitud y (8,1)10,8-11,0(16,0) μm de anchura, con una relación longitud/anchura de 2,2 (Phillips *et al.*, 2005; Phillips, 2007c). No se han observado espermacias en esta especie.

Esta especie es similar a *B. sarmentorum*, pero se puede distinguir en base a características que presentan las ascas, las ascosporas y los conidios. En *B. iberica* se pueden observar las ascas más cortas y anchas por el ápice, las ascosporas se van estrechándose por la base y, por lo general, los conidios son ligeramente más alargados (Phillips *et al.*, 2005).

2.2.2. Descripción patogénica

Botryosphaeria iberica es uno de los hongos que causan chancros en ramillas y muerte regresiva en el género *Quercus* en la Península Ibérica. Actúa, principalmente, en ramas de árboles debilitados (Carrasco *et al.*, 2009).

El crecimiento del patógeno en las ramillas da lugar a su muerte por anillamiento y a la posterior marchitez de las hojas. A veces el hongo puede avanzar hacia ramas más gruesas y da lugar a bandas de corteza muerta bordeada de callos. La madera por debajo del chancro aparece con bandas oscuras que se extienden a lo largo de la rama afectada. Este hongo no suele causar la muerte del árbol (Sinclair *et al.*, 1987).

En especies de interés agrícola destacan los daños ocasionados en manzano (Phillips *et al.*, 2005), vid en España, Australia y California (Urbez-Torres *et al.*, 2007; Pitt *et al.*, 2008; Pintos *et al.*, 2011) y aguacate en California (McDonanld y Eskalen, 2011).

2.3. *Botryosphaeria dothidea*

2.3.1. Morfología

Este dotidiomiceto, está considerado la especie tipo del género *Botryosphaeria* (Crous *et al.*, 2006). Fue descrito por primera vez en 1911 como *Botryosphaeria ribis* Grossenbacher & Duggar en el *Technical Bulletin New York Agricultural Experiment Station* (Punithalingan y Holliday, 1973). Sin embargo, y según recogen Brooks y Ferrin (1994), von Arx y Müller en 1954 afirmaron que a este hongo se le aplicó un nombre erróneo, ya que había sido identificado en 1863 por Cesati y de Notaris como *Botryosphaeria dothidea* (Mong.: Fr.) Ces. *et de Not.*

A partir de este momento, la mayoría de micólogos y fitopatólogos han considerado ambas especies, *B. dothidea* y *B. ribis* (= *B. berengeriana*), como sinónimos (Shahin y Claflin, 1980; Sivanesan, 1984; Cline, 1994; Maas y Ueker, 1994). No obstante, otros autores consideran diferentes a estas dos especies (von Arx, 1987; Farr *et al.*, 1989). Esto ha contribuido a aumentar las numerosas confusiones existentes en la literatura de este género fúngico.

Los estudios morfológicos sobre el complejo *B. dothidea* / *B. ribis* realizados a finales del siglo pasado, así como las análisis filogénicos basados en las secuencias ITS del ADN ribosómico, apoyan la similitud entre ambas especies (Pennycook y Samuels, 1985; Jacobs y Rehner, 1989; Phillips y Lucas, 1997; Crous y Palm, 1999; Denman *et al.*, 2000). Por ello, el nombre más antiguo de *B. dothidea* (1863) o el complejo de especies *B. dothidea* fue utilizado por los micólogos para referirse a estos patógenos (Phillips y Lucas, 1997; Phillips, 2000). Sin embargo, Slippers *et al.* (2004) separa estas dos especies a partir del estudio del neotipo y del epitipo.

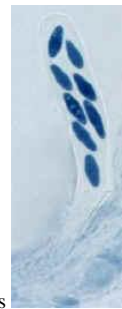
Los ascocarpos de *B. dothidea* se forman en el interior del tejido que infectan, emergiendo por la epidermis al madurar con un tamaño aproximado de 200-500 µm de diámetro. Los pseudotecios, de color oscuro, pueden formar agregados de forma botriosa y llegar a estar compuestos por más de 100 pseudotecios. No obstante, pueden encontrarse solitarios. Dichos cuerpos de aspecto globoso, emergen parcialmente y



Fuente: A.J.L. Phillips

forman un ostiolo muy bien desarrollado que puede ser papilado o no. La pared del pseudotecio está compuesta de 5 a 15 capas de células poliédricas, siendo las capas exteriores de color oscuro y recubriendo el interior del lóculo de dos a cuatro capas interiores de células hialinas. En el interior se encuentran las ascas bitunicadas, claviformes, con unas dimensiones de 84-176 μm de longitud y de 16-24 μm de ancho. Junto a las ascas se encuentran pseudoparafisos filiformes y septados, raramente ramificados en el extremo apical (Slippers *et al.*, 2004; Phillips, 2007d).

Las ascas de esta especie contienen ocho ascosporas unicelulares, hialinas, de paredes lisas y delgadas con contenido granular. Su forma varía de fusiforme a ovoide, algo más gruesas hacia la mitad o el extremo superior, pero de extremos redondeados. El tamaño de las ascosporas es de (15) 18,0-25,5 (28) μm de longitud y (6) 7,5-12,0 (14) μm (Slippers *et al.*, 2004; Phillips, 2007d).



Fuente: A.J.L. Phillips

El anamorfo de *B. dothidea* es *Fusicoccum aesculi* Corda in Sturm, que tiene como sinónimos los siguientes nombres (Phillips, 2005; 2007d):

Phoma flaccida Viala & Ravaz, Bureaux du Progrès Agricole et Viticole, Montpellier, p. 55. 1886.

Macrophoma flaccida (Viala & Ravaz) Cavara, Atti Ist. bot. Univ. Pavia, 1: 315. 1888.

Phoma reniformis Viala & Ravaz, Bureaux du Progrès Agricole et Viticole, Montpellier, p. 57. 1886.

Macrophoma reniformis (Viala & Ravaz) Cavara, Atti Ist. bot. Univ. Pavia, 1: 317. 1888.

Macrophomopsis coronillae (Desm.) Petrak, Ann. Mycol., 22: 108. 1924.

Sphaeria coronillae Desm., Ann. Sci. Nat., Bot, 2e sér., 13: 188. 1840.

Dothiorella reniformis (Viala & Ravaz) Petrak & Sydow, Repert. Spec. nov. Regni veg., 42: 257. 1927.

Camarosporium flaccidum (Viala & Ravaz) Zachos et al., Ann. Inst. Phytopath. Benaki. Nouvelle Série, 12: 213. 1980.

Macrophoma dalmatica (Thüm.) Berl. & Voglino, Atti Soc. Venet.-Trent. Sc. Nat., Padova: 196. 1886.

Sphaeropsis dalmatica (Thüm.) Gigante, Boll. R. Staz. Patol. Veg. n.s. 14. 1934.

Camarosporium dalmaticum (Thüm.) Zachos & Tzav-Klon. [como “dalmatica”],
Annls. Inst. PhytoPhath. Benaki n.s. 12: 69. 1979.



Fuente: A.J.L. Phillips

Los picnidios de *F. aesculi* suelen desarrollarse en el mismo lugar que se encontraba el ascoma, generalmente solitarios, aunque ocasionalmente se pueden encontrar grupos de picnidios que pueden llegar a formar un solo estroma. Las capas externas del picnidio son de color oscuro, compuestas por células de pared gruesa y forma poliédrica, siendo más claras y de pared más fina a medida que estas capas son más internas. Los conidióforos tapizan el

interior del picnidio, son hialinos, con forma cilíndrica, de paredes lisas, ramificados en la base, unicelulares o con una septa y unas dimensiones de 14-24 x 2-3 μm (Slippers *et al.*, 2004; Phillips, 2007b). Las células conidiógenas, con un tamaño de 6-20 x 2-5 μm , inicialmente holoblásticas, llegan a ser enteroblásticas. Se caracterizan por ser hialinas, de paredes lisas, forma cilíndrica y producen uno o más conidios apicalmente. A menudo, la proliferación es percurrente, los conidios se forman sucesivamente en el mismo punto, dando un aspecto anillado a las células conidiógenas, o la producción de conidios se hace a un mismo nivel formándose un engrosamiento periclinal (Slippers *et al.*, 2004; Phillips, 2007d).



Fuente: A.J.L. Phillips

Los conidios se caracterizan por ser hialinos con contenido granular, de pared fina y lisa, con forma fusiforme, de base subtruncada y ápices redondeados, unicelulares, raramente forman una septa al germinar. El tamaño es de (18) 21-28,5 (30) μm de largo y (3,5) 4-4,5 (6) μm de ancho, y una relación longitud/anchura de 4,1 (Slippers *et al.*, 2004; Phillips, 2007d).

En *F. aesculi* se han podido observar espermacias unicelulares, hialinas, más o menos redondeadas o ligeramente alargadas, con un tamaño de 3-6 x 1,5-2 μm (Slippers *et al.*, 2004).

Cuando crece en placa, este hongo inicialmente presenta micelio de color blanco con abundante micelio aéreo, gradualmente va adquiriendo de un color verdoso a un



Fuente: A.J.L. Phillips

verde o violeta oscuro en las colonias más viejas, incluso el micelio aéreo forman una especie de columnas que llegan a la tapa de las placas en las que se incuban. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 (30)° C. Los conidios que se producen son similares a las observadas en el medio natural, pero más alargadas y fusiformes, con una relación longitud/anchura de 5 (Slippers *et al.*, 2004; Phillips, 2007d).

2.3.2. Patogenicidad

Botryosphaeria dothidea está asociada fundamentalmente a la aparición de chancros, anuales o perennes, y a la muerte regresiva de ramas (chancro de debilidad) en plantas leñosas, generalmente en todas aquellas sometidas a algún tipo de estrés (sequía, falta de nutrientes, heladas, defoliaciones, etc.) (Sinclair *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1996; Michailides y Morgan, 2004). También se aísla en ramillas o ramas muertas por la acción de otros patógenos, como ocurre en numerosos árboles frutales. Se tiene constancia de que causa necrosis y manchas foliares (Horner and Palmer, 1935; Ramos *et al.*, 1991; Valencia-Botín *et al.*, 2003), y podredumbres y momificación de inflorescencias y frutos (Michailides y Morgan, 2004; Phillips *et al.*, 2005). Una enfermedad poco conocida causada por *B. dothidea* es la podredumbre de raíz, como la descrita por Hodges (1983) en pino. Además, esta especie produce daños en frutos como en el caso del olivo, dando lugar a la enfermedad conocida como “Escudete”, la cual produce serias pérdidas en el olivar andaluz (Moral *et al.*, 2010).

En cuanto al comportamiento endofito de *B. dothidea*, existen artículos en la bibliografía que recogen este estado o como patógeno latente en proteáceas y eucaliptos entre otros huéspedes (Pusey *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1996; Swart *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001). Esto junto a que ataca principalmente a plantas debilitadas y a su escasa capacidad de infectar plantas sanas y vigorosas, hace que se le haya etiquetado como un patógeno menor. Sin embargo, esto es un error, ya que simplemente se comporta mejor como hongo oportunista que como patógeno primario (Sinclair *et al.*, 1987; Carrasco *et al.*, 2009). No obstante, sí se ha descrito como patógeno primario causando chancros de rama/tallo en *Cistus ladanifer* (Sánchez *et al.*, 2002).

De entre los numerosos huéspedes en los que se ha descrito *B. dothidea* podemos destacar los siguientes géneros: *Acer*, *Aesculus*, *Alnus*, *Alnus*, *Araucaria*, *Atriplex*,

Baccharis, *Betula*, *Berberis*, *Camelia*, *Castanea*, *Celastrus*, *Ceratonia*, *Citrus*, *Corylus*, *Cornus*, *Crataegus*, *Cryptomeria*, *Cupressus*, *Eleagnus*, *Euphorbia*, *Ficus*, *Fraxinus*, *Fuchsia*, *Gleditsia*, *Grevillea*, *Ilex*, *Juniperus*, *Ligustrum*, *Liquidambar*, *Liriodendron*, *Magnolia*, *Melia*, *Monstera*, *Morus*, *Olea*, *Phoenix* y otras palmáceas, *Platanus*, *Pinus*, *Populus*, *Prunus*, *Pseudotsuga*, *Psidium*, *Punica*, *Quercus*, *Rhamnus*, *Robinia*, *Sambucus*, *Solanum*, *Tilia*, *Vitis* y *Viburnum* (Sinclair *et al.*, 1987; Farr *et al.*, 1989; Brooks y Ferrin, 1994; Phillips *et al.*, 2005).

La distribución de *B. dothidea* es cosmopolita y prácticamente se puede encontrar en cualquier lugar donde se encuentre alguno de sus huéspedes. No está claro que exista una especificidad de huésped para este hongo, sin embargo parecen existir ciertos biotipos que manifiestan cierta especificidad de huésped (Slippers *et al.*, 2007; De Wet *et al.*, 2008).

La infección y la predisposición de los huéspedes a ser infestados o a desarrollar la enfermedad está relacionada con las condiciones medioambientales. Cuando hay altas temperaturas, falta de riego u otros tipos de estrés, la infección se ve favorecida (Slippers *et al.*, 2007). Considerando las condiciones medioambientales, la amplia distribución de *B. dothidea*, la variedad de huéspedes y que los principales daños que causa son la muerte regresiva y los chancros de rama, el inicio de la enfermedad es variable. Algunos autores consideran las heridas como una puerta de entrada para el patógeno, incluso necesaria para el desarrollo de la enfermedad (Moral *et al.*, 2010). Otros consideran que las heridas ayudan al desarrollo de chancros (Toole, 1963).

Las infecciones sin heridas pueden producirse en las hojas (Lutrell *et al.*, 1962; Ramos *et al.*, 1991) o a través de las lenticelas o estomas de los frutos o en los brotes y ramas más jóvenes (Horne y Palmer, 1935). La infección más habitual es a través de herida, aunque la existencia de esta (producida por insectos, granizo o lluvia) no implica necesariamente el desarrollo de infección y enfermedad (Wiehe, 1952). También hay que tener en cuenta el tiempo que lleva abierta una herida o la edad de la parte de la planta. Las heridas más recientes son más susceptibles de que se produzca la infección (Schreiber, 1964; Wene 1979; Creswell y Milholland, 1987), así como cuanto más joven es el brote aumenta la probabilidad de infección (Creswell y Milholland, 1987).

***CAPITULO 3. SINTOMATOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN
DE CHANCROS EN ANDALUCÍA***

INTRODUCCIÓN

El género *Botryosphaeria* incluye especies de distribución cosmopolita, principalmente en zonas de clima templado y tropical (Jacobs y Rehner, 1998; Pavlic *et al.*, 2004). Estos hongos tienen un amplio número de huéspedes y se han descrito como endofitos y parásitos, patógenos oportunistas en muchas especies leñosas (Pavlic *et al.*, 2004).

La enfermedad más importante que causa el género *Botryosphaeria* es la formación de chancros y muerte regresiva de ramas en especies leñosas, tanto forestales como frutales, y en menor medida en matorrales leñosos (von Arx, 1987). De entre las numerosas especies leñosas de interés forestal en las que se han descrito especies de *Botryosphaeria* causantes de chancros, destacan las pertenecientes al género *Quercus* (Luque y Girbal, 1989; Ragazzi *et al.*, 1989; 1997; 1999a; 1999b; 1999c; 2000; Morehart, 1994; Luque y Álvarez, 1997; Luque *et al.*, 1999; 2000; Sánchez *et al.*, 2003).

Los chancros producidos por especies del género *Botryosphaeria* en *Quercus* se incluyen como factores implicados en los procesos de decaimiento de estas especies forestales, bien actuando como factores incitantes o como factores contribuyentes, según la terminología de Sinclair (Manion, 1991). El decaimiento forestal más importante descrito en la Península Ibérica es el que afecta a las masas de encinas y alcornoques, conocido con el nombre de “Seca de *Quercus*” (Montoya, 1994).

La encina y el alcornoque

1. Descripción morfológica

La encina (*Quercus ilex* L.) y el alcornoque (*Q. suber* L.) son especies típicamente mediterráneas. Ambas especies pertenecen al Orden *Fagales*, Familia *Fagaceae* y Género *Quercus*. Este género incluye más de 600 especies distribuidas por el hemisferio Norte, siendo uno de los dos géneros más extensos de la familia *Fagaceae* (Samuel *et al.*, 1998)

La encina es un árbol de porte variable, pudiendo alcanzar los 25 m de altura, pero la mayoría de las veces, y generalmente por la acción del hombre, no supera los 10-12 m (Navarro y Fernández, 2000). La corteza es pardo-grisácea y con grietas poco profundas. Las hojas son simples, persistentes, coriáceas, alternas, de formas muy variables y con 5 a 8 pares de nervios secundarios (Navarro y Fernández, 2000). Son

plantas monoicas. El fruto es la bellota, que tiene forma oval. Fructifica a partir de los 8-10 años (Navarro y Fernández, 2000). La corteza del tronco joven, así como las hojas y las bellotas son ricas en taninos. La raíz es muy profunda, pivotante y de rápido crecimiento inicial (Navarro y Fernández, 2000), produciendo inicialmente ramificaciones, y después raíces secundarias gruesas y profundas (Moro, 1995). Tiene la capacidad de producir rebrotes. La encina tiene una gran longevidad, pudiéndose encontrar ejemplares con más de 700 años (Navarro y Fernández, 2000).

El alcornoque es una planta esencialmente alogámica (Natividade, 1950). Raramente presenta más de 25 m de altura (Montoya-Oliver, 1988) y presenta un tronco más o menos recto. Las hojas son simples, alternas, persistentes, con limbo coriáceo y envés tomentoso, de forma variada y con 5-7 pares de nervios secundarios (Natividade, 1950; Ceballos y Ruíz de la Torre, 1979). Florece y fructifica a partir de los 15-20 años. Es una especie monoica. Los frutos (bellotas) son alargados y con cosecha abundante cada 2-3 años (Ceballos, 1979). La raíz principal es profunda, a partir de la cual se desarrollan las raíces laterales muy ramificadas, posibilitando una gran expansión horizontal.

El alcornoque es la única especie del género *Quercus* que produce tejido suberoso (corcho), que envuelve al tronco y a las ramas, poseyendo la capacidad de regenerarse indefinidamente cuando se retira. El corcho está constituido esencialmente por suberina, y en menor proporción por celulosa, taninos, lignina, ceras y otros polisacáridos que le confieren propiedades químicas, físicas y mecánicas únicas (Natividade, 1950). El alcornoque es una especie longeva que puede vivir hasta los 500 años. No obstante, la edad límite de producción económica es de 150-200 años, pues una vez que supera esta edad, la producción de corcho decae en calidad y en grosor.

1.2. Distribución

La distribución de la encina y el alcornoque está condicionada directa o indirectamente por la acción del hombre. A lo largo del tiempo, principalmente factores sociales y económicos delimitaron el área ocupada por estas especies, no siempre atendiendo a sus preferencias edafo-climáticas (Blanco *et al.*, 1998).

El área de distribución de la encina se extiende desde la Península Ibérica, siguiendo la franja mediterránea del sur de Europa, hasta llegar a Turquía (Anatolia), y en el norte de África aparece en el oeste de Marruecos, en Túnez y Argelia, así como en todas las islas del mar Mediterráneo (Figura D.1) . Indiferente en cuanto al suelo, no soporta los suelos encharcadizos y salinos. Presenta gran resistencia a la sequía y a la

continentalidad, tolerando una gran sequedad en el aire. Es rara o escasa en zonas de litoral, sin que se halle ausente de ellas (Ceballos y Ruíz de la Torre, 1979). En la región mediterránea, la encina se encuentra en zonas que el alcornoque desprecia, a parte de algunas zonas en las que ambas especies conviven en formaciones mixtas.

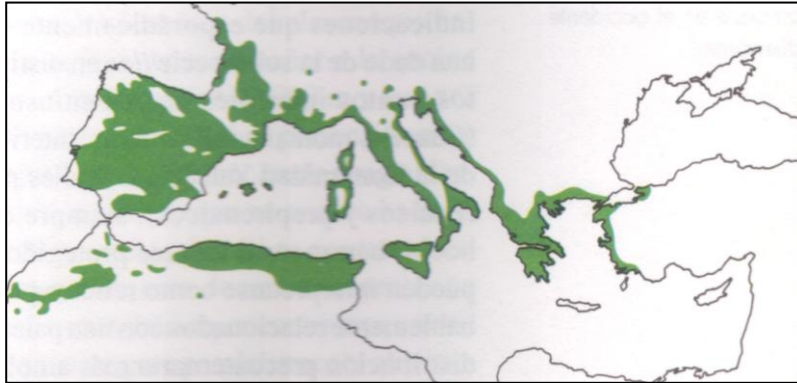


Figura 1. Distribución de *Q. ilex*. Fuente: Blanco *et al.* 1998

España es el primer país en cuanto a extensión de encinares. Está presente en casi todas las provincias, llegando a ocupar una superficie de 2.889.341 ha, lo que representa el 24,51% del área de formaciones florísticas del país (Moro, 1995).

El alcornoque es endémico del sudoeste de Europa (Portugal, España, Italia, Sur de Francia, y noroeste de la antigua Yugoslavia) y del norte de África (zonas de influencia mediterránea en Marruecos, Argelia y Túnez). Según diversos autores, el alcornoque se extiende aproximadamente sobre una superficie mundial que oscila entre 2.150.000 y 2.355.000 ha, situándose entre el 58-63% en el sudoeste de Europa y el 42-37% en el Magreb, correspondiendo la mayor área de distribución del alcornoque a Portugal con cerca del 35-40% del total (Gil, 2005; Junta de Andalucía, 2007).

El alcornoque habita en zonas de transición entre las condiciones mediterráneas y las atlánticas, sin grandes oscilaciones térmicas anuales, con sequías prolongadas y humedad atmosférica relativamente elevada (Junta de Andalucía, 2007). En la figura D.2 se muestra el área de distribución de esta especie, y se puede ver una clara preferencia por la zona atlántica de su área geográfica. El alcornoque se adapta bien a varios tipos de suelo, prefiriendo los suelos ácidos. No aparece en suelos calizos ni en salinos y soporta mal el encharcamiento. Puede crecer en suelos arenosos con pocas arcillas, con un pH entre 5-7 (Natividad, 1950; Junta de Andalucía, 2007).

La superficie de alcornocal en España se estima entre 302.954 y 500.000 ha. Andalucía presenta la mayor extensión de alcornocales, con el 49% del total, con una superficie aproximada de 240.000 ha, de las cuales unas 190.000 son masas puras y el

resto masas mixtas con otras especies (Junta de Andalucía, 2007). Según el 2º Inventario Forestal Nacional (1997), Cádiz, Huelva, Sevilla y Córdoba son las provincias que presentan las mayores extensiones de alcornocal de Andalucía, apareciendo puntualmente en Jaén y en Granada.



Figura 2. Distribución de *Q. suber*. Fuente: Junta de Andalucía, 2007

Entre los numerosos beneficios que aportan los montes compuestos de encinas y alcornoques, cabe destacar la producción de corcho por parte de los alcornoques, que es su producto principal, proporcionando importante ingresos. Otros recursos que generan estas masas forestales son la ganadería y la caza, que aumenta la rentabilidad de los montes contribuyendo a su conservación. También hay que destacar el gran valor ecológico y ambiental de los encinares y alcornocales, de modo que estas formaciones constituyen un magnífico ejemplo de uso multifuncional que debe guiar la correcta gestión de los boques en el marco social actual (Junta de Andalucía, 2007).

Debido a la importancia socioeconómica que tienen estas masas agroforestales en Andalucía, se estableció como objetivo principal de este trabajo determinar la distribución de las distintas especies de *Botryosphaeria* en la región, así como la incidencia de la enfermedad que causan en encinas y alcornoques.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Procedencia de las muestras

Para conocer la distribución de *Botryosphaeria* en Andalucía se hizo necesaria la toma de muestras en distintos puntos de la región con el fin de verificar su presencia en esta zona. Las muestras empleadas en este trabajo se tomaron en dos periodos de tiempo diferenciados: invierno del año 2000-primavera del año 2001, en el que se muestrearon fincas afectadas por el decaimiento de encinas y alcornoques conocido como “Seca”; y durante el periodo 2002-2006, en el que las muestras procedieron de los puntos de la Red Andaluza de Equilibrios Biológicos sobre Ecosistemas Forestales establecida por la Consejería de Medio Ambiente (Junta de Andalucía) en toda Andalucía.

1.1. Fincas afectadas de Seca

Para el estudio de las causas del decaimiento de las masas de *Quercus* mediterráneos se eligieron fincas afectadas de Seca, dentro de las señaladas en el Censo de Focos de Seca de Andalucía (Navarro *et al.*, 2004). De los más de 500 focos de Seca de *Quercus*, se eligieron dos en cada una de las provincias más afectadas (Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla). Los criterios de elección de las fincas fueron:

1.- Fincas representativas de la zona en cuanto a tipo de masa (encinar, alcornocal, monte, dehesa...), tipo de explotación (ganadera, cinegética, corchera...) y tipo de suelo.

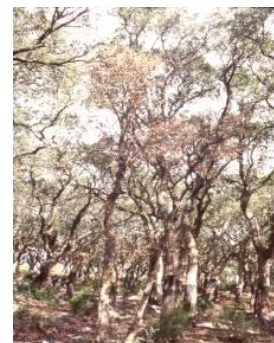
2.- Focos de Seca representativos de la zona en cuanto a porcentaje de árboles muertos, estado de los árboles afectados, etc.

3.- Fincas con buena accesibilidad, cercanas a carreteras o pistas forestales, para facilitar los trabajos posteriores.

Siguiendo estos criterios y en base a la información del Censo de Focos de Seca de Andalucía, se preseleccionaron 10 fincas por provincia. Tras visitar estas fincas, se eligieron 2 fincas por provincia.

Las fincas seleccionadas fueron:

1.- Monte Mogeja Luenga: Finca de propiedad pública situada en el término municipal de Los Barrios, Cádiz. Se trata de un monte alcornocal enclavado en el Parque Natural Los Alcornocales y se caracteriza por tener altas densidades de arbolado con un aprovechamiento principalmente corchero.





2.- San Carlos del Tiradero: Finca de propiedad pública situada igualmente en el término municipal de Los Barrios, Cádiz. También es un monte alcornocal situado en el Parque Natural Los Alcornocales. Posee altas densidades de alcornoque con aprovechamiento corchero, aunque sensiblemente mayores que la

anterior.

3.- La Rozuela: Finca de propiedad privada situada en el término municipal de Pozoblanco, Córdoba. Está enclavada en la Dehesa del Valle de los Pedroches y su aprovechamiento es ganadero, principalmente ovino. Es una dehesa de encinas con pies senescentes y en baja densidad.



4.- Viñuela Alta: Dehesa de propiedad privada situada en el término municipal de Montoro, Córdoba. La especie dominante es la encina, aunque también hay alcornoque. Al igual que en el caso anterior, su aprovechamiento es ganadero, principalmente bovino y porcino.

5.- La Encarnación: situada en el término municipal de Calañas, Huelva. Se trata de un monte público de encinas, cuyo aprovechamiento principal es la caza menor.



6.- La Pizarra: Finca de propiedad privada situada en el término municipal de Villanueva de los Castillejos, Huelva. Es una dehesa de encinas dedicada principalmente a su aprovechamiento

cinagético de caza menor y en menor medida ganadero (ovino).

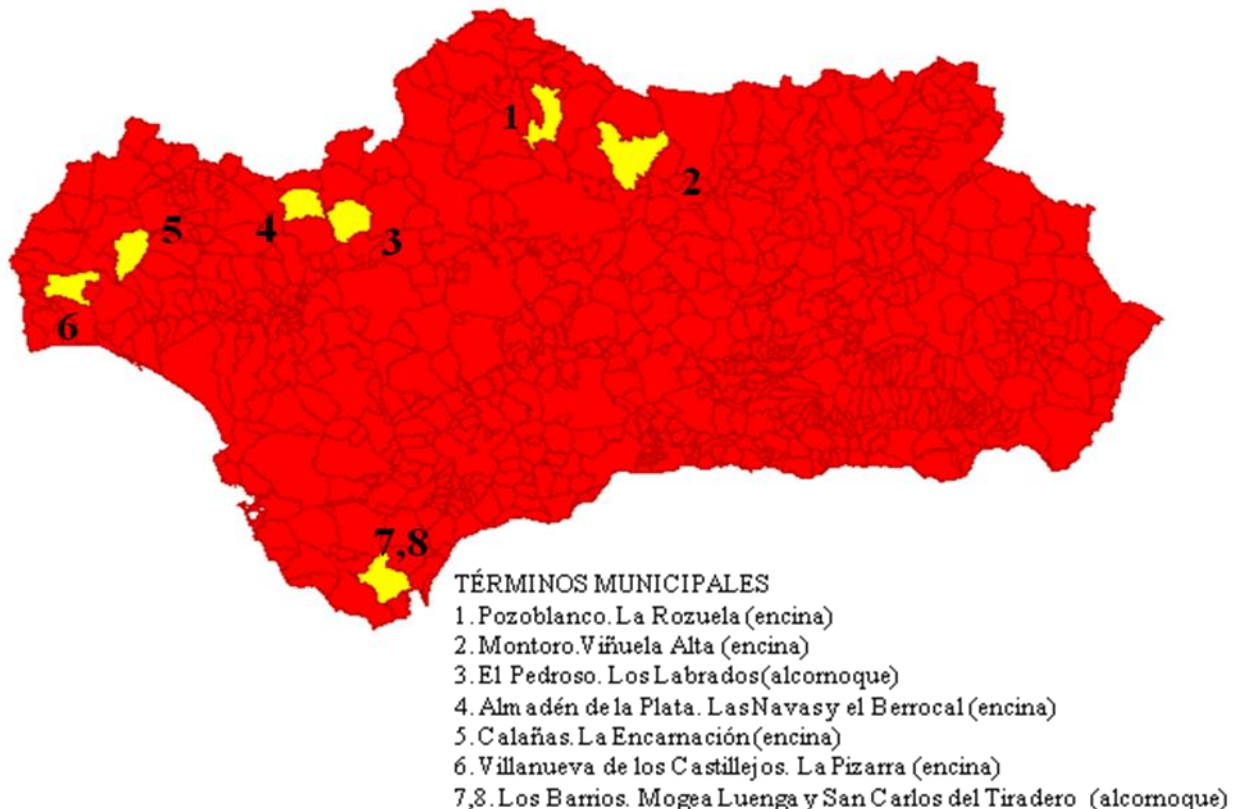
7.- Las Navas y el Berrocal: situada en el término municipal de Almadén de la Plata, Sevilla. Se trata de un monte público de encinas con algún alcornoque disperso, cuyo aprovechamiento principal es la caza menor y en menor medida la ganadería porcina.



8.- Los Labrados: Finca de propiedad privada situada en el término municipal de El Pedroso, Sevilla, dentro del Parque Natural de Sierra Norte. Es una dehesa de alcornoque con alguna encina dispersa, y su aprovechamiento principal es la ganadería porcina.

En cada una de las fincas se seleccionó una parcela de muestreo de 4 ha con el centro situado en un foco de Seca.

Figura 3. Localización de parcelas de toma de muestras de Focos de Seca.

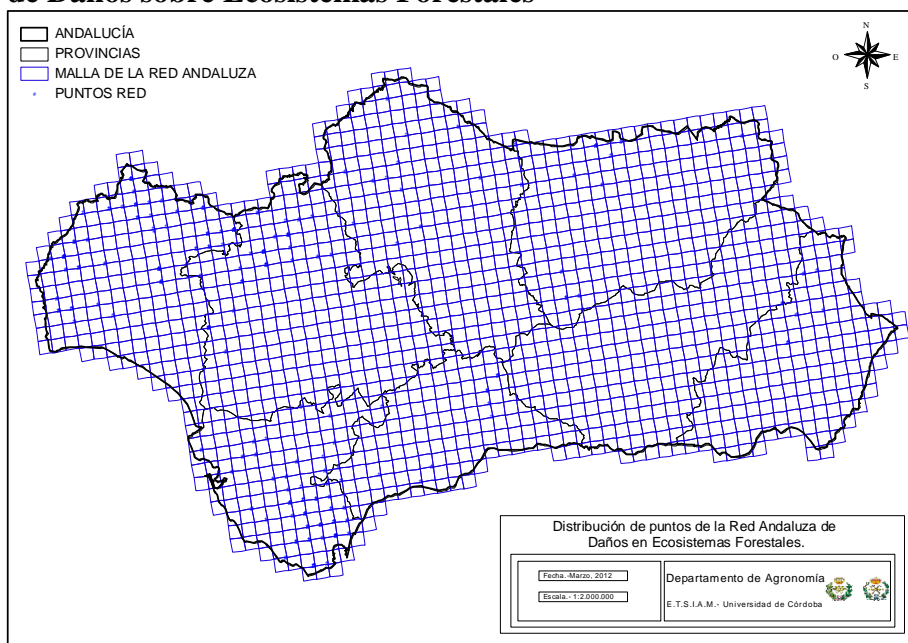


1.2. Puntos de la Red Andaluza de Equilibrios Biológicos sobre Ecosistemas Forestales

La Seca en Andalucía ha originado numerosas pérdidas en las masas forestales. Con el fin de evaluar el estado vegetativo de las masas de *Quercus* se planteó la necesidad de realizar un inventario. Estas mismas necesidades se planteaban a nivel de todos los ecosistemas forestales, por lo que se optó por diseñar un inventario sistemático sobre todas las masas forestales de Andalucía, que se denominó "*Red Andaluza de Seguimiento de Daños sobre Ecosistemas Forestales*" (RASDEF). El seguimiento del estado vegetativo del arbolado se lleva a cabo principalmente mediante el empleo de dos indicadores del estado de los pies: defoliación y decoloración, siendo el parámetro más empleado en los países mediterráneos la defoliación, ya que la decoloración no resulta en estas zonas un buen indicador.

La Red Andaluza de Seguimiento de Daños sobre Ecosistemas Forestales es una malla de 8x8 Km establecida a partir de la Red Nacional existente de 16x16 Km, que a su vez se generó de la Red Europea de 16x16 Km (Reglamento 1696/87 y 926/93). Cada nudo de la malla representa una parcela de toma de datos con un centro marcado con un testigo metálico y 24 árboles de muestreo de entre los pertenecientes al estrato dominante o codominante, siempre con un diámetro normal inventariable. Anualmente, estos puntos son evaluados y en el caso que algún árbol de muestreo esté muerto o desaparecido se sustituye por otro con el mismo número (Carrasco *et al.*, 2009).

Figura 4. Malla de 8x8 Km de la Red Andaluza de Seguimiento de Daños sobre Ecosistemas Forestales



2. Toma de muestras

2.1. Fincas afectadas de Seca

Tras consignar la sintomatología asociada a la desecación de ramas en cada una de las ocho parcelas seleccionadas, se realizaron dos tomas de muestras: en abril-mayo de 2000, y en noviembre-diciembre del mismo año. Para la primera toma de muestras se eligieron cuatro árboles sintomáticos por finca: que presentasen amarillez o marchitez foliar, defoliación y chancros, evitando los árboles muertos. La muestra consistió en tres segmentos de ramas afectadas de chancro por árbol, de longitud entre 25 y 40 cm y diámetro entre 1,5 y 3,5 cm. En la segunda toma de muestras se aumentó a 12 árboles sintomáticos por finca, tomando cuatro segmentos de rama por árbol. En esta segunda prospección se tomaron muestras en todas las fincas, a excepción de las situadas en la provincia de Cádiz.

Una vez seleccionadas las ramas, se procedió a cortar los segmentos con unas tijeras de podar o, cuando la altura lo requiriera, se hacía uso de una pértiga. Estos segmentos de ramas se etiquetaron indicando el nombre de la finca, número de árbol muestreado, número de muestra del árbol y fecha de recolección. Posteriormente, se guardaron en bolsas de plástico para evitar su desecación y se trasladaron al laboratorio.

2.2. Puntos de la Red Andaluza de Equilibrios Biológicos sobre Ecosistemas Forestales

Las muestras tomadas y enviadas por los técnicos especializados de la empresa EGMASA siguen el siguiente protocolo (Sánchez *et al.*, 2004):

1. Elegir árboles sintomáticos, que presenten amarillez o marchitez foliar en ramas aisladas, evitando los árboles muertos.
2. Seleccionar ramas que presenten síntomas evidentes de chancro: lesiones localizadas en la corteza, descartando aquéllas que presenten signos de daños causados por insectos.
3. La muestra estará constituida por 1-2 ramas que muestren chancros procedentes del mismo árbol. No se mezclarán ramas de distintos árboles en la misma muestra, ni es necesario tomar más de una muestra del mismo árbol.
4. De cada una de estas ramas se cortará con tijera de podar o herramienta similar, un trozo de una longitud máxima aproximada de 50 cm y de un diámetro superior a 1 cm que incluya la zona donde se localiza la lesión. Si las lesiones se encuentran en la rama principal y no en las secundarias, estas últimas pueden cortarse y desecharse.

5. Inmediatamente después de cortarlos, los 1-2 trozos de ramas que constituyen una muestra se colocarán en una bolsa de plástico que será cerrada herméticamente. En la muestra no se incluirán trozos de ramas completamente secas o que hayan perdido la corteza.

6. Se asignará un número identificativo a cada una de las bolsas correspondientes a las distintas muestras recogidas. También se consignará la fecha del muestreo, parcela, localidad, etc. Las bolsas debidamente identificadas se enviarán al laboratorio lo antes posible, protegidas de las temperaturas elevadas, asegurándonos de que el cierre impida la desecación del contenido.

3. Tratamiento de las muestras en el laboratorio

Las muestras tomadas se llevaron al laboratorio, donde se realizó una observación y descripción más detallada de los síntomas. Las muestras se podaron, eliminando las ramillas laterales y los ápices y se lavaron cuidadosamente al chorro de agua con jabón neutro. Una vez lavados los segmentos de ramas, para evitar su deterioro y poder trabajar secuencialmente con ellos, se conservaron en cámara fría a 4° C en oscuridad.

Posteriormente, los trozos de rama se lavaron durante 2 h bajo el grifo para favorecer la eliminación de los contaminantes externos (flora epifita). Una vez transcurrido este tiempo se colocaron dentro de una cámara de flujo estéril sobre papel también estéril (esterilización en horno a 120° C, durante 2 h). Posteriormente, con un escalpelo estéril se retiró la corteza externa y, una vez descubierto el tejido cortical necrótico, se cortaron pequeñas cuñas (de 3 mm³ aproximadamente) de la zona de transición entre el tejido sano y el necrosado. Las cuñas se colocaron secuencialmente en placas de Petri con ayuda de unas pinzas estériles. Las placas utilizadas contenían un medio de cultivo genérico que permite el aislamiento de todo tipo de hongos, elaborado a partir de PDA (Patata-Dextrosa-Agar al 2%) (Dhingra y Sinclair, 1995) al que se le añadió ácido láctico al 85% hasta conseguir un pH = 4,5, con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias. De este medio, al que hemos denominado PDAA, se sembró una placa por cada uno de los fragmentos de rama, a razón de 6 cuñas por placa.

El conjunto de placas se identificó anotando la fecha, el medio de cultivo y el número identificativo de la muestra. Se sellaron con Parafilm (American National Can) y se incubaron en oscuridad a 22° C durante las primeras 48 h. Una vez transcurrido este tiempo, se incubaron otros 4 días a 22° C, alternando luz y oscuridad (12h/12h).



Figura 5. Encina con abundantes ramillos secos.



Figura 6. Toma de muestras de ramas en árboles con síntomas

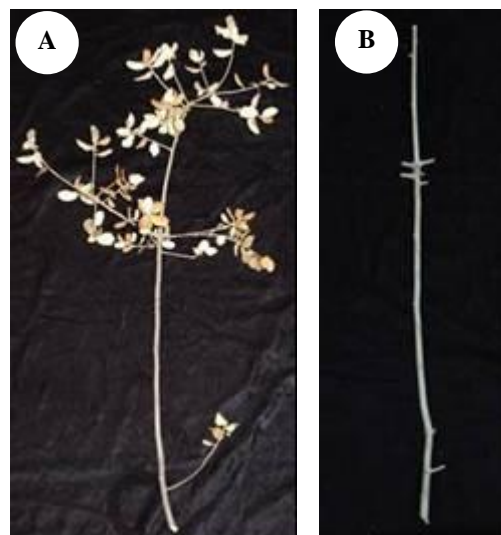


Figura 7. Muestras de ramas sintomáticas:
A) Rama procedente de muestreo de campo.
B) Rama sin ramillos preparada para guardar a 4°C.

Las colonias fúngicas obtenidas se agruparon en función de su morfología y se realizaron transferencias a PDAA de aquéllas consistentemente aisladas. De esta manera se consiguieron cultivos *in vitro* puros de las colonias consistentemente aisladas en cada parcela de muestreo. Se consideraron aislados distintos los obtenidos consistentemente de ramas distintas dentro de cada parcela. Estos aislados se conservaron en tubos de PDAA cubiertos con aceite de parafina en cámara fría a 4° C y en oscuridad.

4. Caracterización e identificación de los aislados

La caracterización e identificación de las estructuras observadas en las ramas y de los aislados fúngicos obtenidos a partir de los tejidos sintomáticos de *Quercus* spp., se realizó en base a características macroscópicas tales como el color, aspecto y morfología de las colonias que formaban en PDAA a 20° C tras 4 días de incubación, y fundamentalmente por medio de la caracterización microscópica de sus estructuras vegetativas y reproductivas.

Para estimular la producción de estructuras de reproducción asexuales, los aislados obtenidos se sembraron separadamente en placas con medio PDAA. Las placas se incubaron a 22° C y con 12 h de luz diarias, realizándose observaciones periódicas con el fin de estimar el tiempo preciso para conseguir la esporulación de los cultivos.

RESULTADOS

1. Descripción de síntomas y signos asociados a las ramas de encina y alcornoque

De las ocho parcelas muestreadas, en la primera prospección se detectó la muerte de ramas asociadas a la presencia de chancros en cuatro de ellas: La Rozuela y Viñuela Alta ambas en Córdoba, Monte Mogeja Luenga en Cádiz y La Encarnación en Huelva. Sin embargo, en la segunda prospección, en todas las fincas prospectadas (seis, ya que no se prospectaron las situadas en provincia de Cádiz) se detectaron los síntomas de la enfermedad. Además, en la finca La Pizarra (Huelva) se observó la asociación entre la presencia de cóccidos (*Kermococcus* sp.) parasitando las ramas y la aparición de chancros. Estas mismas encinas no mostraron ningún tipo de chancro ni de insecto asociado en la primera prospección (Tabla 1).

En las ocho parcelas muestreadas, la sintomatología de la enfermedad resultó similar: desecación y marchitez foliar desde el extremo distal de la rama hacia su base, por lo que se puede hablar de muerte regresiva. Las hojas marchitas quedan unidas durante algún tiempo a la rama (Figura 8A, C). En las ramas que muestran estos síntomas foliares puede apreciarse la presencia de chancros alargados que pueden llegar a ocupar gran parte de la longitud de la rama (Figura 8B). Estos chancros aparecen generalmente como zonas deprimidas de la corteza sin que llegue a apreciarse un cambio de color evidente con respecto al de la corteza sana. En la corteza necrótica del chancro se observaron pequeñas pústulas oscuras (de aproximadamente 1 mm de diámetro) que corresponden a picnidios del patógeno. En condiciones de elevada humedad ambiental, los picnidios producen conidios que aparecen como pequeñas masas conidiales (cirros) blanquecinas u oscuras. La retirada de la corteza externa permitió observar el chancro como una zona de corteza necrosada, de aspecto seco y color marrón oscuro que contrasta con el amarillo verdoso de la corteza sana. La zona de transición entre la corteza necrosada y la sana aparece claramente delimitada.

Estos chancros aparecen principalmente en ramas de diámetro inferior a 3 cm.

La necrosis cortical progresa con mayor rapidez en la dirección longitudinal que en la transversal, dando lugar a chancros alargados (Figura 8C). No obstante, el chancro puede llegar a anillar la rama produciendo su muerte. En los chancros más viejos, situados sobre ramas ya muertas, la corteza presenta un aspecto rugoso y aparece surcada por numerosas grietas longitudinales.

Tabla 1. Síntomas e incidencia de hongos causantes de chancro en las parcelas de focos de seca

FINCA	sp ^a	Incidencia ^b						Otras Enfermedades y Plagas ^c
		Tipo morfológico A*		Tipo morfológico B		Tipo morfológico C		
		Diciembre 2000	Abril 2001	Diciembre 2000	Abril 2001	Diciembre 2000	Abril 2001	
La Rozuela (CO)	E	0	12.5	75	16.6	8.3	4.2	Podredumbre radical, Escobas de Bruja, Sangraduras, <i>Cerambyx</i>
Viñuela Alta (CO)	E	0	27.7	0	16.6	100	0	Podredumbre radical, Chancro carbonoso, <i>Cerambyx</i>
Los Labrados (SE)	A	- ^d	4.2	-	6.3	-	2.1	Sangraduras, Chancro carbonoso
Las Navas y el Berrocal (SE)	E	-	0	-	8.3	-	4.2	Escobas de Bruja, Repilo, Chancro carbonoso, <i>Cerambyx</i>
La Pizarra (HU)	E	-	50	-	0	-	0	Podredumbre radical, <i>Kermococcus</i> , <i>Cerambyx</i>
La Encarnación (HU)	E	33.3	20	41.6	10	0	0	Podredumbre radical,
Monte Mogeá Luenga (CA)	A	100	() ^e	0	()	0	()	Podredumbre radical, <i>Coroebus undatus</i> , <i>Platypus cylindrus</i> , Sangraduras
San Carlos del Tiradero (CA)	A	-	()	-	()	-	()	Podredumbre radical, Sangraduras

^asp = Especie vegetal dominante: A, alcornoque; E, encina.; ^b Incidencia, porcentaje de ramas afectadas de chancro de las que se aisló el hongo correspondiente.

^c Datos obtenidos de Sánchez (2001).; ^d = No se observaron ramas con chancro. ()^e = No se tomaron muestras; * Tipo morfológico A: colonias claras y micelio aéreo muy abundante. Tipo morfológico B: colonias oscuras con micelio aéreo escaso. Tipo morfológico C: colonias oscuras y micelio aéreo abundante



Figura 8. Sintomatología asociada a la desecación y de muerte de ramas de *Quercus* spp.

- A) Detalle de rama muerta de encina asociada a la presencia de lesiones corticales. Finca Viñuela Alta (Córdoba).
- B) Lesión necrótica alargada en rama de encina. Finca Viñuela Alta (Córdoba).
- C) Presencia del cóccido *Kermococcus* en rama seca asociada a la presencia de lesiones corticales. Finca La Pizarra (Huelva)

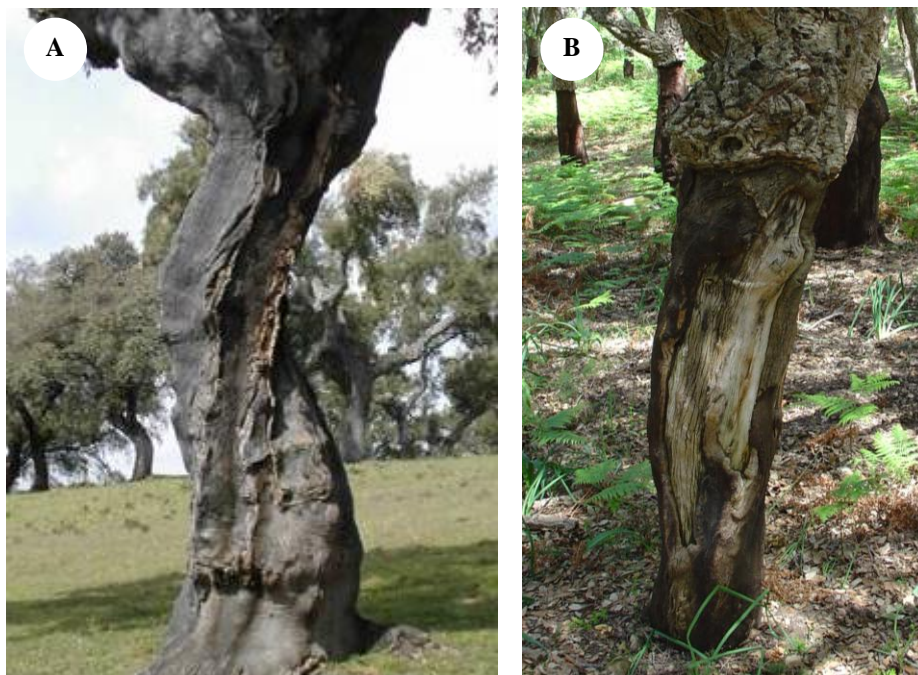


Figura 9. Lesiones en tronco de alcornoque

- A) Abultamientos asociados a lesiones realizadas durante el descorche. Punto de RASDEF (Huelva).
- B) Chancro con callo. Finca San Carlos del Tiradero (Cádiz)

Las muestras de ramas enviadas por los técnicos de la Junta estaban compuestas por ramas con ramillos de hojas que llevaban cierto tiempo secas, que en la mayoría de los casos presentaban la corteza externa con un aspecto seco y agrietado, que al ser retirada permitía observar la lesión cortical como una zona de corteza interna más oscura que contrastaba con el color claro de la corteza sana. Estos chancros aparecían bien delimitados y en ocasiones rodeaban todo el perímetro de la rama, anillándola.

2. Origen de los aislados y morfología de las colonias

De las muestras de tejido cortical necrótico procedentes de las ocho fincas afectadas de Seca, se aislaron consistentemente tres tipos de colonias fúngicas en PDAA con alta incidencia y elevados porcentajes de aislamiento (Tabla R.3.1). Del total de 112 aislados obtenidos en cultivo puro de las muestras procedentes de las parcelas experimentales, 47 presentaban colonias gris claro con abundante micelio aéreo (Figura X). Estos aislados se denominaron DC. Otros 54 aislados formaron colonias de color gris muy oscuro y escasa producción de micelio aéreo (aislados DO) (Figura X), mientras que los restantes 11 aislados formaron colonias gris oscuro con micelio aéreo muy abundante y elevado que llegaba a tocar la tapa de la placa (aislados FA) (Figura X). En las dos fincas de Córdoba y en una de Sevilla, Los Labrados, fue posible aislar los tres grupos morfológicos a partir de ramas afectadas. Sin embargo, en el resto de las parcelas sólo se aisló uno o dos de los grupos morfológicos detectados (Tabla R.3.2).

Figura 9. Morfología de las colonias de *Botryosphaeria* spp. obtenidas de las lesiones de ramas procedentes de las fincas afectadas de Seca. Medio PDA ácido, 4 días de incubación a 20° C.



Tipo morfológico A (*Diplodia corticola*). Colonias claras y micelio aéreo muy abundante.



Tipo morfológico B (*Dothiorella iberica*). Colonias oscuras y micelio aéreo escaso.



Tipo morfológico C (*Fusicoccum aesculi*). Colonias oscuras y micelio aéreo abundante y elevado.

Tabla 2. Aislamiento de hongos a partir de chancros en ramas de *Quercus*

FINCA	sp ^a	Especies fúngicas aisladas ^b					
		DC		DO		FA	
		Diciembre 2000	Abril 2001	Diciembre 2000	Abril 2001	Diciembre 2000	Abril 2001
La Rozuela (CO)	E	0	83.3	73.8	54.1	45	49.9
Viñuela Alta (CO)	E	0	65	0	52.7	28	0
Los Labrados (SE)	A	- ^c	58.3	-	66.6	-	100
Las Navas y El Berrocal (SE)	E	-	0	-	41.6	-	66.6
La Pizarra (HU)	E	-	75	-	0	-	0
La Encarnación (HU)	E	81.5	37.5	28.3	33.3	0	0
Monte Mogeá Luenga (CA)	A	63.5	() ^d	0	()	0	()
San Carlos del Tiradero (CA)	A	-	()	-	()	-	()

^asp = Especie vegetal dominante: A, alcornoque; E, encina.

^b Porcentaje de aislamiento en PDAA a partir del tejido necrótico de las ramas afectadas, de cada uno de los tipos morfológicos, expresado como (nº de cuñas de tejido afectado que dieron lugar a una colonia en PDAA/ nº de cuñas totales) x 100

^c - = No se observaron ramas con chancro.

^d () = No se tomaron muestras.

Tabla 3. Origen de los aislados obtenidos de ramas de *Quercus* con necrosis del tejido cortical procedentes de las parcelas experimentales.

AISLADO	FECHA DE AISLAMIENTO	FINCA	PROVINCIA
DCE-1 a DCE-10	Agosto-2000	La Encarnación	HUELVA
DCE-11 a DCE-14	Julio-2000	Monte Mogeá Luenga	CÁDIZ
DCE-15 y DCE-16	Diciembre-2000	La Pizarra	HUELVA
DCE-17 a DCE-20	Diciembre-2000	La Encarnación	HUELVA
DCE-21 a DCE-23	Diciembre-2000	Viñuela Alta	CÓRDOBA
DCE-24	Diciembre-2000	La Rozuela	CÓRDOBA
DCE-25 a DCE-31	Enero-2001	Viñuela Alta	CÓRDOBA
DCE-32 a DCE-38	Enero-2001	La Rozuela	CÓRDOBA
DCA-1 a DCA-4	Julio-2000	Monte Mogeá Luenga	CÁDIZ
DCA-5 y DCA-6	Febrero-2001	Los Labrados	SEVILLA
DOE-1 y DOE-2*	Marzo-1999	Viñuela Alta	CÓRDOBA
DOE-3 a DOE-24	Julio-2000	La Rozuela	CÓRDOBA
DOE-25 a DOE-27	Septiembre-2000	La Encarnación	HUELVA
DOE-28 y DOE-29	Diciembre-2000	La Encarnación	HUELVA
DOE-30 a DOE-34	Diciembre-2000	Viñuela Alta	CÓRDOBA
DOE-35 a DOE-45	Diciembre-2000	La Rozuela	CÓRDOBA
DOE-46 y DOE-47	Diciembre-2000	Viñuela Alta	CÓRDOBA
DOE-48 a DOE-51	Febrero-2001	Las Navas y el Berrocal	SEVILLA
DOA-1 a DOA-3	Febrero-2001	Los Labrados	SEVILLA
FAE-1 y FAE-2	Julio-2000	La Rozuela	CÓRDOBA
FAE-3 a FAE-5	Julio-2000	Viñuela Alta	CÓRDOBA
FAE-6 a FAE-8	Enero-2001	La Rozuela	CÓRDOBA
FAE-9 y FAE-10	Febrero-2001	Las Navas y el Berrocal	SEVILLA
FAA-1	Febrero-2001	Los Labrados	SEVILLA

A= Colonias claras y micelio aéreo muy abundante (44 aislados).

B= Colonias oscuras con micelio aéreo escaso (54 aislados).

C= Colonias oscuras y micelio aéreo abundante y elevado (11 aislados).

*Los aislados DOA-1 y DOA-2 se obtuvieron de la colección del Grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba.

En cuanto a las muestras procedentes de los puntos de la RASDEF, también se aislaron los tres grupos morfológicos de colonias, obteniéndose un total de 92 aislados, siendo el más frecuente el grupo DC con 81 aislados (88,0%). De los otros dos grupos morfológicos se obtuvieron 9 aislados de DO (9,8%) y 2 aislados del FA (2,2%) (Tabla 4). Se ha podido observar alguno de los tres grupos morfológicos en cualquier provincia andaluza que contuviera masas de encinas y alcornoques (Figura X).

Tabla 4. Número de aislados obtenidos de las ramas de *Quercus* procedentes de puntos de la Red Andaluza de Daños en Ecosistemas Forestales

Año	Nº total de muestras	Nº de aislados DC	Nº de aislados DO	Nº de aislados FA
2001	33	15	0	1
2002	120	32	0	1
2003	23	6	0	0
2004	7	2	1	0
2005	51	26	8	0
2006	8	-	-	-
TOTAL	242	81	9	2

2.2. Caracterización e identificación de los aislados

Los conidiomas picnidiales (picnidios) de los tres grupos morfológicos pudieron observarse en el tejido vegetal infectado, así como en cultivos puros en placas de PDAA. En el tejido vegetal se caracterizaron por estar inmersos en un estroma y presentar una o varias cavidades unidas entre sí, según el grupo morfológico.

La caracterización posterior de las estructuras observadas tanto en placa como en tejido vegetal (Capítulo 3) nos permitieron diferenciar tres especies fúngicas correspondientes a cada grupo morfológico de colonia. El grupo morfológico denominado DC se identificó como *Botryosphaeria corticola*, el DO como *Botryosphaeria iberica* y el FA como *Botryosphaeria dothidea*.

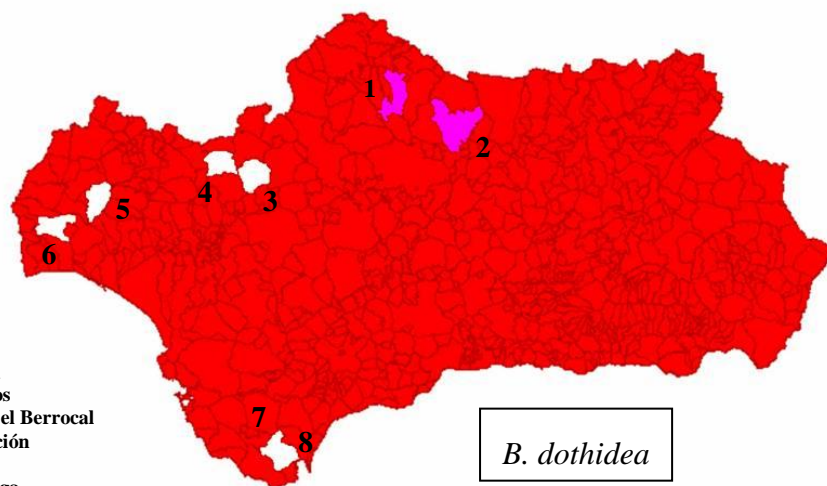
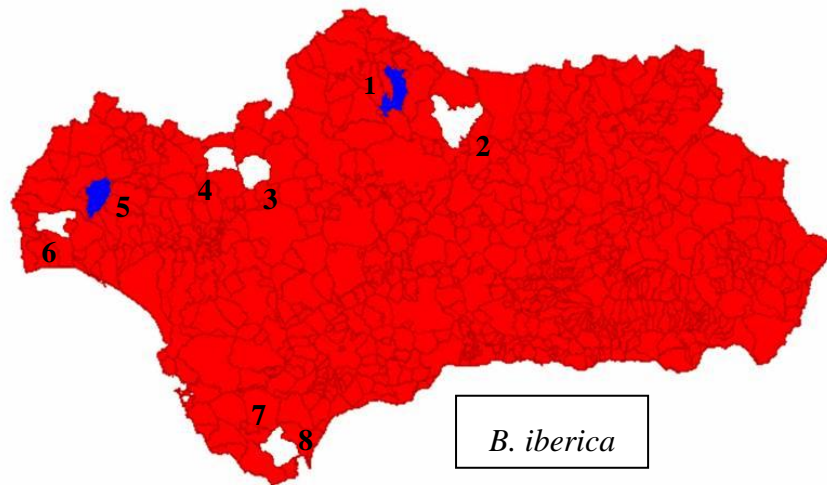
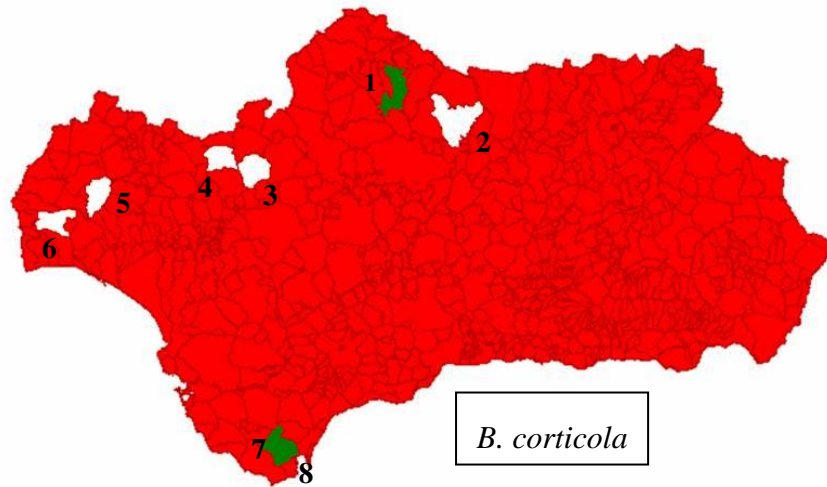
3. Distribución de las especies de *Botryosphaeria* en Andalucía

3.1. Fincas afectadas de Seca

La presencia de ramas afectadas en las parcelas de ensayo se observó en todas las parcelas en la segunda prospección, cuando la evaluación visual se realizó en otoño (Tabla R.3.1). *Botryosphaeria corticola* fue la especie más frecuentemente aislada y la única que se aisló en las cuatro provincias. Por otro lado, sólo se obtuvieron colonias de *B. dothidea* de las muestras procedentes de Córdoba y Sevilla. En las Figuras X se

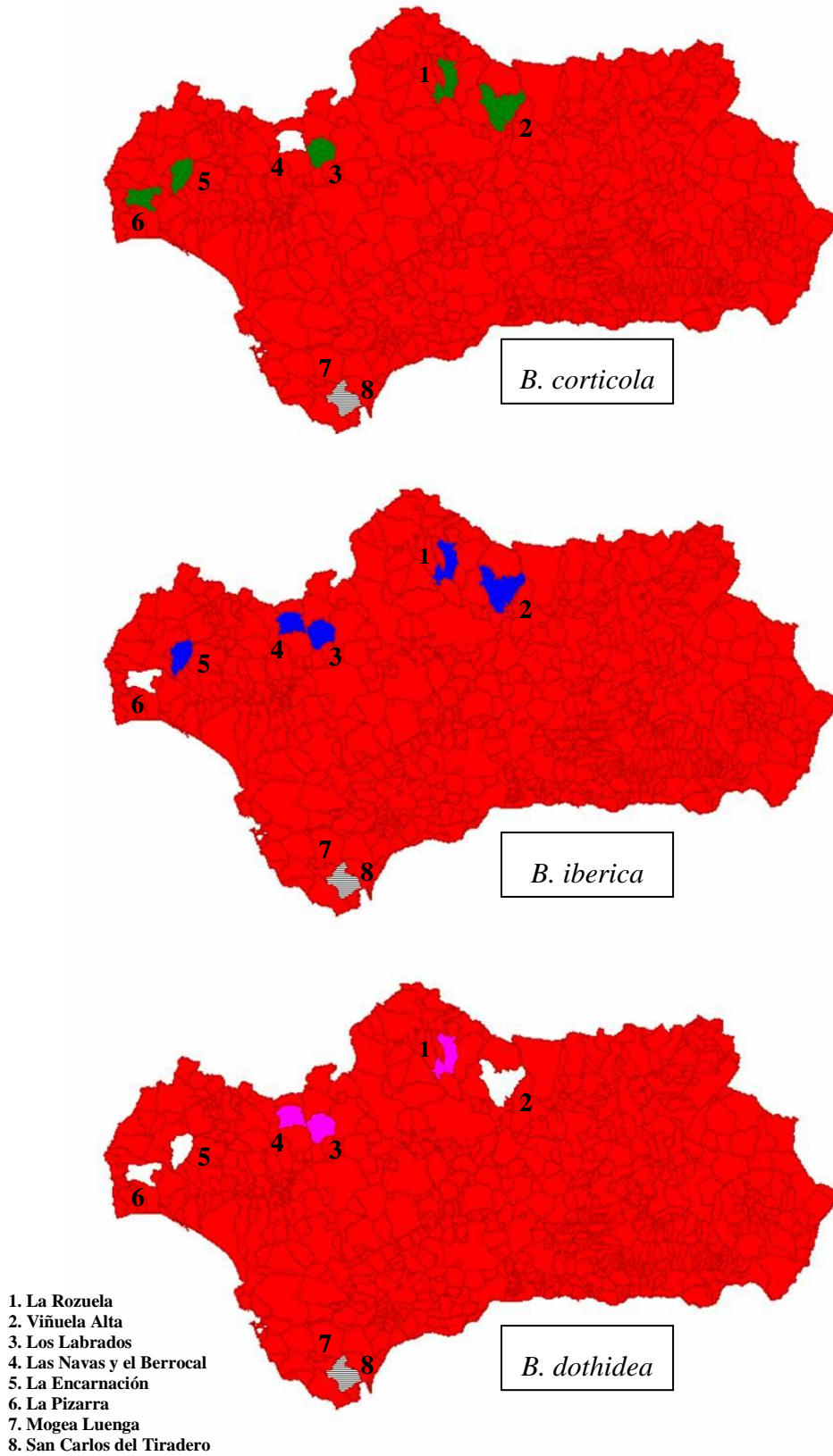
pueden ver la distribución de las tres especies en cada provincia y en cada período de toma de muestras.

Figura 10. Localización de las parcelas afectadas de Seca en las que se aisló *B. corticola*, *B. iberica* y *B. dothidea*. Año 2000.



1. La Rozuela
2. Viñuela Alta
3. Los Labrados
4. Las Navas y el Berrocal
5. La Encarnación
6. La Pizarra
7. Mogeá Luenga
8. San Carlos del Tiradero

Figura. 11. Localización de las parcelas afectadas de Seca en las que se aisló *B. corticola*, *B. iberica* y *B. dothidea*. Año 2001.



3.2. Puntos de la Red Andaluza de Equilibrios Biológicos sobre Ecosistemas Forestales

El número total de muestras de ramas procesadas en laboratorio fue de 242 muestras en el período 2001-2006 (Tabla 4).

La especie fúngica más frecuentemente aislada con 33,5%, en los Puntos de la Red Andaluza de Equilibrios Biológicos Forestales fue *B. corticola*, siendo la única que siempre se ha obtenido de las muestras recibidas en el período 2001-2005. En las provincias en las que aparece durante el período de estudio son: Huelva, Cádiz, Sevilla y Córdoba, ordenadas según la frecuencia de aislamiento de *B. corticola*. (Mapas y Tabla de la red (Anejos)).

Botryosphaeria iberica es la segunda especie que más se ha aislado, con un total de nueve aislamientos positivos (3,7%), uno en 2004 y ocho en 2005. La provincia de Huelva presenta siete puntos de la Red de Daños con aislamiento positivo, y aparece un punto de la Red situado en la Provincia de Jaén y otro en Málaga. (Mapas y Tabla de la red (Anejos)).

La especie aislada con menor frecuencia (0,8%) fue *B. dothidea*, solamente aislada en dos años: en 2001 en un punto de Cádiz y en 2002 en otro punto de Córdoba. (Mapas y Tabla de la red (Anejos)).

Otros géneros fúngicos aislados de las muestras fueron *Trichoderma*, *Phoma*, *Fusarium* y algunas bacterias, pero nunca de forma consistente.

Figura 12. Mapa de la RASDEF con la distribución de puntos en los que se aislaron *B. corticola*. Período 2001-2005.

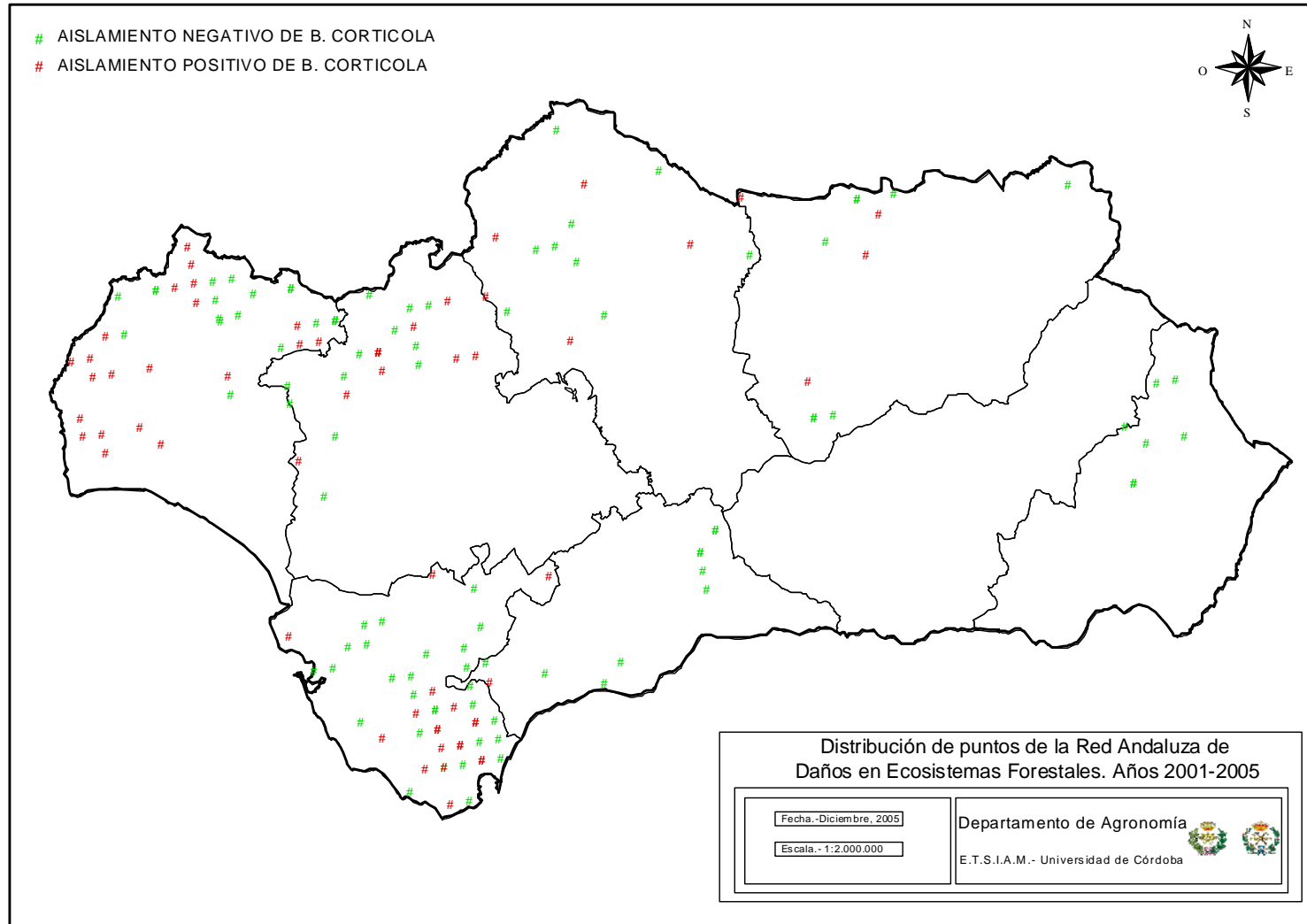


Figura 13. Mapa de la RASDEF con la distribución de puntos en los que se aislaron *B. iberica*. Período 2001-2005.

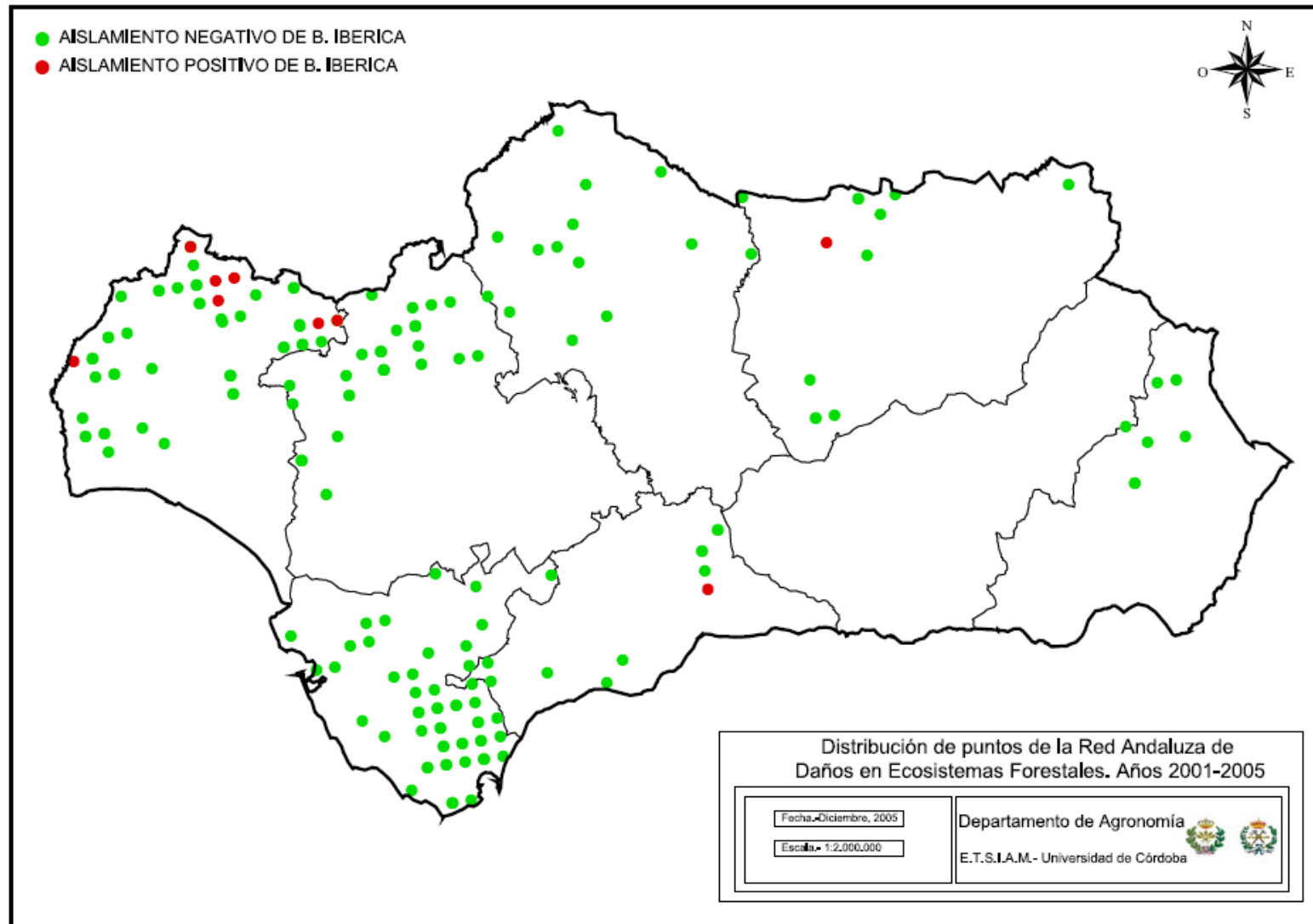
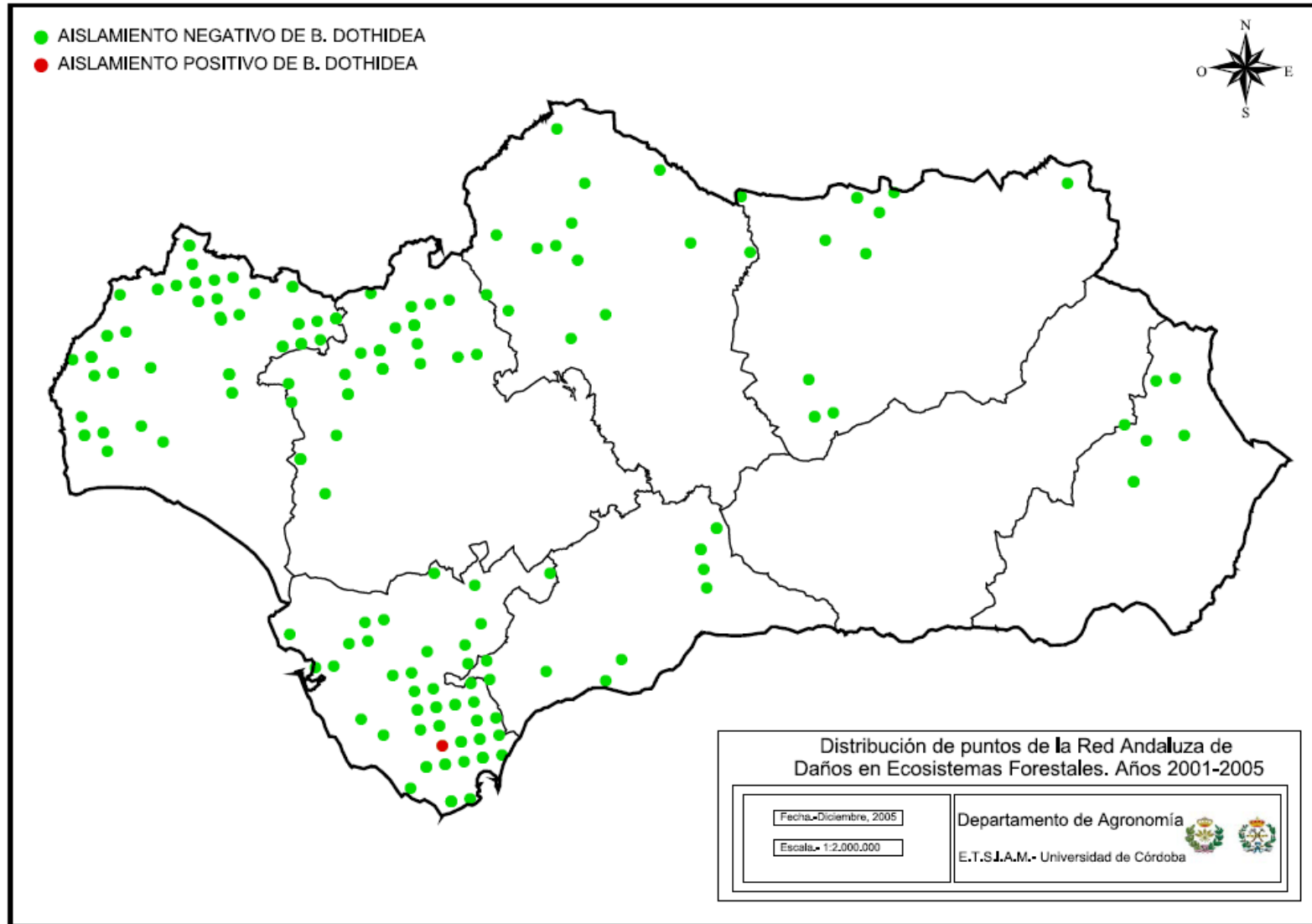


Figura 14. Mapa de la RASDEF con la distribución de puntos en los que se aislaron *B. dothidea*. Período 2001-2005



DISCUSIÓN

Los chancros asociados a la desecación y muerte de ramas como consecuencia de infecciones fúngicas, es uno de los tipos de enfermedad más frecuentemente observadas en cultivos arbóreos, especialmente frutales de hueso y pepita (Tuset, 1996; Zhonghua Ma *et al.*, 2001; Slippers *et al.*, 2007) y también en numerosas especies forestales (Sinclair *et al.*, 1987). La aparición de chancros en las ramas de especies leñosas y la desecación y muerte más o menos rápida de las mismas, está asociada a la infección por hongos que atacan a los tejidos vivos de la corteza y que poseen un comportamiento parasitario no del todo conocido en muchos casos. La separación entre hongos que causan activamente la sintomatología de la enfermedad, de aquellos otros que están presentes invadiendo los tejidos debilitados es un tema difícil de aclarar y, para muchos de estos agentes fúngicos, desconocido (Tuset, 1996).

La presencia de chancros fue frecuente en las ramas de *Quercus* spp. afectadas de clorosis, marchitez foliar, defoliación y muerte. En otros huéspedes, esta sintomatología foliar ha sido descrita por numerosos autores como una manifestación típica de síntomas secundarios producidos por la necrosis cortical de la rama afectada (Shahin y Clafin, 1980; Davison y Tay, 1983; Jones, 1986; Sinclair *et al.*, 1987; Brooks y Ferrin, 1994; Milholland, 1995; Gilbert y Steven, 1996; Tuset, 1996; Slippers *et al.*, 2007). La observación del síntoma primario, es decir el chancro, sólo fue posible en la mayoría de los casos, una vez retirada la corteza externa, de la misma manera que ocurre en otros huéspedes, como en el eucalipto (Davison y Tay, 1983), el nogal europeo (Rumbos, 1987), o la jara pringosa (Sánchez *et al.*, 2002).

En las muestras enviadas por los Técnicos de la Junta de Andalucía procedentes de las ocho provincias andaluzas, así como las tomadas en las fincas asociadas a focos de Seca, se han consignado síntomas de muerte regresiva de ramas y ramas con hojas secas en todas las zonas de Andalucía con masas de encinas y alcornoques.

Los únicos puntos de la RADEF de los que se enviaron muestras y no se ha aislado consistentemente ninguna especie de *Botryosphaeria* han sido los que se encontraban en la provincia de Almería. Navarro *et al.* (2004) distingue cuatro situaciones de las masas de *Quercus* en Andalucía asociadas al decaimiento de estas masas forestales. Una de las situaciones asociadas fundamentalmente a daños por sequía es Andalucía Oriental, la cual incluye los puntos de la RADEF de los que se han enviado muestras localizados en la provincia de Almería. Otras dos situaciones descritas

para el decaimiento son Sierra Morena y Parque Natural de Los Alcornocales (Navarro *et al.*, 2004), en las que se considera al decaimiento como una enfermedad de etiología compleja, con múltiples factores intercambiables en el espacio y el tiempo (Carrasco *et al.*, 2009), siendo la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* y el chancro del tronco causado por *B. corticola* las principales enfermedades asociadas, predominando en Sierra Morena la incidencia de la primera y en el Parque Natural de Los Alcornocales la segunda. Es en esas zonas donde se ha obtenido el mayor número de aislamientos positivos de *Botryosphaeria* asociada a muestras de ramas.

El aislamiento positivo de *Botryosphaeria* spp. en ramas procedentes de puntos de la Red que coinciden con puntos de decaimiento de *Quercus* (Carrasco *et al.*, 2009), junto al período estival en el que se enviaron dichas muestras, pone de manifiesto su mejor comportamiento como hongo oportunista que como patógeno primario (Michailides y Morgan, 2004).

La especie más frecuentemente aislada de las muestras fue *Diplodia corticola*, anamorfo de *B. corticola*. Esta especie se aisló de todas las muestras de ramas sintomáticas procedentes tanto de las fincas con focos de Seca como de las muestras procedentes de la RADEF, a excepción de las muestras recibidas en el año 2006. Esta especie fúngica está considerada por varios autores (Luque *et al.*, 2000; Carrasco *et al.*, 2009) como un factor primario dentro de los factores contribuyentes asociados a la Seca.

Las otras dos especies, *Dothiorella iberica* (teleomorfo *B. iberica*) y *Fusicoccum aesculi* (teleomorfo *B. dothidea*), han sido las especies menos frecuentemente aisladas de los puntos de la RADEF. Sin embargo, sí se obtuvieron elevados porcentajes de aislamiento de ambas especies en las muestras procedentes de las parcelas experimentales con focos de Seca. Además, en estos focos se obtuvieron mejores resultados de aislamiento cuando las muestras se tomaban en primavera. Esta diferencia, en cuanto al número de aislamientos positivos, pudo deberse a que las muestras procedentes de la RADEF se tomaron y enviaron en verano, con elevadas temperaturas (por encima de los 30° C), mientras que las muestras tomadas en los focos de Seca en primavera se hacían con temperaturas más suaves, próximas a las temperaturas óptimas de crecimiento *in vitro* registradas para *D. iberica* (22° C) y *F. aesculi* (25° C) (Sánchez *et al.*, 2003; Slippers *et al.*, 2004; Phillips, 2007d).

De las muestras de ramas procedentes de la RADEF, sólo se obtuvo alrededor de un 50% de aislamiento positivo en *D. corticola*. Esto pudo ser causado por las altas

temperaturas a las que se tomaron y enviaron las muestras, como ya se ha señalado antes. De ahí que para obtener una distribución más exacta de *Botryosphaeria* spp. en Andalucía, se deberían de tomar las muestras en primavera.

***CAPITULO 4. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS
ASOCIADOS A CHANCROS***

INTRODUCCIÓN

El género *Botryosphaeria* incluye una gran número de especies, el cual no para de aumentar (Alves *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007), con una amplia distribución mundial. De entre las enfermedades que causa el género *Botryosphaeria*, destacan por encima de todas los chancros y la muerte regresiva de ramas en especies forestales, y en menor medida, en frutales, matorrales leñosos y especies herbáceas (von Arx, 1987).

Las especies de *Botryosphaeria* son Dothideomicetos con anamorfos Coelomicetos (Denman *et al.*, 2000). Denman *et al.* (2000) recogía 18 géneros de Coelomicetos que habían sido asignados a *Botryosphaeria*. Actualmente, debido a la utilización de técnicas de secuenciación de ADN, no se sabe exactamente el número de géneros y especies que contiene, pues constantemente se está modificando. Lo que sí parece claro es la filogenia de los anamorfos de *Botryosphaeria* (Crous *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2008).

Diversas especies del género *Botryosphaeria* se incluyen como factores implicados en procesos de decaimiento de especies forestales (Sánchez *et al.*, 2010). Se hace necesaria una correcta identificación y caracterización de las especies de *Botryosphaeria* asociadas al decaimiento de encinas y alcornoques para poder establecer las correspondientes medidas de control de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Toma de muestras en parcelas afectadas de Seca

1.1. Localización de las parcelas

Las parcelas de las que se tomaron muestras para el estudio de la enfermedad producida por *Botryosphaeria*, pertenecían a fincas que se encontraban incluidas en el Censo de Focos de Seca de Andalucía (Navarro *et al.*, 2001) descritas en el Capítulo 2.

1.2. Toma de muestras

Tras consignar la sintomatología asociada a la desecación de ramas en cada una de las ocho parcelas seleccionadas, se realizaron dos tomas de muestras: en abril-mayo de 2000, y en noviembre-diciembre del mismo año. Para la primera toma de muestras se eligieron cuatro árboles sintomáticos por finca: que presentasen amarillez o marchitez foliar, defoliación y chancros, evitando los árboles muertos. Cada muestra consistió en tres segmentos de ramas afectadas de chancro por árbol, de longitud entre 25 y 40 cm y diámetro entre 1,5 y 3,5 cm. En la segunda toma de muestras se aumentó a 12 árboles sintomáticos por finca, tomando cuatro segmentos de rama por árbol. En esta segunda prospección se tomaron muestras en todas las fincas, a excepción de las situadas en la provincia de Cádiz.

Una vez seleccionadas las ramas en los árboles, se procedió a cortar los segmentos con unas tijeras de podar o, cuando la altura lo requería, se hacía uso de una pértiga. Estos segmentos de ramas se etiquetaron indicando el nombre de la finca, número de árbol muestreado, número de muestra del árbol y fecha de recolección. Posteriormente, se guardaron en bolsas de plástico para evitar su desecación y se trasladaron al laboratorio.

2. Tratamiento de las muestras en el laboratorio

Las muestras tomadas se llevaron al laboratorio, donde se realizó una observación y descripción más detallada de los síntomas. Las muestras se podaron, eliminando las ramillas laterales y los ápices y se lavaron cuidadosamente al chorro de agua con jabón neutro. Una vez lavados los segmentos de ramas, para evitar su deterioro

y poder trabajar secuencialmente con ellos, se conservaron en cámara fría a 4°C en oscuridad.

Posteriormente, los trozos de rama se lavaron durante 2 h bajo el grifo para favorecer la eliminación de los contaminantes externos (flora epífita). Una vez transcurrido este tiempo se colocaron dentro de una cámara de flujo estéril sobre papel también estéril (esterilización en horno a 120°C, durante 2 h). Posteriormente, con un escalpelo estéril se retiró la corteza externa y, una vez descubierto el tejido cortical necrótico, se cortaron pequeñas cuñas (de 3 mm³ aproximadamente) de la zona de transición entre el tejido sano y el necrosado. Las cuñas se colocaron secuencialmente en placas de Petri con ayuda de unas pinzas estériles. Las placas utilizadas contenían un medio de cultivo genérico que permite el aislamiento de todo tipo de hongos, elaborado a partir de PDA (Patata-Dextrosa-Agar al 2%) (Dhingra y Sinclair, 1995) al que se le añadió ácido láctico al 85% hasta conseguir un pH = 4,5, con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias. De este medio, al que hemos denominado PDAA, se sembró una placa por cada uno de los fragmentos de rama, a razón de 6 cuñas de tejido cortical por placa.

El conjunto de placas se identificó anotando la fecha, el medio de cultivo y el número identificativo de la muestra. Se sellaron con Parafilm (American National Can) y se incubaron en oscuridad a 22°C durante las primeras 48 h. Una vez transcurrido este tiempo, se incubaron otros 4 días a 22°C, alternando luz y oscuridad (12h/12h).

Las colonias fúngicas obtenidas se agruparon en función de su morfología y se realizaron transferencias a PDAA de aquellas consistentemente aisladas. De esta manera se consiguieron cultivos *in vitro* puros de las colonias consistentemente aisladas en cada parcela de muestreo. Se consideraron aislados distintos los obtenidos consistentemente de ramas distintas dentro de cada parcela. Estos aislados se conservaron en tubos de PDAA cubiertos con aceite de parafina en cámara fría a 4°C y en oscuridad.

3. Caracterización e identificación de los aislados

La caracterización e identificación de los aislados fúngicos obtenidos a partir de los tejidos sintomáticos de *Quercus* spp. se realizó en base a sus características macroscópicas tales como el color, aspecto y morfología de las colonias que formaban en PDAA a 20°C tras 4 días de incubación, y fundamentalmente por medio de la

caracterización microscópica de sus estructuras vegetativas y reproductivas, tanto de carácter asexual como sexual.

3.1. Estructuras asexuales

Para estimular la producción de estructuras asexuales, los aislados obtenidos se sembraron separadamente en placas con medio PDAA. Las placas se incubaron a 22°C y con 12 h de luz diarias, realizándose observaciones periódicas con el fin de estimar el tiempo preciso para conseguir la esporulación de los cultivos.

Debido a la gran producción de micelio aéreo, que dificultaba la observación de los cuerpos reproductivos, se optó por modificar el medio de cultivo sólido. Para ello, se recortó en condiciones estériles un disco exterior de agar, por lo que el medio (PDAA) ya no cubría la totalidad de la placa, sino que quedaba un espacio libre de 1 cm aproximadamente hasta el borde. Este procedimiento facilita la observación de las placas al limitar la producción de micelio aéreo y favorecer la formación de estructuras conidiógenas (Gutiérrez, 1999).

Una vez sembrado cada aislado en las placas modificadas, éstas se sellaron y se incubaron a 25° C durante 15 a 35 días, tiempo suficiente para que las colonias cubrieran la superficie del agar, con una disminución considerable en la producción de micelio aéreo y abundante aparición de cuerpos fructíferos.

Tras verificar la producción de estructuras de reproducción asexual, se seleccionaron las zonas con mayor abundancia de cuerpos maduros, con la ayuda del microscopio estereoscópico. De estas zonas se extrajeron los cuerpos fructíferos y parte del micelio acompañante con la ayuda de una aguja estéril. Los cuerpos se tiñeron y se realizaron montajes microscópicos, para su posterior caracterización. Para la realización de las observaciones se utilizó el microscopio óptico con un ocular de 10x y objetivos de 20x y 40x.

Para la caracterización de las estructuras reproductivas asexuales, se consideraron los siguientes parámetros:

- Tamaño, morfología y color del conidioma
- Morfología y color de los conidios

- Presencia o ausencia de septas
- Forma de los ápices
- Rugosidad de la pared de las conidios

Además se seleccionaron 6 aislados por cada grupo morfológico obtenido, de forma que la procedencia de los aislados fuera lo más dispar posible, para medir la longitud y anchura de 50 conidios de cada uno de los aislados, repartidos entre los dos montajes realizados y elegidas al azar.

Con los datos correspondientes a las dimensiones de los conidios se realizó un análisis de la varianza utilizando el programa Statistix 9 (Analytical Software, 2008). Las comparaciones de medias se realizaron según el test LSD protegido de Fisher, al nivel de probabilidad del 5% (Steel y Torrie, 1985).

3.2. Estructuras sexuales

Se procedió a buscar las estructuras de reproducción sexual directamente sobre ramas y trozos de corteza del tronco de árboles afectados de chancro, debido a que no fueron observadas a partir de cultivos *in vitro* procedentes del aislamiento de los tejidos afectados. Para ello, se tomaron ramillas obtenidas siguiendo el mismo protocolo que para la toma de muestras. Estas muestras se tomaron de todas las parcelas. En el caso de los trozos de corteza se usó un formón y un martillo para la extracción de la corteza afectada en las tres parcelas cuya especie principal era el alcornoque. Como las muestras de lesiones en el tronco que se obtuvieron eran relativamente viejas, ya que no se descorchaba desde hacía 9 años para la parcela de San Carlos del Tiradero (Cádiz), 7 años en el Monte Mogeá Luenga (Cádiz) y 6 años en la dehesa de Los Labrados (Sevilla), se incluyeron además muestras de corteza de tronco de alcornoque con chancros obtenidas en la Sierra de Ojén, Cádiz, ya que se trataba de alcornocales descorchados, concretamente entre uno y dos años antes al de la toma de la muestra.

Todas las muestras se colocaron en cámaras húmedas para inducir el desarrollo y la esporulación de las estructuras sexuales. Las muestras de corteza del tronco se mantuvieron en estas condiciones durante 3 días, y en el caso de las ramillas se mantuvieron durante 15-20 días. Las cámaras húmedas consistieron en un recipiente de plástico en cuyo interior se colocó una bandeja de plástico con una rejilla. Sobre esta

rejilla se colocó un papel de filtro humedecido comunicado con una capa de agua desionizada que cubría el fondo del recipiente, con el fin de mantenerlo permanentemente húmedo. Las muestras se colocaron sobre la bandeja y se cubrieron con la rejilla, añadiendo sobre ésta una nueva capa de papel absorbente, también comunicada con el agua del fondo y se cerraron herméticamente.

Transcurrido el tiempo de incubación en condiciones de saturación de humedad, las muestras de ramas y de corteza de tronco se observaron al microscopio estereoscópico. Cuando se detectó la presencia de ascomas, se siguió el procedimiento descrito por Trapero y Kaiser (1992) para la descarga de ascosporas de *Didymella rabiei*. Este método permite la obtención de cultivos monoascospóricos para poder determinar la relación anamorfo-teleomorfo. El método de descarga de ascosporas consistió en tomar con la ayuda de pinzas y escalpelo estériles y en condiciones de asepsia, pequeños trozos de corteza de aquellas zonas que presentaban mayor número de cuerpos fructíferos. Estos trocitos se colocaron en la tapa de una placa de Petri de 9 cm de diámetro en la que previamente se había depositado una masa adhesiva de forma que quedaran adheridos a la tapa. Esta tapa, con los trozos de corteza distribuidos uniformemente, se colocó tapando la placa de Petri que contenía una delgada capa de agar-agua (AA) al 2%. Posteriormente, la placa se selló con Parafilm y se incubó durante 24 h a 22°C para que las ascas expulsaran las ascosporas.

Una vez transcurridas las 24 h, la placa se observó al microscopio invertido y con un capilar estéril acabado en punta, se cortó un bloque de AA en el que se encontraba una ascospora. Este pequeño trozo de AA se sembró en otra placa con medio de cultivo PDAA. En cada placa con PDAA se sembraron 4 trocitos de AA con una ascospora, realizándose un total de 9 placas por muestra. Las placas se sellaron e incubaron bajo luz y a 22°C durante una semana.

Debido a la dificultad de observar estructuras de reproducción sexual directamente sobre el tejido vegetal infectado naturalmente, se procedió a buscar dichas estructuras a través de otros soportes por medio de inoculaciones artificiales en laboratorio. Para ello, se utilizaron dos tipos de materiales: palillos higiénicos de madera planos esterilizados e inoculados mediante dos métodos distintos, y plantones de 3-4 años de encina, alcornoque y coscoja creciendo en bolsas de plástico negro de 4 l.

- En cámara de condiciones controladas a 23° C y alternancia luz/oscuridad 12 h.
- En cámara de condiciones controladas a 23° C y oscuridad permanente.
- En incubador a 10° C y alternancia luz/oscuridad 12 h.
- En incubador a 10° C y oscuridad permanente.
- En umbráculo a temperatura ambiente y condiciones de iluminación natural.
- En umbráculo a temperatura ambiente y oscuridad permanente.

Para cada una de las condiciones de incubación se prepararon cinco placas (repeticiones) con cada uno de los dos medios soporte.

En el segundo método empleado, la inmersión de palillos higiénicos planos en suspensión conidial, se seleccionaron los mismos aislados monoascospóricos en crecimiento activo que en el método anterior. En este caso los cultivos se incubaron a 23° C durante 8 días, hasta que se observaron picnidios maduros. De cada aislado se obtuvo una suspensión conidial de 5×10^5 conidios/ml (Sánchez *et al.*, 2002). Para ello, con una aguja estéril se cogieron los picnidios maduros y se colocaron en viales estériles que contenían 1 ml de agua desionizada estéril. Los viales se agitaron bien para poder suspender los exudados de los picnidios y obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, se estimó el número de conidios por ml en una cámara Neubauer y se ajustó a la concentración a 5×10^5 conidios/ml añadiendo agua desionizada estéril. Una vez obtenida la suspensión conidial de cada aislado, se tomaron 7,5 ml de cada una y se mezclaron en un vaso de precipitados, obteniéndose en total 75 ml de suspensión conidial de la mezcla de aislados. En dicha suspensión se sumergieron los palillos planos de madera estériles, esterilizados en autoclave durante 20 min a 1 atm durante 30 min y posteriormente se colocaron sobre una malla durante 20 min para eliminar el líquido sobrante. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas. Los palillos inoculados se dispusieron formando dos líneas en las cámaras húmedas preparadas de igual forma que las empleadas en la obtención de estructuras sexuales en ramas y corteza. En cada cámara se colocaron un total de 18 palillos y se incubaron 2 cámaras húmedas por condiciones de incubación, que fueron las mismas que las del método anterior.

Con una periodicidad de 15 días, se observaron al microscopio estereoscópico, tanto los palillos que se mantenían en condiciones de temperatura controladas como los que se encontraban en el umbráculo a temperatura ambiente.

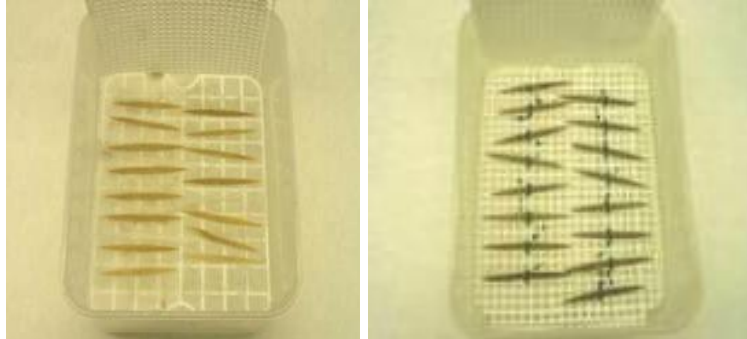


Fig3. Cámara húmeda con palillos higiénicos inoculados:
A) Incubación en cámara en condiciones controladas.
B) Incubación alterna en condiciones húmedas/secas

- Inoculación de plantones con mezcla de aislados

En este método de obtención del estado sexual se inocularon tres especies del género *Quercus*, cultivadas en bolsas de plástico negro de 4 l de capacidad, con un 90% de turba y un 10% de vermiculita, sin haberse añadido ningún tipo de abono. Estas plantas fueron suministradas por el vivero San Jerónimo (Sevilla) de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, y procedían de semilla, teniendo una edad aproximada de 3 años al comienzo del ensayo.

Se inocularon las siguientes especies:

- *Q. ilex* procedente de Aznalcollar (Sevilla).
- *Q. suber* procedente de Los Alcornocales (Cádiz).
- *Q. coccifera* procedente de Hinojos (Huelva).

El método utilizado para la inoculación de los plantones consistió en practicar tres heridas a lo largo del tallo de las plantas y colocar en cada herida un cilindro de agar con micelio mezcla en crecimiento activo.

Para la obtención del micelio mezcla se partió de placas de Petri de 5 cm de diámetro que contenía una delgada capa de PDAA en la que crecía el correspondiente aislado (Tabla X). Estas placas se incubaron a 23°C con fotoperiodo de 12 h hasta que el micelio de cada aislado ocupó toda la superficie de su placa pero sin que llegaran a formarse estructuras de reproducción (2-3 días, dependiendo de la especie y del

aislado). Posteriormente, y en condiciones estériles, se echaron en un vaso de precipitado que contenía 10 ml de agua desionizada y estéril, el contenido de las placas de Petri con el hongo en crecimiento activo de todos los aislados de una misma especie de *Botryosphaeria*. Con la ayuda de una batidora de brazo, se mezcló el conjunto de los aislados de cada especie por separado, hasta obtener una mezcla homogénea. En viales de cristal estériles que contenían 10 ml de agua desionizada y estéril se añadió 10 ml de la mezcla de micelio de cada una de las especies, y se agitaron hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, se cogió 1 ml de esta última suspensión con una jeringuilla estéril y se distribuyó gota a gota por la superficie de una placa de Petri de 9 cm de diámetro que contenía como medio de crecimiento el PDAA. Con la ayuda de un asa de vidrio estéril se extendieron las gotas, formándose una película por toda la superficie del medio de crecimiento. Por cada especie se sembraron ocho placas y se incubaron a 23° C con 12 h/luz hasta que el nuevo micelio ocupara toda la superficie de la placa y estuviera homogéneamente distribuido por la misma. Una vez transcurrido el periodo de incubación, que fue de 5 días, se hicieron incisiones cilíndricas con un sacabocados estéril de 5 mm de diámetro por toda la superficie de la placa, para obtener los discos de agar con micelio que servirían como inóculo.

Para la inoculación, se desinfectó toda la superficie del tallo con un algodón impregnado en alcohol. Una vez evaporado el alcohol, se inoculó en tres puntos, uno central y a 10 ó 20 cm del centro, dependiendo de la longitud del tallo en cada caso, uno por encima y otro por debajo del punto central.

Las heridas en los puntos de inoculación se realizaron con un sacabocados estéril de 5 mm, presionando sobre la corteza, marcando el contorno de la herida. Después, con un escalpelo estéril, se retiró la corteza externa, teniendo cuidado de eliminar sólo ésta. De este modo el inóculo queda en contacto con el tejido vivo de la corteza, y no directamente con la madera. Con la punta de un escápelo estéril, se extrajeron discos de 5 mm del inóculo y se colocaron sobre los distintos puntos de inoculación, de forma que el micelio entrara en contacto con la herida producida. Seguidamente, y con cuidado de que el disco no se moviera, se procedió al sellado con Parafilm del punto de inoculación, para asegurar que el disco de PDAA estuviera en contacto con la herida, evitar su desecación antes de que estableciera la infección e impedir la posible infección por parte de otros hongos en el punto de inoculación.

Se inocularon un total de 72 plantas (Figura x), ocho por especie vegetal (encina, alcornoque y coscoja) y por especie fúngica (DCE, DOE, FAE), de la cuales cuatro habían tenido abundante riego, y a las otras cuatro se les suprimió el riego hasta que las hojas se marchitaron. De las plantas que estaban verdes, una vez inoculadas y tras comprobar que se había producido la infección, dos plantas se cortaron a la altura de la base del tallo y estos tallos cortados se colocaron en recipientes de plástico en vertical sin ningún tipo de sustrato. El resto de plantas verdes se regaron dos o tres veces a la semana. De las cuatro plantas con hojas marchitas inoculadas, dos se cortaron por la base, como en el caso anterior inmediatamente después de la inoculación y se colocaron en vertical en recipientes de plástico, y las otras dos se dejaron sin riego. En todos los casos, las plantas se mantuvieron en el umbráculo y la distribución de las mismas se estableció por bloques formados por plantas inoculadas con la misma especie fúngica

Figura . Esquema de trabajo para las plantas inoculadas artificialmente con la mezcla de aislados de *Botruosphaeria* spp.

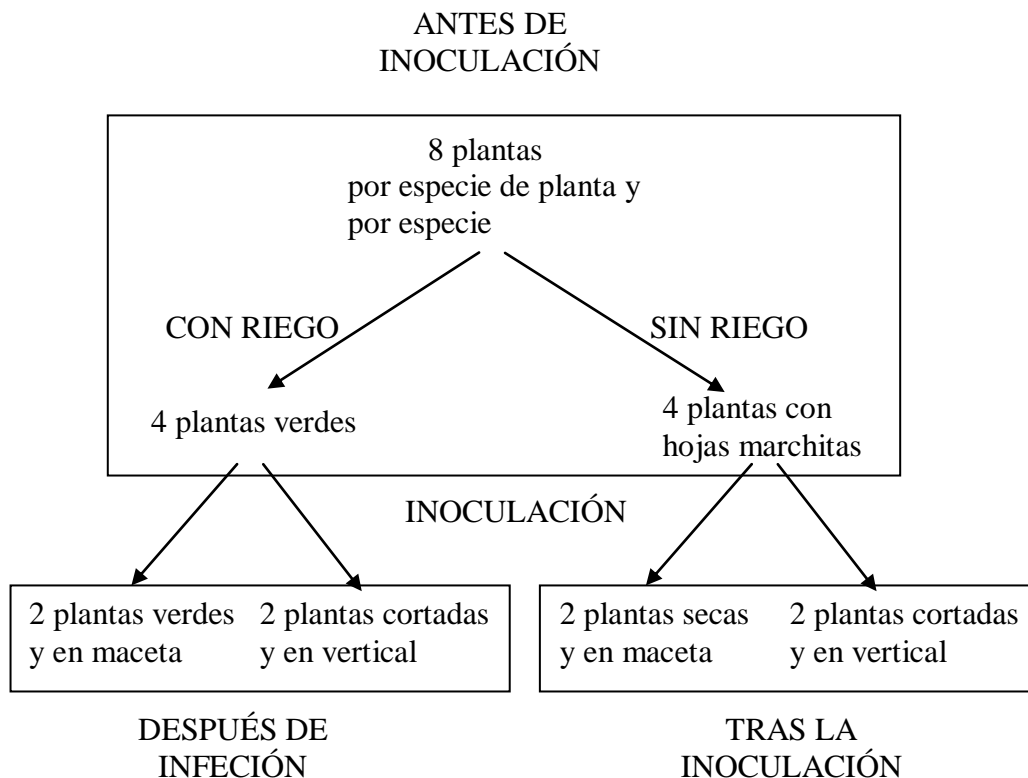




Fig Plantas de encina en bolsa de tres años:
A) Plantas con abundante riego.
B) Planta a la que se le suprimió el riego.



Fig. Plantas de alcornoque, encina y coscoja inoculadas con la mezcla de aislados, cortadas y en vertical.

Observación de estructuras reproductivas

Cuando se observó la presencia de cuerpos fructíferos tanto en las ramas y trozos de corteza del tronco naturalmente infectado, como en los palillos y plantas inoculadas artificialmente, se extrajeron con ayuda de una aguja estéril. Los cuerpos fructíferos así extraídos se colocaron sobre portas, se tiñeron con fucsina ácida en lactofenol, y se cubrieron con cubreobjetos para su posterior observación microscópica. Los montajes así realizados se examinaron al microscopio óptico con objetivo de 40x y ocular 10x.

Para la caracterización de las estructuras reproductivas de carácter sexual, se consideraron los siguientes parámetros:

- Presencia de espermacias
- Tamaño y morfología del ascoma
- Forma de las ascas y ascosporas
- Tamaño de las ascas y ascosporas
- Número de ascosporas por asca
- Tipo de pared del asca
- Tipo de pared y septación de las ascosporas

Para medir la longitud y anchura de las ascosporas, se eligieron un total de 30 esporas, elegidas entre los distintos montajes obtenidos.

4. Determinación de las curvas de crecimiento

Para la determinación de las tasas de crecimiento se seleccionaron los mismos seis aislados por grupo morfológico que ya habían sido elegidos para la caracterización del tamaño de los conidios. El medio de cultivo seleccionado para la realización de este ensayo fue PDAA, debido al buen crecimiento del hongo en este medio de cultivo en los ensayos realizados con anterioridad.

La siembra de las placas se realizó de la siguiente manera: con un sacabocados de 7 mm de diámetro se extrajo un disco de agar de una placa con el hongo en crecimiento activo. Éste se colocó en el centro de otra placa de Petri de 9 cm de diámetro con PDAA, de forma que el micelio contenido en el disco entrara en contacto

con el medio de la nueva placa. Las temperaturas de incubación seleccionadas fueron 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35° C, realizándose tres repeticiones (placas) para cada aislado y temperatura. Las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron en oscuridad a las siete temperaturas citadas. Para medir el crecimiento, con un calibrador digital se realizaron las medidas de los diámetros mayor y menor de la colonia una vez transcurridos 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 7; 10 y 14 días tras la siembra.

A las medidas del diámetro de cada colonia se les restó el diámetro del disco de agar de siembra. Posteriormente, se calcularon las tasas de crecimiento diario dividiendo el diámetro medio de la colonia (expresado en mm) entre el número de días transcurridos hasta alcanzar dicho diámetro, teniendo en cuenta que si la placa estaba llena en la fecha medida, se tomaba la medida anterior al llenado de la placa como último valor considerado para calcular la tasa de crecimiento.

De cada aislado se elaboraron curvas de crecimiento a las diferentes temperaturas. Para ello, los datos obtenidos se ajustaron matemáticamente a una curva de regresión, eligiendo aquella que mejor se ajustara a todos los aislados; esto se realizó para cada grupo morfológico. La elección definitiva del modelo se realizó en base a los siguientes criterios: el coeficiente de determinación (R^2), la significación de los coeficientes de regresión, la distribución de los residuos estandarizados sobre los valores ajustados y el ajuste con el proceso observado en el ensayo.

Utilizando la ecuación resultante, se calculó para cada uno de los grupos morfológicos la temperatura óptima de crecimiento así como la temperatura máxima y mínima a las que el hongo deja de crecer, estimándose así el intervalo de temperaturas de crecimiento.

RESULTADOS

1. Origen de los aislados y morfología de las colonias

Como ya se indicó en el Capítulo 2, de las muestras de tejido cortical necrótico procedentes de las ocho fincas afectadas de Seca, se aislaron consistentemente tres tipos de colonias fúngicas en PDAA con alta incidencia y elevados porcentajes de aislamiento (Tabla R.2.1), aislándose además otros géneros de hongos pero de forma no consistente, como fue el caso de especies del género *Phoma*, *Selenophoma*, *Fusarium*, *Coryneum*, *Trichoderma* y algunas bacterias. En un principio, todas las colonias eran de color blanco en el medio PDAA, tornándose a gris verdoso y posteriormente a gris oscuro con el tiempo. Tras 15 días de incubación a 22°C, se distinguían tres morfologías de colonia distintas. Del total de 112 aislados obtenidos en cultivo puro de las muestras procedentes de las parcelas experimentales, 47 presentaban colonias gris claro con abundante micelio aéreo (Figura X). Estos aislados se denominaron DC. Otros 54 aislados formaron colonias de color gris muy oscuro y escasa producción de micelio aéreo (aislados DO) (Figura X), mientras que los restantes 11 aislados formaron colonias gris oscuro con micelio aéreo muy abundante que llegaba a tocar la tapa de la placa (aislados FA) (Figura X).

2. Caracterización e identificación de los aislados

2.1. Caracterización de las estructuras asexuales

Los conidiomas picnidiales (picnidios) de los tres grupos morfológicos pudieron observarse en el tejido vegetal infectado tanto natural como artificialmente, así como en cultivos puros en placas de PDAA. En el tejido vegetal se caracterizaron por estar inmersos en un estroma y presentar una o varias cavidades unidas entre sí, según el grupo morfológico. En el caso de los aislados DC y DO, los picnidios solían ser uniloculares (Figuras.) y multiloculares para el caso de los aislados FA (Fig.), de forma que sólo eran visibles una vez abierto el poro común.

Los resultados de las mediciones de los conidios para cada uno de los aislados se presentan en la Tabla X.

En los picnidios de los aislados DC (Figura X) se observó la ausencia de conidióforos. Las células conidiógenas midieron 17-26 x 4 µm y eran hialinas, lisas, cilíndricas y aseptadas. La formación de conidios fue holoblástica, formándose un

Tabla 3. Origen de los aislados obtenidos de ramas de *Quercus* con necrosis del tejido cortical procedentes de las parcelas experimentales.

AISLADO	FECHA AISLAMIENTO	DE	FINCA	PROVINCIA
DCE-1 a DCE-10	Agosto-2000		La Encarnación	HUELVA
DCE-11 a DCE-14	Julio-2000		Monte Moge Luenga	CÁDIZ
DCE-15 y DCE-16	Diciembre-2000		La Pizarra	HUELVA
DCE-17 a DCE-20	Diciembre-2000		La Encarnación	HUELVA
DCE-21 a DCE-23	Diciembre-2000		Viñuela Alta	CÓRDOBA
DCE-24	Diciembre-2000		La Rozuela	CÓRDOBA
DCE-25 a DCE-31	Enero-2001		Viñuela Alta	CÓRDOBA
DCE-32 a DCE-38	Enero-2001		La Rozuela	CÓRDOBA
DCA-1 a DCA-4	Julio-2000		Monte Moge Luenga	CÁDIZ
DCA-5 y DCA-6	Febrero-2001		Los Labrados	SEVILLA
DOE-1 y DOE-2*	Marzo-1999		Viñuela Alta	CÓRDOBA
DOE-3 a DOE-24	Julio-2000		La Rozuela	CÓRDOBA
DOE-25 a DOE-27	Septiembre-2000		La Encarnación	HUELVA
DOE-28 y DOE-29	Diciembre-2000		La Encarnación	HUELVA
DOE-30 a DOE-34	Diciembre-2000		Viñuela Alta	CÓRDOBA
DOE-35 a DOE-45	Diciembre-2000		La Rozuela	CÓRDOBA
DOE-46 y DOE-47	Diciembre-2000		Viñuela Alta	CÓRDOBA
DOE-48 a DOE-51	Febrero-2001		Las Navas y el Berrocal	SEVILLA
DOA-1 a DOA-3	Febrero-2001		Los Labrados	SEVILLA
FAE-1 y FAE-2	Julio-2000		La Rozuela	CÓRDOBA
FAE-3 a FAE-5	Julio-2000		Viñuela Alta	CÓRDOBA
FAE-6 a FAE-8	Enero-2001		La Rozuela	CÓRDOBA
FAE-9 y FAE-10	Febrero-2001		Las Navas y el Berrocal	SEVILLA
FAA-1	Febrero-2001		Los Labrados	SEVILLA

A= Colonias claras y micelio aéreo muy abundante (44 aislados).

B= Colonias oscuras con micelio aéreo escaso (54 aislados).

C= Colonias oscuras y micelio aéreo abundante y elevado (11 aislados).

*Los aislados DOA-1 y DOA-2 se obtuvieron de la colección del Grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba.

Fig.Y. Morfología de las colonias de *Botryosphaeria* spp. obtenidas de las lesiones de ramas procedentes de las fincas afectadas de Seca. Medio PDA ácido, 4 días de incubación a 20° C.



Tipo morfológico A (*Diplodia corticola*). Colonias claras y micelio aéreo muy abundante.



Tipo morfológico B (*Dothiorella iberica*). Colonias oscuras y micelio aéreo escaso.



Tipo morfológico C (*Fusicoccum aesculi*). Colonias oscuras y micelio aéreo abundante y elevado.

conidio individual en el extremo de la célula conidiógena que posteriormente proliferaba de forma percurrente, dando lugar a 2-3 collarettes, o bien la proliferación ocurría al mismo nivel originando hinchazones periclinales. La maduración del picnidio daba lugar a una matriz mucilaginosa de color oscuro constituida por los conidios.

Los conidios obtenidos de los cultivos puros no difirieron de los producidos en los estromas del tejido vegetal infectado. En ambos casos fueron hialinos, aseptados, con pared celular lisa y relativamente gruesa. Aproximadamente el 80% eran cilíndricos, con el ápice redondeado y la base redondeada o truncada (Figura X). Sus dimensiones medias fueron $27,9 \pm 2,7 \times 13,2 \pm 1,5 \mu\text{m}$ (Tabla R.2.4), con una relación longitud / anchura (L/A) de $2,1 \pm 0,3$. El 20% restante eran subglobosas (Figura X), con unas dimensiones medias de $16,7 \pm 2,8 \times 13,6 \pm 1,2 \mu\text{m}$ y una relación L/A de $1,2 \pm 0,2$. Ocasionalmente se observaron conidios cilíndricos, de color marrón claro y con una septa (Figura X). Las características de los aislados DC se corresponden con las descritas para *Diplodia corticola*, el anamorfo de *Botryosphaeria corticola* (Alves *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2009 a; 2009 b).

En los picnidios de los aislados DO (Figura X) tampoco se observaron conidióforos. Las células conidiógenas eran hialinas, lisas, cilíndricas, aseptadas, holoblásticas al principio, después mostraban proliferación percurrente con uno o dos collarettes. Sus dimensiones fueron $12-15(-17) \times 3-4,5 \mu\text{m}$. Los conidios obtenidos en cultivo fueron idénticos a las procedentes del tejido enfermo. Inicialmente eran hialinos y aseptados, con pared gruesa, para posteriormente adquirir una coloración marrón oscura, con una septa central, lisa externamente y ornamentada (verrucosa) internamente. De forma recta, ovoide a oblonga, con ápice obtuso y base truncada (Figura X). Sus dimensiones medias fueron $23,9 \pm 2,1 \times 9,4 \pm 1,1 \mu\text{m}$, con una relación L/A de $2,6 \pm 0,3$ (Tabla R.2.4). Las características que presentan los aislados DO se corresponden con la descripción de la especie *Dothiorella iberica*, estado anamórfico de *Botryosphaeria iberica* (Phillips *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009 a; 2009 b).

Los picnidios de los aislados FA (Figura X) presentaron conidióforos hialinos, cilíndricos, lisos, en ocasiones ramificados. Las células conidiógenas eran hialinas, lisas, de pared delgada y cilíndricas, de más de $28 \mu\text{m}$ de longitud \times $2-2,5 \mu\text{m}$ de anchura, holoblásticas, ocasionalmente proliferando al mismo nivel para dar lugar a hinchazones periclinales. Los conidios obtenidos en los cultivos resultaron idénticos a los procedentes de la corteza infectada y fueron hialinos, lisos, de pared delgada,

fusiformes a elipsoidales, con contenido granular, ápice sub-agudo, base truncada con una pequeña protuberancia, más anchos en el tercio superior del conidio, mayoritariamente aseptados, aunque ocasionalmente presentaban una septa (Figura X). Sus dimensiones medias fueron $22,6 \pm 3,4 \times 4,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$, con una relación L/A de $5,2 \pm 1,1$ (Tabla R.2.4). Las características de los aislados FA en el huésped y en cultivo corresponden al género *Fusicoccum*, anamorfos del género *Botryosphaeria* (Pennycook y Samuels, 1985; Crous y Palm, 1999). Estos aislados se corresponden con la descripción de la especie-tipo *Fusicoccum aesculi* descrita por Crous y Palm (1999), teleomorfo de *Botryosphaeria dothidea* (Pennycook y Samuels, 1985, Romero *et al.*, 2009 a; 2009 b).

En general, para los tres parámetros analizados (Tabla A1 del Anejo): longitud, anchura y la razón longitud/anchura, se observaron diferencias significativas entre los diferentes aislados, para cada grupo morfológico. La comparación de medias según el test LSD (mínima diferencia significativa) protegido de Fisher al nivel de probabilidad del 5% mostró diferencias significativas dentro de cada uno de los grupos morfológicamente distintos. No obstante, los grupos homogéneos obtenidos para las distintas dimensiones (incluida la relación L/A) variaron en cada caso (Tabla A1 del Anejo).

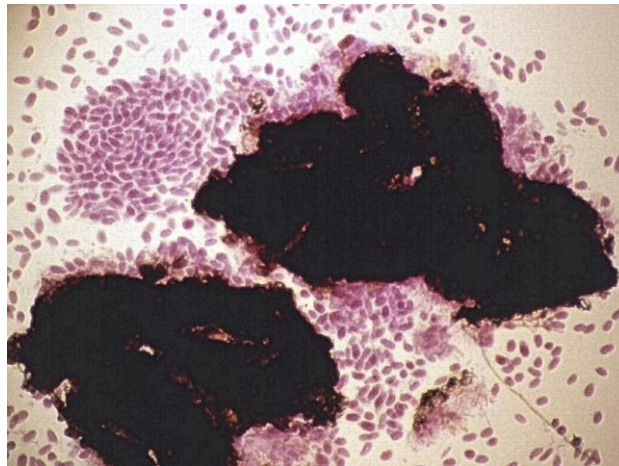
Cabe comentar que en el análisis de varianza tanto para la variable anchura del conidio de la especie *D. corticola* como la longitud para el caso de *F. aesculii* y como consecuencia de esto, para sus respectivas relaciones Longitud/Anchura del conidio, se aplicó un análisis de varianza paramétrico, aunque no cumpliesen el criterio de homocedasticidad (como se observa en la Tabla A1 de Anejo, el test de Bartlett presentaba $P < 0.05$), por ser este más concluyente que el análisis no paramétrico.

En el caso de *D. corticola*, este criterio no se cumplía debido a que el aislado DCA1, que tenía los valores más bajos de anchura de conidio, presentó una desviación estándar inferior que el resto de aislados de la misma especie. Para *F. aesculi* el aislado responsable del no cumplimiento de este criterio fue FAE3 que presentó una desviación estándar para la longitud de los conidios inferior a la del resto de aislados de la misma especie (Tabla 4).

FiguraXX. Estructuras asexuales de *Diplodia corticola*. (Tipo morfológico A).



Picnidio redondeado con poro

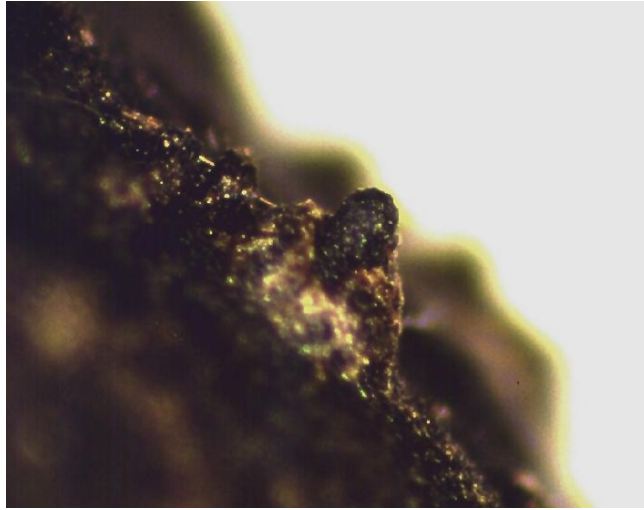


Fragmentos de picnidios y abundante presencia de conidios hialinos

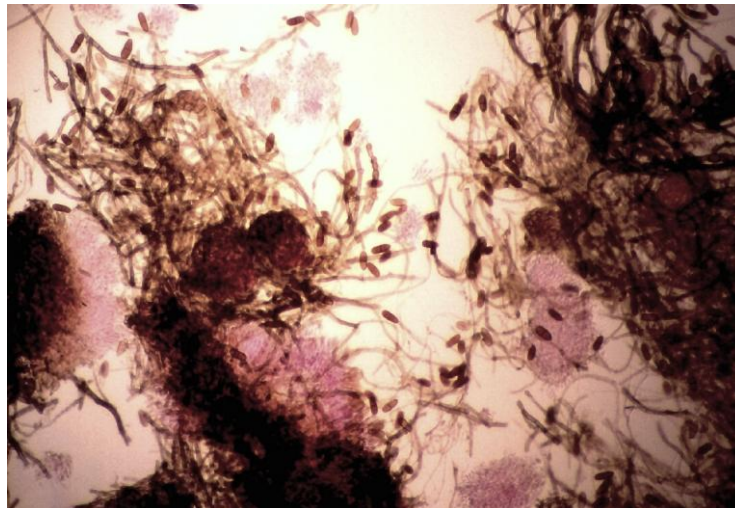


Tres tipos de conidios: cilíndricos y subglobosos hialinos y, pigmentados con una septa.

FiguraXX. Estructuras asexuales de *Dothiorella iberica*. (Tipo morfológico B).



Picnidio de *D. iberica* en rama.

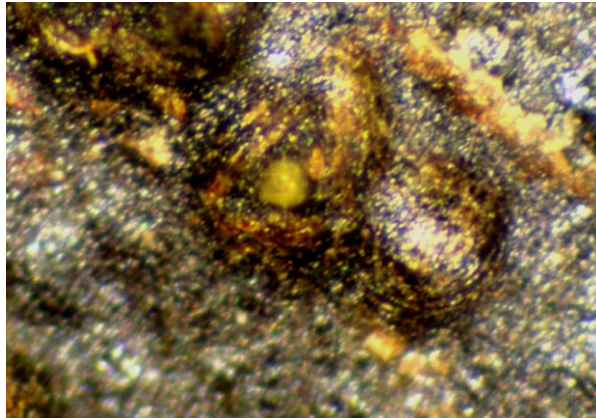


Fragmentos de picnidios y conidios de color oscuro

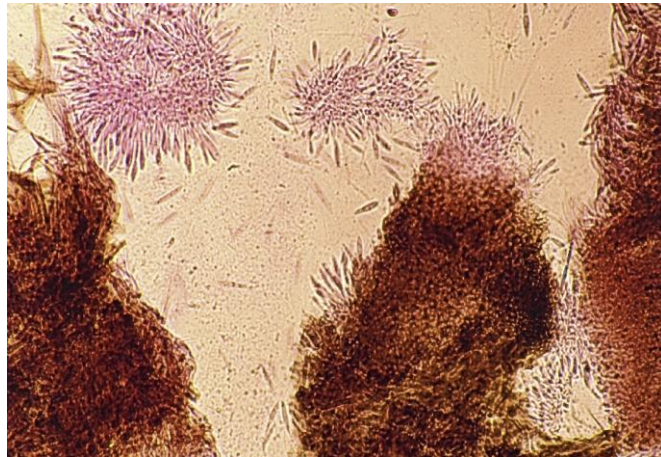


Detalle de conidio oscuro, septado, cilíndrico, ápice redondeado y base truncada.

FiguraXX. Estructuras asexuales de *Fusicoccum aesculi*. (Tipo morfológico C).



Picnidio con masa mucialaginoso de color claro formada por conidios.



Fragmentos de picnidios y conidios hialinos.



Conidios fusiformes, hialinos y aceptados.

Tabla 4. Dimensiones de los conidios de los aislados de los tipos morfológicos DC, DO, Y FA.

Morfología de la colonia	Aislado	Longitud (L)	Anchura (A)	Razón L/A
A	DCE1	27,1 ± 2,6 ^a	13,6 ± 1,5	2,0 ± 0,3
	DCA1	28,3 ± 2,5	12,4 ± 0,8	2,3 ± 0,2
	DCE1	27,2 ± 2,2	14,4 ± 1,5	1,9 ± 0,2
	DCE6	28,9 ± 2,3	13,6 ± 1,2	2,1 ± 0,2
	DCE9	26,5 ± 2,1	14,4 ± 1,6	1,9 ± 0,2
	DCE11	27,5 ± 2,5	12,9 ± 1,5	2,1 ± 0,3
		LSD^b_{0,05}	0,939	0,544
B	DOE3	24,3 ± 1,7	9,4 ± 1,1	2,6 ± 0,3
	DOE12	25,1 ± 1,6	9,8 ± 0,8	2,6 ± 0,3
	DOE14	25,3 ± 1,9	9,7 ± 1,1	2,6 ± 0,4
	DOE25	23,5 ± 1,8	9,1 ± 1,1	2,6 ± 0,4
	DOE26	23,8 ± 1,5	8,8 ± 0,9	2,7 ± 0,3
	DOE27	21,5 ± 1,5	9,2 ± 1,1	2,4 ± 0,4
		LSD^b_{0,05}	0,667	0,407
C	FAE1	23,5 ± 2,4	4,8 ± 0,7	4,9 ± 0,7
	FAE2	25,7 ± 2,5	4,8 ± 0,7	5,5 ± 0,7
	FAE3	23,4 ± 1,7	4,1 ± 0,5	5,8 ± 0,7
	FAE4	22,9 ± 2,5	4,4 ± 0,7	5,3 ± 0,9
	FAE5	23,4 ± 1,9	4,3 ± 0,8	5,6 ± 1,3
	FAE7	17,5 ± 2,8	4,8 ± 0,8	3,8 ± 1,1
		LSD^b_{0,05}	0,912	0,286

^a Todos los valores vienen expresados en µm. Cada valor es la media de 50 observaciones ± la desviación estándar.

^b Mínima diferencia significativa (LSD) al nivel de probabilidad P = 0,05 (Steel y Torrie, 1985).

En los cultivos puros y en los tejidos corticales infectados, así como en los palillos higiénicos infestados artificialmente, también se produjeron espermacias hialinas, de 2 μm de longitud y alrededor de 1 μm de anchura. Las espermacias aparecían entremezcladas con los conidios o bien se producían en lóculos (espermogonios) independientes (Figura X), de aspecto similar a los picnidios, aunque de menor tamaño.

2.2. Caracterización de las estructuras sexuales

Los aislados no formaron estructuras sexuales en las placas de cultivo. Del mismo modo, en las ramas y palillos inoculados artificialmente y en las ramas y trozos de corteza afectadas de chancro que se obtuvieron en las distintas parcelas de muestreo, sólo se obtuvieron estructuras de reproducción asexual y espermogonios. En general, se observó una mayor presencia de picnidios, conidios, espermogonios y espermacias en aquellas plantas que se encontraban muertas cuando se inocularon. Sólo en el caso de las muestras de corteza del tronco afectadas que se tomaron de alcornoques descorchados en 1998 en la Sierra de Ojén (Cádiz), y en una planta de encina y otra de alcornoque que estaban vivas cuando se inocularon con la mezcla de aislados DCE, se localizaron estructuras reproductivas de carácter sexual.

En la muestra de corteza de tronco, los ascocarpos se localizaron en el tejido cortical necrosado, en unas cavidades (lóculos) de aproximadamente 4 mm de diámetro e inmersas en el tejido del huésped. A partir de los montajes realizados con el material de estas lesiones, se pudieron observar las estructuras sexuales del hongo. La morfología de los cuerpos en los que se desarrollaban las ascas y ascosporas no pudo determinarse con exactitud, ya que debido al tamaño de los cuerpos, los montajes tuvieron que aplastarse mucho para poder ser observados al microscopio. No obstante, se observaron estructuras aproximadamente esféricas, formadas por gruesas capas de células redondeadas y muy pigmentadas, presentando más de un lóculo (Figura X).

Las ascas se caracterizaron por ser bitunicadas, hialinas, cilíndricas, claviformes, lisas y alargadas, más anchas por el extremo en el que está presente el poro (Figuras X). El tamaño medio de un total de 15 ascas medidas, fue de $112,03 \pm 9,5 \mu\text{m}$ de longitud y $25,25 \pm 1,8 \mu\text{m}$ de anchura.

Las ascosporas se generaron en el interior de las ascas, siendo en total ocho ascosporas por asca. La mayoría de las ascosporas eran hialinas, lisas y unicelulares, pero algunas presentaron dos septas y color marrón (Figuras X). Ambos tipos de ascosporas estaban presentes en la misma asca. De las 30 ascosporas que se eligieron

para medir su longitud y anchura, el 50% fueron ascosporas con dos septas y de color marrón. El tamaño medio de las ascosporas fue de $28,6 \pm 2,1$ μm de longitud y $13,3 \pm 1,7$ μm de anchura y con una relación Longitud/Anchura de $2,2 \pm 0,3$ μm .

Las características de las estructuras sexuales, principalmente el tamaño y forma de las ascosporas, han permitido identificar al único teleomorfo obtenido como *Botryosphaeria corticola* (Schw.) Sacc. (Alves *et al.* 2004; Romero *et al.*, 2009 a; 2009 b).

Las colonias obtenidas de los cultivos monoascospóricos (26 en total) de *B. corticola* presentaban idéntica morfología que las colonias de *D. corticola* que se obtuvieron consistentemente asociados a las ramillas tomadas en las parcelas de ensayo. Igualmente, las características de los picnidios y conidias no difirieron de las ya descritas para esta especie.

En cuanto a las plantas que se inocularon con la mezcla de cada especie de *Botryosphaeria*, transcurrido 1 año desde la inoculación artificial, únicamente se pudieron observar en dos plantas ascocarpos en los que se pudieron distinguir algunas ascas con ocho ascosporas similares a las descritas para *B. corticola*. Estas plantas correspondían a una encina y a un alcornoque inoculados con la mezcla de aislados DCE, que estaban vivas cuando se inocularon y que, después de confirmarse la infección, se cortaron y se mantuvieron en vertical en el umbráculo. En el resto de las plantas sólo se pudieron observar picnidios-conidios y espermogonios-espermacias.

Para las dos especies restantes, *B. iberica* y *B. dothidea* la correspondencia anamorfo-teleomorfo no se pudo llevar a cabo ante la imposibilidad de obtener los estados sexuales de los mismos.

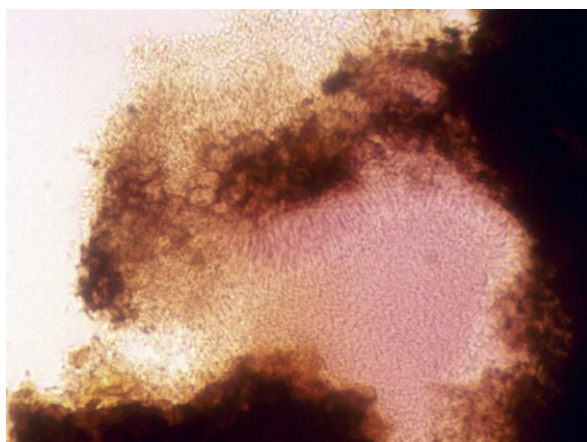


Figura XZ. Espermogonio y espermacias de *B. corticola*

Figura. Plantas cortadas del ensayo de inoculación de plántones con mezcla de aislados.



Planta de alcornoque viva inoculada con la mezcla de aislados DC. Pueden verse los tres puntos de inoculación.

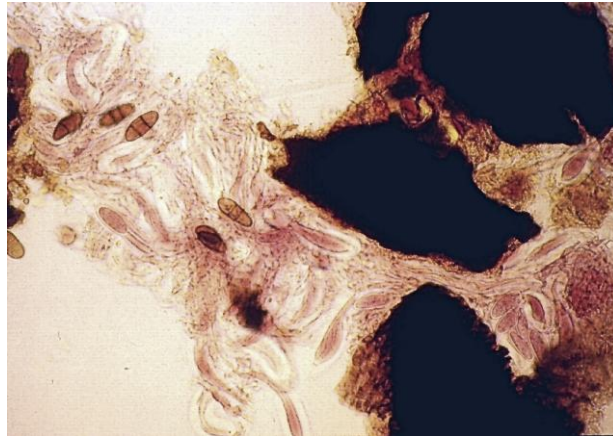


Planta de alcornoque viva inoculada con la mezcla de aislados DC. Formación de chancro en el punto de inoculación.



Planta de alcornoque muerta inoculada con la mezcla de aislados DC.

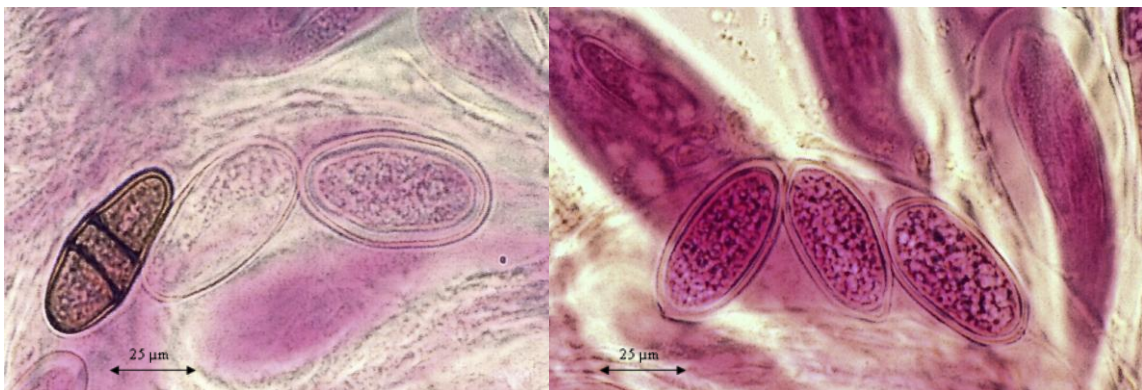
Figura ZX. Estructuras sexuales de *Botryosphaeria corticola*.



Pseudoteca fragmentada, ascas inmaduras y maduras. Ascosporas hialinas y pigmentadas



Ascas maduras bitunicadas, clavadas y con ocho ascosporas en su interior



Asca inmadura a la derecha. Ascas conteniendo ascosporas hialinas y aseptadas y , ascosporas pigmentadas con dos septas

3. Tasa de crecimiento a distintas temperaturas

A la temperatura superior ensayada, 35°C, los aislados de *B. corticola* y de *B. dothidea* crecían con dificultad, mientras que para los aislados de *B. iberica* el crecimiento fue nulo. A la temperatura de 5°C los aislados de *B. dothidea* apenas crecieron durante los primeros días de incubación, iniciándose el crecimiento de las colonias una vez transcurridos aproximadamente 4 días tras la siembra, mientras que para las otras dos especies, el crecimiento a esta temperatura se iniciaba desde el primer día de incubación

Para la determinación de las curvas de crecimiento de cada especie fúngica, se eligió el valor medio de las tasas de crecimiento máximo. Esta tasa, representativa del crecimiento, se calculó a partir de las tasas de crecimiento medidas a los 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 días para cada temperatura en la que se registró crecimiento de los aislados.

Las tasas de crecimiento de los aislados de las distintas especies a las diferentes temperaturas ensayadas se muestran en la Tabla 6, mientras que sus correspondientes análisis de varianza se recogen en la Tabla A2 del Anejo. El análisis global de la varianza mostró diferencias significativas en función del aislado, la temperatura de incubación y de la interacción entre ambas variables. Por ello, se realizaron análisis separados para cada temperatura. El análisis de la varianza para cada temperatura de crecimiento mostró diferencias significativas en la tasa de crecimiento medio de los aislados para todas las temperaturas excepto para la temperatura de 5°C (Tabla A2 del Anejo), resultando las temperaturas de 25°C y 30°C las que distribuían de forma más homogénea a los aislados por especies, según la comparación de medias del test de la mínima diferencia significativa (LSD) protegido de Fisher (Steel y Torrie, 1985).

Debido a la pequeña variabilidad mostrada entre los distintos aislados de la misma especie, los datos se ajustaron a una única curva representativa del crecimiento de todos los aislados ensayados, para cada una de las especies.

Después de evaluar varios modelos para el ajuste de los datos, incluido el modelo Beta de Analytis (Campbell y Madden, 1990), la ecuación elegida para las tres especies fúngicas fue un polinomio de tercer grado forzado en el origen, por ser en la totalidad de los casos la que mejor se ajustaba a los valores observados:

$$y = a \cdot T + b \cdot T^2 + c \cdot T^3$$

Donde **y** representa la tasa del crecimiento, **T** es la temperatura de crecimiento y **a**, **b** y **c** son los coeficientes de la regresión. La misma ecuación sin forzar en el origen también ofrecía un buen ajuste de los datos.

A partir de estos polinomios se construyeron las curvas de crecimiento para las distintas especies entre 5 y 35° C que se presentan en la Figura 15. Los ajustes de las curvas, parámetros y ecuaciones aparecen en la Tabla A3 del Anejo.

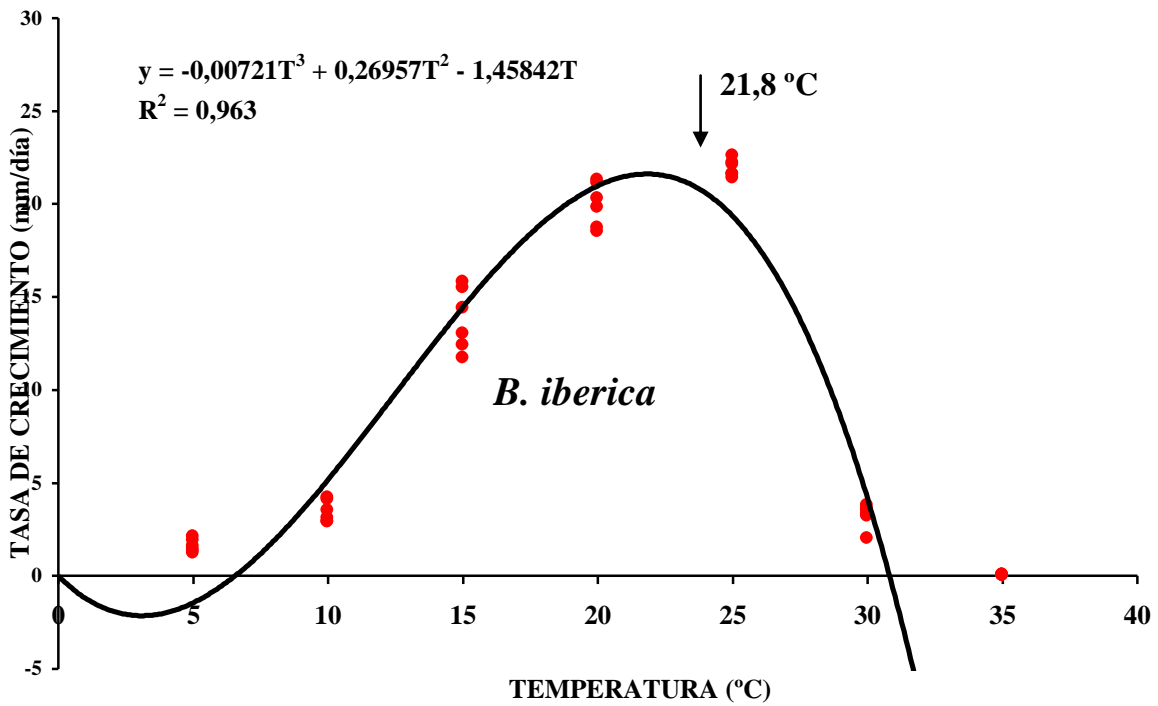
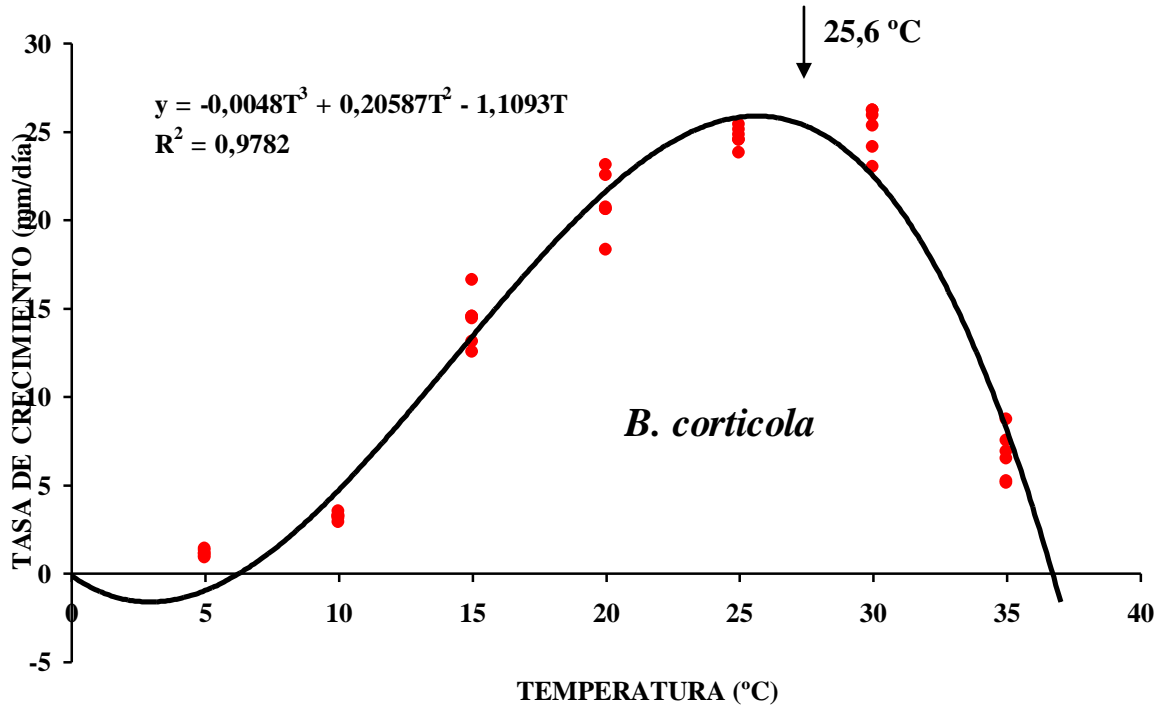
Tabla 6. Tasas de crecimiento (mm/día) de aislados de *B. corticola*, *B. iberica* y *B. dothidea* en PDAA a diferentes temperaturas.

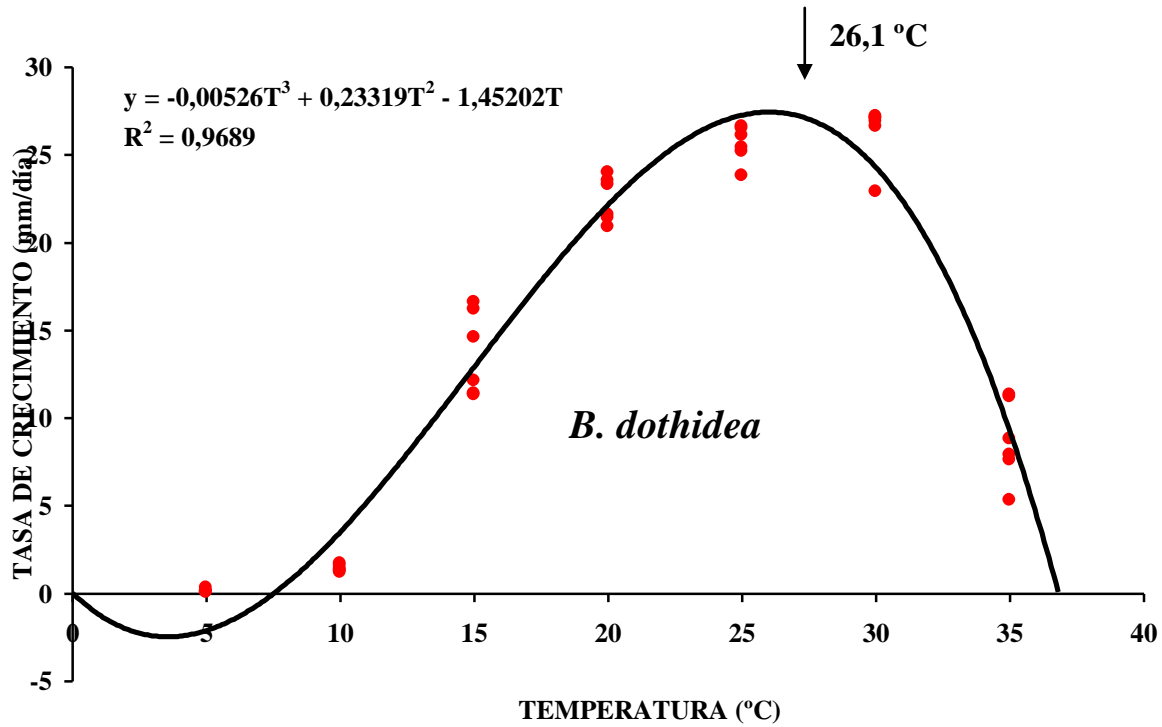
AISLADO	TEMPERATURA (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
DCE1	0,96	3,20	14,43	20,62	24,55	23,01	8,71
DCA1	1,11	3,19	12,49	18,28	23,80	24,11	6,91
DCE3	1,12	3,11	14,51	20,63	24,49	25,33	7,46
DCE6	1,35	3,35	13,10	20,68	25,34	26,21	5,15
DCE9	0,87	2,95	14,50	22,42	24,78	26,17	5,19
DCE11	1,42	3,51	16,57	23,16	25,06	25,87	6,55
DOE3	1,44	3,47	14,36	19,81	21,57	3,65	0
DOE12	1,60	2,89	13,10	20,29	22,23	3,82	0
DOE14	1,31	2,89	12,42	18,74	21,41	3,26	0,06
DOE25	2,15	4,11	15,80	21,33	22,05	3,26	0,04
DOE26	1,96	4,14	15,54	21,10	22,57	3,50	0,04
DOE27	1,24	3,03	11,74	18,54	21,62	1,99	0
FAE1	0,06	1,39	16,21	23,56	26,49	27,18	8,89
FAE2	0,08	1,61	12,04	20,90	25,20	26,58	7,57
FAE3	0,11	1,31	14,64	23,36	26,05	27,15	11,23
FAE4	0,13	1,26	16,59	24,00	26,65	27,25	11,26
FAE5	0,09	1,68	11,40	21,61	25,42	26,93	7,92
FAE7	0,34	1,32	11,32	21,40	23,78	22,87	5,27
LSD^a_{0,05}	1,51	1,79	3,20	2,26	1,93	3,18	6,15

^a Para cada temperatura, los valores de tasa de crecimiento cuya diferencia no exceda del valor marcado por el test de la mínima diferencia significativa (LSD) protegido de Fisher (Steel y Torrie, 1985) son estadísticamente iguales para P = 0,05.

Figura 15. Curvas de crecimiento de *B. corticola*, *B. iberica* y *B. dothidea*.

La flecha indica la temperatura óptima de crecimiento estimada.





Una vez conocidos los coeficientes de regresión, se estimó la temperatura óptima de crecimiento para cada una de las especies mediante la derivación de los polinomios y el cálculo de los máximos. Estas temperaturas óptimas de crecimiento (Tabla 7) fueron de 21,8°C para *B. iberica*, 25,6°C para *B. corticola* y 26,1°C para *B. dothidea*.

Por otra parte, una vez conocida la expresión del polinomio, se pudo estimar la temperatura mínima de crecimiento para cada especie, que no se ajustó a las observaciones experimentales, estimándose temperaturas mínimas superiores a 5°C para las tres especies, mientras que en la práctica se observó que en todos los casos a la temperatura de 5°C existía crecimiento. La temperatura máxima de crecimiento estimada para la especie *B. iberica* fue de 30,8°C. En el caso de *B. corticola* y *B. dothidea*, las temperaturas máximas estimadas excedieron del intervalo de temperaturas ensayado.

Tabla 7. Temperatura óptima estimada y tasa de crecimiento máxima para las especies *B. corticola*, *B. iberica* y *B. dothidea*.

Especie	T^a óptima (° C)	Tasa de crecimiento máxima (mm/día)
<i>B. corticola</i>	25,6	26,0
<i>B. iberica</i>	21,8	21,6
<i>B. dothidea</i>	26,1	27,4

^aLa temperatura óptima fue estimada a partir de la derivación de las ecuaciones polinómicas de regresión calculadas para cada especie y la tasa de crecimiento máxima sustituyendo estas temperaturas óptimas en las ecuaciones correspondientes.

DISCUSIÓN

El género *Botryosphaeria*, entre las enfermedades que producen, destacan, por encima de todas, los chancros y la muerte regresiva de ramas en especies forestales, y en menor medida, en frutales, matorrales leñosos y especies herbáceas (von Arx, 1987)

En la identificación de los teleomorfos, anamorfos y el establecimiento de correspondencia entre la forma sexual y asexual, existen numerosas dificultades en las especies del género *Botryosphaeria*. Esto se debe a que la taxonomía de estas especies es muy dependiente de la taxonomía de sus anamorfos y ésta es muy confusa. Algunas de las características utilizadas para su identificación, tales como el color de los conidios, la presencia de septas, o la morfología del estroma presentan gran plasticidad (Jacobs y Rehener, 1998; Denman *et al.*, 2000). Sin embargo, el empleo de técnicas de secuenciación y análisis de ADN facilita la correcta identificación de especies, tanto nuevas, como especies ya identificadas en las que sólo se había utilizado la morfología (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008).

Las características morfológicas de las tres especies aisladas, así como su posterior confirmación por técnicas de ADN (Sánchez *et al.*, 2003), nos han permitido identificarlas como se indica a continuación, ordenadas por su frecuencia de aislamiento.

La especie más frecuentemente aislada se identificó como *Diplodia corticola*, estado anamórfico de *Botryosphaeria corticola*. Las descripciones de Alves *et al.* (2004) del estado anamórfico de *B. corticola* se corresponde bastante bien con las características de la especie fúngica observada en cuanto a la morfología de los conidios hialinos aseptados, y a la relación Longitud/Anchura de los mismos. De hecho, algunos aislados obtenidos en este trabajo fueron utilizados por Alves *et al.* (2004) para la descripción de la especie.

El estado sexual del hongo fue identificado en muestras de tronco afectadas que se tomaron de alcornos descorchados 2 años antes de la toma de muestra. También se pudieron observar espermacias y estructuras sexuales en las ramas cortadas y secas que permanecieron un año en el umbráculo. Esto pone de manifiesto la dificultad de encontrar el estado sexual en el género *Botryosphaeria* de algunas especies en el medio natural (Crous *et al.* 2006) .

En ningún caso se produjo la formación de ascocarpos en medio de cultivo artificial, hecho ya descrito por Slippers *et al.* (2007) en este género. Del mismo modo,

en las ramas y trozos de corteza afectadas de chancro de las parcelas de muestreo sólo se obtuvieron estructuras de reproducción asexual.

La segunda especie consistentemente asociada al tejido cortical de ramas afectadas se identificó como *Dothiorella iberica*, estado anamórfico del dotideomiceto *Botryosphaeria iberica*. El estado sexual del hongo no se obtuvo ni en placas de cultivo ni en material natural o artificialmente infectado.

Las dimensiones de los conidios de *B. iberica* obtenidas en este trabajo ($23,9 \pm 2,1 \times 9,4 \pm 1,1 \mu\text{m}$, relación longitud/anchura $2,6 \pm 0,3$) difieren ligeramente de las que Phillips *et al.* (2005) ($(17,2)23-23,4(28,6) \times (8,1)10,8-11,0(16,0) \mu\text{m}$, relación longitud/anchura 2,2) y Urbez-Torres *et al.* (2007) ($(20,1-) 22,5-23,5 (-27,1) \times (8,1) 9,3-9,8 (-11,2) \mu\text{m}$, relación longitud/anchura 2,4) dieron para esta especie. Sin embargo, el mismo autor (Allan Phillips) fue quien confirmó la identificación de la especie mediante secuenciación del ADN de los aislados obtenidos en este trabajo. Tanto el sustrato o medio de cultivo (Morgan-Jones y White, 1987), como el origen de los aislados, pudieron ser motivos de las diferencias existentes entre los estudios.

Para la especie menos frecuentemente aislada, sus características morfológicas nos han permitido identificarla como *Fusicoccum aesculi*, cuyo teleomorfo es *Botryosphaeria dothidea*. Al igual que en la especie anterior, el estado sexual del hongo no se obtuvo ni en placas de cultivo ni en material natural o artificialmente infectado.

La caracterización de los conidios de las tres especies mostró la existencia de diferencias significativas en los parámetros observados: longitud, anchura y razón longitud / anchura. A pesar de estas diferencias, no se pudieron establecer grupos homogéneos dentro de cada especie, según las dimensiones de los conidios de los aislados.

El crecimiento de las tres especies asociadas al chancro de *Quercus* spp. se ajustó a un mismo modelo, obteniéndose curvas similares para todas ellas. Las temperaturas óptimas de crecimiento fueron: $25,6^{\circ}\text{C}$ para *D. corticola*, $21,8^{\circ}\text{C}$ para *D. iberica* y $26,1^{\circ}\text{C}$ para *F. aesculi*.

La temperatura óptima de *F. aesculi* fue similar a la observada por Brooks y Ferrin (1994) en aislados procedentes de especies arbustivas (27°C). El hongo creció con tasas bastantes elevadas en todo el intervalo de temperatura ensayado ($5-35^{\circ}\text{C}$), aunque a la temperatura de 5°C estos aislados apenas crecieron durante los primeros días de incubación, iniciándose el crecimiento aproximadamente 4 días tras la siembra.

Jacobs y Rehner (1998) y Moral *et al.* (2010) encontraron aislados de *F. aesculi* de huéspedes distintos, que no crecían a 35°C y mostraban tasas de crecimiento muy bajas a 10°C. También Brooks y Ferrin (1994) trabajaron con aislados de *Fusicoccum* sp. procedentes de más de 50 especies de arbustos de California y tampoco encontraron crecimiento a 35°C.

La tasa de crecimiento máximo para *F. aesculi*, que fue de 27,4 mm/día, coincide con la tasa de crecimiento máxima de esta misma especie en olivo obtenida por Moral *et al.* (2010).

Para la especie *D. iberica*, hay un estudio realizado por Úrbez-Torres *et al.* (2007) en el que se indica su temperatura óptima de crecimiento entre 20-25°C, intervalo que incluye la temperatura óptima de crecimiento indicada en este trabajo para dicha especie.

El análisis de varianza individualizado para cada temperatura de crecimiento mostró diferencias significativas en las tasa de crecimiento medio para todas las temperaturas, excepto para 5°C, resultando las temperaturas de 25°C y 30°C las que distribuían de forma más homogénea a los aislados por especies, con lo que serían las más idóneas para poder diferenciar entre los anamorfos de estas especies (Jacobs y Rehner, 1998).

***CAPÍTULO 5. GAMA DE HUÉSPEDES
DE BOTRYOSPHERIA SPP.***

INTRODUCCIÓN

De entre las enfermedades que causa el género *Botryosphaeria*, destacan por encima de todas los chancros y la muerte regresiva de ramas en especies forestales, y en menor medida, en frutales, matorrales leñosos y especies herbáceas (Alves *et al.*, 2004; Crous *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2007). En este sentido, se han señalado diversas especies del género como factores implicados en los procesos de decaimiento de especies forestales (von Arx, 1987; Luque y Álvarez, 1997; Ragazzi *et al.*, 1989; 1997; Sánchez *et al.*, 2010), bien actuando como factores incitantes o como factores contribuyentes, según la terminología de Sinclair (Manion, 1991).

Los hongos productores de chancros son parásitos del tallo y suelen acceder a los tejidos vivos del huésped a través de heridas, aberturas naturales de la corteza o picaduras de insectos. La invasión por parte del hongo de los tejidos del huésped generalmente desencadena en este último una respuesta defensiva de tipo morfológico, estimulando la formación de un callo (proliferación de células indiferenciadas a partir del cambium) alrededor de la zona invadida por el hongo. La aparición de este tejido proporciona la apariencia característica a los chancros y además actúa como una barrera física que impide la extensión del hongo a las partes sanas del huésped. La producción de callo por parte del hospedante puede dar lugar a la cicatrización del chancro pero produce un ensanchamiento excesivo alrededor de la zona necrosada, síntoma característico de estas enfermedades. Este tipo de respuesta por parte del huésped es de tipo morfológico, pero existe otro tipo de respuesta química, donde las células próximas al punto de infección producen sustancias antifúngicas, tóxicas para el agente patógeno, como fitoalexinas, cuya misión es impedir la proliferación de éste. Estas sustancias son segregadas como consecuencia de mecanismos inducidos en la planta por la acción del patógeno (Manion 1991; Tuset, 1996).

La morfología y severidad de los chancros que ocasionan las especies pertenecientes al género *Botryosphaeria* dependen del huésped, del diámetro de la rama atacada y de la predisposición de la planta. Las lesiones causadas varían desde manchas superficiales y diminutas en las ramas hasta chancros hundidos y rodeados por gruesas capas de callo. La severidad de estos chancros depende del número de lesiones, de la proximidad entre éstas y del vigor de la planta antes de la infección (Sinclair *et al.*, 1987).

De entre las numerosas especies leñosas de interés forestal en las que se han descrito especies de *Botryosphaeria* causantes de chancros, destacan las pertenecientes al género *Quercus* (Luque y Girbal, 1989; Ragazzi *et al.*, 1989; 1997; 1999a; 1999b; 1999c; 2000; Morehart, 1994; Luque y Álvarez, 1997; Luque *et al.*, 1999; 2000; Sánchez *et al.*, 2003; Turco *et al.*, 2006).

La especie *B. corticola* es considerada como uno de los factores contribuyentes del decaimiento de *Quercus* en España, Italia, Marruecos y Portugal. Se encuentra asociada a la formación de chancros en ramas de *Quercus* en Europa y en troncos de alcornoque en diferentes zonas de España (Andalucía y Cataluña) (Luque *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2007a; Carrasco *et al.*, 2009; Tsopelas *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2010).

Las masas de *Quercus*, más concretamente encinares y alcornocales, son los bosques más representativos de la Península Ibérica seca. Cuando se encuentran bien conservados constituyen uno de los ecosistemas naturales más complejos y maduros del territorio (Blanco *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2006). En estado natural, es muy probable que estos ecosistemas forestales presentaran una alta diversidad en el estrato arbóreo, siendo abundantes las formaciones mixtas de varios *Quercus*, con especies acompañantes como el madroño, el durillo y el labiérnago y, en las zonas más cálidas, el mirto, la coscoja, el acebuche, el lentisco e incluso, el algarrobo (Blanco *et al.*, 1998). Sin embargo, estas masas de encinas y alcornoques se destacan por la influencia y transformación que el hombre ha ejercido continuamente en dichas masas. Es muy difícil de encontrar encinares o alcornocales vírgenes ni tan siquiera seminaturales, a excepción de algunos bosquetes de pequeña extensión asociadas a las zonas más altas o escarpadas, de muy difícil acceso, o bien a las más pobres (Blanco *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2006).

Conocidos los agentes fúngicos asociados a la Seca que causan los chancros de ramas en encinas y alcornoques y el de tronco de alcornoque (Sánchez *et al.*, 2010), y debido a que los encinares y alcornocales albergan una gran cantidad de especies vegetales (Blanco *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2006), se hace necesario saber tanto si las encinas y alcornoques como si las especies acompañantes pueden ser huéspedes alternativos a las *Botryosphaeria* spp. descritas en ambos tipos de huéspedes.

MATERIALES Y MÉTODOS

En estos ensayos se inocularon diferentes especies de plantas (encinas, alcornoques, coscojas y dos variedades de olivo) con cuatro especies distintas de *Botryosphaeria* (*B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *N. mediterraneum*). El método de inoculación empleado fue el de micelio en crecimiento activo con herida, empleado por Sánchez *et al.* (2003) en inoculaciones con *B. corticola*, *B. iberica* y *B. dothidea* en ramas de encina en campo.

1. Elección de aislados

Los aislados que se seleccionaron para este ensayo de inoculación cruzada en diferentes especies de *Quercus* y variedades de olivos se basó en la patogenicidad demostrada de dichos aislados en trabajos previos (Sánchez *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2005). Los aislados seleccionados fueron los siguientes:

Espece fúngica	Referencia del aislado	Planta*	Procedencia
<i>B. corticola</i>	DCE-6	Encina	Huelva
	DCA-5	Alcornoque	Cádiz
<i>B. iberica</i>	DOE-25	Encina	Huelva
	DOA-2	Alcornoque	Sevilla
<i>B. dothidea</i>	FAE-2	Encina	Córdoba
	FAA-1	Alcornoque	Sevilla
	FJ-20	Jara	Córdoba
<i>N. mediterraneum</i>	FO-1	Olivo 'Gordal'	Sevilla

* Planta de la que se obtuvo el aislado.

Estos aislados proceden de la colección de hongos perteneciente al grupo de Patología Agroforestal del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. Estos aislados se encontraban guardados en frío a 4°C en tubos herméticamente cerrados con medio de crecimiento PDA y rellenos de aceite de parafina.

2. Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se partió de una placa de PDAA en la que se encontraba el aislado en cultivo puro obtenida a partir de los tubos guardados en frío. De dicha placa se extrajo un disco de agar y se sembró en una nueva placa de PDAA. Esta se selló y se incubó a 25° C durante 4 días, tiempo necesario para que el micelio cubriera prácticamente la totalidad de la placa, pero no suficiente para que se iniciara la producción de conidios. Así se aseguró que la inoculación posterior se realizaría únicamente con el micelio vegetativo del hongo.

3. Material vegetal

Las inoculaciones se realizaron en tres especies del género *Quercus*:

- *Q. ilex* procedente de Aznalcollar (Sevilla).
- *Q. suber* procedente de Los Alcornocales (Cádiz).
- *Q. coccifera* procedente de Hinojos (Huelva).

Y dos variedades de olivo: Gordal y Picual. Todas ellas con 5 años de edad y una altura comprendida entre 1,5 y 2,2 m.

Las tres especies de *Quercus* fueron suministradas por el vivero San Jerónimo (Sevilla) de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía. Las plantas fueron obtenidas de bellotas de las procedencias anteriormente indicadas. Se encontraban cultivados en bolsas de plástico negro de 4l de capacidad, con un 90% de turba y 10% de vermiculita, sin haberse añadido ningún tipo de abono.

Todas las plantas de olivo procedían del Vivero La Conchuela y se encontraban plantados en macetas. Los olivos gordales estaban injertados sobre acebuches.

Del conjunto de plantas, se desecharon aquellas que presentaban grietas u otras lesiones en la corteza del tallo, asegurándonos que todas las plantas seleccionadas estaban libres de enfermedad antes de proceder a su inoculación. Para cada aislado, las plantas se seleccionaron al azar, de esta forma se aseguraba que se inoculaban todos los aislados en plantas de todos los tamaños.

4. Inoculación

El método de inoculación elegido fue con herida en el tallo de la planta mediante discos de agar con micelio del hongo en crecimiento activo (Sánchez *et al.*, 2002; 2003).

Se procedió de la siguiente manera: se desinfectó superficialmente el punto de inoculación, situado hacia la mitad de la longitud del tallo, utilizando para ello un algodón impregnado con alcohol. Una vez seca la zona de inoculación, se realizó en ésta una herida con un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, tras lo cual, con la ayuda de unas pinzas estériles, se retiró la corteza externa. De las placas de PDAA preparadas a tal efecto, se extrajeron discos de agar de 6 mm de diámetro conteniendo el micelio del hongo en crecimiento activo y se colocaron sobre el punto de inoculación, de forma que el micelio entrara en contacto con la herida producida. Seguidamente, y con cuidado de que el disco no se moviera, se procedió al sellado con Parafilm del punto de inoculación, para asegurar que el disco de agar estuviera en contacto con la herida, evitar su desecación antes de que se estableciera de infección, e impedir la posible entrada de otros hongos en la zona de inoculación.

Las plantas control se trataron de la misma manera, excepto por la ausencia de inóculo en el disco de agar.

Se inocularon por aislado seis plántones de alcornoque, olivo gordal y olivo picual, cinco plántones de encina y cuatro de coscoja. Las 27 plantas inoculadas por cada aislado de *Botryosphaeria* (DCE-6, DCA-5, DOE-25, DOA-2, FAE-2, FAA-1, FO-1, FJ-20) junto a las 27 plantas testigo se mantuvieron en el umbráculo de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes (ETSIAM), con dos riegos semanales durante el periodo que duró el ensayo. El ensayo se dio por terminado cuando las plantas inoculadas mostraron los síntomas de la enfermedad: desarrollo de chancros y/o marchitez foliar.

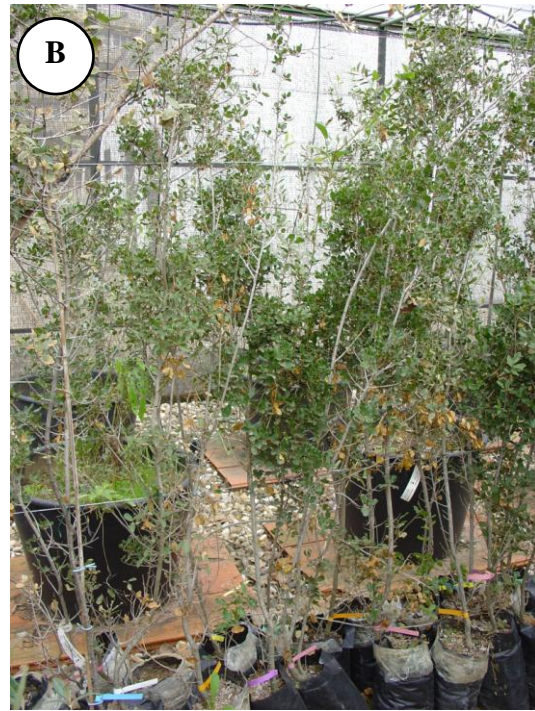


Figura . Plantas de (A) encina, (B) cocoja, (C) olivo 'Picual' y (D) olivo 'Gordal' en el umbráculo de la ETSIAM.



1. Desinfección del punto de inoculación con alcohol.



2. Herida con sacabocados de 6 mm esterilizado.



3. Marca realizada por el sacabocados.



4. Eliminación de la corteza externa.



5. Situar el disco de agar con el hongo en crecimiento activo en punto de inoculación y sellado con Parafilm.



Plantas de coscoja inoculadas colocadas en el umbráculo.

Figura . Inoculación de planta de coscoja con el aislado DCA-5 (*B. corticola*).
Método de inoculación con micelio en crecimiento activo con herida.

5. Evaluación de síntomas

Una vez concluido el experimento, se procedió a realizar las siguientes observaciones para cada planta inoculada o testigo:

- Aparición de lesiones en el tallo: presencia o ausencia de zonas necróticas visibles, depresiones, agrietamientos o desecación de la corteza.
- Estado de las hojas: turgencia de los ápices y márgenes, marchitez, defoliación.

Posteriormente, las plantas se cortaron a la altura del cuello de la raíz con la ayuda de unas tijeras de podar. Se cortaron todas las ramas laterales, dejando sólo el tallo principal. Las repeticiones de cada tratamiento se ataron en un mismo haz, guardándolas en un saco de plástico negro. Estos sacos se etiquetaron y se guardaron a 4° C en oscuridad.

Los haces se fueron sacando uno a uno y se trasladaron al laboratorio, se les retiró el Parafilm que protegía el punto de infección. Después se desinfectó superficialmente la rama con un algodón impregnado en alcohol y una vez evaporado éste se eliminó la corteza externa con un escalpelo estéril.

Seguidamente se observaron y midieron los siguientes parámetros:

- Longitud inferior del chancro (Li): distancia existente entre el punto de inoculación y el borde proximal de la rama, observado una vez retirada la corteza externa
- Longitud superior del chancro (Ls): distancia existente entre el punto de inoculación y el borde distal de la rama, observado una vez retirada la corteza externa
- Anillado (A): se observó el anillamiento o no de la totalidad del diámetro del tallo
- Existencia o no de cuerpos de fructificación

6. Medida de la severidad de las infecciones

Para evaluar la severidad de las infecciones, se eligió la longitud total de la lesión cortical producida en la rama inoculada.

A los datos de longitud total de chancros se les realizó el análisis de la varianza utilizando el programa “Statistix 9” (Analytical Software, 2008). Las comparaciones de

medias se realizaron según el test LSD protegido de Fisher, al nivel de probabilidad del 5%. (Steel y Torrie, 1985).

7. Reaislamiento del hongo inoculado

Una vez evaluados los síntomas de la enfermedad en las ramas inoculadas y testigo, para poder relacionar la presencia/ausencia del hongo en el tejido cortical con la presencia/ausencia de síntomas, se procedió a la realización de aislamientos del tejido cortical afectado. Para ello, con un escalpelo estéril se cortaron cuñas de unos 3 mm³ y se transfirieron a placas de PDAA. El número de cuñas por rama inoculada que se tomó para los aislamientos dependió del tamaño del chancro producido, distinguiéndose de este modo (Figura 5):

- **Tipo A:** no presentaron lesión visible alguna.

En estos casos se tomaron por tallo inoculado, una cuña a cada lado del punto de inoculación (**1, 2**).

- **Tipo B:** en este caso los tallos inoculados presentaron lesiones corticales de longitud inferior a 5 cm.

En estos tallos se tomaron las dos cuñas cercanas al final de la lesión (**1, 2**), y dos cuñas en la zona externa próxima de dicha lesión (**3, 4**).

- **Tipo C:** presentaron lesiones de longitud comprendida entre 5 y 25 cm.

Además de las cuñas **1, 2, 3** y **4**, se procedió a tomar otras dos cuñas en posición proximal y distal entre el punto de inoculación y el final de la lesión del tallo (**5, 6**).

- **Tipo D:** presentaron lesiones superiores a 25 cm de longitud.

En estas ocasiones se procedió del mismo modo que en el caso anterior, y además se tomaron dos cuñas adicionales en la zona intermedia del chancro en posición proximal y distal (**7, 8**).

En la base de las placas se numeraron los puntos en los que se iban a colocar cada una de las cuñas para conocer exactamente su procedencia.

Las placas así obtenidas se incubaron durante 2 días a 22° C en oscuridad y posteriormente durante otros 5 días a 22° C con 12 h de luz diarias. Al cabo de este tiempo, se consignó el crecimiento de colonias fúngicas a partir de cada una de las cuñas y se identificó el hongo aislado en base a la morfología de las colonias obtenidas

y a la presencia de estructuras de reproducción asexual. En los casos dudosos, se realizaron transferencias, para confirmar la identificación.

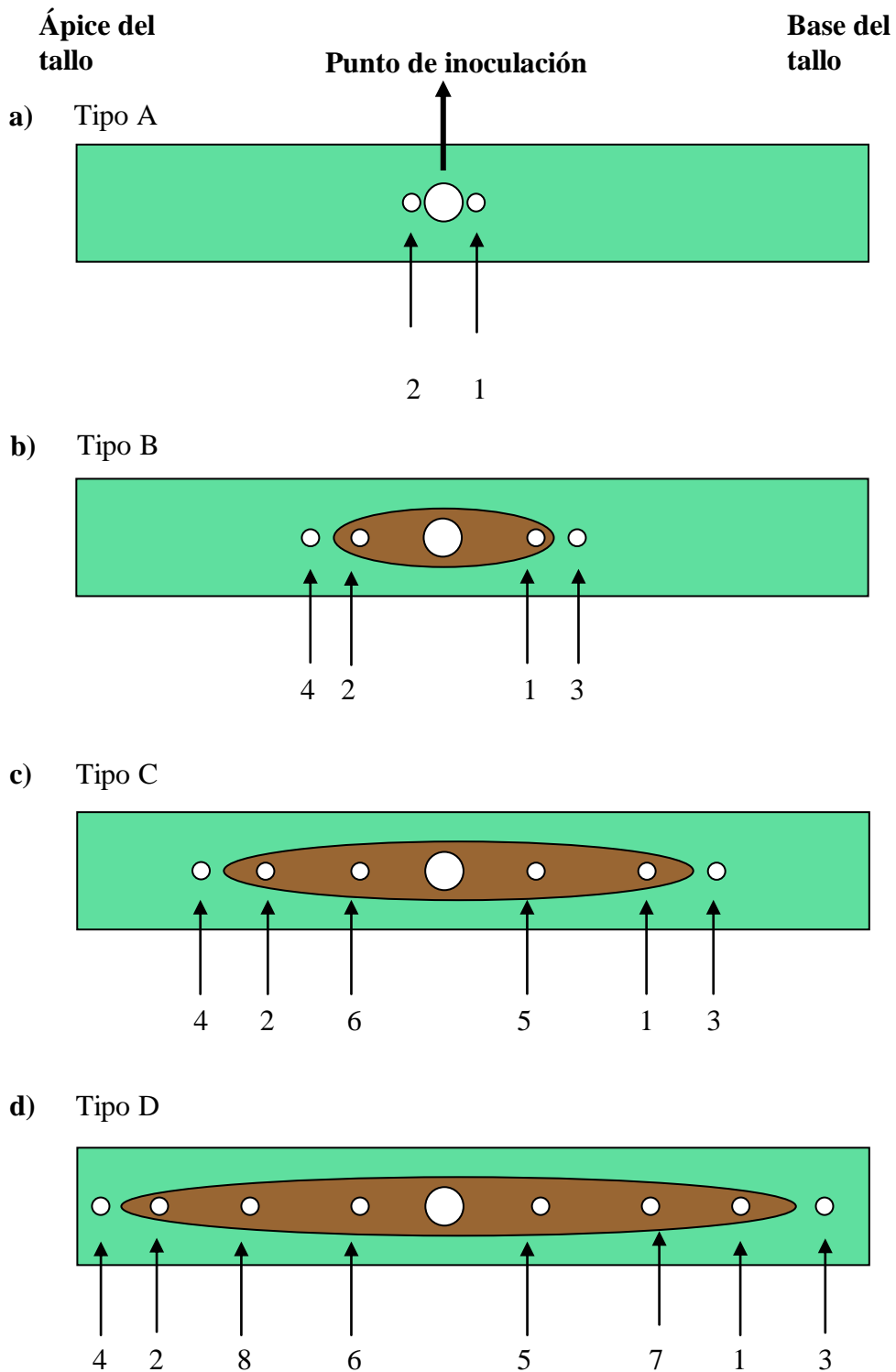


Figura. Esquema de toma de muestras para el reisolamiento de ramas inoculadas.

RESULTADOS

El ensayo se dio por concluido cuando habían transcurrido 3 meses desde la inoculación. Este tiempo fue el necesario para que al menos una de las plantas presentara la sintomatología de la enfermedad: presencia de lesiones en la corteza, anillamiento y marchitez de la planta completa.

Durante los 3 meses que estuvieron incubando las plantas se observaron algunos síntomas en algunas plantas inoculadas de encina, alcornoque y coscoja. Los síntomas que se observaron fueron exudados, falta de brotación, defoliación y presencia de hojas con márgenes atabacados. Los exudados lo presentaron tres plantas de encina, tres de alcornoque y tres de coscoja inoculadas con *B. corticola* y, cinco plantas de coscoja, dos inoculadas con *B. iberica* y tres inoculadas con *B. ribis*. Los exudados fueron todos de color marrón oscuro. Los exudados producidos por las plantas inoculadas con *B. corticola* eran abundantes y recorrían en dirección descendente parte del tallo de la planta (Fig. R4.1 y 2) y, los de las plantas inoculadas con *B. ribis* sólo se localizaban en la zona delimitada por el Parafilm que protegía el punto de inoculación (Fig. R4.3).

Tabla 4R.1. Síntomas y signos observados en plantas de *Quercus* spp. y dos variedades de olivo inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*

INÓCULO	PLANTA HUÉSPED				
	ENCINA	ALCORNOCQUE	COSCOJA	OLIVO 'GORDAL'	OLIVO 'PICUAL'
DCE-6	Exudado, defoliación, tinción de vasos. Presencia de cuerpos fructíferos	Exudado, defoliación, tinción de vasos, anillamiento y muerte. Presencia de cuerpos fructíferos	Exudado, anillamiento y muerte. Presencia de cuerpos fructíferos	Chancro, tinción de vasos. Presencia de cuerpos fructíferos	Asintomáticos
DCA-5	Defoliación. Presencia de cuerpos fructíferos	Exudado, tinción de vasos	Anillamiento y muerte. Presencia de cuerpos fructíferos	Presencia de cuerpos fructíferos	Tinción de vasos
DOE-25	Defoliación. Presencia de cuerpos fructíferos		Presencia de cuerpos fructíferos	Tinción de vasos. Presencia de cuerpos fructíferos	Engrosamiento anormal del tallo

Tabla 4R.1. (Continuación)

INÓCULO	PLANTA HUÉSPED				
	ENCINA	ALCORNOQUE	COSCOJA	OLIVO 'GORDAL'	OLIVO 'PICUAL'
DOA-2	Ausencia de brotación, tinción de vasos. Presencia de cuerpos fructíferos	Muerte	Defoliación y Brotación anormal, Presencia de cuerpos fructíferos	Perdida de turgencia en hojas	Tinción de vasos
FAE-2		Tinción de vasos. Presencia de cuerpos fructíferos		Tinción de vasos. Presencia de cuerpos fructíferos	Tinción de vasos
FAA-1		Tinción de vasos, defoliación y muerte. Presencia de cuerpos fructíferos	Brotación anormal	Tinción de vasos	Tinción de vasos
FO-1		Brotación anormal. Presencia de cuerpos fructíferos	Exudado	Chancro	Tinción de vasos, defoliación
FJ-20	Defoliación	Defoliación	Presencia de cuerpos fructíferos		Defoliación
TESTIGO					

Transcurridos 3 meses desde la inoculación, se observó que dos plantas de alcornoque y cuatro plantas de coscoja inoculadas con *B. corticola*, presentaban la copa con hojas secas a partir del punto de inoculación. Tras levantar la corteza, estas plantas presentaban en el punto de inoculación y rodeando al tronco una clara diferenciación entre la parte superior de color marrón y la inferior de color verde (foto). En cuanto a las plantas de encina inoculadas con el mismo hongo, en todas se podía ver rodeando al punto de inoculación una zona deprimida de color marrón oscuro, la cual se extendía distal y proximalmente, muy bien delimitada y diferenciada del color verdoso del tallo sano (foto).

Tras realizarse el análisis estadístico de los datos, se observó que existían diferencias significativas tanto entre especies de plantas inoculadas, como entre los diferentes aislados de *Botryosphaeria* sp. (Anejos). Por este motivo, se hizo un análisis individualizado de la longitud media de las lesiones en función de la planta huésped.



Fig. R4.1. Exudados en encinas inoculadas con *B. corticola*





Fig. R4.2. Exudado en alcornoque inoculado con *B. corticola*.



Fig. R4.3. Defoliación de alcornoque inoculado con *B. corticola*.



Fig. R4.X. Exudado en coscoja inoculada con *N. mediterraneum*



Fig. R4.1. Exudados en coscojas inoculadas con *B. corticola*.



Fig. R.4.4. Chancro en olivo Gordal inoculado con *B. corticola*.

La especie vegetal que presentó una mayor longitud de chancro, fue la coscoja inoculada con *B. corticola* aislado de muestras de ramas de alcornoque (DCE-6), con una longitud media de 73,62 cm.

Tabla 4R.2. Longitud media de las lesiones corticales de plantas de *Quercus* spp. y dos variedades de olivo inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*

INÓCULO	PLANTA HUÉSPED				
	ENCINA	ALCORNOCQUE	COSCOJA	OLIVO 'GORDAL'	OLIVO 'PICUAL'
DCE-6 (<i>B. corticola</i>)	32,25 ^a	37,58 ^b	57,62 ^c	1,75 ^b	0,91 ^b
DCA-5 (<i>B. corticola</i>)	21,22	12,50	73,62	1,60	1,60
DOE-25 (<i>B. iberica</i>)	0,70	1,01	2,12	0,82	0,77
DOA-2 (<i>B. iberica</i>)	1,32	0,95	0,00	0,80	0,45
FAE-2 (<i>B. dothidea</i>)	0,70	3,10	1,30	1,27	0,73
FAA-1 (<i>B. dothidea</i>)	0,94	1,92	0,00	1,07	0,87
FJ-20 (<i>B. dothidea</i>)	1,60	0,92	0,55	1,03	0,87
FO-1 (<i>B. ribis</i>)	1,42	1,85	3,77	16,47	1,23
TESTIGO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

^a Todos los valores vienen expresados en cm. Cada valor es la media de 5 repeticiones.

^b Cada valor es la media de 6 repeticiones.

^c Cada valor es la media de 4 repeticiones.

El análisis de la varianza y la comparación de medias (Anejos) de la longitud de las lesiones para cada especie vegetal, mostró que en coscoja, *B. corticola* (DCE-6 DCA-5) presentaba valores significativamente mayores que el resto de aislados; para alcornoque sólo fue el aislado de *B. corticola* procedente de encina (DCE-6) el que causó longitudes de lesiones significativamente mayores que el resto de aislados, siendo este mismo aislado en encina con el que se observa también diferencias significativas con respecto a los otros aislados, seguido del aislado de *B. corticola* procedente de encina (DCA-5). En cuanto a los olivos, se observaron diferencias significativas entre aislados en las plantas de olivo 'Picual', presentando las plantas inoculadas con *B. corticola* aisladas a partir de alcornoque (DCA-5) valores ligeramente mayores de longitud de chancro que el resto de aislados. Los olivos de la variedad Gordal no presentaron diferencias significativas en función de las longitudes de chancro. No obstante, aquellas plantas inoculadas con *B. ribis* (FO-1) presentaron una mayor

longitud de tejido afectado que el resto de plantas 'Gordal' inoculadas con las otras especies de *Botryosphaeria*.

Tabla 4R.3. Severidad media de las lesiones corticales de plantas de *Quercus* spp. y dos variedades de olivo inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*. Para cada columna, letras distintas indican diferencias significativas según el test de Fisher para $p < 0,05$.

INÓCULO	PLANTA HUÉSPED				
	COSCOJA	ALCORNOCQUE	ENCINA	OLIVO 'GORDAL'	OLIVO 'PICUAL'
DCE-6 (<i>B. corticola</i>)	53,15 a	23,71 a	20,15 a	1,18 ab	0,64 b
DCA-5 (<i>B. corticola</i>)	51,15 a	5,22 b	12,23 b	1,93 ab	0,94 a
DOE-25 (<i>B. iberica</i>)	1,72 b	0,53 b	0,51 c	0,59 b	0,47 bc
DOA-2 (<i>B. iberica</i>)	0,00 b	0,45 b	0,73 c	0,54 b	0,33 c
FAE-2 (<i>B. dothidea</i>)	0,00 b	1,54 b	0,42 c	0,76 b	0,51 bc
FAA-1 (<i>B. dothidea</i>)	0,80 b	0,93 b	0,64 c	0,70 b	0,56 bc
FJ-20 (<i>B. dothidea</i>)	0,40 b	0,50 b	1,00 c	0,73 b	0,62 b
FO-1 (<i>B. ribis</i>)	2,52 b	0,94 b	0,89 c	11,94 a	0,75 ab

Todas las especies fúngicas inoculadas se recuperaron en las plantas que presentaban lesiones, menos *B. iberica* en Olivo 'Picual'. En la distribución por zonas, las especies fúngicas se recuperaron con altos porcentajes cerca del punto de inoculación, en el caso de chancros tipo A y B, y si la zona necrótica era extensa, como en los chancros tipo C y D, estos elevados porcentajes se obtenían en los extremos (puntos de muestreo 1 y 2). Por otro lado, de las plantas que se encontraban anilladas en el punto de inoculación, se realsó el hongo tanto en el extremo de la zona necrótica de la lesión como en la zona sana inmediatamente posterior al tejido afectado (puntos de muestreo 1 y 3).

Tabla 4R.4. Porcentajes de reaislamiento de las especies fúngicas *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis* de plantas inoculadas artificialmente.

PLANTA HUÉSPED	Inóculo	Puntos de muestreo según la longitud del chancro ^b					
		1	2	3	4	5	6
Coscoja	DCE-6 (<i>B. corticola</i>)	100	100	0	0	50	0
	DCA-5 (<i>B. corticola</i>)	100	50	0	0	0	0
	DOE-25 (<i>B. iberica</i>)	100	100				
	DOA-2 (<i>B. iberica</i>)	50	0				
	FAE-2 (<i>B. dothidea</i>)	100	100				
	FAA-1 (<i>B. dothidea</i>)	50	50				
	FJ-20 (<i>B. dothidea</i>)	100	50				
	FO-1 (<i>B. ribis</i>)	100	100	0	0	0	0
	DCE-6 (<i>B. corticola</i>)	100	100	100	100	0	0
	DCA-5 (<i>B. corticola</i>)	100	100	100	50	0	0
Encina	DOE-25 (<i>B. iberica</i>)	66,6	66,6				
	DOA-2 (<i>B. iberica</i>)	50	0	0	0		
	FAE-2 (<i>B. dothidea</i>)	100	100	0	0		
	FAA-1 (<i>B. dothidea</i>)	100	100	0	0		
	FJ-20 (<i>B. dothidea</i>)	100	100	0	0		
	FO-1 (<i>B. ribis</i>)	100	100	0	0		

Tabla 4R.4. (Continuación)

PLANTA HUÉSPED	Inoculo	Puntos de muestreo según la longitud del chancro ^b											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Alcornoque	DCE-6 (<i>B. corticola</i>)	100	80	100	80	60	75	50	50	100	100	0	0
	DCA-5 (<i>B. corticola</i>)	100	66,6	100	66,6	100	50	100	100	100	0		
	DOE-25 (<i>B. iberica</i>)	66,6	0	33,3	0								
	DOA-2 (<i>B. iberica</i>)	100	33,3	100	0								
	FAE-2 (<i>B. dothidea</i>)	66,6	33,3	66,6	33,3	50	50	50	0	0	0	0	0
	FAA-1 (<i>B. dothidea</i>)	33,3	33,3	33,3	33,3	100	100						
	FJ-20 (<i>B. dothidea</i>)	66,6	66,6	50	50								
	FO-1 (<i>B. ribis</i>)	100	66,6	66,6	0	0	0						

Tabla 4R.4. (Continuación)

PLANTA HUÉSPED	Inoculo	Puntos de muestreo según la longitud del chancro ^b			
		1	2	3	4
Olivo 'Gordal'	DCE-6 (<i>B. corticola</i>)	100	100	0	0
	DCA-5 (<i>B. corticola</i>)	66	100	33,3	0
	DOE-25 (<i>B. iberica</i>)	100	50		
	DOA-2 (<i>B. iberica</i>)	100	50		
	FAE-2 (<i>B. dothidea</i>)	100	100	0	0
	FAA-1 (<i>B. dothidea</i>)	100	66,6	0	
	FJ-20 (<i>B. dothidea</i>)	100	100		
	FO-1 (<i>B. ribis</i>)	100	100	0	
	Olivo 'Picual'	DCE-6 (<i>B. corticola</i>)	66,6	33,3	
DCA-5 (<i>B. corticola</i>)		33,3	33,3	33,3	33,3
DOE-25 (<i>B. iberica</i>)		66,6	100		
DOA-2 (<i>B. iberica</i>)		0	0		
FAE-2 (<i>B. dothidea</i>)		100	100	0	100
FAA-1 (<i>B. dothidea</i>)		33,3	0		
FJ-20 (<i>B. dothidea</i>)		100	100		
FO-1 (<i>B. ribis</i>)		100	33,3	33,3	33,3

Se realizó siembra directa de los cuerpos fructíferos que se encontraban en las lesiones de las plantas inoculadas. Sólo se aisló el aislado DCE-6 (*B. corticola*) de aquellos cuerpos fructíferos procedentes de tallos de alcornoque inoculados con dicho aislado. En cuanto a las plantas que presentaron tinción de vasos, también se realizaron aislamientos utilizando el mismo sistema que para las cuñas de corteza necrótica. En este caso no se obtuvo reaislamiento de ninguna de las especies inoculadas.

Los valores de recuperación de los hongos ensayados en las placas procedentes de las plantas testigo fue del 0% en todos los casos.

Tanto de las ramas testigo como en las inoculadas, en algunos casos se aislaron diversas especies fúngicas de los géneros *Phoma*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis* y *Coniothyrium*, pero nunca de forma consistente.



Plantas de coscoja inoculadas con el aislado DCA-5 (*B. corticola*):

A) Presencia de numerosos cuerpos fructíferos cerca del punto de inoculación.
B) y C) Tejido cortical necrótico claramente diferenciado del tejido sano, después de eliminar la corteza externa.



Plantas de coscoja inoculadas con el aislado DCE-6 (*B. corticola*):

A) Lesión cortical claramente diferenciada de la zona sana antes de eliminar la corteza externa.
B) Lesión cortical claramente diferenciada de la zona sana tras la eliminación de la corteza externa.



Plantas de coscoja inoculadas con los aislados DOA-2 (A) y DOE 25(B) (*B. iberica*):

A) Pequeña lesión cortical alrededor del punto de inoculación.

B) Lesión cortical a ambos lados del punto de inoculación.



Plantas de coscoja inoculadas con los aislados FAA-1(A) y FAE-2 (B) (*B. dothidea*): Pueden apreciarse la pequeñas lesiones corticales alrededor del punto de inoculación.



Plantas de coscoja inoculadas con el aislado FJ-20 (*B. dothidea*). Pueden apreciarse la pequeñas lesiones corticales alrededor del punto de inoculación.



Plantas de coscoja inoculadas con el aislado FO-1 (*B. ribis*): en ambos casos se aprecia el tejido cortical necrótico claramente diferenciado de la zona sana.



Planta de coscoja Testigo en la que no se aprecia tejido necrótico más allá del punto de inoculación.



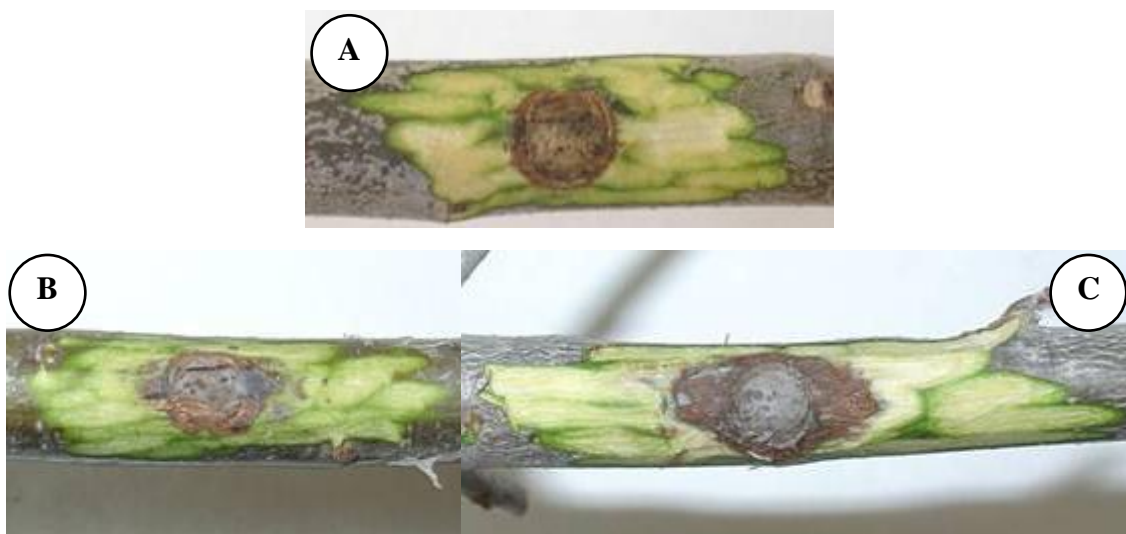
Plantas de encina inoculadas con el aislado DCA-5 (*B. corticola*):

A) Presencia de numerosos cuerpos fructíferos cerca del punto de inoculación.

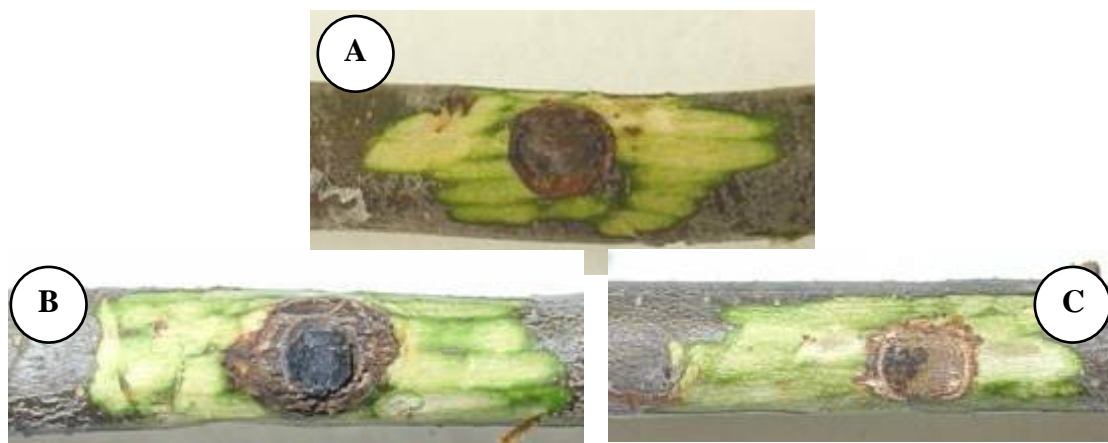
B) Tejido cortical necrótico claramente diferenciado del tejido sano, después de eliminar la corteza



Planta de encina inoculada con el aislado DCE-6 (*B. corticola*): Tejido cortical necrótico tras eliminar la corteza externa.



Plantas de encina inoculadas con los aislados DOE 25(A) y DOA-2 (B y C) (*B. iberica*): Pueden observarse pequeñas lesiones corticales alrededor del punto de inoculación y cuerpos fructíferos en el punto de inoculación.



Plantas de encina inoculadas con los aislados FAA-1(A) y FAE-2 (B y C) (*B. dothidea*):

- A) No se observa tejido cortical necrótico alrededor del punto de inoculación.
- B) y C) Tejido cortical necrótico alrededor del punto de inoculación.



Planta de encina inoculada con el aislado FJ-20 (*B. dothidea*) en la que se observa tejido cortical necrótico.



Plantas de encina inoculadas con el aislado FO-1 (*B. ribis*):

A) Tejido cortical necrótico irregularmente distribuido.

B) Pequeña lesión cortical alrededor del punto de inoculación.



Planta Testigo en la que no se aprecia tejido cortical necrótico alrededor del punto de inoculación

A



B



C



D



E



Plantas de alcornoque inoculadas con el aislado DCA-5 (*B. corticola*):

A) Presencia de cuerpos fructíferos cerca del punto de inoculación.

B) Lesión deprimida rodeada de corteza sana.

C) y D) Tejido cortical necrótico claramente diferenciado del tejido sano, después de eliminar la corteza externa.

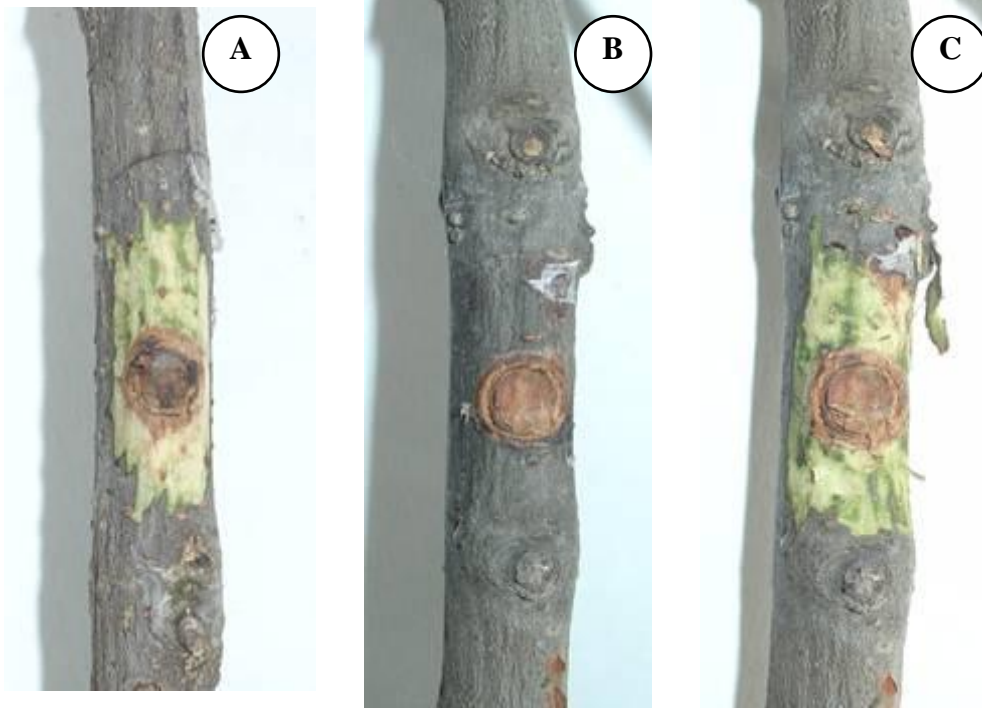
E) Tinción de vasos que sobrepasa la zona necrótica de la lesión.



Plantas de alcornoque inoculadas con el aislado DCE-6 (*B. corticola*):

A) y B) Cuerpos fructíferos en plantas inoculadas.

C) y D) Corteza interna necrótica bien diferenciada de la parte sana.



Plantas de alcornoque inoculadas con los aislados DOA-2 (A) y DOE 25(B y C) (*B. iberica*): Puede observarse una pequeña lesión cortical alrededor del punto de inoculación.



Planta de alcornoque inoculada con el aislado FAA-1 (*B. dothidea*): se puede ver como se extiende la lesión cortical



Plantas de alcornoque inoculadas con el aislado FAE-2 (*B. dothidea*):
A) Corteza agrietada en el punto de inoculación. Pueden verse cuerpos fructíferos.
B) Lesión cortical una vez retirada la corteza externa.



Plantas de alcornoque inoculadas con el aislado FJ-20 (*B. dothidea*)



Plantas de alcornoque inoculadas con el aislado FO-1 (*B. ribis*): en ambos casos se ve el tejido cortical necrótico claramente diferenciado de la zona sana.



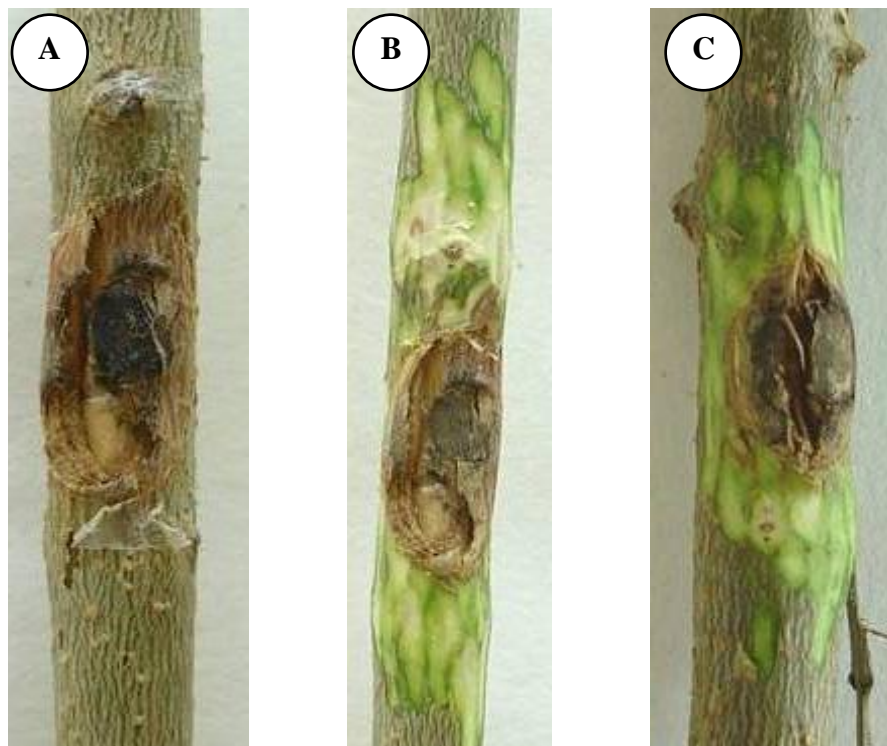
Planta Testigo en la que no se aprecia tejido cortical necrótico alrededor del punto de inoculación



Plantas de olivo 'Gordal' inoculadas con el aislado DCA-5 (*B. corticola*):

A) Lesión en el punto de inoculación antes de retirar la corteza externa.

B) Tejido cortical necrótico claramente diferenciado del tejido sano, después de eliminar la corteza externa.

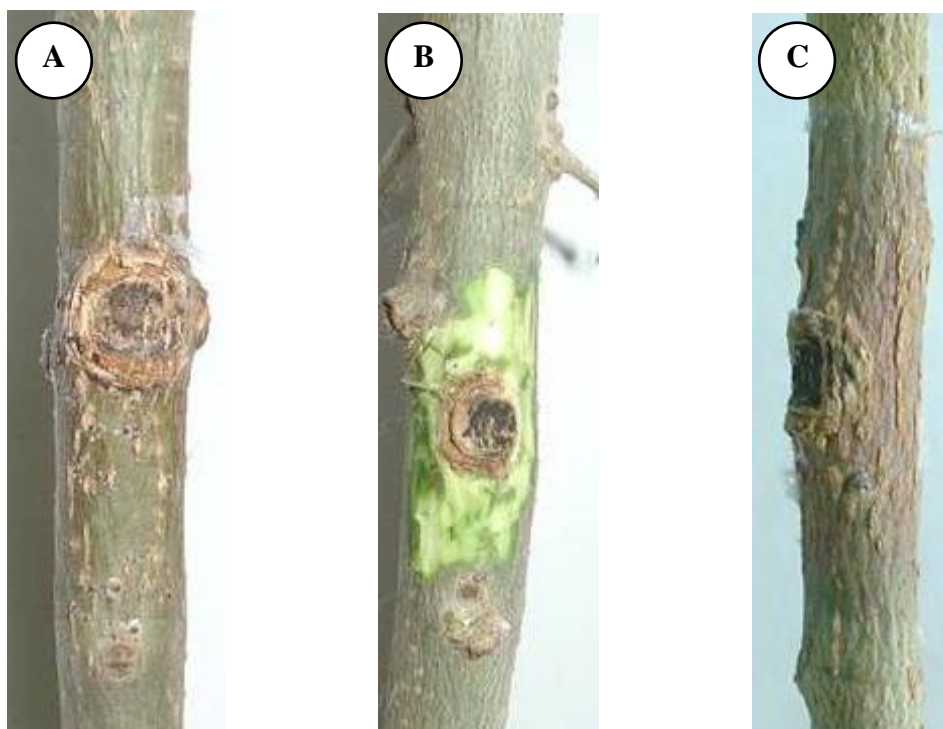


Plantas de olivo 'Gordal' inoculada con el aislado DCE-6 (*B. corticola*):

A) Lesión en el punto de inoculación.

B) Tejido cortical necrótico claramente diferenciado del tejido sano, después de eliminar la corteza externa. Se puede observar un callo alrededor de la lesión.

C) Tejido cortical necrótico y agrietado.



Plantas de olivo 'Gordal' inoculadas con los aislados DOE 25 (A y B) y DOA-2 (C) (*B. iberica*):

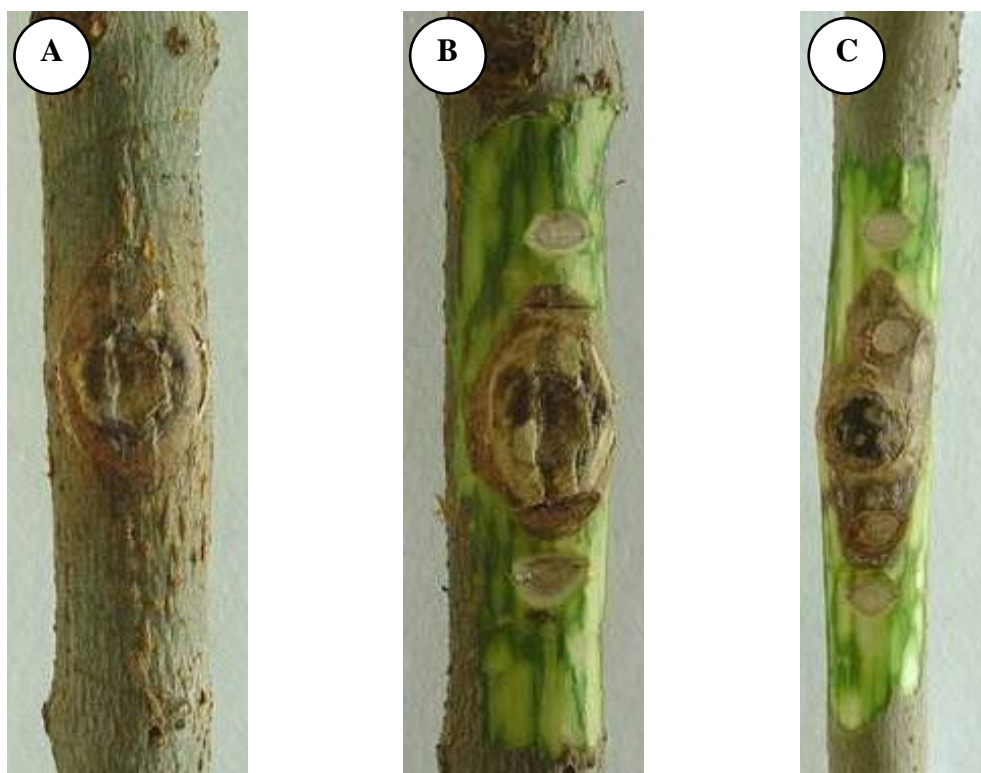
A) Presencia de cuerpos fructíferos y callo rodeando al punto de inoculación.

B) Ausencia de tejido cortical necrótico rodeando el punto de inoculación una vez eliminada la corteza externa.

C) Callo que rodea al punto de inoculación.



Plantas de olivo 'Gordal' inoculadas con FAA-1 (*B. dothidea*): puede observarse una pequeña lesión cortical alrededor del punto de inoculación



Plantas de olivo 'Gordal' inoculadas con el aislado FAE-2 (*B. dothidea*):

A) Lesión alrededor del punto de inoculación, pérdida de corteza externa y formación de callo.

B) Tejido cortical necrótico una vez eliminada la corteza externa.

C) Tejido cortical necrótico claramente diferenciado del tejido sano, después de eliminar la corteza externa.



Planta de olivo 'Gordal' inoculada con el aislado FJ-20 (*B. dothidea*) en la que se observa el tejido cortical necrótico.



Planta de olivo 'Gordal' inoculada con el aislado FO-1 (*B. ribis*):

A) Lesión cortical antes de retirar la corteza externa.

B) La misma planta una vez eliminada la corteza externa. Se aprecia el tejido cortical necrótico extendiéndose a ambos lados del punto de inoculación.



Plantas de olivo 'Picual' inoculadas con el aislado DCA-5 (*B. corticola*):

A) Lesión cortical en el punto de inoculación.

B) y C) Tejido cortical necrótico claramente diferenciado del tejido sano, después de eliminar la corteza externa.



Planta de olivo 'Picual' inoculada con el aislado DCE-6 (*B. corticola*): Callo alrededor del punto de inoculación.



Planta de olivo 'Picual' inoculada con el aislado DOA-2 (*B. iberica*): Callo alrededor del punto de inoculación y estrecha franja de necrosis del tejido cortical en algunas zonas.



Planta de olivo 'Picual' inoculada con el aislado DOE-25 (*B. iberica*):

- A) Agrietado de la corteza en el punto de inoculación.
- B) Necrosis del tejido cortical una vez retirada la corteza externa.



Planta de olivo 'Picual' inoculada con el aislado FJ-20 (*B. dothidea*) en la que se observa el tejido cortical necrótico.



Planta de olivo 'Picual' inoculada con el aislado FO-1(*N. mediterraneum*): Se aprecia tejido necrótico extendiéndose a ambos lados de la lesión.



Planta Testigo de olivo 'Picual' en la que no se aprecia tejido cortical necrótico alrededor del punto de inoculación.

DISCUSIÓN

De entre las enfermedades que causa el género *Botryosphaeria*, destacan por encima de todas los chancros y la muerte regresiva de ramas en especies forestales, y en menor medida, en frutales, matorrales leñosos y especies herbáceas (Slippers *et al.*, 2004).

La morfología y severidad de los chancros que ocasionan las especies pertenecientes al género *Botryosphaeria* dependen del huésped, del diámetro de la rama atacada y de la predisposición de la planta. Las lesiones causadas varían desde manchas superficiales y diminutas en las ramas hasta chancros hundidos y rodeados por gruesas capas de callo (Sinclair *et al.*, 1987).

El carácter patógeno de *B. corticola* sobre diferentes especies de *Quercus* queda demostrado en estos ensayos de inoculación artificial en tallos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sánchez *et al.* (2003) y Tsopelas *et al.* (2009) en rama cortada y ramas en medio natural en encina y coscoja respectivamente. También queda demostrada la patogenicidad de la especie *Neofusicoccum mediterraneum* sobre olivos variedad Gordal (Romero *et al.*, 2005) en condiciones controladas.

Los ensayos realizados en este trabajo han reproducido los síntomas primarios de la enfermedad: los chancros, para las inoculaciones realizadas con aislados de *B. corticola* en las tres especies de *Quercus* y en los olivos de la variedad Gordal, La observación de estos síntomas sólo fue posible, a excepción de los olivos 'Gordal', una vez retirada la corteza externa, de la misma manera que ocurre en otros huéspedes como en el eucalipto (Davison y Tay, 1983), el nogal europeo (Rumbos, 1987) y la jara pringosa (Sánchez *et al.*, 2002).

Los ensayos se realizaron en primavera con temperaturas suaves y las plantas se mantuvieron en óptimas condiciones en cuanto a riego, por lo que en este caso *B. corticola* se comportó como patógeno primario en las plantas de *Quercus* y reproduciendo los síntomas observados en campo: clorosis, marchitez foliar, defoliación y muerte de la rama o el tallo afectado (Carrasco *et al.*, 2009). Numerosos autores describen esta sintomatología como una manifestación típica de síntomas secundarios producidos por la necrosis cortical de la rama afectada (Sinclair *et al.*, 1987; Tuset, 1996; Sánchez *et al.*, 2003). Sin embargo, los exudados producidos en las plantas inoculadas con *B. corticola* en las tres especies de *Quercus* y *N. mediterraneum* en coscoja, es un síntoma no descrito en ensayos de patogenicidad de estas especies en

Quercus por otros autores (Sánchez *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2005; Tsopelas *et al.*, 2009).

En las inoculaciones con *B. iberica*, *B. dothidea* y *N. mediterraneum* se observó una respuesta defensiva de tipo morfológica. Esta respuesta consistió en la formación de callo alrededor de la zona afectada por el chancro, que posiblemente paralizaría la expansión de este. La formación de callo en estas plantas muestra la capacidad de las mismas para poner en marcha sus mecanismos de defensa cuando no se encuentran sometidas a estrés (Luque *et al.*, 2003). Por otro lado, la falta de este callo en las plantas de *Quercus* spp. inoculadas con *B. corticola* muestra la alta capacidad de este hongo para colonizar tejido cortical de estas plantas en ausencia de estrés (Sánchez *et al.*, 2003).

La presencia de exudados y cuerpos fructíferos en el punto de inoculación protegido por el Parafilm puede deberse al elevado grado de humedad que se da en ese punto, que favorece la esporulación de las especies fúngicas.

La especie vegetal que presentó una mayor longitud de los chancros fue la coscoja inoculada con *B. corticola*. Tsopelas *et al.* (2009) describió por primera vez a *B. corticola* produciendo chancros en coscoja. Los síntomas (muerte de ramas y ramillos con hojas marchitas) descritos en campo y en inoculación de ramas por Tsopelas *et al.* (2009) coinciden con los descritos en el presente trabajo. Sin embargo Tsopelas *et al.* (2009) no señalan el anillamiento de ramas.

Los altos porcentajes de reaslamiento de *B. iberica*, *B. dothidea* y *N. mediterraneum* a partir de tejidos corticales que ellos mismos han necrosado, muestran la alta capacidad de estos hongos para sobrevivir en los chancros como saprofitos.

Los resultados de este trabajo en cuanto a la inoculación con *Botryosphaeria* spp. en coscoja, junto al de Tsopelas *et al.* (2009), pone de manifiesto que las especies vegetales acompañantes en las masas de encinas y alcornoques pueden actuar como huéspedes o como fuentes de inóculo adicionales para la infección de las especies principales.

El género *Botryosphaeria* incluye especies de distribución cosmopolita, principalmente en zonas de clima templado y tropical (Jacobs y Rehner, 1998; Pavlic *et al.*, 2004). Estos hongos tienen un amplio número de huéspedes y se han descrito como endofitos y parásitos, patógenos oportunistas en muchas especies leñosas (Pavlic *et al.*, 2004). No está claro que exista una especificidad de huéspedes para estos hongos, sin embargo hay trabajos como el de De Wet *et al.* (2008), en el que se indica la preferencia

de ciertos géneros con respecto al grupo de plantas en las que se han descrito, como es el caso de las especies de *Dothiorella* que se han aislado prácticamente sólo en angiospermas, mientras que *Neofusicoccum* spp. aparecen mayoritariamente en gimnospermas. Por otro lado, Slippers *et al.* (2007) a partir de técnicas moleculares identifican especies de *Botryosphaeria* que se aíslan de algunas especies frutales y no de otras, como ocurre con *Neofusicoccum luteum* en vid y *Neofusicoccum australe* en manzanos, cuando ambos cultivos se encuentran en una misma zona de producción. Los resultados obtenidos en nuestro ensayo muestran una clara preferencia por parte de *B. corticola* hacia los *Quercus* y por parte de *N. mediterraneum* hacia los olivos, más concretamente, los de la variedad Gordal. De aquí se desprende que puede existir una cierta relación íntima de determinadas especies de *Botryosphaeria* hacia géneros o especies de plantas concretos, e incluso se podrían establecer biotipos de dicho género fúngico.

***CAPITULO 6. CONTROL DE *B. corticola* EN TRONCO
DE ALCORNOQUE***

INTRODUCCIÓN

Las masas de alcornoques, ya sean puras o mixtas, constituyen una de las más típicas manifestaciones del monte mediterráneo, que cubre gran parte de sierras, arenales y zonas adhesionadas. El alcornocal es un sistema forestal en el que ha intervenido la mano del hombre, legándolo hasta nuestros días con unos elevados niveles de conservación y calidad ambiental. El alcornocal puede considerarse un monte generoso, por la multitud y variedad de productos que ofrece. El principal producto del alcornoque es el corcho. Las zonas rurales obtienen de los alcornocales muchos de esos beneficios, no solo económicos. Los daños que puedan aparecer en esas masas de alcornoques pueden perjudicar dichas zonas (Blanco *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2006).

Dentro de las plagas y enfermedades que puedan sufrir los alcornoques en el tronco, los chancros pueden ser los que más afecten a la producción de corcho (Junta de Andalucía, 2009). Estos chancros se caracterizan por seguir la línea de heridas realizadas por las hachas durante el descorche, presentándose en esas zonas el corcho más abultado y agrietado, y en ocasiones pueden dejar al descubierto la madera. La corteza que se queda en el interior de las lesiones se presenta plana y de aspecto más delgado que en el resto del árbol, provocando la pérdida de la forma cilíndrica del tronco (Carrasco *et al.* 2009). En otras ocasiones, se pueden observar chancros de diferentes tamaños, en los que aparece el callo rodeando a la madera, quedando ésta expuesta al exterior (Navarro *et al.* 2004). En ocasiones, estos chancros pueden anillar el tronco y causar la muerte del árbol, como se ha descrito en alcornocales de Cataluña (Luque y Girbal, 1989).

Las medidas de control para los chancros de tronco en alcornoque deben de ser de tipo preventivo, ya que una vez presentes las lesiones, las medidas curativas son ineficaces (Romero *et al.*, 2009). Entre las medidas culturales para prevenir la enfermedad se encuentra el evitar la existencia de heridas mecánicas o de poda y, la eliminación de ramas afectadas durante los periodos secos de verano o los de reposo invernal, siempre antes de las primeras lluvias de primavera, debido a que con éstas se produce la mayor dispersión de esporas (Romero *et al.*, 2009). En cuanto al control químico, existen numerosas referencias de aplicación de fungicidas para la lucha contra diferentes especies de *Botryosphaeria* (Denman *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2008; Amponsah *et al.*, 2012). Tras ensayos realizados en Cataluña, en los que se obtuvieron muy buenos resultados con la aplicación sobre tronco de una disolución acuosa de

benomilo (750 ppm) y oxiquinoleato de cobre (720 ppm) (Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca, Generalitat de Catalunya, 2000), la aplicación de Benomilo, hasta su supresión del registro europeo de productos fitosanitarios en 2003, estaba ampliamente extendida en los alcornocales catalanes tras el descorche. Tras dicha supresión, dejaron de realizarse tratamientos después del descorche. No obstante, Luque *et al.* (2008) realizaron ensayos con productos pulverizados sobre la superficie descorchada, obteniendo buenos resultados con otros productos de la familia de los benzimidazoles.

La importancia económica y cultural que representa la extracción del corcho en determinadas zonas de Andalucía, hace necesario establecer ensayos en zonas corcheras para determinar qué productos proporcionan una mayor protección de los alcornoques frente a los daños que produce *Botryosphaeria corticola* en los troncos de dichos árboles.

MATERIALES Y METODOS

1. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de *B. corticola*

Se ha ensayado el efecto de diferentes fungicidas sobre el crecimiento micelial de cultivos puros de *B. corticola* creciendo en el medio base PDA acidificado (PDAA). Se utilizaron los aislados de *B. corticola* DCA-28 y DCA-32. Ambos aislados proceden de la siembra de ascosporas de *B. corticola*, de una muestra de chancro de tronco de alcornoque descorchado en 1998 en la Sierra de Ojén, provincia de Cádiz. Estos aislados se encuentran almacenados, inmersos en aceite de parafina a 4° C y en oscuridad, en la micoteca del grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba.

1.1. Fungicidas

Los fungicidas utilizados se escogieron entre los autorizados para el control de algunas especies de *Botryosphaeria* en cultivos leñosos y publicados en el Vademecum 04 (Liñán, 2004), y los que se habían empleado en otros trabajos previos en Cataluña (Luque *et al.*, 2004). Se trato de incluir fungicidas sistémicos, algún orgánico de amplio espectro, productos cúpricos y productos biológicos, tanto comerciales como experimentales (Segura, 2004). En la tabla A se muestran las materias activas así como los productos comerciales utilizados para la evaluación de su efecto sobre el crecimiento micelial de *B. corticola*. También se ensayó la mezcla Metil Tiofanato y Sulfato Cuprocálcico.

Las dosis empleadas variaron según el grupo de fungicidas. Para los productos químicos se ensayaron las dosis 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 ppm de materia activa, si bien la última dosis no se utilizó para el Difenconazol, Folpet+Sulfato Cuprocálcico y el producto que sólo contenía Sulfato Cuprocálcico. Las dosis que se emplearon para los productos biológicos fueron de 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 conidios \times ml $^{-1}$ para los hongos y, 10^9 , 10^8 , 10^7 y 10^6 unidades formadoras de colonia (ufc) \times ml $^{-1}$ para la bacteria. Además se incluyó un testigo sin producto alguno.

En todos los casos, las dosis seleccionadas trataron de incluir desde una dosis baja que apenas inhibiera el crecimiento del patógeno hasta una dosis alta que lo inhibiera completamente. Las distintas dosis de los fungicidas se prepararon con ADD (agua destilada y desionizada) estéril en una cámara de flujo laminar. Partiendo de las dosis más altas se obtuvieron las diferentes dosis por diluciones sucesivas. Todos lo

productos utilizados son solubles en agua, por lo que no fue necesario añadir ningún tipo de disolvente adicional.

Tabla A. Fungicidas utilizados para evaluar su efecto sobre el crecimiento micelial de *Botryosphaeria corticola*

Materias activas	Formulación	Producto comercial	Casa comercial	Dosis recomendadas
Fungicidas sistémicos				
Metil Tiofanato	70% WP	Topsin 70W	Rhône-Poulenc	50-100g/hl
Carbendazima	50% WP	Orocarben	Quimicas Oro	50-60g/hl
Flusilazol	25% EC	Punch CS	Du Pont	0,8l/ha
Carbendazima	12,5%			
Epoconazol	12,5%	Lovit	BASF	1l/ha
Difenoconazol	25% EC	Score 25	Syngenta	60cc/hl
Pyraclostrobin	5%	Cabrio TOP	BASF	200g/hl
Fungicidas órgano protectores				
Folpet	10% WP	Cupertine folpet	I.Q: del Vallés	400-600g/hl
Sulfato Cuprocálcico	20%			
Fungicidas cúpricos				
Sulfato cuprocálcico	20% WP	Bordeaux mixture	Sipcam Inagra	600-1000g/hl
Productos biológicos				
<i>Trichoderma</i>	10 ⁹ conidias/l	Trichomic	Trichodex	7l/ha
<i>Phoma</i> sp.		Experimental	-	6 10 ⁵ u.f.c./ml
<i>Bacillus subtilis</i>		Experimental	-	10 ⁹ u.f.c./ml

1.2. Preparación de los medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue Patata-Dextrosa-Agar (PDA) (Difco). Se prepararon 250 ml del medio por cada dosis de fungicida, vertiendo 25 ml en cada placa de Petri de 9 cm de diámetro. Se realizaron tres repeticiones (experimentos) para cada producto ensayado, concentración, y aislado. Cada repetición consto de dos placas.

El medio de cultivo se preparó, para cada dosis de los nueve fungicidas químicos, en un medio con 240 ml de ADD y la cantidad del medio de cultivo sintético correspondiente a 250 ml. Posteriormente, se esterilizó en el autoclave a 120° C durante 20 min y se añadieron los 10 ml de ADD estéril restantes con la dosis de fungicida correspondiente. Además se preparó el medio de cultivo correspondiente al testigo sin fungicida con 10 ml de ADD estéril sin ningún producto. Una vez vertidos los medios

de cultivo con las distintas dosis de fungicidas y el testigo sin fungicida, se dejaron enfriar y seguidamente se procedió a la siembra del patógeno.

En el caso de los productos biológicos *Trichoderma* y el experimental *Phoma*, el medio de crecimiento empleado fue el PDA Difco, una vez esterilizado y frío, y para la bacteria *B. subtilis* agar nutritivo (AN) (Difco). Este ensayo constó de tres repeticiones para cada concentración de agente biológico y aislado de *B. corticola*. Como estos productos, por su propia naturaleza, no pueden añadirse al medio de crecimiento, se procedió a preparar suspensiones con las concentraciones a ensayar y posteriormente, realizar extensiones de área limitada sobre el medio de crecimiento correspondiente.

Las suspensiones de los fungicidas biológicos se obtuvieron de la siguiente forma: en el caso del hongo *Trichoderma*, al ser un producto comercial, se tomó directamente la cantidad necesaria de producto para obtener la suspensión conidial de concentración $10^6 \text{ ufc} \times \text{ml}^{-1}$. Los fungicidas *Phoma* y *B. subtilis* a ser experimentales, los cultivos se encontraban conservados inmersos en aceite de parafina a 4° C en la colección de hongos y bacterias que gestiona el grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba, por lo que hubo que limpiarlas de aceite. En el caso de *Phoma*, se transfirió de los tubos con medio PDA y aceite de parafina a placas de PDA y una vez que el hongo hubo crecido de forma abundante, se transfirieron nuevamente a placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenía medio PDA. Los aislados se incubaron durante 7 días a una temperatura de 23° C bajo luz. Transcurrido este tiempo se prepararon las suspensiones conidiales a evaluar.

La suspensión conidial de *Phoma* se preparó con ayuda de un asa de siembra, con la que se raspó sobre la colonia y con la que se recogieron los conidios que se depositaron en un tubo de vidrio estéril de fondo plano que contenía ADD estéril. Los tubos se sellaron con Parafilm y se agitaron durante 2 min en el agitador orbital. Las suspensiones conidiales se ajustaron a $10^6 \text{ ufc} \times \text{ml}^{-1}$. Para el conteo de los conidios se utilizó una cámara Neubauer. La concentración en la suspensión conidial de *Phoma* coincide con la utilizada por Segura (2003) cuando estudió el efecto de diferentes aislados fúngicos en la germinación de conidios de *Spilocaea oleagina*.

Para preparar la suspensión de *B. subtilis* se comenzó por su recuperación a partir de tubos con AN y aceite de parafina conservados a 4° C . Para ello y con la ayuda de un asa de siembra, se sembró en estrías en placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían AN, medio genérico utilizado habitualmente para el crecimiento de bacterias, y se incubaron en cámara de cultivo a 27° C en oscuridad durante 48 h. Transcurrido

este tiempo, el aislado se transfirió nuevamente a placas de AN, ya que en la transferencia anterior, aunque la colonia bacteriana había crecido relativamente bien, también se podía observar la presencia de restos de aceite de parafina. Las placas sembradas se incubaron durante 48 h a 27° C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se prepararon las suspensiones bacterianas. Para ello, se utilizó un asa de siembra con la que se recogieron las bacterias de las placas y se depositaron en tubos de vidrio estériles que contenían ADD estéril, se agitaron durante 60 s en el agitador orbital y se ajustaron a una concentración de 10^9 ufc \times ml⁻¹. La concentración de bacterias se ajustó visualmente por comparación con las concentraciones estándar de sulfato de bario de la escala McFarland's (Noval, 1991).

Por el reverso de las placas de Petri de 9 cm en las que se iban a realizar el ensayo de inhibición del crecimiento micelial de *B. corticola*, se dibujó una línea que dividía a la placa en dos partes iguales. En el punto medio de una de las partes de la placa, se colocó 30 μ l de la suspensión del producto biológico a la dosis correspondiente que posteriormente se extendía con una varilla estéril de vidrio. Las placas de PDA que contenían los hongos se sellaron y se incubaron durante 4 días con un fotoperíodo de 12 h, mientras que las placas de AN con la bacteria se incubaron 2 días a 27° C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se procedió a la siembra del aislado de *B. corticola* correspondiente.

1.3. Siembra e incubación de los medios de cultivo

A partir de placas de PDAA con los aislados de *Botryspaheria corticola* DCA-28 y DCA-32 en crecimiento activo, se realizaron cortes cilíndricos de 5 mm de diámetro con un sacabocados estéril. Estos cilindros se transfirieron al centro de placas de Petri de 9 cm de diámetro con el medio PDA y la correspondiente dosis de fungicida (fungicidas sistémicos, protectores o mezclas) o, en el centro de la mitad de la placa libre del producto biológico previamente sembrado. También se procedió a la siembra de las placas testigo que únicamente contenían el medio de cultivo PDA o AN.

Finalizada la siembra, las placas de Petri se sellaron con Parafilm y se incubaron a temperatura constante de 23° C bajo 12h luz/ 12h de oscuridad en una cámara de crecimiento.

1.4. Evaluación del crecimiento

El crecimiento micelial del patógeno se evaluó a los 2 y a los 4 días de incubación tras las siembras. En el caso de las placas de Petri que contenían el medio de crecimiento con los fungicidas, se midió el diámetro de cada colonia formada en cada placa correspondiente a cada dosis de fungicida. En las colonias con forma circular se midió un único diámetro y en la de tipo elipsoidal o irregular se midieron dos ejes perpendiculares, anotando la media de ambos. El diámetro de la colonia se expresó en mm. Los datos obtenidos se transformaron en mm de crecimiento real, restándole los 5 mm correspondientes al diámetro del cilindro inicial de siembra.

Para los productos biológicos, las placas se observaron a los 2 días y posteriormente a diario hasta un máximo de 7 días.

Para evaluar el crecimiento micelial en presencia de los productos biológicos, se utilizó la escala Badalyan modificada por Campanile *et al.* (2006), basada en la interacción entre antagonista y patógeno. La escala está compuesta por tres tipos de interacción (A, B y C) y por cuatro subtipos (CA1, CA2, CB1 y CB2), donde A equivale a la formación de un cordón micelial entre los dos organismos; B, el cordón micelial se forma a una cierta distancia, sin contacto entre microorganismos; C, no existe cordón micelial y un microorganismo ocupa toda la superficie de la placa; CA1, a pesar de la existencia de un cordón micelial, se produce una ocupación parcial de la superficie de la placa; CA2, igual que anterior pero la placa es totalmente ocupada por uno de los microorganismos, CB1, aunque inicialmente no hay contacto entre microorganismos, se produce una ocupación parcial de la placa; CB2, en este caso la ocupación de la placa es total. Posteriormente, a cada tipo y subtipo de interacción se le asigna un valor: A=1; B=2; C=3; CA1=3,5; CA2=3,5; CB1=4; CB2=4,5 y se calcula el Índice de Antagonismo (IA) para cada fungicida mediante la fórmula:

$$IA = \sum N * I$$

donde N es el número de veces que aparece el tipo o subtipo de interacción e I el valor de la interacción.

1.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos a partir de las placas que contenían el patógeno creciendo en presencia de la dosis correspondiente de cada fungicida químico, se analizaron mediante el programa Statistix 9 (Analytical Software, 2008). A partir del diámetro de crecimiento

real de la colonia de calculó el Índice de Inhibición Relativa de crecimiento (IRC) mediante la expresión:

$$\text{IRC} = \frac{(\text{Dtestigo} - \text{Ddosis})}{\text{Dtestigo}} * 100$$

en la que D = diámetro de la colonia.

Se realizó el análisis de la varianza para cada uno de los fungicidas de naturaleza química, siendo la variable dependiente el IRC y las independientes la concentración de la materia activa y los distintos fungicidas.

2. Eficacia de aplicaciones de fungicidas en campo

Se han realizado dos ensayos de campo para evaluar la eficacia de fungicidas para prevenir la aparición de chancros del tronco producidos por *B. corticola*, uno en la Sierra Norte de Sevilla y otro en el Parque Natural de los Alcornocales de Cádiz.

2.1. Ensayo de campo 1

Localización y descripción de la parcela experimental

En junio de 2004 se eligió una masa pura de alcornocales en dehesa con el fin de comparar la eficacia de diversos fungicidas (Tabla C.3.1). La parcela experimental se estableció en la finca Las Navas y el Berrocal, situada en el término municipal de Almadén de la Plata, Sevilla. Se trata de un monte público con masas mixtas de encinas y alcornocales de distintas edades, cuyo principal aprovechamiento es la caza menor y mayor, además de la ganadería porcina y la obtención de miel.



Figura. Vista parcial de la parcela de ensayo en la finca "Las Navas y El Berrocal"



Figura. Vista parcial de la parcela en la que se realizó el ensayo. Las Navas y El Berrocal



Figura. Árbol marcado con crotal

Se marcaron un total de 400 alcornoques con crotales numerados del 1 al 400, al mismo tiempo que se realizaba una evaluación de la incidencia de la enfermedad en los árboles a descorchar. La elección de la parcela se basó en la accesibilidad de la misma, en el número de árboles disponibles, en las distintas orientaciones que nos podíamos encontrar en la parcela para comprobar si las variaciones de temperatura y humedad que se producen en las diferentes zonas afectaban a la infecciones, y en la proximidad a otra zona que había sido descorchada el año anterior (Figura X), para asegurarnos la

presencia de inóculo natural para que se produjeran infecciones en la parcela experimental.

Diseño experimental

Cada tratamiento se aplicó sobre 30 pies con un diseño experimental de bloques al azar. Se establecieron bloques de 13 árboles de números consecutivos y a cada árbol del bloque se le realizó un tratamiento distinto, incluido el testigo. El número total de árboles tratados fueron 390.

Aplicación de los fungicidas

Este ensayo se realizó en la segunda quincena del mes de julio de 2004. La dosis que se empleó para cada producto comercial se calculó a partir de las dosis recomendadas por el fabricante para cultivos leñosos y en todos los casos el disolvente empleado fue agua.



Figura. Descorche y aplicación de productos en la parcela de ensayo Las Navas y el Berrocal

En el caso de los productos biológicos experimentales, se obtuvieron suspensiones de cada uno siguiendo los métodos descritos en el apartado 2 y utilizándose el agua también como disolvente.

Tabla C.3.1. Materias activas y dosis de los productos fúngicos ensayados en la finca Las Navas y el Berrocal, Sevilla.

<i>MATERIA ACTIVA</i>	<i>DOSIS (PRODUCTO COMERCIAL)</i>
Carbendazima	0,5 g/l
Carbendazima + Flusilazol	1,3 ml/l
Metil Tiofanato	1 g/l
Metil Tiofanato + Sulfato Cuprocálcico (Caldo Bordelés)	1 g/l +10 g/l

Epoxiconazol	2 ml/l
Difenoconazol	0,6 ml/l
Pyraclotrabin	2 gr/l
Folpet + Sulfato Cuprocálcico	10 gr/l
Sulfato Cuprocálcico (Caldo Bordelés)	10 gr/l
Comercial Trichoderma	10 ml/l
Experimental HO-31 (<i>Phoma</i> sp.)	6 x 10 ⁵ ufc/ml
Experimental BO-165 (<i>Bacillus subtilis</i>)	10 ⁸ ufc/ml
Testigo	Agua

La aplicación de los productos se realizó por la mañana a razón de dos productos por día, para evitar las horas de más calor. El medio utilizado para los tratamientos fue un atomizador de mochila de 15 l y la aplicación se realizaba inmediatamente después del descorche, asegurándonos de que toda la superficie descorchada recibiera el tratamiento por igual. El volumen de producto aplicado por árbol varió entre 0,3 y 0,6 l, dependiendo del diámetro del árbol y de la altura del descorche.

En los cuatro primeros tratamientos (Metil-Tiofanato , mezcla Metil Tiofanato y Sulfato cuprocálcico, Carbendazima, el producto comercial mezcla Flusilazol y Carbendazima), después de realizarse la aplicación de los productos, a los árboles tratados les quitaron las zapatas, produciéndose nuevas heridas no tratadas y que pudieran ser posibles vías de infección. Además, algunos de los árboles que se encontraban marcados con crotales no pudieron ser descorchados debido, en algunos casos, al pequeño diámetro que presentaban y, en otros, por la dificultad de la pela, pues eran árboles en los que o bien la casca se arrancaba con el corcho, o bien eran árboles con antiguas lesiones en los troncos en los que incluso se podía observar corcho no sacado de campañas de descorche anteriores.



Figura. Árbol no tratado por presentar diámetro pequeño.



Figura. Árbol no tratado por la dificultad de la pela.

2.2. Ensayo de campo 2

Localización y descripción de la parcela experimental

En julio de 2005 se eligió otra parcela para ensayar los fungicidas con los que se habían obtenido los mejores resultados en los ensayo *in vitro* y los mejores resultados preliminares en el ensayo de campo 1.

En este caso la parcela experimental estaba localizada en la finca Valdeinfierno, muy próxima al arroyo del mismo nombre, situada en el término municipal de Los Barrios, Cádiz. Es una finca de titularidad pública y enclavada en el Parque Natural Los Alcornocales. La masa se caracteriza por una densidad elevada de alcornoques con un aprovechamiento principalmente corchero.



Figura Vistas parciales de la parcela de ensayo Valdeinferno.

La elección de la parcela de ensayo se basó en la accesibilidad de la misma y en la representabilidad de la parcela en la zona. A la misma vez que se fueron marcando los árboles, se realizó una evaluación de la incidencia de la enfermedad.

Diseño experimental

Cada tratamiento se aplicó sobre 30 pies en bloques al azar. Se establecieron bloques de 6 árboles de números consecutivos y a cada árbol del bloque se le realizó un tratamiento distinto incluyendo el testigo, de forma análoga en la realizada en el ensayo anterior, siendo en este caso el número total de árboles tratados de 180.

Aplicación de los fungicidas

Los productos químicos ensayados fueron el Metil Tiofanato y la Carbendazima, y para cada uno de ellos se ensayaron dos tiempos de aplicación: uno inmediatamente después del descorche y otro transcurridas 24 h tras el descorche. En cuanto al tratamiento biológico, se eligió *Trichoderma*. Tanto este tratamiento como el tratamiento Testigo se aplicaron inmediatamente después del descorche. En la Tabla C.3.2. se recogen las dosis de cada producto aplicado.



Figura. Descorche y aplicación de productos en la parcela de ensayo Valdeinfierno

Tabla C.3.2. Materias activas y dosis de los productos ensayados en la finca Valdeinfierno, Cádiz

<i>MATERIA ACTIVA</i>	<i>DOSIS (PRODUCTO COMERCIAL)</i>
Carbendazima	0,5 g/l
Metil Tiofanato	1 g/l
Producto biológico comercial <i>Trichoderma</i>	10 ml/l

La dosis que se empleó para cada producto se calculó a partir de las dosis recomendadas por el fabricante para cultivos leñosos y en todos los casos el disolvente empleado fue agua.

La aplicación de los productos se realizó por la mañana, evitándose las horas de más calor. El medio utilizado fue un atomizador de mochila de 15 l, asegurándonos de que toda la superficie descorchada recibiera el tratamiento por igual. El volumen de producto aplicado por árbol varió entre 0,3 y 0,6 l, dependiendo del diámetro del árbol. Se estableció una altura media de descorche de 1,7 m, debido a que los árboles

presentaban alturas de descorches anteriores inaccesibles desde el suelo (alturas superiores a los 2,5 m).

2.3. Evaluación de los tratamientos

Las parcelas de ensayo fueron evaluadas dos veces al año: una después de las lluvias de primavera y otra después de las lluvias de otoño. En Sevilla, las evaluaciones se realizaron durante los años 2005-2007, con un total de cinco evaluaciones, y en Cádiz durante el período 2006-2008. En dichas evaluaciones, se anotaba la presencia o ausencia de sangraduras y/o chancros en cada árbol, además de consignar si tanto chancros como sangraduras se encontraban asociadas o no a heridas. Además, se anotaba la aparición de nuevas lesiones y la evolución de las antiguas lesiones en el tronco. También se realizaron otras visitas con el único fin de recorrer la zona y observar la evolución de ensayo a grandes rasgos.

La primera visita, después de la aplicación de los productos que se llevó a cabo en la parcela de “Las Navas y El Berrocal”, se realizó en el otoño de 2004 y la primera evaluación se llevó a cabo en febrero de 2005. En dicha evaluación se tomó nota del número de sangraduras y de chancros, además de marcarse los diferentes tipos de lesiones. En la marcación de lesiones se utilizaron chinchetas de cabeza plana con el siguiente código de colores:

- Color verde para sangraduras húmedas.
- Color naranja para sangraduras secas.
- Color amarillo para los chancros.



La segunda evaluación del ensayo localizado en la parcela situada en la finca de Las Navas y el Berrocal fue en noviembre de 2005, una tercera evaluación en junio de 2006, la cuarta en diciembre de 2006 y la quinta, y última, en junio de 2007. También se hizo una visita en junio de 2005, con el único fin de recorrer la parcela de ensayo y observar algún cambio drástico en dicha parcela.

La parcela de ensayo situada en Valdeinfierno, después de la aplicación de los productos, se visitó en el otoño de 2005, llevándose a cabo la primera evaluación en junio de 2006, la segunda en noviembre de 2006, la tercera en junio de 2007, la cuarta en diciembre de 2007 y la última en noviembre de 2008. En este caso, sólo se utilizó un color de chincheta para marcar los chancros en cada evaluación.

En las sucesivas evaluaciones además de anotarse el número de lesiones por árbol, se tomó nota de la longitud de cada uno de los chancros que se observaban en los árboles.

También se tomaron muestras de los chancros de mayor tamaño. Con la ayuda de un martillo y un formón, se cortaron trozos de los bordes de chancros en crecimiento activo, de una longitud aproximada de 5 cm, y se guardaron en bolsas de plástico para su conservación y transporte. Una vez en laboratorio, se procedió a incubarlos en cámara húmeda y a realizarse los aislamientos en el medio genérico PDAA. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 23° C y con un fotoperiodo de 12h/día.

2.4. Análisis de los datos

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Statistix 9 (Analytical Software, 2008). Para realizar los correspondientes análisis estadísticos, se sumaron las longitudes de los chancros que presentaba cada árbol, y los datos del número de chancros correspondientes a cada árbol se transformaron mediante la expresión:

$$Y = (NCH + 0,5)^{0,5}$$

siendo NCH el número de chancro por árbol.

A ambos datos se les realizó un análisis de la varianza y comparaciones de medias se realizaron según el test LSD protegido de Fisher, al nivel de probabilidad del 5%. En los análisis estadísticos no se incluyeron aquellos bloques en los que el árbol en el que se había realizado el tratamiento TESTIGO no presentaba ningún tipo de lesión.

RESULTADOS

1. Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de *B. corticola*

A los dos días tras la siembra de los aislados, los únicos productos que inhibieron el crecimiento de ambos aislados por encima del 90% en todas las concentraciones ensayadas fue la mezcla comercial Fluxilazol y Carbendazima. El Metil-Tiofanato lo hizo a partir de la concentración de 0,1 ppm. A la concentración de 1000 ppm todos inhibieron por encima del 90%, menos el difenoconazol, por otro lado producto comercial mezcla Folpet y Sulfato Cuprocálcico sólo lo hizo a la concentración de 1000 ppm. El producto compuesto por Sulfato Cuprocálcico no inhibió el crecimiento de los aislados a las concentraciones de 1,10 y 100 ppm, por el contrario dieron lugar a valores de crecimiento por encima de los valores del testigo. Sin embargo, se obtuvieron valores de inhibición del 100% para el aislado DCA-28 y del 86% para el DCA-32 a la concentración de 1000 ppm (Figura R.3).

Transcurridos los cuatro días tras la siembra, los resultados obtenidos fueron similares a los de los dos días. Tan sólo destacar que el Sulfato cuprocálcico mostró inhibición de crecimiento cero o próximo a cero a las concentraciones de 1,100 y 1000 ppm (Figura R.4) .

En cuanto a los productos biológicos, la interacción entre estos productos y *B. corticola* se muestran en la tabla R.1. El producto que presenta una mayor actividad antagonista es el experimental *B. subtilis* en todas sus concentraciones, pero la distancia entre la bacteria y el micelio de *B. corticola* disminuye al ir disminuyendo la concentración de bacteria (Fig. R. Biológicos). Los otros dos productos (*Trichoderma* y *Phoma* sp.) no presentan ningún tipo de actividad antagonista, siendo ocupada toda la placa por *B. corticola* sin establecerse ningún tipo de interacción con los productos.

Tabla R.1. Interacción e Índice de Antagonismo entre los productos biológicos ensayados y *B. corticola*.

Producto biológico	Concentración	Tipo de interacción ^a	Índice de Antagonismo ^b
<i>Trichoderma</i>	10 ⁶	-	0
	10 ⁵	-	0
	10 ⁴	-	0
	10 ³	-	0
<i>Phoma</i> sp. (HO-31)	10 ⁶	-	0
	10 ⁵	-	0
	10 ⁴	-	0
	10 ³	-	0
<i>Bacillus subtilis</i> (BO-165)	10 ⁹	CB1	12
	10 ⁸	CB1	12
	10 ⁷	CB1	12
	10 ⁶	CB1	12

^a Valor del tipo de interacción: A=1; B=2; C=3; CA1=3,5; CA2=3,5; CB1=4; CB2=4,5.

^b Índice de Antagonismo = $\sum N * I$, donde N es el número de veces que aparece el tipo o subtipo de interacción e I el valor de la interacción.

Fig R.1. Inhibición del crecimiento micelial de las colonias de *Botryosphaeria corticola* por los productos químicos ensayados a los 4 días de incubación a 23° C en 12 h luz/12 h oscuridad.

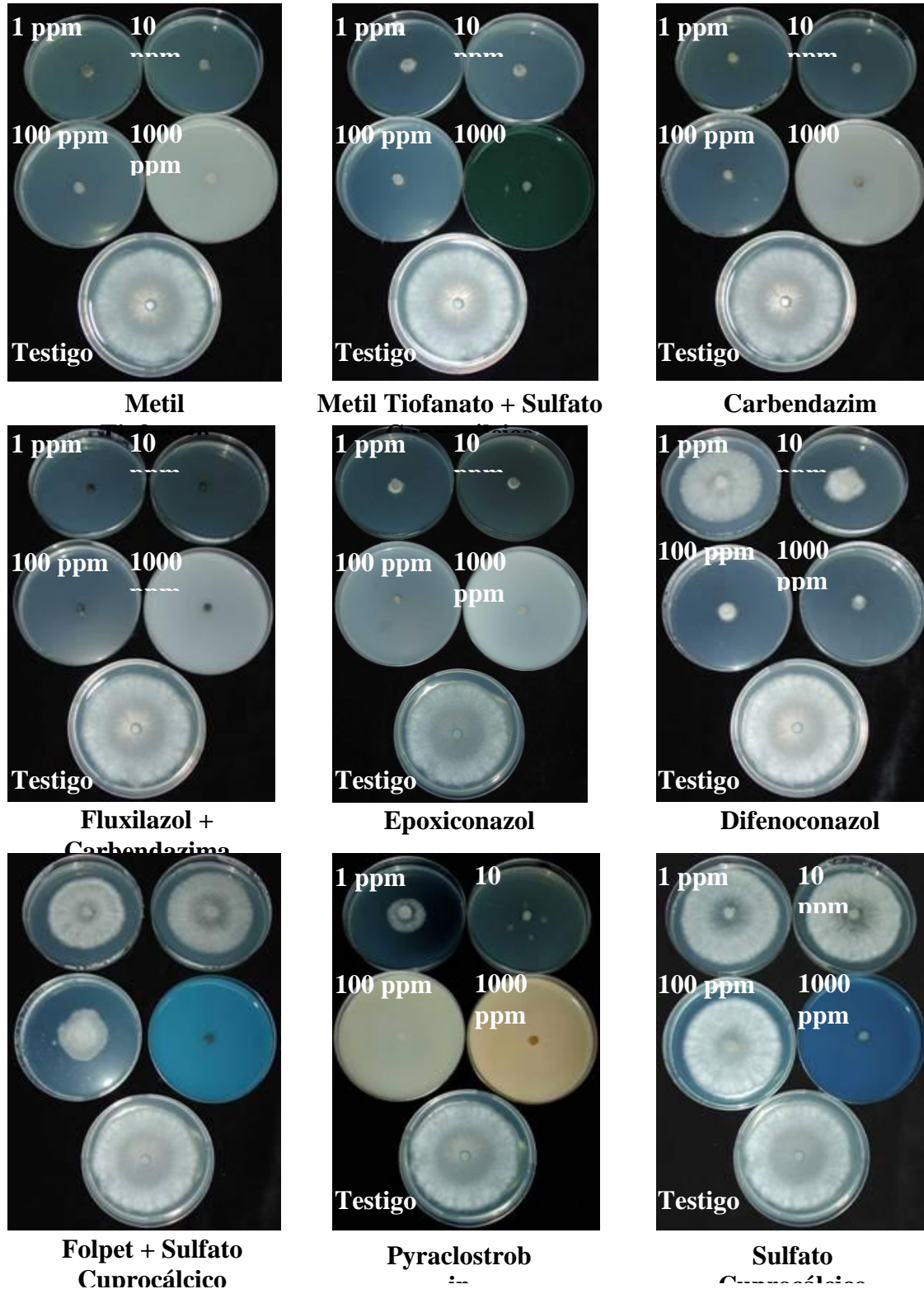
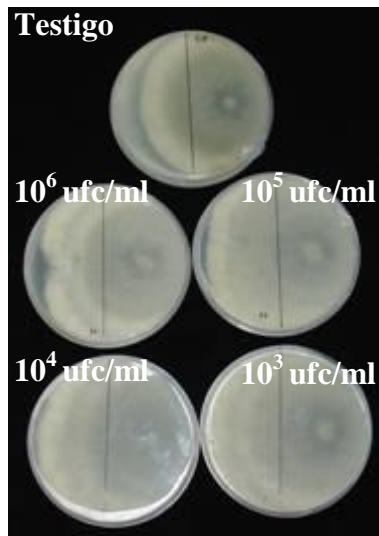
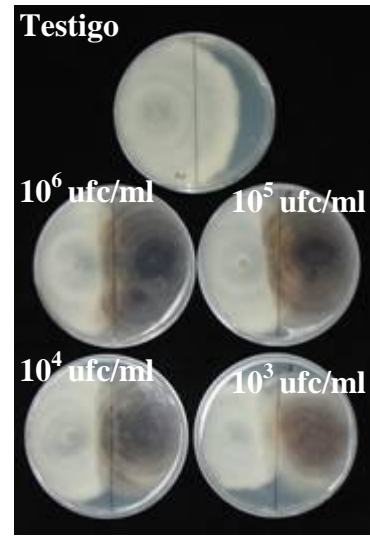


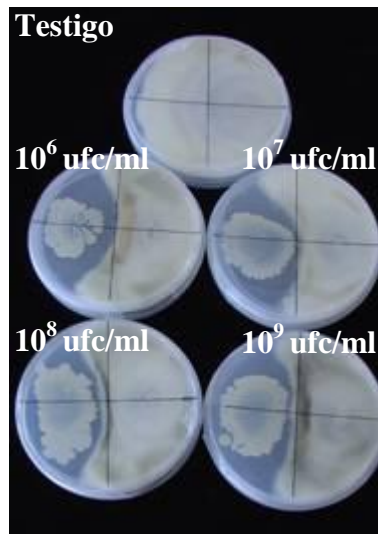
Fig R.2. Inhibición del crecimiento micelial de las colonias de *Botryosphaeria corticola* por los productos biológicos ensayados a los 7 días de incubación a 23° C en 12 h luz/12 h oscuridad.



Trichoderma



Phoma sp.



Bacillus subtilis

Fig. R.3. Inhibición del crecimiento micelial (%) de los aislados de *B. corticola* DCA-28 y DCA-32 a los 2 días de incubación a 23° C en 12 h luz/12 h oscuridad.

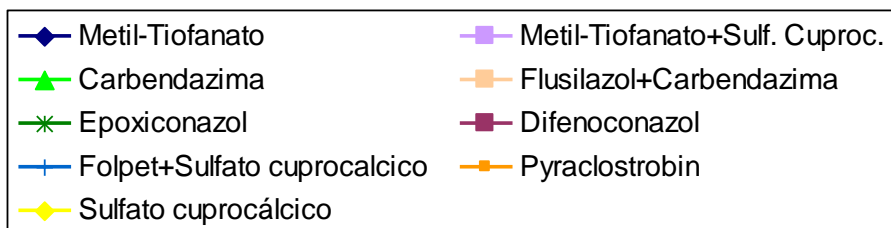
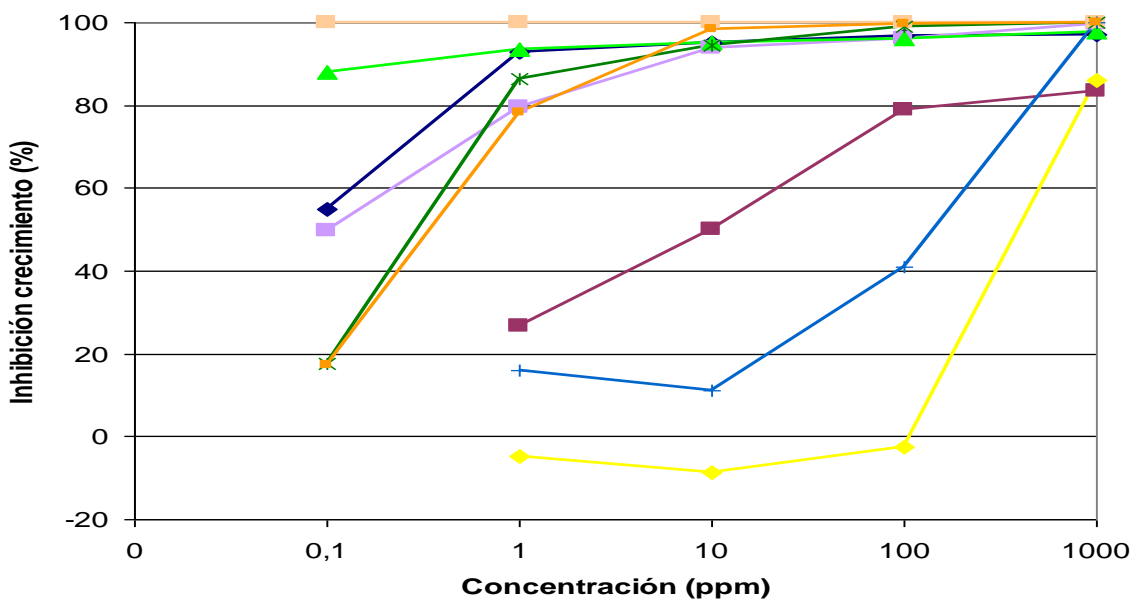
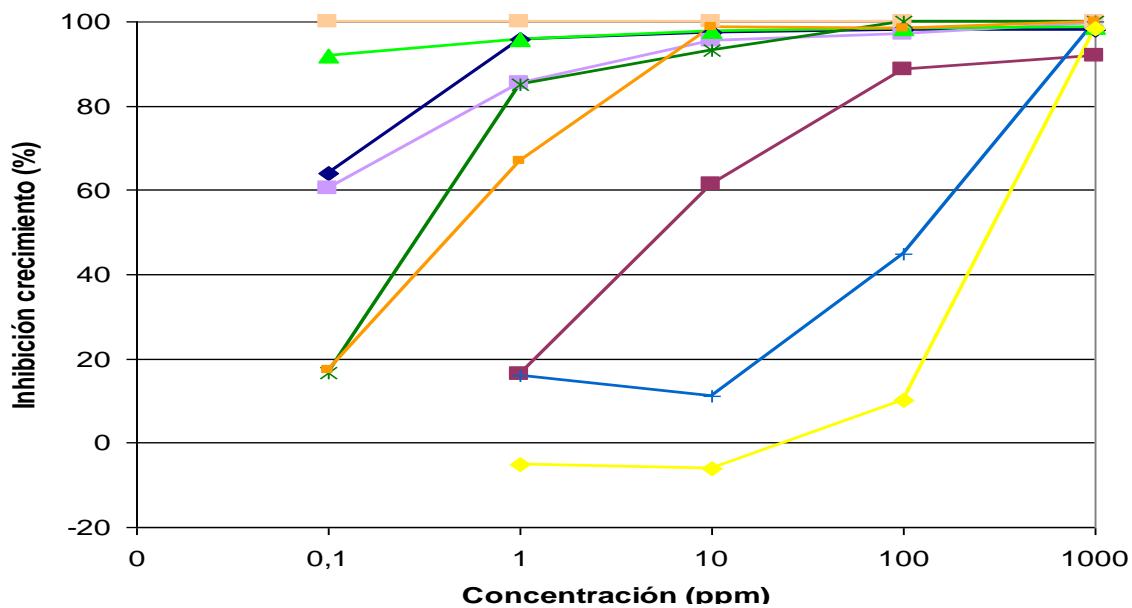
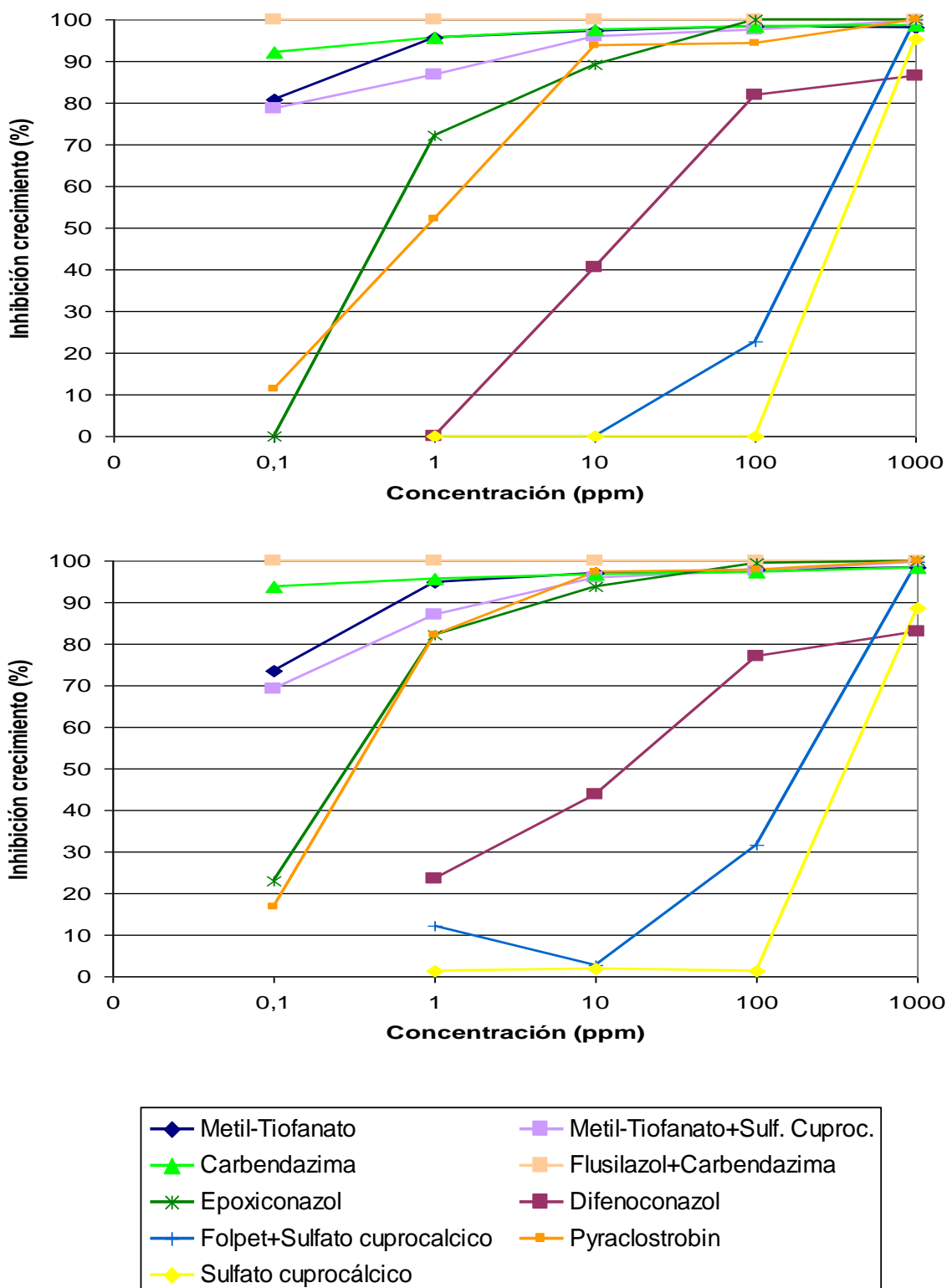


Fig. R.4. Inhibición del crecimiento micelial (%) de los aislados de *B. corticola* DCA-28 y DCA-32 a los 4 días de incubación a 23° C en 12 h luz/12 h oscuridad.



2. Eficacia de aplicaciones de fungicidas en campo

2.1. Ensayo en la finca “Las Navas y El Berrocal” (Sevilla)

Se realizaron un total de cinco evaluaciones desde la aplicación de los tratamientos, dos por año y dos visitas adicionales de evaluación visual del ensayo (otoño del 2004 y primavera de 2005).

En la primera visita a la parcela experimental (noviembre de 2004) únicamente se pudieron observar sangraduras en los árboles tratados y testigo. En según qué individuos, las sangraduras se encontraban asociadas a heridas que se les habían realizado involuntariamente en la casca durante el descorche. El tamaño medio de dichas sangraduras era variable, pero en ningún caso fueron superiores a 5 cm. En otros casos, los troncos presentaban heridas de descorche pero sin ningún tipo de sangradura asociada.



Figura Primera visita, noviembre de 2004:

A) Árbol tratado con Carbendazima. Presencia de sangraduras si y no asociadas a herida.

B) Árbol tratado con Piraclostrobin. Sangradura no asociada a herida.

C) Detalle de chancro pequeño (< 5cm) asociado a herida.

En la primera evaluación (febrero de 2005) se observó una elevada incidencia de sangraduras secas y chancros en la mayoría de los árboles. En esta primera evaluación sólo se marcaron y contaron los chancros por árbol, pero no se midieron tamaños debido a que la longitud media de chancro era inferior a 5 cm. La distribución de chancros y sangraduras fue zonal, los bloques que se encontraban orientados a la zona de descorche del año anterior presentaron un mayor número de árboles con lesiones que los que estaban situados en una vaguada y más alejados de dicha zona. Esta distribución por orientaciones se mantuvo en resto de las evaluaciones.

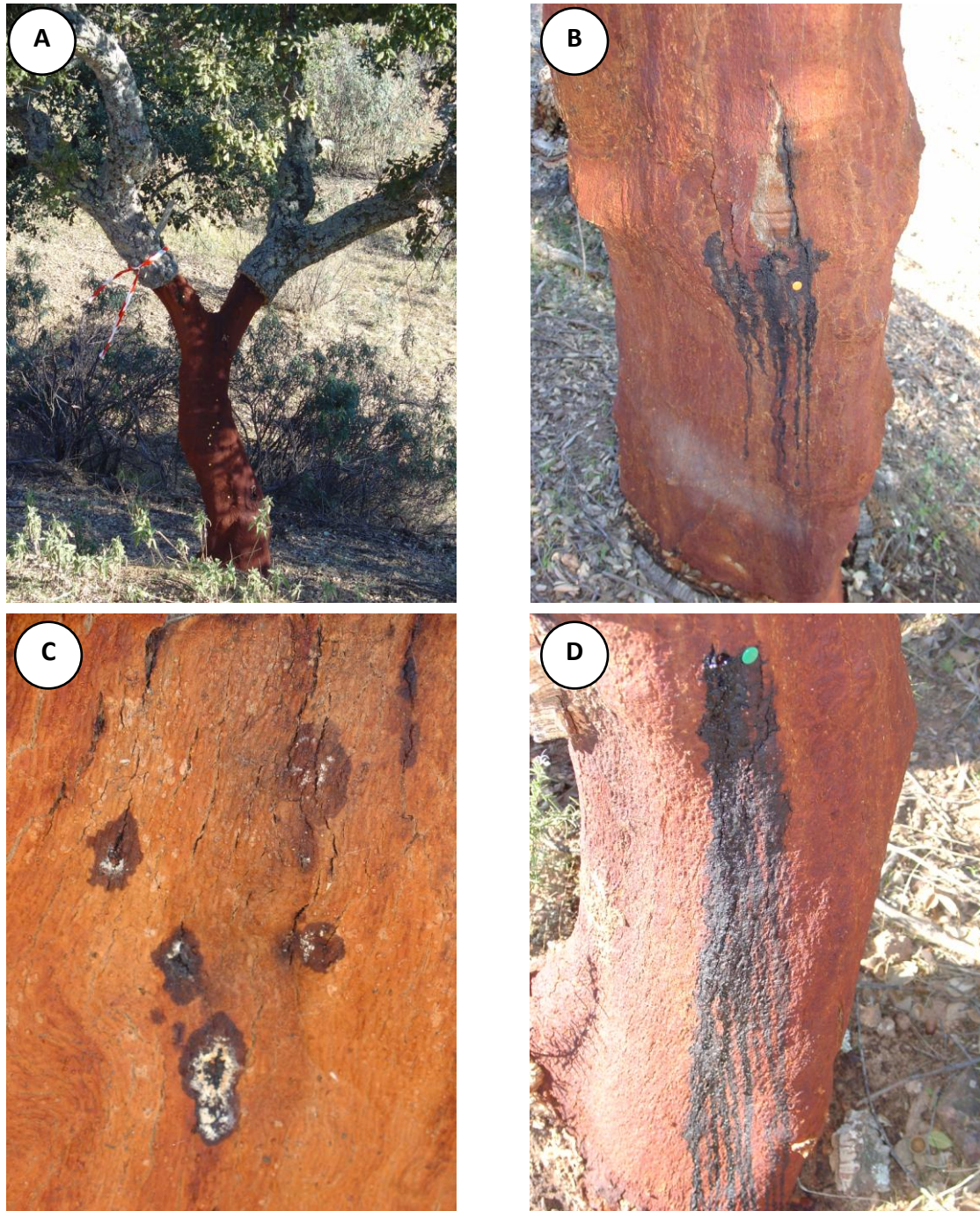


Figura. Primera evaluación. Febrero de 2005:

A) Árbol tratado con Epoxiconazol. Abundante presencia de chancros y una sangradura seca.

B) Árbol con sangradura seca.

C) Detalle de chancros de menos de 5 cm, asociados a heridas, con el centro de color blanquecino.

D) Chancro sangrante húmedo.

En la segunda visita (junio de 2005) se llevó a cabo una evaluación visual de la parcela. En este caso no se apreciaron diferencias con respecto a la presencia de chancros y sangraduras en los árboles tratados y testigos, por lo que no se realizó una evaluación más detallada. Sólo se observó el aumento de tamaño de algunos chancros que en la primera evaluación midieron más de 5 cm y algunas sangraduras secas de pequeño tamaño habían desaparecido.

En la segunda evaluación (noviembre de 2005, inmediatamente después de las lluvias otoñales) se observó un ligero aumento en el número de chancros y en general se mantuvo el de sangraduras secas. Al número de chancros se le realizó el correspondiente análisis estadístico y, una vez procesados los datos, no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, los árboles tratados con Metil Tiofanato y Sulfato Cuprocálcico y el producto biológico *Trichoderma* presentaban un número menor de chancros en comparación con el tratamiento testigo (Tabla A5.3). En esta evaluación tampoco se midieron los chancros.



Figura Segunda evaluación (noviembre de 2005) Cuatro sangraduras secas se han unido en una. Obsérvese la corteza agrietada

En la tercera evaluación (julio de 2006), se recorrió la zona, se evaluó árbol por árbol y se contaron y midieron las lesiones presentes en cada uno de los árboles tratados y testigos. Una vez analizados los datos, se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos para el número de chancros, pero no se observaron estas diferencias en cuanto a la longitud de los mismos. En cualquier caso, los productos con los que se obtuvieron ligeramente los mejores resultados, tanto en longitud de chancro como en el número de los mismos, fue el Metil Tiofanato, la mezcla Folpet – Sulfato Cuprocálcico

y el Sulfato Cuprocálcico, y en cuanto a los productos biológicos fue el producto experimental BO-165 (Tabla A5.3).

En la cuarta evaluación (diciembre de 2006), se realizaron las mismas mediciones que en las evaluaciones anteriores y una vez obtenidos los datos, se analizaron estadísticamente. Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al número de chancros, pero no para la longitud de los mismos (Tabla A5.3). En esta evaluación, los árboles tratados con el producto comercial mezcla Folpet y Sulfato cuprocálcico presentaron a los mejores resultados con respecto a los testigos no tratados en cuanto al número de chancros, seguidos de los árboles tratados con Metil tiofanato y Sulfato cuprocálcico (Tabla A5.3). Con respecto a la longitud de chancros, los árboles en los que se obtuvo una menor longitud de chancro fueron aquellos tratados con el producto comercial mezcla Folpet y Sulfato cuprocálcico, seguidos del producto comercial mezcla Flusilazol y Carbendazima y de los árboles tratados con epoxiconazol (Tabla A5.3).

En la quinta evaluación realizada (Mayo de 2007), se pudo observar en determinados árboles la presencia de chancros cicatrizados de un tamaño de 20-30 cm con un callo bien formado alrededor de la lesión y en ocasiones con desprendimiento de la casca muerta que dejaba a la vista la madera. Estos chancros se presentaban en las evaluaciones anteriores como zonas de corteza deprimidas, agrietadas y parcialmente desprendidas, de tal forma que al golpear sonaban a hueco (Fig. X). La presencia de estos chancros eran más frecuentes en las zonas más bajas de los árboles que habían sido tratado con Metil-Tiofanato, o con la mezcla Metil Tiofanato y Sulfato cuprocálcico, o con Carbendazima, o con el producto comercial mezcla Flusilazol y Carbendazima. De las muestras tomadas de los chancros cicatrizados, no se aisló a la especie *B. corticola*.

Una vez analizados los datos obtenidos en la quinta evaluación, se observaron diferencias significativas entre productos para el número de chancros, pero no se observaron estas diferencias en cuanto a la longitud de los mismos (Tabla A5.3). Los productos con los que se obtuvieron una menor longitud total de chancros fueron el Metil Tiofanato y el producto comercial mezcla Folpet y Sulfato cuprocálcico (Tabla A5.3), siendo también los árboles tratados con Metil Tiofanato los que presentaban un menor número de chancros, seguido de los tratados con carbendazima y Sulfato cuprocálcico (Tabla A5.3).

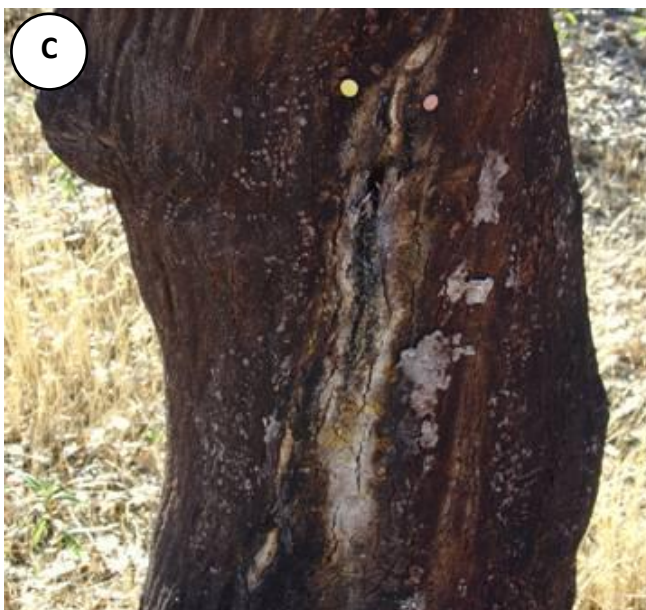


Figura . Tercera evaluación. Julio de 2006:

- A) Lesiones marcadas como chancros de color más claro que el resto de la corteza.
- B) Dos chancro y una sangradura seca que han dado lugar a un único chancro.
- C) Chancro y sangradura seca, sólo aparece el chancro con el centro de color grisáceo y bordes más claros que la corteza.
- D) Chancro con el centro grisáceo, rodeado de corteza de color más claro. Grietas en la corteza.

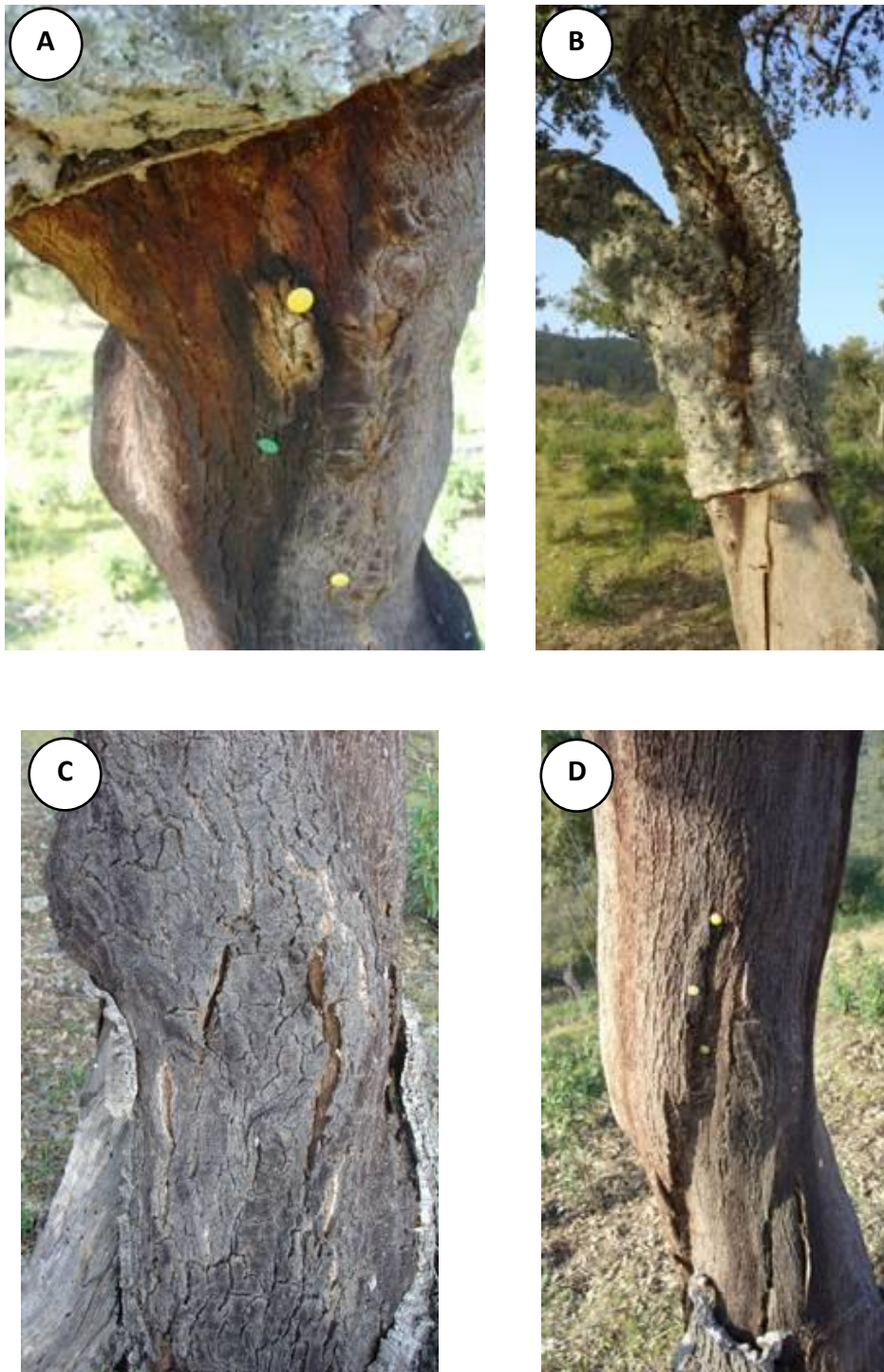


Figura . Cuarta evaluación. Diciembre de 2006:

A) Chancro y sangradura seca, sólo aparece el chancro con el centro de color más claro que la corteza..

B) Corteza agrietada longitudinalmente. Obsérvese que grieta en zona descorchada se encuentra en la misma vertical que la sangradura procedente de la rama.

C) y D) Tronco con corteza agrietada que al golpearla sonaba a hueco.

La sexta y última evaluación realizada (noviembre de 2007) se recorrió la parcela y siguieron observando que en algunos árboles tratados con Metil-Tiofanato, o con la mezcla Metil Tiofanato y Sulfato cuprocálcico, o con Carbendazima, o con el producto comercial mezcla Flusilazol y Carbendazima, en la parte más baja del tronco, la presencia la corteza agrietada y de aspecto más seco, que al golpearla sonaba a hueco. En otros árboles con otros tratamientos también se podía observar ocasionalmente este tipo de lesiones (Fig.) .

Del análisis de datos de esta sexta evaluación se obtuvo que existían diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al número de chancros pero no en la longitud de los mismos (Tabla A5.3). El producto con el que se obtenía un menor número de chancros era el producto comercial mezcla Flusilazol y Carbendazima, seguido del Sulfato cuprocálcico y Piraclostrabin (Tabla A5.3). En cuanto a la longitud de chancro, los árboles tratados con Sulfato cuprocálcico y con el producto comercial mezcla Flusilazol y Carbendazima presentaron una menor longitud de chancro (Tabla A5.3).

Repesto a las sangraduras, no se llevó a cabo ningún análisis estadístico, debido a que no se pudo establecer una relación entre la presencia de dichas sangraduras con su posterior evolución a chancros causados por *B. corticola*. Incluso su número decreció, llegando a desaparecer estos síntomas a lo largo del tiempo en la mayoría de los árboles.



Figura. Quinta evaluación. Mayo 2007:

A) Chancros cicatrizados y visibles tras eliminarse la corteza superficial. Árboles tratados con Carbendazima.

B) Chancro no cicatrizado, no se observa callo alrededor de la lesión. Árbol Testigo.

Fig. Evolución en el tiempo del número medio de chancros para los distintos tratamientos ensayados en la parcela “Las Navas y El Berrocal” (Sevilla).

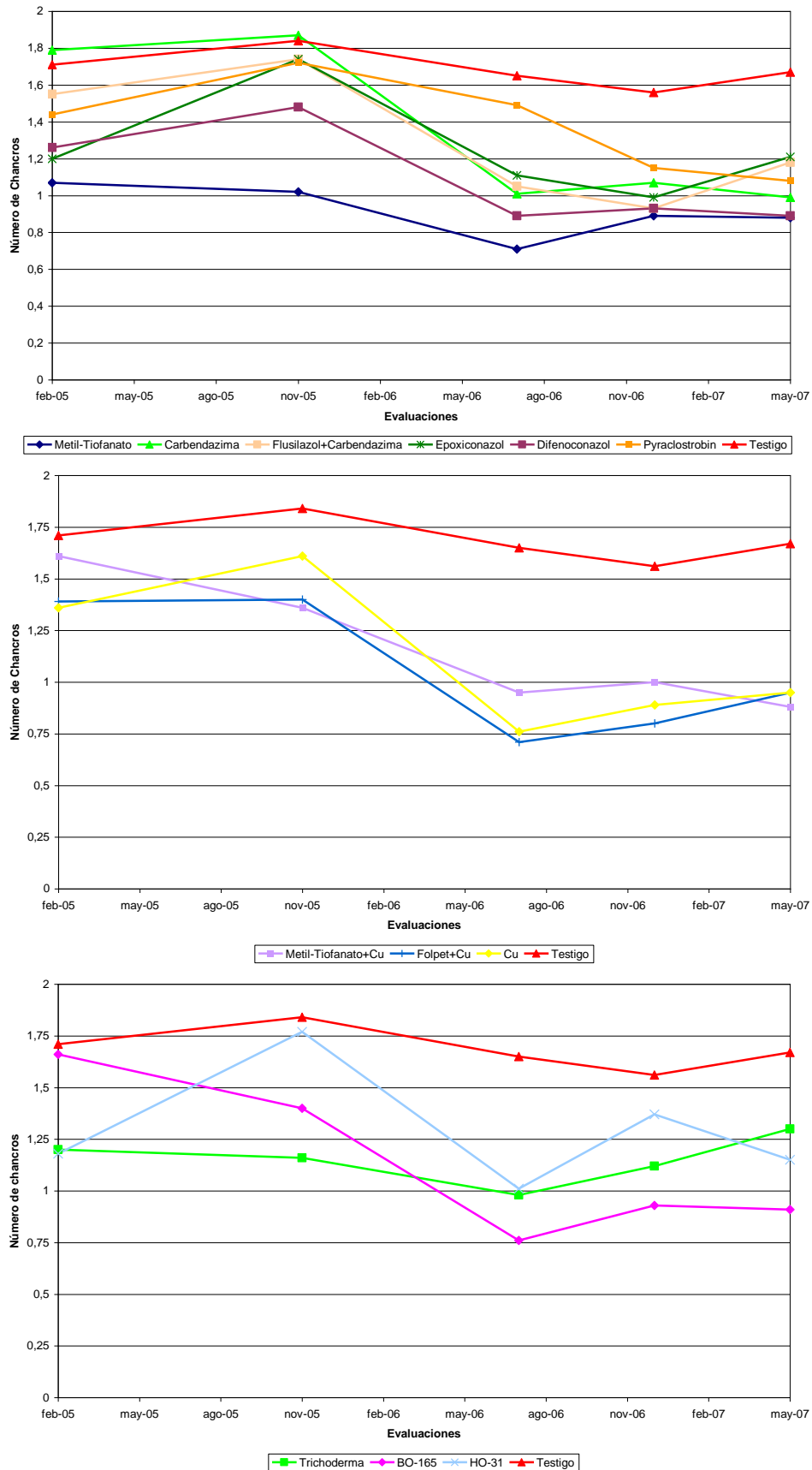
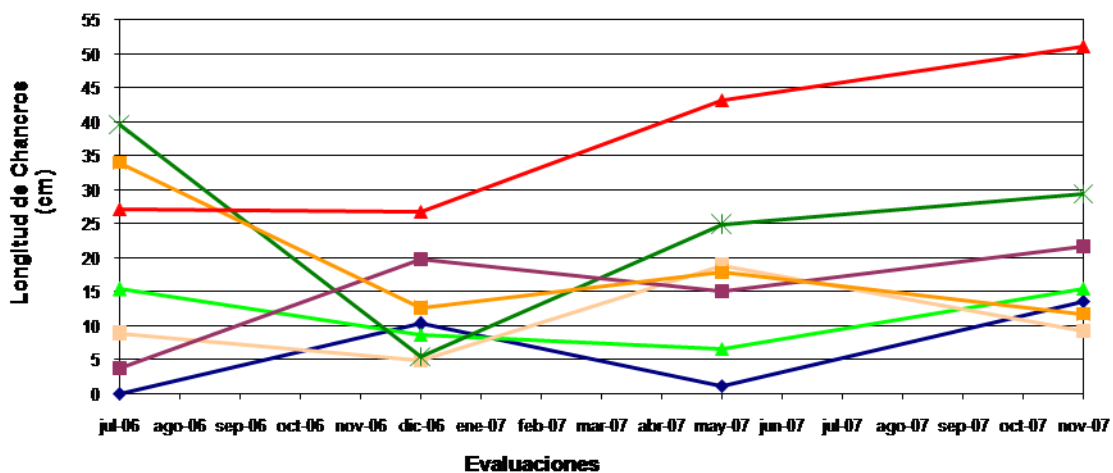
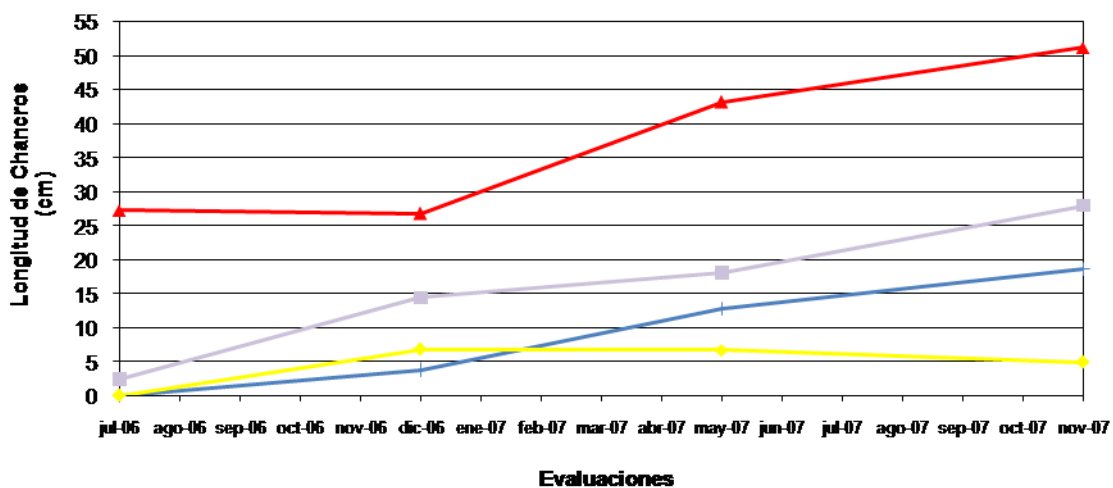


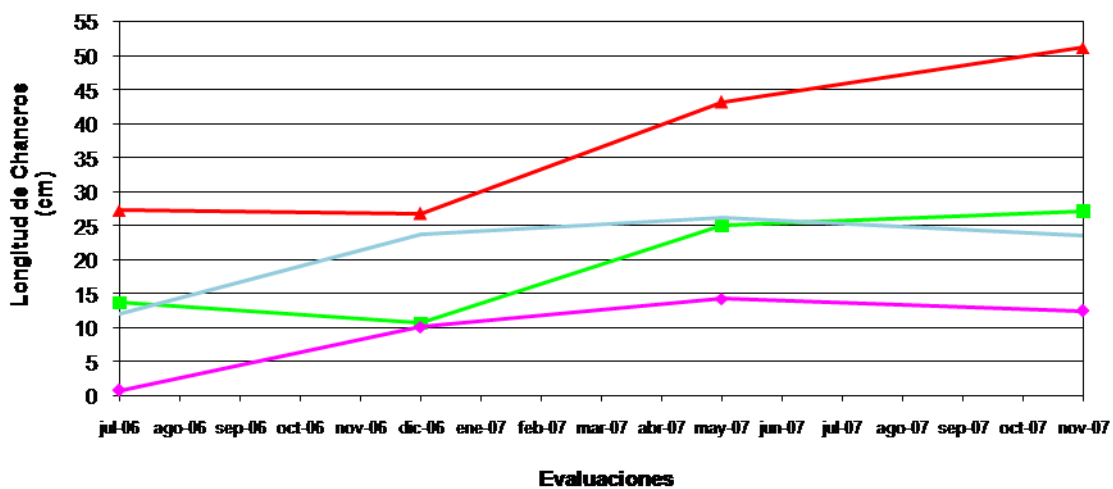
Fig. Evolución en el tiempo de la longitud media de los chancros para los distintos tratamientos ensayados en la parcela “Las Navas y El Berrocal” (Sevilla)



Metil-Tiofanato Carbendazima Fusilazol+Carbendazima Epoxiconazol Difenconazol Pyraclostrobin Testigo



Metil-Tiofanato+Cu Folpet+Cu Cu Testigo



Trichoderma BO-165 HO-31 Testigo

2.2. Ensayo en la finca “Valdeinfierno” (Cádiz)

En la primera visita realizada después de la aplicación de los productos (noviembre de 2005) se observó que mayoría de los árboles presentaba numerosas sangraduras en el tronco asociadas a daños causadas por el insecto *Platipus* sp.. Sólo en algunos árboles se pudieron observar sangraduras que no estaban asociadas a heridas causadas por el insecto. En las siguientes evaluaciones se pudo constatar que la mayoría de las sangraduras causadas por la picadura del insecto desaparecieron sin dar lugar a ningún tipo de lesión cortical.

En la primera evaluación de la parcela (junio de 2006) se marcaron y contabilizaron todos los chancros presentes en cada uno de los árboles tratados y trestigos y se midió la longitud de todos ellos (Tabla A5.2). Además, se anotó el número de sangraduras por árbol. En algunos de los árboles se pudieron observar lesiones más o menos extensas con la parte central de la corteza seca mostrando un color blanquecino, asociadas o no a sangraduras (foto). En otros, la formación inicial de corcho presentaba buen aspecto pero al golpearlo sonaba a hueco. Al número de chancros así como a la longitud total de chancros por árbol se le realizó el correspondiente análisis estadístico (Tabla A5.4). No se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ni entre bloques en ninguno de los casos (Tabla A5.4), si bien los valores más bajos en cuanto a número de los chancros se obtuvieron con el tratamiento con Metil Tiofanato inmediatamente después del descorche y, los mas bajos de longitud de chancro era los de la carbendazima aplicada inmediatamente después del descorche (Tabla A5.4). En cuanto a las sangraduras, fueron más abundantes en los árboles testigo que en los árboles tratados con cualquiera de los productos ensayados (Tabla A5.2).

En la segunda evaluación (noviembre de 2006) se señalaron nuevos chancros y se contaron y midieron todos los chancros presentes en los árboles tratados y en los testigos (Tabla A5.2). En general, se produjo un aumento en el número de chancros así como un aumento de la longitud en los que ya habían sido medidos en la primera evaluación. Se observaron zonas huecas en la corteza que además presentaban grietas en el corcho, que al eliminarlo dejaba ver la casca necrosada delimitada por un callo. El análisis estadístico de los datos dio lugar a resultados similares a los obtenidos en la primera evaluación (Tabla A5.4): no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ni para el número ni para la longitud de chancro, si bien de nuevo los árboles tratados con Metil Tiofanato inmediatamente después del descorche presentaron el menor número de chancros y además de menor tamaño.

En la tercera evaluación (junio de 2007), se produjo un aumento en el número de chancros así como un aumento de la longitud en los que ya habían sido medidos en evaluaciones anteriores. Se volvieron a observar chancros ocultos por el corcho agrietado y que al golpearlos sonaban a huecos principalmente de la mitad hacia debajo de la zona descorchada. El análisis estadístico de los datos de nuevo no dio lugar a diferencias significativas entre tratamientos para el número de chancros, pero sí se han observado estas diferencias en cuanto a la longitud de los mismos (Tabla A5.4), siendo los árboles tratados con el producto Metil Tiofanato y aplicado inmediatamente después del descorche el que presentó longitudes de chancro significativamente menores que los árboles testigo.

En la cuarta evaluación (diciembre de 2007), aumentó el número de chancros y la longitud de aquellos que habían sido medidos en las anteriores evaluaciones (Tabla A5.2). No se obtuvieron diferencias significativas ni de en el número de chancros ni en la longitud de los mismos cuando se realizaron los análisis estadísticos de los datos (Tabla A5.4). Los árboles tratados con el producto Metil Tiofanato y aplicado inmediatamente después del descorche presentaban los valores más bajos en cuanto al número y longitud de chancros (Tabla A5.4).

En la quinta y última evaluación (noviembre de 2008) se pudo observar una disminución drástica en cuanto al número y longitud media de los chancros (Tabla A5.2). Sin embargo, aquellos árboles en los que se había constatado en las evaluaciones anteriores chancros grandes (de más de 30 cm) la longitud de los mismos había aumentado (Tabla A5.2). Por otro lado, se quitaron chinchetas de los troncos (fueron las marcas físicas para señalar los chancros) que no se encontraban asociadas a ningún tipo de lesión. También se pudo observar la presencia de nuevos chancros que no habían sido marcados en las evaluaciones anteriores y que ya presentaban la corteza agrietada y/o parcialmente desprendida del tronco. De nuevo los árboles tratados con Metil Tiofanato y Carbendazima aplicados inmediatamente después del descorche presentaron los valores más bajos en cuanto a la longitud de los chancros observados. Sin embargo el análisis estadístico de los datos no mostró diferencias significativas entre tratamientos ni para el número de chancros ni para la longitud de los mismos (Tabla A5.4).

Cabe destacar que los árboles tratados con algún producto inmediatamente después del descorche presentaron tanto el número como la longitud de los chancros menor que el testigo y los árboles tratados veinticuatro horas después con Metil

Tiofanato o Carbendazima. Incluyendo el producto biológico *Trichoderma* (Tabla A5.4).



Fig. Sangraduras observadas durante la visita realizada en noviembre 2005. Nótese la abundancia de picaduras de *Platypus* sp. asociadas a la presencia de sangraduras en el árbol que aparece en primer plano y la ausencia de las mismas en el árbol que aparece en segundo plano



Figura. Primera evaluación. Junio de 2006:

A) Tratamiento Carbendazima 24 horas tras el descorche. Obsérvese el alto número de chancros.

B) Tratamiento Testigo. Chancro con corteza agrietada, exudado de color oscuro con el centro de color blanco.

C) Tratamiento Metil Tiofanato. Presencia de manchas oscuras, con el centro de color blanco.

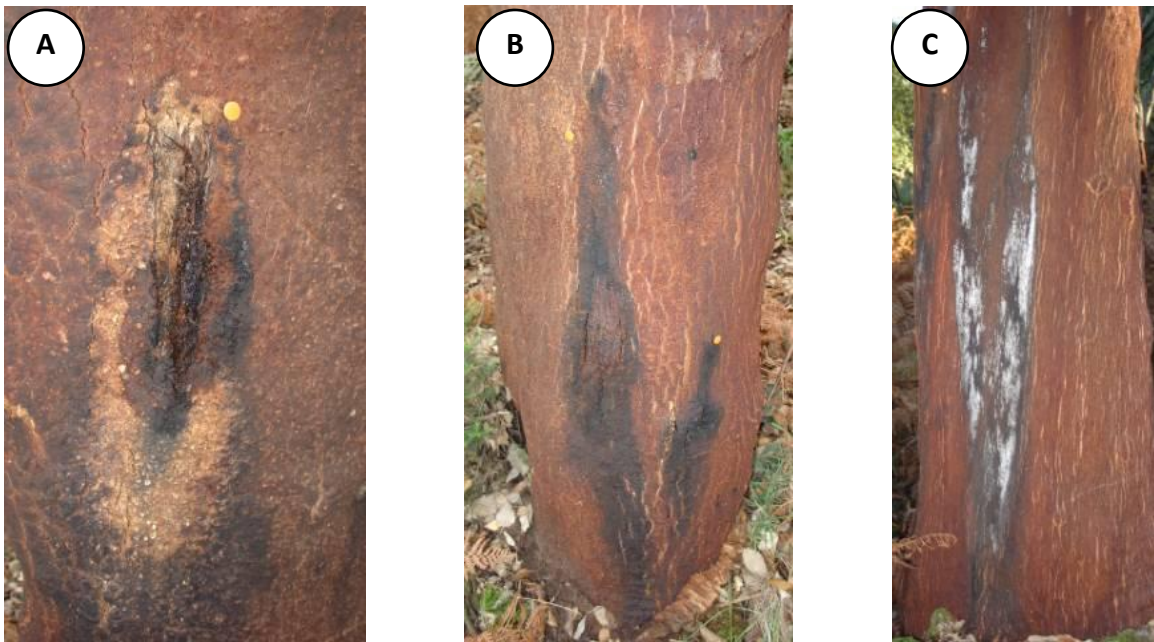


Figura. Segunda evaluación. Noviembre 2006.

A) Tratamiento Carbendazima. Chancro con callo rodeado de un tono más claro que la corteza.

B) Tratamiento Metil Tiofanato aplicado 24h tras el descorche. Corteza agrietada en exudado antiguo, cuando se golpea suena a hueco.

C) Tratamiento Trichoderma. Mancha extensa de color blanco, asociada a un exudado antiguo.



Figura. Quinta evaluación Noviembre de 2008. Tratamiento Metil Tiofanato aplicado 24h tras el descorche. Los chancros han desaparecido y quedan pequeñas manchas de color más claro que la corteza.

Fig. Evolución en el tiempo del número medio de chancros para cada tratamiento en la parcela “Valdeinfierno” (Cádiz).

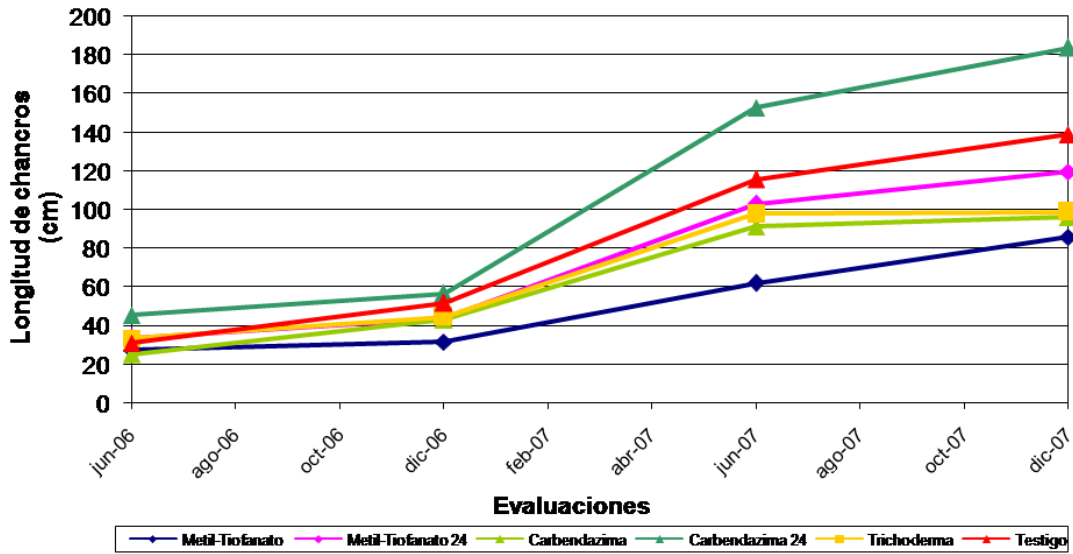
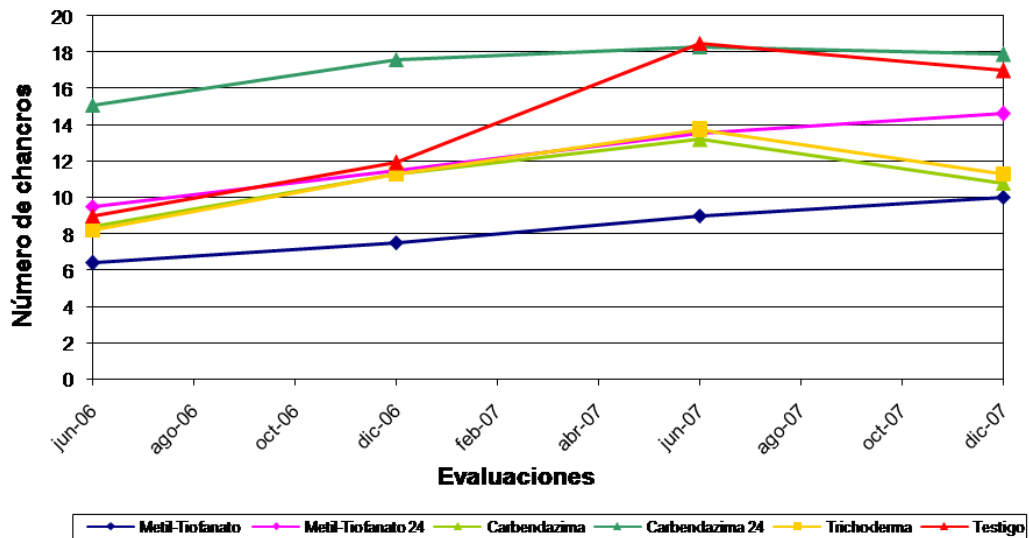


Fig Evolución en el tiempo de la longitud media de los chancros para cada tratamiento en la parcela “Valdeinfierno” (Cádiz).



DISCUSION

A la vista de los resultados obtenidos en la inhibición de crecimiento micelial los mejores productos que podrían recomendarse para su aplicación son el Metil Tiofanato, la Carbendazima y también esta última mezclada con Fluxilazol. Y los productos más desaconsejados para su utilización a concentraciones bajas serían el Sulfato Cuprocálcico sólo o en mezcla con Folpet y el Difenconazol. En cuanto a los productos biológicos, sólo ante *Bacillus subtilis* (BO-165) *B. corticola* mostró cierto inhibición de crecimiento. Algunos autores (Wei-Qun y Michailides, 2001; Xiang-Tian *et al.*, 2011) han realizados ensayos de control de diferentes especies de *Botryosphaeria in vitro* e *in vivo* con el género *Bacillus*, incluso con esta especie, obteniendo buenos resultados y considerándola como un posible buen agente biológico para el control de *Botryosphaeria* spp.

Se ha podido observar que la evolución del estado fitosanitario de los árboles en las parcelas de ensayo ha sido la misma en cuanto a la aparición de síntomas (sangraduras, chancros, corcho agrietado en las zonas más bajas del tronco), si bien en la parcela de Valdeinfierno (Cádiz) estas lesiones se desarrollaron antes en el tiempo que en las parcela de Las Navas y el Berrocal (Sevilla). Puede que se haya debido a las diferencias de temperatura, humedad y lluvia que se dan en cada una de las parcelas. Las temperaturas suaves y la elevada humedad que se registra habitualmente en la finca Valdeinfierno en comparación con las condiciones más secas de la Sierra Norte sevillana donde se ubica la finca Las Navas y el Berrocal (Junta de Andalucía, 2007) favorecen el desarrollo de la enfermedad, como se ha comprobado en ensayos de laboratorio con rama cortada en condiciones controladas y en plantas en umbráculo (Luque *et al.*, 2000; Sánchez *et al.* 2003).

Los productos que han dado mejor resultados en los ensayos de campo han sido el Metil Tiofanato y la Carbendazima. Estos coinciden en parte con los datos obtenidos en Cataluña que obtienen los mejores resultados con el Metil Tiofanato (Luque *et al.*, 2004). Hay que destacar que ambos productos dan una buena protección frente a *B. corticola* cuando se aplican inmediatamente después del descorche, ya que cuando la aplicación se realiza 24 h después del descorche, como se observó en la parcela de ensayo de Valdeinfierno, se pierde completamente su efectividad. Así pues, de los resultados de nuestro trabajo se desprende que las 24 h inmediatamente después de efectuado la saca del corcho es el momento crítico para que tenga lugar la infección fúngica de la corteza recién descorchada, ya que la aplicación de estos fungicidas

sistémicos con posterioridad a este momento crítico, al no evitar las infecciones ocurridas durante las primeras 24 h, resultan completamente ineficaces.

En el ensayo de la parcela situada en Las Navas y El Berrocal también aparece el Sulfato Cuprocálcico como un producto efectivo al dar lugar a una menor longitud de los chancros. Esto coincide con los datos obtenidos en laboratorio para la inhibición del crecimiento micelial, pues la dosis empleada en campo resulta superior a la dosis máxima de 1000 ppm utilizada en el ensayo de laboratorio. Este resultado contradice el obtenido por Luque *et al.* (2004), que concluyen que los fungicidas basados en cobre (sulfato e hidróxido) presentan una eficacia protectora nula o muy baja frente a la enfermedad. Esto puede ser debido a la posible utilización de concentraciones más bajas en cuanto a la materia activa o a las diferencias climáticas en las distintas zonas de ensayo (Cataluña y Sierra Norte sevillana). Los valores más altos de humedad que se registran habitualmente en los alcornocales catalanes (Blanco *et al.*, 1998) en comparación con la Sierra Norte de Sevilla podrían explicar el porqué de estas diferencias en cuanto a la eficacia de los derivados cúpricos. Aunque la eficacia del sulfato cuprocálcico solo o mezclado con algún fungicida sistémico no se ha ensayado en las condiciones más húmedas del Parque Natural de los Alcornocales, éste es un punto a considerar en futuras investigaciones.

La cicatrización de heridas de pequeño tamaño, en ambas parcelas de ensayo, con la consiguiente disminución en el número de chancros visibles pudo ser debido a la formación de nuevo corcho, ocultando las lesiones iniciales. Estas lesiones ocultas pueden ser las responsables de la mala saca del corcho, pues cuando se realiza la pela en estas lesiones es posible o que la capa madre se quede pegada al corcho o que le corcho se quede pegado al tronco. En ambos casos, la producción de corcho disminuye en esa zona, siendo el primero de ellos el que más perjudica al árbol, pues la madera queda expuesta y puede ser atacada por hongos de pudrición e insectos que junto a las pelas sucesivas aumento de tamaño de los chancros, debilita por esa zona al tronco, que en días con mucho viento, pueden partir al árbol por ese punto y llegar a matarlo.

Ninguno de los productos biológicos ha dado buenos resultados en campo para poder utilizarlos frente a *Botryosphaeria*. Sin embargo, en el ensayo que se realizó en la parcela de Valdeinfierno (Cádiz), el producto comercial de *Trichoderma* daba mejores resultados en cuanto al número y longitud de chancros que el Metil Tiofanato y la Carbendazima aplicados 24h después del descorche, por lo que la aplicación de este producto en árboles recién descorchados ejerce una cierta protección frente a *B.*

corticola. Hay trabajos, realizados en ramas y plántulas, que señalan la posible utilización de hongos antagonistas, especies del género *Bionectria*, *Dictyochoaeta*, *Fusarium* y *Alternaria*, para el control de *B. corticola* en *Quercus* sp. (Campanile *et al.*, 2006; Franceschini *et al.*, 2006).

En cuanto a las exudaciones oscuras más o menos abundantes observadas en los troncos descorchados y tratados, en las que no se pudo establecer una relación directa con las lesiones causadas *B. corticola*, ni con ningún otro tipo de agente, pone de manifiesto que dichas exudaciones no tienen porqué estar asociadas directamente con ningún ataque externo, y en ocasiones han sido el resultado directo de picaduras de insectos. Estas exudaciones tampoco estuvieron siempre asociadas a las heridas realizadas involuntariamente durante el descorche, por lo que podrían ser consecuencia de microheridas producidas al separar el corcho de la casca. De hecho, el efecto del descorche en el árbol podría considerarse como el de una gran herida por sí mismo, independientemente de las pequeñas heridas causadas por los operarios en la casca (Vieira, 1991).

El Metil Tiofanato, como materia activa, se encuentra incluido en el Anejo I según la Directiva 2005/52/CE sobre productos fitosanitarios y está autorizada para su uso agrícola en el control de chancros causados por otras especies de *Botryosphaeria* en cultivos leñosos (Vademecum 2012). En cambio, la carbendazima, aunque se encuentra incluida en dicho Anejo, tiene muy limitado su uso. Debido a esto y por los resultados obtenidos tanto en este trabajo, así como los resultados de Luque *et al.* (2007), el Metil Tiofanato debe ser considerado como un producto a aplicar en los alcornocales andaluces tras el descorche para el control de *B. corticola*.

***CAPITULO 7. DISCUSIÓN GENERAL Y
CONCLUSIONES***

Discusión General

Los decaimientos de las masas de *Quercus* de la cuenca mediterránea se vienen observando desde principios de los años 80 (Montoya, 1994). A este decaimiento en el suroeste de la Península Ibérica se le dio el nombre de “Seca”, entendiéndose como tal cualquier modificación del estado vegetativo normal de encinas y alcornoques, independientemente de los síntomas concretos que se observen (Carrasco *et al.*, 2009). Sin embargo, los síntomas aéreos que se originan como consecuencia de la pérdida de vigor de las masas de *Quercus* son muy inespecíficos. Cuando se hace una observación detallada de estos síntomas y se describe su distribución espacial y su evolución temporal, se pueden diferenciar los efectos de una sequía prolongada de los síntomas de una enfermedad (Carrasco *et al.*, 2009).

A finales del siglo pasado se realizó un censo de focos de Seca con el objetivo último de identificar el o los agentes causales del deterioro de las masas de *Quercus* en Andalucía (Navarro *et al.*, 2004). Para ello se tomaron muestras de raíz y de la parte aérea con síntomas como muerte regresiva de ramas, clorosis en las hojas, marchitez y presencia de ramillos secos con hojas marchitas en zonas aisladas de la copa. Cuando se hizo una observación detallada de determinadas ramas que todavía tenían prendidas hojas secas, se pudieron ver lesiones corticales (chancros) en esas ramas. Dichos chancros aparecían como zonas alargadas de corteza necrosada, y cuando se eliminaba la corteza superficial se podía diferenciar la zona oscura y de aspecto más seco de la zona amarillo-verdosa de la corteza sana, de la misma manera que ocurre en otros huéspedes, como en el eucalipto (Davison y Tay, 1983), el nogal europeo (Rumbos, 1987) o la jara pringosa (Sánchez *et al.*, 2002). Este tipo de síntomas en ramas también se observaron en muestras que enviaron los Técnicos de la Junta de Andalucía procedentes de la Red Andaluza de Seguimiento de Daños sobre Ecosistemas Forestales (RASDEF). Estos síntomas aparecen asociados a los chancros presentes en ramas muertas como consecuencia de infecciones fúngicas observadas en cultivos leñosos, especialmente frutales de hueso y pepita (Tuset, 1996; Zhonghua Ma *et al.*, 2001; Slippers *et al.*, 2007) y también en numerosas especies forestales (Sinclair *et al.*, 1987).

De los aislamientos de los chancros de esas ramas procedentes de distintos puntos de Andalucía, se obtuvieron consistentemente asociadas tres especies fúngicas correspondientes al género *Botryosphaeria*. Para dicho género, de entre las

enfermedades que produce, destacan por encima de todas, los chancros y la muerte regresiva de ramas en especies forestales, y en menor medida, en frutales, matorrales leñosos y especies herbáceas (von Arx, 1987).

Las tres especies de *Botryosphaeria* identificadas en este trabajo corresponden a *Diplodia corticola* (teleomorfo *B. corticola*), *Dothiorella iberica* (teleomorfo *B. iberica*) y *Fusicoccum aesculi* (teleomorfo *B. dothidea*) (Alves *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2005). *Dothiorella corticola* fue la especie más frecuentemente aislada de todas las muestras procedentes de los focos de Seca y de los puntos de la RASDEF, seguida de *D. iberica* y *F. aesculi*, en este orden. Estas especies se aislaron de las ramas procedentes de todas las provincias de las que se enviaron muestras, menos de Almería. Esta amplia distribución de *Botryosphaeria* en las masas de encinas y alcornoques de Andalucía pone de manifiesto la distribución cosmopolita del género (Jacobs y Rehner, 1998).

El elevado porcentaje de aislamiento de *B. corticola* hace pensar que esta especie se comporta como un patógeno primario de *Quercus* en Andalucía, al igual que para diferentes especies de *Quercus* en Italia (Carrasco *et al.*, 2009). Por otro lado, *B. iberica* y *B. dothidea* podrían actuar principalmente como factores de decaimiento, causando lesiones en ramas de árboles debilitados (Carrasco *et al.*, 2009).

En las mismas zonas de la toma de muestras de ramas, se observaron alcornoques cuyos troncos presentaban lesiones de distinto tipo y tamaño. Las lesiones corticales observadas en algunos casos seguían las líneas de descorche y presentaban la corteza abultada y agrietada, que en ocasiones dejaban ver la madera. Las zonas que quedaban entre las lesiones descritas aparecían aplanadas, provocando la pérdida de la forma cilíndrica del tronco. Otro tipo de síntomas observados fueron lesiones restringidas de la corteza (chancros) de distinto tamaño, circundadas por el característico callo rodeando la lesión y apareciendo en el interior de ella la madera expuesta hacia el exterior. Estos chancros podían llegar a alcanzar la longitud de la zona descorchada, pero en ningún caso se observó la presencia de alcornoques anillados como los observados en Cataluña (Luque y Girbal, 1989). Lo que si se observó fue la presencia de ejemplares partidos por el punto en el que se encontraba el chancro de gran longitud, pues la madera expuesta es un punto de infección preferente tanto para insectos xilófagos como para hongos de podredumbre de la madera (Junta de Andalucía, 2007).

De las muestras procesadas procedentes de chancros del tronco de alcornoques, únicamente se aisló al estado teleomórfico (*B. corticola*) de una muestra procedente de un árbol que había sido descorchado 2 años antes. Esto pone de manifiesto la dificultad de encontrar el estado sexual en el género *Botryosphaeria* en el medio natural (Crous *et al.* 2006).

El bajo índice de aislamiento tanto de *B. iberica* como de *B. dothidea* a partir de lesiones corticales de ramas de *Quercus*, así como su ausencia en lesiones del tronco de muestras procedentes de puntos de la RASDEF, pudo ser debido a que las muestras fueron tomadas en verano, con altas temperaturas y escasa humedad ambiental, que junto a las temperaturas óptimas de crecimiento que presentaron los aislados en los experimentos *in vitro* (*B. corticola* y *B. dothidea* alrededor de 25° C, con un crecimiento lento a 35° C, y *B. iberica*, con temperatura óptima de crecimiento a 21° C, sin crecimiento a 35° C) hace pensar que quizá el momento en el que se tomaron las muestras no era el más adecuado. Pero también es un indicio de que *B. corticola* se muestra como un patógeno primario de ramas en ambas especies de *Quercus* y en tronco de alcornoque, mientras que las otras dos especies serían patógenos de debilidad capaces de producir chancros en ramas únicamente en árboles debilitados por el decaimiento (Carrasco *et al.*, 2009).

Los ensayos encaminados a establecer la relación anamorfo-teleomorfo de las tres especies de *Botryosphaeria* realizados sobre palillos de madera y tallos de plantas susceptibles dieron resultados negativos, si bien se observó la presencia de espermogonios y espermacias. Pero en ningún caso se produjo la formación de ascocarpos, ni en medios de cultivo artificiales, hecho ya descrito por Slippers *et al.* (2007) en este género, ni en los otros ensayos sobre palillos de madera o tallos infectados artificialmente. Del mismo modo, de las ramas y trozos de corteza afectadas de chancro de las parcelas de muestreo sólo se obtuvieron estructuras de reproducción asexual.

Las masas de *Quercus*, más concretamente encinares y alcornocales, son los bosques más representativos de la Península Ibérica seca. En estado natural, es muy probable que estos ecosistemas forestales presentaran una alta diversidad en el estrato arbóreo, siendo abundantes las formaciones mixtas de varios *Quercus*, con especies acompañantes como el madroño, el durillo y el labiérnago y, en las zonas más cálidas, el mirto, la coscoja, el acebuche, el lentisco e incluso, el algarrobo (Blanco *et al.*, 1998).

Dichas especies pueden ser huéspedes alternativos de *Botryosphaeria* spp., sobre todo *B. corticola*, como se ha podido constatar en los ensayos de inoculación artificial de diferentes especies de *Quercus* (encina, alcornoque y coscoja) y dos variedades de olivo (Gordal y Picual) con diferentes aislados de *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *Neofusicoccum mediterraneum*.

El carácter de patógeno primario de *B. corticola* constatado en estos ensayos concuerda con los resultados obtenidos por Sánchez *et al.* (2003) y Tsopelas *et al.* (2009) en ramas cortadas y ramas en el medio natural en encina y coscoja, respectivamente. También queda demostrada la preferencia de la especie *Neofusicoccum mediterraneum* sobre olivos de la variedad Gordal, descrita por otros autores (Romero *et al.*, 2005; Moral *et al.*, 2010) en condiciones controladas.

La especie *Q. coccifera* (coscoja) inoculada con *B. corticola*, fue la que presentó un mayor tamaño de los chancros, además de presentar abundantes exudados a partir del punto de inoculación. Los resultados de este trabajo en cuanto a la inoculación con *Botryosphaeria* spp. en coscoja, junto al de Tsopelas *et al.* (2009) también en coscoja y el de Sánchez *et al.* (2002) en jara pringosa, pone de manifiesto que las especies vegetales acompañantes en las masas de encinas y alcornoques pueden actuar como huéspedes o como fuentes de inóculo adicionales para la infección de las especies principales.

En cuanto al control de *Botryosphaeria* spp., y más concretamente para los chancros del tronco en alcornoque, por ser la extracción del corcho una de las actividades de los montes alcornoques que generan importantes ingresos económicos en determinadas zonas rurales (Junta de Andalucía, 2009), se ha obtenido como principal resultado que los mejores productos sustitutivos del Benomilo para aplicar inmediatamente después del descorche son los fungicidas sistémicos Metil-Tiofanato y Carbendazima en las parcelas de ensayo situadas en las provincias Sevilla y Cádiz. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Luque *et al.* (2008) para los alcornoques catalanes. Por otro lado, en la parcela situada en la provincia de Sevilla, el Sulfato Cuprocálcico da buenos resultados en cuanto a la disminución significativa de la longitud de los chancros, confirmándonos los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*. La eficacia de la utilización de este producto como fungicida para el control de chancros en alcornoques en Andalucía se tendría que comprobar en las mismas condiciones climáticas que el Metil-Tiofanato y la Carbendazima (en parcelas más

húmedas situadas en los alcornoques de Cádiz), ya que otros ensayos realizados en condiciones naturales más húmedas que en las de las dehesas de alcornoque sevillanas, muestran la escasa capacidad de inhibición de los derivados cúpricos frente a *B. corticola* (Luque *et al.*, 2004).

En cuanto a los productos biológicos, *B. corticola* mostró cierta inhibición del crecimiento micelial *in vitro* frente a *Bacillus subtilis* (BO-165), bacteria ya estudiada por otros investigadores obteniendo resultados similares (Wei-Qun y Michailides, 2001; Xiang-Tian *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en los ensayos de campo con este producto indica que disminuye considerablemente la longitud de los chancros frente a los árboles testigo, pero no su número, obteniendo similares resultados con los otros dos productos biológicos en ambas parcelas. Por lo tanto, no resultan tan eficaces como los fungicidas sistémicos Metil-Tiofanato y Carbendazima para el control de *B. corticola* en campo.

Cabe destacar que la utilización de fungicidas para el control de *B. corticola* lo que hace es disminuir tanto el número de chancros como la longitud de los mismos, pero no protege totalmente a los árboles del ataque de dicho hongo. Por tanto, unas buenas prácticas culturales (por ej., la eliminación de las zapatas durante el descorche, antes de la aplicación de fungicidas, la aplicación de los fungicidas protectores inmediatamente después del descorche), junto a unas condiciones ambientales favorables para el descorche (baja humedad en el ambiente, ausencia de viento extremadamente seco) (Junta de Andalucía, 2009) y la aplicación de productos formulados para poder ser transportados y aplicados fácilmente a las masas de alcornoques, posiblemente reduciría considerablemente la formación de chancros en sus troncos.

CONCLUSIONES

1. El chancro de *Quercus* spp. es una enfermedad que afecta a montes y dehesas andaluzas, pudiéndose encontrar en cualquier zona en la que se encuentre presente la encina y/o el alcornoque.

2. La sintomatología de la enfermedad en ramas consiste en la aparición de chancros, que originan una progresiva pérdida de turgencia que avanza hasta la marchitez de las hojas apicales, progresando hasta la muerte completa de la rama afectada.

3. En cuanto al chancro del tronco del alcornoque, la enfermedad consiste en lesiones corticales que pueden ser visibles o estar ocultas por la corteza, rodeadas de un callo y en cuyo interior, una vez que se desprende la corteza muerta, se expone al medio ambiente exterior la madera.

4. Las tres especies fúngicas *B. corticola* (anamorfo *D. corticola*), *B. iberica* (anamorfo *Dothiorella iberica*) y *B. dothidea* (anamorfo *F. aesculi*) se han aislado consistentemente del tejido necrótico de los chancros.

5. El elevado porcentaje de aislamiento de *B. corticola* de muestras de ramas muestra que esta especie se comporta como un patógeno primario de *Quercus* en Andalucía, mientras que *B. iberica* y *B. dothidea* podrían actuar principalmente como factores de decaimiento, causando lesiones en ramas de árboles debilitados. Si bien las tres especies pueden actuar como agentes contribuyentes del decaimiento de las masas de *Quercus* en esta comunidad.

6. *Botryosphaeria corticola* y *B. dothidea* presentan un amplio rango de temperaturas de crecimiento, mientras que para *B. iberica* el rango es menor. Esto, junto a las elevadas temperaturas óptimas de crecimiento obtenidas (superiores a 25° C) indican una mejor adaptación de las dos primeras especies a su hábitat.

7. Los síntomas observados en las plantas inoculadas con las tres especies coincidieron con los descritos en campo: clorosis, marchitez foliar, defoliación y muerte de ramas.

8. La especie *Q. coccifera* (coscoja) inoculada con *B. corticola* fue la que presentó una mayor longitud de chancro, seguida de los otros *Quercus* (*Q. ilex* y *Q. suber*) inoculados con aislados de la misma especie.

9. Los altos porcentajes de reaislamiento de *B. iberica*, *B. dothidea* y *N. mediterraneum* a partir de tejidos corticales que ellos mismos han necrosado muestran la elevada capacidad de estos hongos como saprofitos.

10. Las inoculaciones artificiales de plantas de diferentes especies con distintas especies de *Botryosphaeria* muestran una clara preferencia por parte de *B. corticola* hacia los *Quercus* y por parte de *N. mediterraneum* hacia los olivos, más concretamente, los de la variedad Gordal. Podría existir una cierta relación íntima de determinadas especies de *Botryosphaeria* hacia géneros o especies de plantas concretos, que incluso permitirían establecer biotipos de dicho género fúngico.

11. La evolución del estado fitosanitario de los árboles (sangraduras, chancros, corcho agrietado ocultando los chancros) en la parcela de Valdeinfierno (Cádiz) ha sido más rápida que en la parcela de Las Navas y el Berrocal (Sevilla), probablemente debido a las condiciones ambientales húmedas, más favorables para el desarrollo de la enfermedad en Cádiz.

12. Los productos que han dado mejores resultados en los ensayos de campo han sido el Metil Tiofanato y la Carbendazima aplicados al tronco inmediatamente después del descorche. Si dichos productos se aplican 24 h después de realizarse la saca del corcho, pierden su poder de protección frente a *B. corticola*.

13. Los productos biológicos ensayados en campo: producto comercial *Trichoderma* (marca comercial Trichomic) y los dos productos experimentales *Phoma* sp. y *Bacillus subtilis*, no han dado buenos resultados para el control de *B. corticola* en tronco de alcornoque.

14. La materia activa Sulfato Cuprocálcico ha inhibido totalmente el crecimiento micelial en placa a la concentración de 1000 ppm, siendo también este producto efectivo en la protección de troncos de alcornoque en la parcela situada en Las Navas y El Berrocal (Sevilla).

15. No se pudo establecer una relación directa entre las exudaciones oscuras observadas en los troncos descorchados y tratados, con las lesiones causadas por *B. corticola*, ni con ningún otro tipo de agente. Por lo tanto, las exudaciones no tienen porqué estar asociadas directamente con ningún ataque externo.

16. El Metil Tiofanato, como materia activa, incluido en el Anejo I según la Directiva 2005/52/CE, debe ser considerado como un producto a aplicar en los alcornoques andaluces tras el descorche para el control de *B. corticola*.

CAPITULO 8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. San Diego, California. 922 pp
- Ainsworth, G.C. 1973. The fungi. An advanced treatise. Vol. IV. Academic Press, NY. 621 pp.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. 1985. Introducción a la Micología. Omega, Barcelona. 638 pp.
- Amponsah, N.T., Jones, E., Ridgway, H.J. and Jaspers, M.V. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. Pest Manag Sci 2012 Jan 30. doi: 10.1002/ps.2309. [Epub ahead of print]. (Abstract)
- Arx, J. A. von 1987. Plant pathogenic fungi. J. Cramer, Berlín. 228 pp.
- Biosca, E.G., González, R., López-López, M.J., Soria, S., Monton, C, Pérez-Laorga, E. y López, M.M. 2003. Isolation and characterization of *Breeneria quercina*, causal agent for bark canker and drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. Phytopathology 35: 485-492.
- Brasier C.M and Scott J.K. 1994 European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. EPPO Bull 24: 221–232.
- Brasier, C.M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. Ann. Sci. For. 53: 347-358.
- Brooks, F.E., Ferrin, D.M. 1994. Branch dieback of southern California chaparral vegetation caused by *Botryosphaeria dothidea*. Phytopathology 84: 78-83.
- Carrasco, A., Fernández, A., Trapero, A., Lopez, G., Sánchez, I., Ruiz, J.M, Jiménez, J.J., Domínguez, L., Romero, M.A., Carbonero, M.D., Sánchez, M.E., Caetano, P., Gil, P., Fernández, P., Navarro, R.M., Sánchez, R., Raposo, R., y Rodríguez, S. 2009. Procesos de Decaimiento Forestal (La Seca). Situación del conocimiento. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Córdoba.
- Correll, J., Guerber, J., Wasiwa, L. Sherill, J. and Morelock, T. 2000. Inter and intra species variation in *Colletotrichum* and Mechanisms which affect population structure. En: *Colletotrichum*. Host specificity, pathology, and hostpathogen interaction. Eds. Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M.B. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 393.

- Creswell, T.C. and Milholland, R.D. 1987. Responses of blueberry genotypes to infection by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 71: 710-713.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W., Phillips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55: 235-253.
- Denman, D., Crous, P.C., Taylor, J.E., Ji-Chuan K., Pascoe, I., Wingfield, M.J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45: 129-140.
- Denman, S., Crous, P.W., Sadie, A. and Winfield, M.J. 2004. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria magnifica* in the Western Cape Province of South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33: 97-102.
- Fernández, P., Serrano, M., De Vita, P., Carbonero, M.D., Trapero, A. y Sánchez, E. 2008. Susceptibilidad del altramuz amarillo (*Lupinus luteo* L.) a la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. Pastos, clave en la gestión de los territorios: Integrando disciplinas. Consejería Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. 1989. *Fungi on plants and plants products in the United States*. APS Press, St. Paul, MN. 1251 pp.
- Gallego, F.J., de Algaba, A.P. y Fernández-Escobar, R. 1999. Etiology of oak decline in Spain. *European Journal of Forest Pathology*, 29.
- García Moreno, A., Calzado, C., Escuin, S., Guerrero, J.E., Fernández, P. y González, M.P. 2008. Detección en los cambios de la cobertura de arbolado en dehesa mediante imágenes Landsat-TM y modelos lineales de mezclas espectrales. Pgs. 567-574 en: Pastos, clave en la gestión de los territorios: Integrando disciplinas. Actas de la XLVIII Reunión Científica de la SEEP. Córdoba.
- Gramaje, D. y Armengol, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potencial inoculum sources, detection, identification and management strategies. *Plant disease* 95: 1040-1055.
- Hanlin, R.T. 1990. *Illustrated genera of Ascomycetes*. APS Press, St. Paul, MN. 263 pp.
- Hodges, C.S. 1983. Pine mortality in Hawaii associated with *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 67: 555-556.
- Horner, W.T. and Palmer, D.F. 1935. The control of *Dothiorella* rot on avocado fruits. *University of California College of Agriculture Bulletin* 594: 1-16.

- Jacobs, K.A., Rehner, S.A. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90: 601-610.
- Jiménez, J.J. Sánchez, J.E y Trapero, A. 2005. El Chancro carbonoso de *Quercus* II: Patogenicidad de *Biscogniauxia mediterránea*. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas* 31: 563-575.
- Jiménez, J.J. Sánchez, J.E., Romero, M.A., Belbahri, L., Trapero, A., Lefort, F. y Sánchez M.E. 2008. Pathogenicity of *Pythium spiculum* and *P. sterilum* on feeder roots of *Quercus rotunfolia*. *Plant Pathology* 57: 369.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. 2008. Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi, 10th ed. CAB International, 2283pp. Wallingford, U.K.
- Luque, J., Álvarez, I. 1997. Patogenicidad de hongos aislados del alcornoque en Cataluña. II Congreso Forestal Español. Tomo V. pp. 227-232.
- Luque, J.; Girbal, J. 1989. Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *European Journal of Forest Pathology* 19: 7-13.
- Luque, J., Cohen, M., Savé, R., Biel, C., Álvarez, I. 1999. Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L. *Annales des Sciences Forestieres* 56: 19-26.
- Luque, J., Parladé, J. y Pera, J. 2000. Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology* 30: 247-263.
- Luque, J., Pera, J. y Parladé, J. 2008. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria corticola* on cork oak in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology* 38: 147-155.
- Lutrell, E.S., Davis, T.S. and Murray B.R. 1962. *Botryosphaeria* twing bligh of Arizona Cypress. *Plant Disease Reporter* 46: 261-264.
- Manion, P.D. 1991. Tree disease concepts. Prentice-Hall, Londres. 402 pp.
- McDonald, V., Eskalen, A., 2011. Botryosphaeriaceae species associated with Avocado branch cankers in California. *Plant Disease* 95: 1465-1473 (Abstract).
- Morehart, A.L. 1994. The occurrence of *Calcarisporium* on isolates of *Botryosphaeria quercuum* from oak trees in Delaware. *Plant Disease* 78: 101.
- Montoya, J.M. 1994. ¿Qué es la "seca de los *Quercus*"?. *Actas de la X Reunión Anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines, Madrid*. 4 pp.

- Moral, J., Lovera, M., Benitez, M.J., Arquero, O. y Trapero, A. 2006. First report of *Botryosphaeria obtusa* causing fruit rot of quince (*Cydonia oblonga*) in Spain. *New Disease Reports* 13: 33.
- Moral, J., Muñoz-Díez, C., Gozález, N., Trapero, A., and Michailides, T.J. 2010. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other host in Spain and California. *Phytopathology* 100: 1340-1351.
- Navarro, R.M., Fernández, P., Trapero, A., Caetano, P., Romero, M.A., Sánchez, M.E., Fernández, A., Sánchez, I. y López, G. 2004. Los procesos de decaimiento de Encinas y Alcornoques. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Pavlic, D., Slippers, B., Couthinho, T., Gryzenhout, M., & Wingfield M.J. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50: 313-322.
- Phillips A.J.L., Rumbos, I.C., Alves A. and Correia A. 2005. Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia* 159: 433-439.
- Phillips, A.J.L. 2007a. Re-evaluation. Version 01 saved 8 October 2007. http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/Important_notice.htm
- Phillips, A.J.L. 2007b. *Diplodia corticola*. Version 2 saved 8 October 2007. http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/botryosphaeria_corticola_2.htm
- Phillips, A.J.L. 2007c. *Diplodia dothidea*. Version 02 saved 8 October 2007. http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/botryosphaeria_dothidea_2.htm
- Phillips, A.J.L. 2007d. *Diplodia dothidea*. Version 02.2 saved 8 October 2007. http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/botryosphaeria_dothidea_2.htm
- Phillips, A.J.L., Crous, P.W and Alves, A. 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusa*. *Fungal Diversity* 25: 141-155
- Phillips A.J.L., Alves A., Pennycook S.R., Johnston P.R., Ramaley A. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia* 21: 29-55.
- Pitt, W. M., Huang, R., Savocchia, S., Steel, C. 2008. First Report of *Dothiorella iberica* (*Botryosphaeria* *iberica*) associated with Grapevine Decline in Australia. 6th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Florence, Italy, 1–3 September. (Abstract)

- Proffer, T.J. 1996. First report of *Diplodia mutila* on golden-chain tree (*Laburnum x watereri*). Plant Disease 80: 1303.
- Pusey P.L., Reilly, C.C. and Okie, W.R. 1986. Symptomatic responses of peach trees to various isolates of *Botryosphaeria dothidea*. Plant Disease 70: 568-572.
- Ragazzi, A., Dellavalle I., Mesturino, L. 1989. The oak decline: a new problem in Italy. European Journal of Forest Pathology 19: 105-110.
- Ragazzi, A., Moricca, S., Dellavalle I. 1997. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Diplodia mutila* isolates on oak. European Journal of Forest Pathology 27: 391-396.
- Ragazzi, A., Moricca, S., Dellavalle I. 1999a. Interactions between *Quercus* spp. and *Diplodia mutila* under water-stress conditions. Journal of Plant Diseases and Protection 106: 495-500. (Abstract in Science Citation Index CDE).
- Ragazzi, A., Moricca, S., Dellavalle I. 1999b. Water-stress and development of canker by *Diplodia mutila* on *Quercus robur*. Journal of Phytopathology 147: 425-428.
- Ragazzi, A., Moricca, S., Vagniluca, S., Comparini, C., Dellavalle I. 1999c. Leaf water potential and peroxidase-activity in *Quercus cerris* and *Q. pubescens* after inoculation with *Diplodia mutila*. Journal of Phytopathology 147: 55-59. (Abstract in Science Citation Index CDE).
- Ragazzi, A., Dellavalle, I., Moricca, S., Capretti, P., Raddi, P. 2000. Decline of oak species in Italy. Problems and Perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Florencia. 257 pp.
- Ramos, L.J., Lara S.P., McMillan R.T. Jr. and Narayanan, K.R. 1991. Tip dieback of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. Plant Disease 75: 315-318.
- Reynolds, D.R. 1981. Ascomycete systematics. The Luttrellian concept. Springer-Verlag, New York. 242 pp.
- Romero, M.A., Sánchez, M.E., Trapero, A. 2005. First Report of *Botryosphaeria ribis* as a Branch Dieback Pathogen of Olive Trees in Spain. Plant Disease 89: 208.
- Romero, M.A., Sánchez, J.E., Jiménez, J.J., Belbahri, L. Trapero, A., Lefort, F. y Sánchez, M.E. 2007. New *Pythium* taxa causing root rot Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. J. Phytopatol. 155: 289-595.
- Romero, M.A. De Vita, P., Sánchez, M.E. y Trapero, A. 2009. Evaluación de procesos de decaimiento forestal en Andalucía. Seguimiento global y medidas de control. Documento II: Tratamientos con fungicidas para el control de chancros causados

- por *Botryosphaeria* en alcornoques 2006-2008. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 16 pp.
- Sánchez, M.E., Gutiérrez, J., Trapero, A. 2002. *Botryosphaeria* canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathology* 51: 364-372.
- Sánchez, M.E., Venegas, J., Romero, M.A., Phillips, A.J.L., Trapero, A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease* 87: 1515-1521.
- Sánchez, J.E., Romero, M.A., Sánchez, M.E. y Trapero, A. 2004. Protocolo de recogida y envío de muestras al laboratorio de Patología Agroforestal. En: Red andaluza de Seguimientos de Daños sobre Ecosistemas Forestales. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 97 pp.
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Romero, M.A., Navarro, R.M., y Trapero, A. 2006. *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. *Proceedings of the Third International IUFRO Working Party. Meeting at Freising. Germany.*
- Sardinero S., Fernández Cancio, A., Pereira, I. y Manrique, E. 2000. Oak decline and vegetation dynamics in Southwestern Spain. INIA Report for Research Project 1FD97-0911-C3-1. Instituto Nacional de Investigación Científica y Tecnológica Agraria y Alimentaria. Madrid.
- Schoch C.L., Shoemaker R.A., Seifert K.A., Hambleton S., Spatafora J.W. and Crous P.W. 2006. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. *Mycologia* 98:1041– 1052.
- Schoch, Conrad. 2007. *Dothideomycetes*. Version 19 March 2007 (under construction). <http://tolweb.org/Dothideomycetes/29051/2007.03.19> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Schreiber, L.R. 1964. Stem canker and die-back of *Rhododendron* caused by *Botryosphaeria ribis* Gross & Dug. *Plant Disease Reporter* 48: 207-210.
- Sinclair, W.A., Lyon, H.H., Johnson, W.T. 1987. *Diseases of trees and shrubs*. Cornell University Press, London. 574 pp.
- Sivanesan, A. 1984. *The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs*. J. Cramer, Vaduz. 701 pp.

- Slippers, B., Crous, P.W., Denman, S., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D. and Wingfield, M.J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96(1): 83-101.
- Slippers, B., Smit, W.A., Crous, P.W., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D. and Wingfield, M.J. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of *Botryosphaeriaceae* associated with pome and stone fruit trees in South Africa and the other region on the world. *Plant Pathology* 56: 128-139.
- Slippers, B. and Wingfield, M.J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90-106.
- Smith, H., Wingfield, M.J., Crous, P. And Coutinho T.A. 1996. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South Africa Journal of Botany* 62: 86-88.
- Stanosz, G.R. 1996. Branch dieback of savin juniperus in Pennsylvania caused by *Diplodia mutila*. *Plant Disease* 81: 111.
- Stanosz, G.R., Swart, W.J., Smith, D.R. 1998. Similarity between fungi identified as *Diplodia pinea* f. sp. *cupressi* in Israel and *Botryosphaeria stevensii* or *Diplodia mutila* on *Juniperus* in the United States. *European Journal of Forest Pathology* 28: 32-42.
- Swart, W.J., Botes, W. 1995. First report of stem canker caused by *Botryosphaeria obtusa* on pistacio. *Plant Disease* 79: 1036-1038.
- Swart, L., Crous, P.W., Petroni, O. and Taylor J.E. 2000. Fungal endophytes of Proteaceae, with particular emphasis on *Botryosphaeria proteae*. *Mycoscience* 41: 123-127.
- Taylor, J.E., Denman S. and Crous, P.W. 2001. Endophytes isolated from three species of *Protea* in nature reserve in the Wester Cape, South Africa. *Sydowia* 53: 247-260.
- Toole, E.R. 1963. Sweetgum lesion caused by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Disease Reporter* 47: 229-231.
- Tsopelas, P., Slippers, B., Gonou-Zagou, Z. and Wingfield, M.J. 2009. First report of *Diplodia corticola* in Greece on kermes oak (*Quercus coccifera*). *New Disease Reports* 20: 12.

- Turco, E., Marianelli, L., Vizzuso, C., Ragazzi, A., Gini, R., Selleri, B., and Tucci R. 2006. First report of *Botryosphaeria dothidea* on Sycamore, Red Oak and English Oak in Northwestern Italy. *Plant Disease* 90: 1106.
- Urbez-Torres J.R., Leavitt G.M., Voegel T.M., Gubler W.D. 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California . *Plant Disease* 90: 1490-1503.
- Vieira Natividade, J. 1991. Subericultura. Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación. Madrid. 448 pp.
- Wiehe, P.O. 1952. Life cycle of *Botryosphaeria ribis* on *Aleurites montana*. *Phytopathology* 42: 521-526.
- Zhou, S. & Stanosz G.R. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from analyses ITS and 5.8s rDNA sequences. *Mycologia* 93:516-527.

CAPITULO 9. ANEJOS

Tabla A1. Resultados de los análisis de muestras procedentes de la Red Andaluza de Daños en Ecosistemas Forestales. Período 2001 – 2005.

1. Resultados del año 2001.

Nº de Punto	<i>B. cortícola</i>	<i>B. iberica</i>	<i>B. dothidea</i>
AL-1009			
AL-1010			
AL-1016			
AL-1025			
AL-1027			
AL-1042			
CA-1007	X		
CA-1021			
CA-1025	X		
CA-1026	X		
CA-1030			
CA-1031			
CA-1040			
CA-1041			
CA-1050			
CA-1051			
CA-1058			
CA-1065			
CA-1066			
CA-1084			
CA-1085			
CA-1090			
CA-1092			
CA-1096			
CA-1105			
CA-1110			
CA-1112			
CA-1113			
CA-1117			
CA-1125			
CA-1142	X		
CA-1145	X		
CA-1150			
CA-1165			
CA-1168			
CA-1315			
CA-1380	X		
CA-1390	X		
CA-1400	X		
CA-1410			
CA-1420	X		X
CA-1430			

Tabla A1. (Continuación)

1. Resultados del año 2001.

Nº de Punto	<i>B. cortícola</i>	<i>B. iberica</i>	<i>B. dothidea</i>
CA-1440	X		
CA-1450	X		
CA-1460	X		
CA-1470			
CA-1480			
HU-0760	X		
JA-1001	X		
JA-1007			
JA-1007			
JA-1058	X		
JA-1187			
JA-1188			
MA-1018			
MA-1106			

2. Resultados del año 2002

Nº de Punto	<i>B. cortícola</i>	<i>B. iberica</i>	<i>B. dothidea</i>
AL-1042			
CA-1083	X		
CA-1084			
CA-1085			
CA-1093	X		
CA-1095	X		
CA-1102			
CA-1103	X		
CA-1104			
CA-1109	X		
CA-1111			
CA-1117			
CO-1050	X		
CO-1054			
CO-1067			
CO-1093	X		
CO-1107			
CO-1108			
CO-1126			
CO-1136	X		
HU-1001	X		
HU-1009			
HU-1011			
HU-1020	X		
HU-1025			

Tabla A1. (Continuación)**2. Resultados del año 2002**

HU-1027	
HU-1034	
HU-1041	X
HU-1052	
HU-1054	
HU-1058	X
HU-1067	
HU-1068	
HU-1079	X
HU-1089	
HU-1093	X
HU-1094	
JA-1007	
JA-1009	
JA-1022	X
JA-1032	
JA-1158	X
JA-1187	
MA-1018	
MA-1026	
MA-1089	X
MA-1096	
SE-1008	
SE-1017	
SE-1018	
SE-1019	X
SE-1024	X
SE-1035	
SE-1036	X
SE-1038	
SE-1043	
SE-1046	
SE-1048	X
SE-1050	
SE-1052	X
SE-1053	X
SE-1055	
SE-1080	
SE-1094	

Tabla A1. (Continuación)

3. Resultados del año 2003.

Nº de Punto	<i>B. cortícola</i>	<i>B. iberica</i>	<i>B. dothidea</i>
CA-1111	X		
CO-1083			
HU-1025			
HU-1028			
HU-1041			
HU-1054			
HU-1079			
MA-1026			
MA-1070			
SE-1024			
SE-1036	X		
SE-1048	X		
SE-1094	X		
SE-1127			

4. Resultados año 2004.

Nº de Punto	<i>B. cortícola</i>	<i>B. iberica</i>	<i>B. dothidea</i>
HU-1001	X		
HU-1033			
HU-1041			
JA-1037		X	
SE-1058	X		

5. Resultados año 2005.

Nº de Punto	<i>B. cortícola</i>	<i>B. iberica</i>	<i>B. dothidea</i>
CA-1108			
CA-1117	X		
CO-1004			
CO-1032	X		
CO-1036			
CO-1066			
CO-1089	X		
HU-1001		X	
HU-1004	X		
HU-1007			
HU-1009			
HU-1010	X		
HU-1011	X		
HU-1012		X	

Tabla A1. (Continuación)

5. Resultados del año 2005.

Nº de Punto	<i>B. cortícola</i>	<i>B. iberica</i>	<i>B. dothidea</i>
HU-1013		X	
HU-1020	X		
HU-1021		X	
HU-1023			
HU-1027	X		
HU-1033			
HU-1034			
HU-1040	X	X	
HU-1052	X		
HU-1053		X	
HU-1054		X	
HU-1057	X		
HU-1058	X		
HU-1067			
HU-1068	X		
HU-1069	X		
HU-1079	X		
HU-1082	X		
HU-1089			
HU-1093			
HU-1094	X		
HU-1096	X		
HU-1106	X		
HU-1109	X		
MA-1037			
MA-1050		X	
SE-1023			
SE-1024	X		
SE-1036	X		
SE-1048	X		
SE-1058	X		
SE-1058	X		
SE-1094	X		

Tabla A2. Análisis de varianza y comparación de medias para el tamaño de las conidias de los aislados de *Botryosphaeria corticola*, *Botryosphaeria iberica* y *Botryosphaeria dothidea*.

1. Aislados de *Botryosphaeria corticola*.

1.1. Análisis de varianza para la longitud de las conidias

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	195.026	39.0052	6.84	0.0000
WITHIN	294	1675.66	5.69951		
TOTAL	299	1870.68			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	3.60	5	0.6080

COCHRAN'S Q	0.2044
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	1.6119

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.66611
EFFECTIVE CELL SIZE	50.0

1.2. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
DCE6	28.900	A
DCA1	28.350	A B
DCE11	27.550	B C
DCE3	27.200	C D
DCE1	27.075	C D
DCE9	26.500	D

CRITICAL T VALUE	1.968	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.9397		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.4775		

1.3. Análisis de varianza para la anchura de las conidias

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	156.042	31.2083	16.34	0.0000
WITHIN	294	561.438	1.90965		
TOTAL	299	717.479			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	30.37	5	0.0000
COCHRAN'S Q		0.2128	
LARGEST VAR / SMALLEST VAR		4.2679	
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS			0.58597
EFFECTIVE CELL SIZE			50.0

1.4. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
DCE3	14.475	A
DCE9	14.400	A
DCE1	13.650	B
DCE6	13.600	B
DCE11	12.975	C
DCA1	12.450	C

CRITICAL T VALUE	1.968	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.5439		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2764		

1.5. Análisis de varianza para la relación L/A (expresada como la relación entre la longitud y la anchura de la conidia)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	6.69100	1.33820	20.28	0.0000
WITHIN	294	19.3976	0.06598		
TOTAL	299	26.0886			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	15.17	5	0.0096
COCHRAN'S Q		0.2512	
LARGEST VAR / SMALLEST VAR		2.3024	
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS			0.02544
EFFECTIVE CELL SIZE			50.0

1.6. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
DCA1	2.2838	A
DCE11	2.1513	B
DCE6	2.1364	B
DCE1	2.0101	C
DCE3	1.8964	D
DCE9	1.8590	D

CRITICAL T VALUE 1.968 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.1011
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.0514

2. Aislados de *Botryosphaeria iberica*.

2.1. Análisis de varianza para la longitud de las conidias

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	466.422	93.2844	32.42	0.0000
WITHIN	294	845.969	2.87744		
TOTAL	299	1312.39			

BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	CHI-SQ	DF	P
	6.44	5	0.2660

COCHRAN'S Q 0.2209
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 1.7859

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 1.80814
 EFFECTIVE CELL SIZE 50.0

2.2. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
DOE14	25.325	A
DOE12	25.050	B
DOE3	24.300	C
DOE26	23.775	C D
DOE25	23.500	D
DOE27	21.525	E

CRITICAL T VALUE 1.968 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.6677

STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.3393

2.3. Análisis de varianza para la anchura de las conidias

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	33.3125	6.66250	6.22	0.0000
WITHIN	294	314.937	1.07122		
TOTAL	299	348.250			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	8.28	5	0.1414

COCHRAN'S Q	0.2000
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	2.0805

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	0.11183
EFFECTIVE CELL SIZE	50.0

2.4. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
DOE12	9.7750	A
DOE14	9.7250	A
DOE3	9.4500	A B
DOE27	9.2000	B C
DOE25	9.1000	B C
DOE26	8.8500	C

CRITICAL T VALUE	1.968	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	0.4074		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.2070		

2.5. Análisis de varianza para la relación L/A (expresada como la relación entre la longitud y la anchura de la conidia).

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	3.17347	0.63469	5.27	0.0001
WITHIN	294	35.3751	0.12032		
TOTAL	299	38.5485			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	7.13	5	0.2111
COCHRAN'S Q		0.2036	
LARGEST VAR / SMALLEST VAR		1.9373	
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS			0.01029
EFFECTIVE CELL SIZE			50.0

2.6. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
DOE26	2.7152	A
DOE14	2.6390	A
DOE25	2.6190	A
DOE3	2.6061	A
DOE12	2.5792	A
DOE27	2.3798	B

CRITICAL T VALUE	1.968	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON		0.1365	
STANDARD ERROR FOR COMPARISON		0.0694	

3. Aislados de *Botryosphaeria dothidea*.

3.1. Análisis de varianza para la longitud de las conidias

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	1917.78	383.555	71.51	0.0000
WITHIN	294	1576.91	5.36363		
TOTAL	299	3494.68			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	17.70	5	0.0033
COCHRAN'S Q		0.2427	
LARGEST VAR / SMALLEST VAR		2.8120	
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS			7.56383
EFFECTIVE CELL SIZE			50.0

3.2. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FAE2	25.750	A
FAE1	23.550	B
FAE3	23.450	B
FAE5	23.350	B
FAE4	22.950	B
FAE7	17.475	C

CRITICAL T VALUE 1.968 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.9116
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4632

3.3. Análisis de varianza para la anchura de las conidias

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	25.6042	5.12083	9.71	0.0000
WITHIN	294	155.125	0.52764		
TOTAL	299	180.729			

BARTLETT'S TEST OF
 EQUAL VARIANCES

CHI-SQ	DF	P
9.77	5	0.0821

COCHRAN'S Q 0.2264
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 2.3368

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.09186
 EFFECTIVE CELL SIZE 50.0

3.4. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FAE1	4.8500	A
FAE7	4.8250	A
FAE2	4.7750	A
FAE4	4.3750	B
FAE5	4.3500	B C
FAE3	4.0750	C

CRITICAL T VALUE 1.968 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.2859
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1453

3.5. Análisis de varianza para la relación L/A (expresada como la relación entre la longitud y la anchura de la conidia)

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	5	139.143	27.8285	32.69	0.0000
WITHIN	294	250.296	0.85135		
TOTAL	299	389.439			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	33.27	5	0.0000
COCHRAN'S Q			0.3296
LARGEST VAR / SMALLEST VAR			3.8181
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS			0.53954
EFFECTIVE CELL SIZE			50.0

3.6. Comparación de medias

AISLADO	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FAE3	5.8267	A
FAE5	5.5967	A B
FAE2	5.4740	A B
FAE4	5.3567	B
FAE1	4.9353	C
FAE7	3.7600	D

CRITICAL T VALUE	1.968	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON			0.3632
STANDARD ERROR FOR COMPARISON			0.1845

Tabla A3. Análisis de la varianza de la tasa de crecimiento (mm/día) de los aislados de *Diplodia* sp., *Diplodia mutila* y *Fusicoccum* sp. en PDAA a diferentes temperaturas

1. Global

Análisis de varianza

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
TEM (A)	6	28425.8	4737.64	165.15	0.0000
REP (B)	2	7.06473	3.53237	0.12	0.8852
A*B	12	344.243	28.6869		
AIS (C)	17	2103.26	123.721	32.84	0.0000
A*C	102	5435.50	53.2892	14.15	0.0000
A*B*C	238	896.557	3.76705		
TOTAL	377	37212.5			

2. Análisis de la varianza individualizado por temperatura

2.1. Temperatura 5° C

Análisis de varianza

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REP (A)	2	9.82806	4.91403	5.93	0.0062
AIS (B)	17	23.4570	1.37982	1.66	0.1010
A*B	34	28.1855	0.82899		
TOTAL	53	61.4705			

2.2. Temperatura 10° C

Análisis de varianza

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REP (A)	2	3.96889	1.98444	1.70	0.1987
AIS (B)	17	49.3675	2.90397	2.48	0.0118
A*B	34	39.8058	1.17076		
TOTAL	53	93.1422			

Comparación de medias

AIS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
DOE26	4.1397	A
DOE25	4.1063	A
DCE11	3.5121	A
DOE3	3.4729	A B
DCE6	3.3516	A B C
DCE1	3.1978	A B C
DCA1	3.1944	A B C
DCE3	3.1090	A B C D
DOE27	3.0294	A B C D E
DCE9	2.9598	A B C D E
DOE14	2.8948	A B C D E
DOE12	2.8940	A B C D E
FAE5	1.6808	B C D E
FAE2	1.6154	C D E
FAE1	1.3943	D E
FAE7	1.3244	D E
FAE3	1.3137	D E
FAE	1.2578	E

CRITICAL T VALUE 2.032 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 1.7954
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.8835

2.3. Temperatura 15° C

Análisis de varianza

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REP (A)	2	2.11619	1.05810	0.28	0.7539
AIS (B)	17	162.531	9.56065	2.57	0.0093
A*B	34	126.323	3.71537		
TOTAL	53	290.970			

Comparación de medias

AIS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FAE4	16.587	A
DCE11	16.566	A
FAE1	16.211	A B
DE25	15.786	A B
DE26	15.537	A B C
FAE3	14.634	A B C D
DCE3	14.513	A B C D E
DCE9	14.498	A B C D E
DCE1	14.427	A B C D E
DAE3	14.365	A B C D E
DAE12	13.086	B C D E
DCE6	13.063	B C D E
DCA1	12.487	C D E
DAE14	12.416	C D E
FAE2	12.044	D E
DAE27	11.741	D E
FAE5	11.405	E
FAE7	11.325	E

CRITICAL T VALUE 2.032 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 3.1984
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 1.5738

2.4. Temperatura 20° C

Análisis de varianza

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REP (A)	2	33.1818	16.5909	8.91	0.0008
AIS (B)	17	147.059	8.65054	4.65	0.0001
A*B	34	63.2887	1.86143		
TOTAL	53	243.530			

Comparación de medias

AIS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FAE4	24.004	A
FAE1	23.561	A B
FAE3	23.358	A B
DCE11	23.158	A B C
DCE9	22.424	A B C D
FAE5	21.615	B C D E
FAE7	21.397	B C D E
DOE25	21.327	B C D E
DOE26	21.087	C D E
FAE2	20.889	D E F
DCE6	20.681	D E F G
DCE3	20.633	D E F G
DCE1	20.629	D E F G
DOE12	20.286	D E F G I
DOE3	19.811	E F G I
DOE14	18.741	F G I
DOE27	18.539	G I
DCA1	18.280	I

CRITICAL T VALUE 2.032 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 2.2639
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON

2.5. Temperatura 25° C

Análisis de varianza

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REP (A)	2	4.66776	2.33388	1.72	0.1951
AIS (B)	17	156.612	9.21249	6.77	0.0000
A*B	34	46.2596	1.36058		
TOTAL	53	207.540			

Comparación de medias

AIS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FAE4	26.651	A
FAE1	26.491	A
FAE3	26.051	A B
FAE5	25.418	A B C
DCE6	25.338	A B C
FAE2	25.204	A B C
DCE11	25.064	A B C
DCE9	24.781	A B C
DCE1	24.551	B C
DCE3	24.491	B C D
DCA1	23.798	C D E
FAE7	23.778	C D E
DOE26	22.571	D E F
DOE12	22.231	E F
DOE25	22.050	E F
DOE27	21.624	F
DOE3	21.569	F
DOE14	21.417	F

CRITICAL T VALUE	2.032	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	1.9355		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	0.9524		

2.6. Temperatura 30° C

Análisis de varianza

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REP (A)	2	37.5029	18.7514	5.09	0.0117
AIS (B)	17	6152.08	361.887	98.22	0.0000
A*B	34	125.269	3.68439		
TOTAL	53	6314.85			

Comparación de medias

AIS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
F AE4	27.251	A
F AE1	27.184	A
F AE3	27.151	A
F AE5	26.934	A
F AE2	26.578	A
D CE6	26.218	A
D CE9	26.168	A B
D CE11	25.871	A B C
D CE3	25.331	A B C
D CA1	24.114	A B C
D CE1	23.014	.. B C
F AE7	22.874 C
D OE12	3.8232 D
D OE3	3.6473 D
D OE26	3.4960 D
D OE25	3.2602 D
D OE14	3.2581 D
D OE27	1.9862 D

CRITICAL T VALUE 2.032 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 3.1850
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 1.5672

2.7. Temperatura 35° C

Análisis de varianza

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REP (A)	2	260.042	130.021	9.46	0.0005
AIS (B)	17	847.646	49.8616	3.63	0.0007
A*B	34	467.426	13.7478		
TOTAL	53	1575.11			

Comparación de medias

AIS	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
FAE4	11.260	A
FAE3	11.230	A
FAE1	8.8925	A
DCE1	8.7105	A
FAE5	7.9183	A
FAE2	7.5678	A
DCE3	7.4568	A
DCA1	6.9105	A
DCE11	6.5524	A
FAE7	5.2717	A B
DCE9	5.1871	A B
DCE6	5.1538	A B
DOE14	0.0590	B
DOE26	0.0423	B
DOE25	0.0423	B
DOE27	0.0000	B
DOE3	0.0000	B
DOE12	0.0000	B

CRITICAL T VALUE	2.032	REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	6.1524		
STANDARD ERROR FOR COMPARISON	3.0274		

Tabla A4. Regresión lineal de la tasa de crecimiento de los aislados de *Botryosphaeria corticola*, *Botryosphaeria iberica* y *Botryosphaeria dothidea* en función de la temperatura

1. *Botryosphaeria corticola*.

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

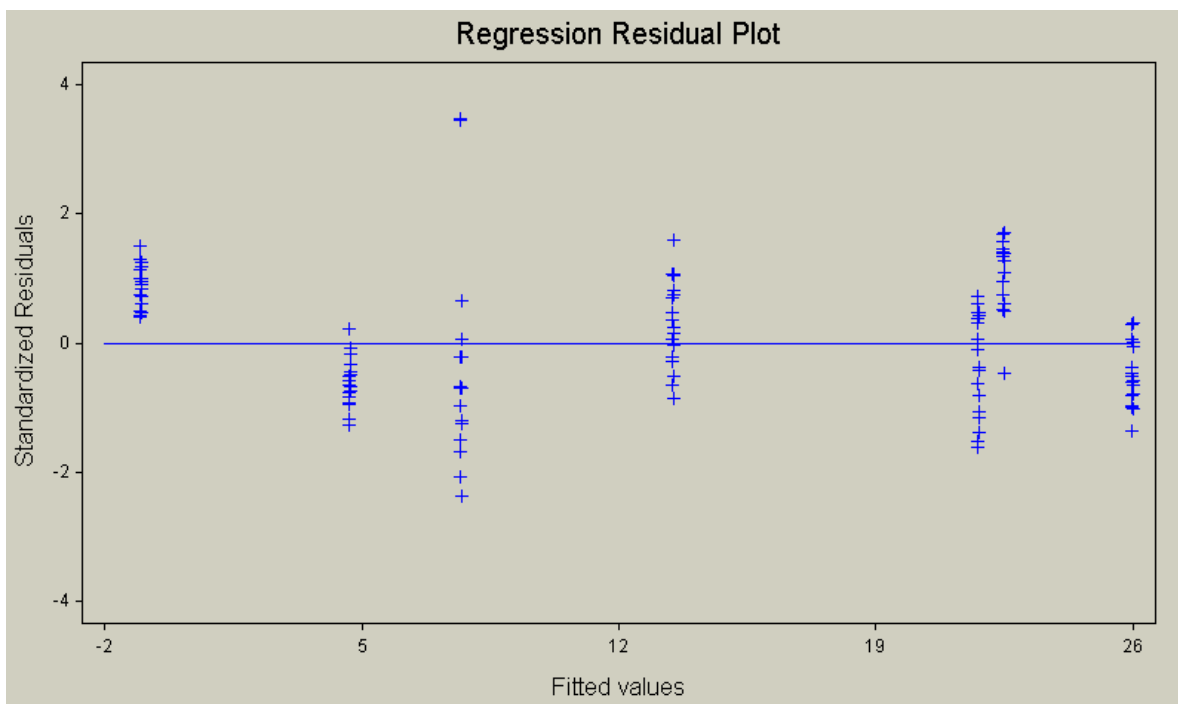
PREDICTOR					
VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEM	-1.10930	0.10286	-10.78	0.0000	21.3
TEM2	0.20587	0.00864	23.84	0.0000	251.0
TEM3	-0.00480	1.725E-04	-27.81	0.0000	129.4
R-SQUARED	0.9782	RESID. MEAN SQUARE (MSE)		6.27165	
ADJUSTED R-SQUARED	0.9776	STANDARD DEVIATION		2.50433	

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	34575.4	11525.1	1837.66	0.0000
RESIDUAL	123	771.413	6.27165		
TOTAL	126	35346.8			

La transformación realizada fue: $y = a*T + b*T^2 + c*T^3$

donde y representa la tasa de crecimiento media, T es la temperatura de crecimiento y a , b y c son los coeficientes de la regresión.

Distribución de los residuos estandarizados sobre los valores ajustados:



2. Botryosphaeria ibérica.

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEM	-1.45842	0.13708	-10.64	0.0000	20.9
TEM2	0.26957	0.01335	20.19	0.0000	253.9
TEM3	-0.00721	3.090E-04	-23.32	0.0000	132.0

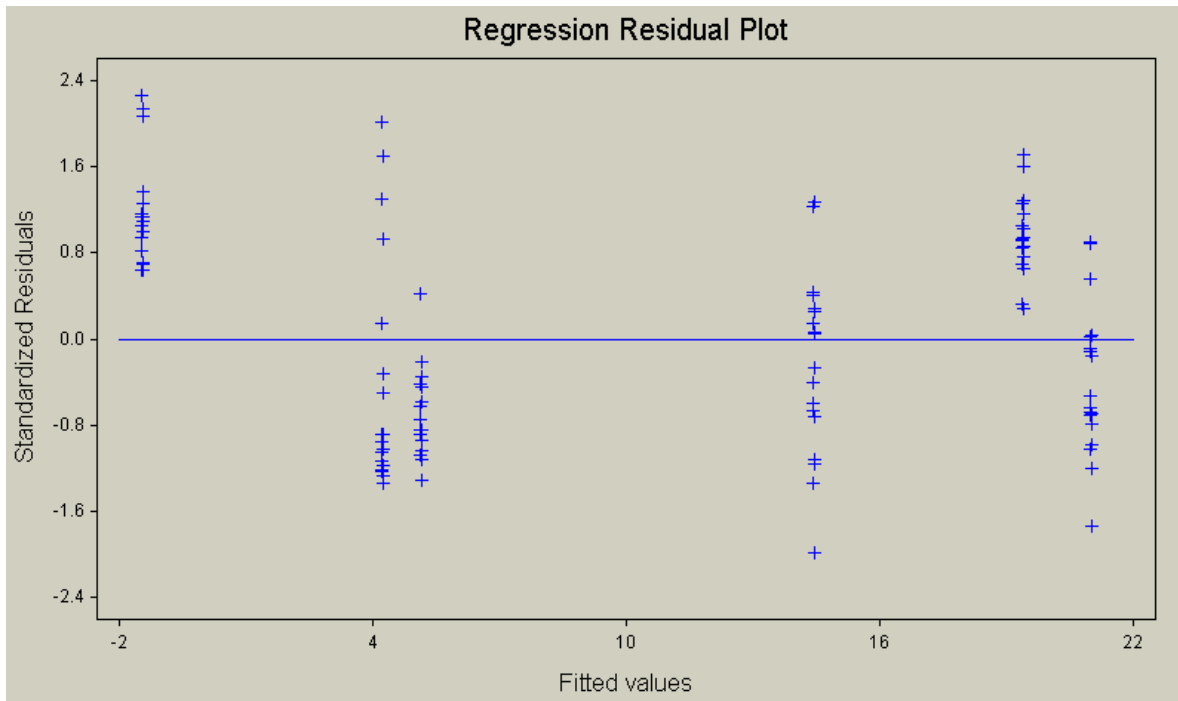
R-SQUARED	0.9630	RESID. MEAN SQUARE (MSE)	7.06938
ADJUSTED R-SQUARED	0.9619	STANDARD DEVIATION	2.65883

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	19320.0	6439.99	910.97	0.0000
RESIDUAL	105	742.285	7.06938		
TOTAL	108	20062.3			

La transformación realizada fue: $y = a \cdot T + b \cdot T^2 + c \cdot T^3$

donde y representa la tasa de crecimiento media, T es la temperatura de crecimiento y a , b y c son los coeficientes de la regresión.

Distribución de los residuos estandarizados sobre los valores ajustados:



3. Botryosphaeria dothidea.

NOTE: MODEL FORCED THROUGH ORIGIN

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	VIF
TEM	-1.45202	0.12906	-11.25	0.0000	21.3
TEM2	0.23319	0.01084	21.52	0.0000	251.0
TEM3	-0.00526	2.164E-04	-24.30	0.0000	129.4

R-SQUARED	0.9689	RESID. MEAN SQUARE (MSE)	9.87335
ADJUSTED R-SQUARED	0.9681	STANDARD DEVIATION	3.14219

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	3	37824.7	12608.2	1277.00	0.0000
RESIDUAL	123	1214.42	9.87335		
TOTAL	126	39039.1			

La transformación realizada fue: $y = a*T + b*T^2 + c*T^3$

donde y representa la tasa de crecimiento media, T es la temperatura de crecimiento y a , b y c son los coeficientes de la regresión.

Distribución de los residuos estandarizados sobre los valores ajustados:

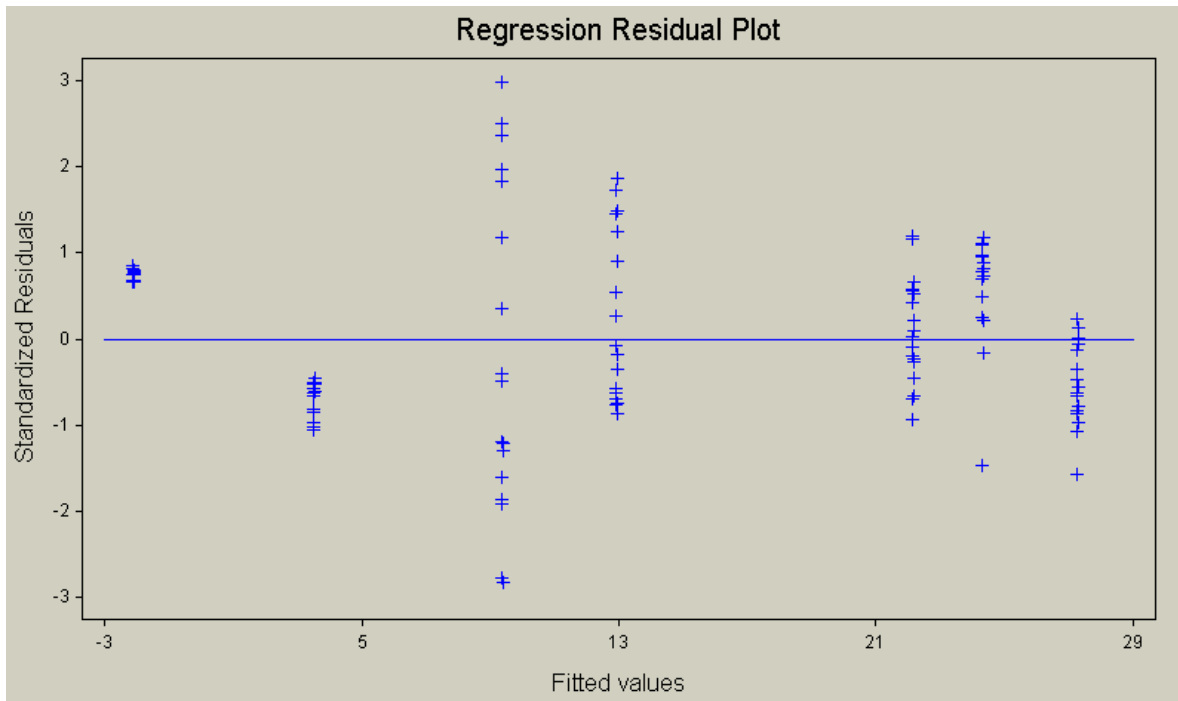


Tabla A5. Análisis de la varianza y comparación de medias de la longitud del tejido necrótico en plantas de *Quercus* spp. y dos variedades de *Olea europaea* inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*.

1. Análisis de la varianza

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLADO	7	20386.0	2912.29	21.90	0.0000
PLANTA	4	5908.1	1477.04	11.11	0.0000
AISLADO*PLANTA	28	23085.4	824.48	6.20	0.0000
Error	179	23799.7	132.96		
Total	218				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares
 Grand Mean 7.2788 CV 158.42

2. Comparación de medias

2.1. En función de los aislados

AISLADO	Mean	Homogeneous Groups
DOE	26.027	A
DOA	22.089	A
FO	4.955	B
FA	1.218	B
FE	1.160	B
DE	1.085	B
FJ	0.993	B
DA	0.703	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.973 Critical Value for Comparison VARIES
 Error term used: Error, 179 DF
 There are 2 groups (A and B) in which the jeans are not significantly different from one another.

2.2. En función del huésped

HUESPED	Mean	Homogeneous Groups
COSCOJA	17.362	A
ENCINA	7.519	B
ALCORNOCQUE	7.479	B
GORDAL	3.100	BC
PICUAL	0.933	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.973 Critical Value for Comparison VARIES
 Error term used: Error, 179 DF
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tabla A6. Análisis de la varianza y comparación de medias de la longitud del tejido necrótico en plantas de *Quercus coccifera* L. inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*.

1. Análisis de la varianza

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLADO	7	25342.7	3620.39	16.73	0.0000
Error	24	5193.0	216.38		
Total	31	30535.7			

Grand Mean 17.362 CV 84.72

2. Comparación de medias

AISLADO	Mean	Homogeneous Groups
DCA	73.525	A
DCE	57.625	A
FO	3.7750	B
DOE	2.1250	B
FAA	1.3000	B
FJ	0.5500	B
DOA	0.0000	B
FAE	0.0000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 10.401
 Critical T Value 2.064 Critical Value for Comparison 21.467

Error term used: Error, 24 DF

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tabla A7. Análisis de la varianza y comparación de medias de la longitud del tejido necrótico en plantas de *Quercus ilex* L. inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*.

1. Análisis de la varianza

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLADO	7	5336.81	762.401	9.95	0.0000
Error	35	2680.75	76.593		
Total	42				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 7.5189 CV 116.40

2. Comparación de medias

AISLADO	Mean	Homogeneous Groups
DCE	32.258	A
DCA	21.220	A
FJ	1.600	B
FO	1.417	B
DOA	1.317	B
FAA	0.940	B
FAE	0.700	B
DOE	0.700	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 2.030 Critical Value for Comparison VARIES

Error term used: Error, 35 DF

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tabla A8. Análisis de la varianza y comparación de medias de la longitud del tejido necrótico en plantas de *Quercus suber* L. inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*.

1. Análisis de la varianza

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLADO	7	6844.4	977.774	4.36	0.0011
Error	40	8975.8	224.396		
Total	47	15820.3			

Grand Mean 7.4792 CV 200.29

2. Comparación de medias

AISLADO	Mean	Homogeneous Groups
DCE	37.583	A
DCA	12.500	B
FAE	3.100	B
FAA	1.917	B
FO	1.850	B
DOE	1.017	B
DOA	0.950	B
FJ	0.917	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 8.6486
 Critical T Value 2.021 Critical Value for Comparison 17.480

Error term used: Error, 40 DF

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tabla A9. Análisis de la varianza y comparación de medias de la longitud del tejido necrótico en plantas de *Olea eurpaea* L. var. Gordal. inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*.

1. Análisis de la varianza

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLADO	7	1230.06	175.723	1.01	0.4374
Error	40	6944.14	173.603		
Total	47	8174.20			

Grand Mean 3.1000 CV 425.03

2. Comparación de medias

AISLADO	Mean	Homogeneous Groups
FO	16.467	A
DCE	1.750	AB
DCA	1.600	AB
FAE	1.267	AB
FAA	1.067	B
FJ	1.033	B
DOE	0.817	B
DOA	0.800	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 7.6071
 Critical T Value 2.021 Critical Value for Comparison 15.375

Error term used: Error, 40 DF

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tabla A10. Análisis de la varianza y comparación de medias de la longitud del tejido necrótico en plantas de *Olea europaea* L. var. Picual inoculadas con *B. corticola*, *B. iberica*, *B. dothidea* y *B. ribis*.

1. Análisis de la varianza

Source	DF	SS	MS	F	P
AISLADO	7	5.1967	0.74238	5.01	0.0004
Error	40	5.9300	0.14825		
Total	47	11.1267			

Grand Mean 0.9333 CV 41.25

2. Comparación de medias

AISLADO	Mean	Homogeneous Groups
DCA	1.6000	A
FO	1.2667	AB
DCE	0.9167	BC
FAA	0.8667	BCD
FJ	0.8667	BCD
DOE	0.7667	CD
FAE	0.7333	CD
DOA	0.4500	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2223
 Critical T Value 2.021 Critical Value for Comparison 0.4493

Error term used: Error, 40 DF

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tabla A11. Inhibición del crecimiento micelial (%) de los aislados de *B. corticola* DCA-28 y DCA-32 a los 2 días de incubación a 23° C en 12 h luz/12 h oscuridad.

1. Aislado DCA-28.

PRODUCTO	CONCENTRACIÓN DE MATERIA ACTIVA (ppm)				
	0,1	1	10	100	1000
Metil-Tiofanato	63,87	95,78	97,28	98,04	98,21
Metil-Tiofanato+Sulfato Cuprocálcico	60,55	85,34	95,48	97,18	99,82
Carbendazima	92,05	95,67	97,57	98,37	98,58
Flusilazol+Carbendazima	100	100	100	100	100
Epoxiconazol	16,64	85,24	93,3	100	100
Difenoconazol	-	16,27	61,5	88,75	91,78
Folpet+Sulfato Cuprocálcico	-	16,05	11,26	44,99	100
Pyraclostrobin	17,18	66,99	98,58	98,35	100
Sulfato Cuprocálcico	-	-5,09	-6,021	10,05	98,25

2. Aislado DCA-32.

PRODUCTO	CONCENTRACIÓN DE MATERIA ACTIVA (ppm)				
	0,1	1	10	100	1000
Metil-Tiofanato	54,85	92,74	95,03	96,71	97,15
Metil-Tiofanato+Sulfato Cuprocálcico	49,77	79,52	93,72	96,1	99,76
Carbendazima	87,84	93,67	94,98	95,95	97,57
Flusilazol+Carbendazima	100	100	100	100	100
Epoxiconazol	17,51	86,27	94,33	99,08	100
Difenoconazol		26,86	49,95	78,85	83,42
Folpet+Sulfato Cuprocálcico		16,05	11,26	41	100
Pyraclostrobin	17,18	78,14	98,23	99,66	100
Sulfato Cuprocálcico		-4,72	-8,51	-2,43	86,18

Tabla A12. invitro1. Inhibición del crecimiento micelial (%) de los aislados de *B. corticola* DCA-28 y DCA-32 a los 2 días de incubación a 23° C en 12 h luz/12 h oscuridad.

1. Aislado DCA-28.

PRODUCTO	CONCENTRACIÓN DE MATERIA ACTIVA (ppm)				
	0,1	1	10	100	1000
Metil-Tiofanato	80,74	95,69	97,32	98,25	98,16
Metil-Tiofanato+Sulfato Cuprocálcico	78,6	86,87	95,93	97,56	99,76
Carbendazima	92,05	95,67	97,57	98,37	98,58
Flusilazol+Carbendazima	100	100	100	100	100
Epoxiconazol	0	72,18	89,26	100	100
Difenoconazol		0	40,57	81,78	86,48
Folpet+Sulfato Cuprocálcico		0	0	22,63	100
Pyraclostrobin	11,45	52,18	93,85	94,31	100
Sulfato Cuprocálcico		0	0	0	95,34

2. Aislado DCA-32.

PRODUCTO	CONCENTRACIÓN DE MATERIA ACTIVA (ppm)				
	0,1	1	10	100	1000
Metil-Tiofanato	73,45	94,8	96,95	97,85	98,34
Metil-Tiofanato+Sulfato Cuprocálcico	69,08	86,94	95,85	97,54	99,76
Carbendazima	93,73	95,74	96,73	97,29	98,38
Flusilazol+Carbendazima	100	100	100	100	100
Epoxiconazol	23,04	82,15	93,87	99,47	100
Difenoconazol		23,49	43,85	77,05	82,84
Folpet+Sulfato Cuprocálcico		12,09	2,69	31,71	99,69
Pyraclostrobin	16,78	82,26	97,21	97,91	100
Sulfato Cuprocálcico		1,42	1,98	1,44	88,66

Tabla A13. Ev aluaciones de campo de las parcelas de ensayo situadas en Las Navas y El Berrocal (Sevilla). Periodo 05-07.

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES									
			FEB-05	NOV 05	JULIO 06		DICIEMBRE 06		MAYO 07		NOVIEMBRE-07	
			Nº Chancros	Nº Chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
1	1	1	0	1	1	21	0	0	1	9	1	53
2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	3	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	5	16	18	1	61	2	14	4	169	5	272
6	1	6	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	8	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	9	1	2	2	62	0	0	2	33	0	0
10	1	10	0	0	1	27	0	0	0	0	0	0
11	1	11	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	12	0	9	0	0	2	10	4	56	3	6
13	1	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	2	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
15	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	2	5	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
19	2	6	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
20	2	7	8	8	1	89	0	0	1	32	2	130
21	2	8	1	1	1	74	0	0	3	27	1	26
22	2	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	2	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
24	2	11	0	0	0	0	1	5	0	0	7	14
25	2	12	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6
26	2	13	2	2	1	43	0	0	1	42	2	90
27	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
28	3	2	5	5	1	105	0	0	5	44	0	0
29	3	3	6	26	2	32	0	0	2	98	0	0

Tabla A13. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES									
			FEB-05	NOV 05	JULIO 06		DICIEMBRE 06		MAYO 07		NOVIEMBRE-07	
			Nº Chancros	Nº Chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
30	3	4	23	26	2	16	2	11	1	15	15	72
31	3	5	9	11	2	22	0	0	3	340	3	118
32	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	3	8	1	1	1	33	1	17	1	30	1	45
35	3	9	0	0	0	0	1	5	3	93	1	55
36	3	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	3	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	3	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	3	13	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
40	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	95
41	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
42	4	3	8	11	1	6	0	0	0	0	0	0
43	4	4	6	6	1	23	1	5	4	51	0	0
44	4	5	5	5	0	0	2	10	3	24	0	0
45	4	6	0	7	0	0	0	0	0	0	1	56
46	4	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	4	8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
48	4	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	4	10	0	0	0	0	2	62	1	14	0	0
50	4	11	0	0	0	0	3	15	0	0	0	0
51	4	12	0	3	0	0	6	62	2	10	5	115
52	4	13	10	10	0	0	7	87	3	90	0	0
53	5	1	3	3	0	0	1	5	2	15	0	0
54	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	5	3	12	12	0	0	11	65	1	4	4	16
56	5	4	22	31	2	8	14	82	0	0	2	6
57	5	5	49	57	6	43	16	109	0	0	15	99
58	5	6	11	11	0	0	4	20	4	58	0	0

Tabla A13. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES									
			FEB-05	NOV 05	JULIO 06		DICIEMBRE 06		MAYO 07		NOVIEMBRE-07	
			Nº Chancros	Nº Chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
59	5	7	2	5	3	64	1	5	5	102	0	0
60	5	8	2	11	6	48	4	29	0	0	2	45
61	5	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	5	10	2	3	3	50	2	23	2	30	1	9
63	5	11	3	3	2	108	1	8	5	88	4	294
64	5	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65 ^b	5	13										
66	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	6	2	0	0	0	0	2	14	0	0	0	0
68	6	3	7	7	1	6	3	15	0	0	1	10
69	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	6	5	1	1	4	53	3	23	2	32	0	0
71	6	6	4	4	3	14	0	0	0	0	0	0
72	6	7	1	1	0	0	0	0	2	45	0	0
73	6	8	5	5	3	3	3	15	0	0	0	0
74	6	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75	6	10	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
76	6	11	1	1	1	39	1	5	2	32	1	39
77	6	12	3	3	2	48	2	16	3	99	2	108
78	6	13	3	3	0	0	1	16	4	25	0	0
79	7	1	4	5	0	0	1	5	0	0	0	0
80	7	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
81	7	3	9	9	3	119	2	10	4	45	1	24
82	7	4	0	0	0	0	2	13	0	0	0	0
83	7	5	1	1	1	86	0	0	2	20	1	9
84	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	7	7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
86	7	8	1	1	14	216	6	51	1	8	0	0
87	7	9	0	0	0	0	1	5	1	9	0	0

Tabla A13. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES									
			FEB-05	NOV 05	JULIO 06		DICIEMBRE 06		MAYO 07		NOVIEMBRE-07	
			Nº Chancros	Nº Chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
175 ^b	14	6										
176	14	7	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
177	14	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
178	14	9	5	5	2	14	3	17	1	3	3	57
179	14	10	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
180 ^b	14	11										
181	14	12	3	6	0	0	0	0	0	0	1	120
182	14	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	15	1	0	2	1	9	1	5	0	0	2	71
184	15	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
185	15	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
186	15	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
187 ^b	15	5										
188	15	6	2	2	0	0	1	5	0	0	0	0
189	15	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
190	15	8	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
191	15	9	5	5	1	5	0	0	3	33	1	2
192	15	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
193	15	11	5	6	0	0	1	11	0	0	1	34
194	15	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
195	15	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
196	16	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
197	16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
198	16	3	0	0	0	0			0	0		
199	16	4	0	0	4	245	0	0	1	14	1	52
200	16	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
201	16	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202	16	7	2	2	1	8	1	13	0	0	0	0
203	16	8	4	4	1	2	0	0	1	21	0	0

Tabla A13. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES									
			FEB-05	NOV 05	JULIO 06		DICIEMBRE 06		MAYO 07		NOVIEMBRE-07	
			Nº Chancros	Nº Chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
233	18	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
234	18	13	2	3	2	13	1	40	1	40	1	47
235 ^b	19	1										
236 ^b	19	2										
237	19	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	19	4	0	1	0	0	1	9	1	4	0	0
239	19	5	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0
240	19	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
241 ^b	19	7										
242	19	8	4	4	2	30	0	0	0	0	0	0
243	19	9	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
244	19	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
245 ^b	19	11										
246	19	12	0	1	0	0	1	7	1	4	0	0
247	19	13	3	4	0	0	1	20	1	26	0	0
248	20	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
249	20	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	142
250	20	3	3	7	0	0	3	53	3	75	0	0
251	20	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
252	20	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
253	20	6	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
254	20	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
255	20	8	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0
256	20	9	5	8	1	26	2	45	2	47	1	30
257	20	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
258	20	11	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
259	20	12	4	4	0	0	1	7	0	0	1	0
260	20	13	1	1	0	0	2	14	0	0	4	14
261	21	1	3	4	0	0	2	25	3	306	4	511

Tabla A13. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES									
			FEB-05	NOV 05	JULIO 06		DICIEMBRE 06		MAYO 07		NOVIEMBRE-07	
			Nº Chancros	Nº Chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
291	23	5	4	3	0	0	1	13	1	20	3	48
292	23	6	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0
293	23	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
294	23	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
295	23	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
296	23	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
297 ^b	23	11										
298	23	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
299	23	13	4	4	0	0	0	0	0	0	1	3
300	24	1	3	3	0	0	2	10	0	0	1	4
301	24	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	68
302	24	3	2	5	0	0	1	5	3	23	1	8
303	24	4	3	19	0	0	0	0	0	0	0	0
304	24	5	5	6	0	0	0	0	0	0	1	66
305	24	6	3	3	0	0	0	0	0	0	2	79
306	24	7	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
307	24	8	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0
308	24	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
309	24	10	1	3	1	11	1	11	1	12	1	29
310	24	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
311	24	12	0	1	0	0	1	18	2	21	1	20
312	24	13	13	13	0	0	1	5	2	67	1	14
313	25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
314	25	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	25
315	25	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
316	25	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
317	25	5	5	5	1	14	2	119	1	78	1	77
318	25	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
319	25	7	10	12	2	21	0	0	0	15	0	0

Tabla A13. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES									
			FEB-05	NOV 05	JULIO 06		DICIEMBRE 06		MAYO 07		NOVIEMBRE-07	
			Nº Chancros	Nº Chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
349	27	11	2	3	0	0	2	50	2	61	2	45
350	27	12	0	1	1	26	1	30	3	64	1	53
351	27	13	7	8	0	0	0	0	0	0	0	0
352	28	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
353	28	2	2	0	1	5	0	0	0	0	0	0
354	28	3	2	2	0	0	1	20	2	12	0	0
355	28	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
356	28	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
357	28	6	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
358	28	7	5	5	0	0	0	0	0	0	1	9
359	28	8	3	3	2	46	1	7	3	54	1	92
360	28	9	2	5	0	0	1	5	0	0	1	30
361	28	10	1	1	0	0	0	0	0	0	1	25
362	28	11	1	3	1	6	1	7	8	60	3	55
363	28	12	2	4	1	7	1	13	3	46	1	16
364	28	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
365	29	1	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
366	29	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
367	29	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
368	29	4	11	13	1	3	1	22	3	77	1	75
369	29	5	6	4	2	21	0	0	1	6	1	7
370	29	6	44	39	0	0	3	138	1	73	2	82
371	29	7	5	5	0	0	2	37	3	83	0	0
372	29	8	1	1	1	5	0	0	0	0	0	0
373	29	9	1	1	0	0	1	44	1	92	0	0
374	29	10	4	1	0	0	1	10	1	8	1	10
375	29	11	0	0	0	0	2	23	2	15	0	0
376	29	12	0	0	0	0	1	52	5	90	3	65
377	29	13	5	4	2	40	2	91	4	106	4	118

Tabla A13. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES									
			FEB-05	NOV 05	JULIO 06		DICIEMBRE 06		MAYO 07		NOVIEMBRE-07	
			Nº Chancros	Nº Chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
378	30	1	0	0	0	0	2	106	1	25	0	0
379	30	2	3	3	0	0	2	106	2	97	1	18
380	30	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
381	30	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
382	30	5	4	4	0	0	1	16	1	8	0	0
383	30	6	6	7	0	0	3	93	3	82	2	60
384	30	7	1	4	0	0	1	16	2	28	1	3
385	30	8	5	5	0	0	2	41	2	73	2	76
386	30	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
387	30	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
388	30	11	0	0	2	27	1	20	1	9	1	8
389	30	12	1	6	1	8	1	14	1	27	0	0
390	30	13	0	0	4	25	1	5	0	0	0	0

^a El número de Tratamiento hace referencia al orden en el que se aplicó en campo cada producto. A continuación se detalla la materia activa del producto al que hace referencia cada número:

1. Metil Tiofanato
2. Metil Tiofanato + Sulfato Cuprocálcico (Caldo Bordelés)
3. Carbendazima
4. Carbendazima + Flusilazol
5. Epoxiconazol
6. Difenconazol
7. Folpet + Sulfato Cuprocálcico
8. Piraclostrabin
9. Producto biológico experimental BO-165
10. Sulfato Cuprocálcico (Caldo Bordelés)
11. Producto biológico comercial Trichoderma
12. Testigo
13. Producto biológico experimental HO-31

^b Árboles que no fueron tratados.

Tabla A14. Evaluaciones de campo de las parcelas de ensayo situada en Valdeinfierno (Cádiz). Periodo 06-08.

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES										
			JULIO 06			DICIEMBRE 06		JUNIO 07		DICIEMBRE 07		NOVIEMBRE-08	
			Nº Sangraduras	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
1	1	1	16	2	11	2	8	4	59	3	25	7	121
2	1	2	4	1	23	2	10	4	185	3	71	3	49
3	1	3	19	5	27	12	51	11	126	11	179	7	64
4	1	4	8	2	4	1	6	9	141	4	142	5	124
5	1	5	23	1	2	1	8	4	201	2	151	2	146
6	1	6	10	1	2	1	2	1	2	4	201	0	0
7	2	1	0	86	219	84	247	84	197	61	297	21	154
8	2	2	0	7	34	17	67	17	236	27	389	7	223
9	2	3	540	2	4	4	16	12	200	17	215	4	109
10	2	4	12	0	0	7	23	8	105	9	120	5	79
11	2	5	30	0	0	3	10	3	9	2	6	1	10
12	2	6	0	4	12	5	31	6	46	4	33	0	0
13	3	1	1	1	9	1	9	2	25	1	24	1	35
14	3	2	0	4	11	3	9	9	66	10	121	3	237
15	3	3	15	1	2	1	44	3	39	3	66	1	23
16	3	4	9	6	89	6	69	14	505	16	670	14	663
17	3	5	27	7	14	9	30	15	60	14	75	8	61
18	3	6	4	3	6	3	19	7	97	3	39	3	37
19	4	1	0	3	6	5	14	10	64	5	13	3	34
20	4	2	4	9	50	6	145	9	312	19	188	9	355
21	4	3	2	1	26	0	0	2	70	3	73	3	123
22	4	4	13	1	7	3	33	4	377	8	464	5	434
23	4	5	8	3	24	7	29	1	8	5	76	2	83
24	4	6	8	1	5	3	15	0	0	3	20	0	0
25	5	1	9	6	75	2	48	10	292	10	333	5	115
26	5	2	5	2	4	3	7	3	4	3	8	4	129
27	5	3	0	43	88	7	100	9	253	12	306	6	166
28	5	4	0	3	54	7	91	10	226	7	250	8	215
29	5	5	0	12	69	11	62	10	61	12	90	0	0

Tabla A14. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES										
			JULIO 06			DICIEMBRE 06		JUNIO 07		DICIEMBRE 07		NOVIEMBRE-08	
			Nº Sangraduras	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
30	5	6	0	34	183	51	212	44	401	55	591	7	297
31	6	1	0	26	170	29	110	44	468	32	396	10	274
32	6	2	0	17	58	17	59	17	98	17	127	2	33
33	6	3	0	9	52	26	153	37	257	35	271	3	47
34	6	4	2	1	2	2	42	5	126	5	147	2	77
35	6	5	2	0	0	0	0	1	90	1	35	3	74
36	6	6	5	0	0	1	3	1	2	2	5	0	0
37	7	1	0	8	19	7	22	7	23	7	17	0	0
38	7	2	0	2	4	3	7	6	17	9	30	2	26
39	7	3	0	0	0	0	0	83	219	60	230	3	66
40	7	4	0	75	197	65	152	23	324	19	345	3	154
41	7	5	0	16	59	17	49	2	12	2	4	1	40
42	7	6	0	0	0	0	0	0	0	1	5	1	56
43	8	1	3	0	0	0	0	4	198	4	193	3	191
44	8	2	0	3	6	5	10	4	8	7	17	2	78
45	8	3	0	4	60	6	65	11	309	14	396	9	287
46	8	4	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0
47	8	5	0	32	101	51	125	50	209	57	343	5	83
48	8	6	0	18	57	19	63	21	92	18	75	1	7
49	9	1	0	6	19	12	31	15	33	12	44	1	14
50	9	2	0	12	32	13	46	27	109	27	115	1	7
51	9	3	0	1	2	5	10	9	18	6	14	0	0
52	9	4	0	3	8	6	21	12	66	10	44	3	40
53	9	5	0	2	4	3	6	6	29	5	36	1	14
54	9	6	0	10	37	8	25	9	62	12	85	2	63
55	10	1	0	1	2	1	2	3	10	2	36	2	62
56	10	2	0	4	10	4	8	2	4	4	12	0	0
57	10	3	0	0	0	2	121	2	209	6	344	6	289
58	10	4	0	13	49	18	48	19	80	15	65	0	0

Tabla A14. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES										
			JULIO 06			DICIEMBRE 06		JUNIO 07		DICIEMBRE 07		NOVIEMBRE-08	
			Nº Sangraduras	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
59	10	5	5	0	0	0	0	3	57	3	61	1	30
60	10	6	0	1	2	2	9	7	66	10	132	7	185
61	11	1	0	14	75	18	64	20	169	13	65	1	19
62	11	2	0	7	18	8	16	10	78	15	109	2	55
63	11	3	0	4	6	5	10	7	35	9	57	1	15
64	11	4	0	6	12	12	40	12	51	10	103	4	49
65	11	5	0	0	0	4	71	6	298	7	333	7	224
66	11	6	0	2	4	3	6	3	6	3	7	0	0
67	12	1	0	5	11	8	46	11	184	9	167	4	153
68	12	2	0	5	10	3	6	8	113	9	174	4	104
69	12	3	9	0	0	1	2	7	180	5	183	6	201
70	12	4	0	33	93	36	117	44	372	46	339	5	142
71	12	5	38	7	14	8	20	8	59	1	2	1	35
72	12	6	22	3	6	3	6	2	4	2	5	0	0
73	13	1	0	1	2	0	0	1	35	1	40	1	12
74	13	2	0	3	6	1	2	2	4	1	3	0	0
75	13	3	5	0	0	0	0	4	130	5	186	4	155
76	13	4	0	10	30	11	46	13	26	15	44	3	35
77	13	5	2	7	14	6	27	7	40	7	45	2	19
78	13	6	0	0	0	3	50	5	137	5	159	4	101
79	14	1	0	28	68	63	144	74	194	67	207	1	11
80	14	2	0	0	0	0	0	3	70	2	93	2	78
81	14	3	40	21	42	25	50	26	52	12	24	0	0
82	14	4	0	3	7	3	6	6	85	6	59	2	55
83	14	5	0	10	22	14	35	12	40	12	64	1	22
84	14	6	0	13	26	15	30	25	73	20	115	1	7
85	15	1	0	1	5	1	2	2	4	1	4	0	0
86	15	2	32	26	54	34	91	27	183	27	238	4	76
87	15	3	24	1	4	3	6	5	61	3	60	1	26

Tabla A14. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES										
			JULIO 06			DICIEMBRE 06		JUNIO 07		DICIEMBRE 07		NOVIEMBRE-08	
			Nº Sangraduras	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
88	15	4	1	2	20	3	40	10	142	8	178	4	83
89	15	5	23	1	2	1	2	6	17	5	24	0	0
90	15	6	0	16	55	14	53	20	66	26	125	3	18
91	16	1	0	3	109	3	88	5	154	7	173	1	30
92	16	2	0	1	2	1	2	5	68	4	70	1	15
93	16	3	28	10	33	11	35	13	99	11	111	3	32
94	16	4	49	17	34	26	68	20	40	23	51	0	0
95	16	5	10	9	42	9	44	9	63	9	67	0	0
96	16	6	0	7	37	5	45	7	36	7	36	3	32
97	17	1	3	4	8	7	14	5	28	7	40	2	28
98	17	2	0	22	44	33	68	27	54	18	36	0	0
99	17	3	0	3	53	3	57	4	77	4	100	4	57
100	17	4	0	4	17	7	50	6	86	8	294	4	60
101	17	5	7	3	6	8	23	9	18	8	23	0	0
102	17	6	0	3	33	3	41	3	50	3	21	2	23
103	18	1	0	0	0	1	2	0	0	2	4	0	0
104	18	2	0	30	150	30	179	39	249	36	384	4	51
105	18	3	27	26	52	47	94	50	100	43	112	2	23
106	18	4	0	26	52	41	106	41	148	36	180	4	59
107	18	5	0	1	2	2	4	2	4	1	2	1	7
108	18	6	0	13	117	14	76	20	140	25	147	3	49
109	19	1	5	9	12	27	107	28	110	24	149	4	50
110	19	2	0	19	43	19	43	35	69	40	126	2	32
111	19	3	0	10	37	14	51	28	74	31	159	6	67
112	19	4	0	118	508	81	285	67	476	79	502	21	251
113	19	5	0	9	22	26	57	26	92	17	40	3	79
114 ^b	19	6	0	2	4	4	8	3	6	0	0		
115	20	1	0	0	0	0	0	0	0	1	19	2	78
116	20	2	0	4	8	5	10	0	0	0	0	0	

Tabla A14. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES										
			JULIO 06			DICIEMBRE 06		JUNIO 07		DICIEMBRE 07		NOVIEMBRE-08	
			Nº Sangraduras	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
117	20	3	0	9	40	10	76	7	124	12	135	7	109
118	20	4	0	8	16	33	79	29	58	30	90	2	12
119	20	5	7	6	17	6	12	9	79	12	115	3	70
120	20	6	0	23	68	25	87	28	89	32	110	1	8
121	21	1	0	1	33	1	7	4	66	5	76	4	58
122	21	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	10
123	21	3	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	7
124	21	4	2	0	0	0	0	0	0	6	12	0	0
125	21	5	72	6	12	26	62	60	128	55	163	3	50
126	21	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
127	22	1	0	2	84	7	124	5	238	5	182	3	130
128	22	2	0	15	59	33	153	29	199	24	216	5	70
129	22	3	11	0	0	5	10	4	30	4	26	1	4
130	22	4	26	2	4	9	18	5	43	4	17	0	0
131 ^b	22	5	0	13	105	13	110						
132	22	6	0	4	8	7	14	10	150	10	233	3	101
133	23	1	0	0	0	3	6	2	4	3	6	0	0
134	23	2	10	5	10	20	41	12	24	18	36	0	0
135 ^b	23	3	3	1	6	6	21						
136	23	4	0	0	0	0	0	3	6	10	22	2	23
137	23	5	5	12	31	26	67	28	56	23	59	3	14
138	23	6	0	0	0	0	0	4	72	10	99	7	60
139	24	1	0	1	2	10	53	10	60	13	98	4	36
140	24	2	0	1	2	2	4	2	30	3	60	1	4
141	24	3	0	5	10	6	18	5	81	6	105	5	72
142	24	4	0	5	14	13	89	21	204	22	226	7	139
143	24	5	10	32	83	32	108	27	359	26	408	5	239
144	24	6	0	0	0	1	19	2	36	2	42	1	22
145	25	1	0	1	2	0	0	1	15	1	43	4	111

Tabla A14. (Continuación)

Árbol	Bloque	Tratamiento ^a	EVALUACIONES										
			JULIO 06			DICIEMBRE 06		JUNIO 07		DICIEMBRE 07		NOVIEMBRE-08	
			Nº Sangraduras	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros	Nº Chancros	Longitud de chancros
175	30	1	0	0	0	1	18	3	85	3	85	3	94
176	30	2	0	7	14	7	20	6	12	9	18	0	0
177	30	3	0	2	9	3	55	5	64	6	53	2	48
178	30	4	0	0	0	3	6	9	67	6	61	2	32
179	30	5	0	1	2	3	29	3	21	4	29	1	10
180	30	6	0	1	2	1	2	4	26	7	42	2	17

^a El número de Tratamiento hace referencia al orden en el que se aplicó en campo cada producto. A continuación se detalla la materia activa del producto al que hace referencia cada número:

1. Metil Tiofanato 24h
2. Producto biológico comercial Trichoderma
3. Carbendazima 24h
4. Testigo
5. Carbendazima
6. Metil Tiofanato

^b Árboles tratados y que fueron eliminados durante el desarrollo del ensayo

Tabla A15. Análisis de la varianza y comparación de medias para el valor transformado del número de chancros (valor transformado del número de chancros = (número de chancros + 0,5)^{1/2}) (Steel y Torrie, 1985) y la longitud de chancros de las evaluaciones realizadas en la parcela de ensayo de la finca Las Navas y El Berrocal (Sevilla).

1. Evaluación realizada en Febrero de 2005

1.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
Bloque	10	5.692	0.56921	0.65	0.7712
Tratam	12	6.862	0.57180	0.65	0.7958
Error	117	103.018	0.88049		
Total	139				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.4177 CV 66.19

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	2.914	2.91440	3.38	0.0687
Remainder	116	100.103	0.86296		

1.2. Comparación de medias

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
Carben	1.7880	A
Testigo	1.7118	A
BO	1.6573	A
MetTio+Cu	1.6153	A
Flusi+Carb	1.5514	A
Piraclos	1.4392	A
Folpet+Cu	1.3864	A
Cu	1.3640	A
Difeno	1.2626	A
Epoxi	1.2052	A
Trichoderm	1.1980	A
HO	1.1834	A
MetTio	1.0680	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.980 Critical Value for Comparison VARIES

Tabla A15. (Continuación)

2. Evaluación realizada en Noviembre de 2005

2.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
Bloque	16	18.338	1.14615	1.11	0.3487
Tratam	12	13.528	1.12730	1.09	0.3695
Error	185	191.070	1.03281		
Total	213				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.5471 CV 65.69

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	3.999	3.99882	3.93	0.0488
Remainder	184	187.071	1.01669		

2.2. Comparación de medias

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
Carben	1.8721	A
Testigo	1.8453	A
HO	1.7460	A
Epoxiconaz	1.7418	A
Fluzil+Car	1.7418	A
Pyraclostr	1.7237	AB
Cu	1.6066	AB
Difenocona	1.4830	AB
BO	1.4018	AB
Folpet+Cu	1.3963	AB
Met-tio+Cu	1.3633	AB
Trichoderm	1.1654	AB
Met-tio	1.0256	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.973 Critical Value for Comparison VARIES

Tabla A15. (Continuación)

3. Evaluación realizada en Julio de 2006

3.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	8	1.2816	0.16021	0.66	0.7249
TRATAMIEN	12	8.7528	0.72940	3.01	0.0013
Error	94	22.8051	0.24261		
Total	114				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.0064 CV 48.94

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	0.6421	0.64209	2.69	0.1041
Remainder	93	22.1630	0.23831		

3.2. Comparación de medias

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
Test	1.6495	A
Pyraclotr	1.4902	AB
Epoxico	1.1111	BC
Flusi+Carb	1.0511	BC
HO	1.0110	C
Carben	1.0090	C
Trichoderm	0.9768	C
MetTio+Cu	0.9466	C
Difenoco	0.8939	C
BO	0.7646	C
Cu	0.7646	C
Met Tio	0.7071	C
Folpet+Cu	0.7071	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.986 Critical Value for Comparison VARIES

3.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	8	10032.8	1254.10	1.43	0.1928
TRATAMIEN	12	18893.3	1574.44	1.80	0.0591
Error	94	82234.6	874.84		
Total	114				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 12.236 CV 241.73

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	21536.7	21536.7	33.00	0.0000
Remainder	93	60697.9	652.7		

Tabla A15. (Continuación)

3.4. Comparación de medias

TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Epoxico	39.620	A
Pyraclotr	34.000	AB
Test	27.222	ABC
Carben	15.444	ABC
Trichoderm	13.667	ABC
HO	11.999	ABC
Flusi+Carb	8.7778	BC
Difenoco	3.7778	C
MetTio+Cu	2.4444	C
Cu	1.3333	C
BO	0.7778	C
Met Tio	8.88E-15	C
Folpet+Cu	1.78E-15	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.986 Critical Value for Comparison VARIES

4. Evaluación realizada en Diciembre de 2006

4.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	12	3.4993	0.29161	1.58	0.1053
TRATAM	12	6.8381	0.56984	3.08	0.0007
Error	135	24.9608	0.18489		
Total	159				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.0518 CV 40.88

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	0.5381	0.53806	2.95	0.0881
Remainder	134	24.4227	0.18226		

4.2. Comparación de medias

TRATAM	Mean	Homogeneous Groups
Testigo	1.5641	A
HO	1.3747	AB
Pyraclor	1.1525	BC
Trichoderm	1.1380	BCD
Carben	1.0728	BCD
Epoxi	0.9956	CD
MetTio+Cu	0.9929	CD
Flusi+Carb	0.9336	CD
BO	0.9336	CD
Difeno	0.9260	CD
Cu	0.8938	CD
MetTio	0.8910	CD
Folpet+Cu	0.8052	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.978 Critical Value for Comparison VARIES

Tabla A15. (Continuación)

4.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	12	15890.4	1324.20	2.78	0.0021
TRATAM	12	7909.8	659.15	1.38	0.1819
Error	135	64397.2	477.02		
Total	159				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 12.162 CV 179.58

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	4492.4	4492.41	10.05	0.0019
Remainder	134	59904.8	447.05		

4.4. Comparación de medias

TRATAM	Mean	Homogeneous Groups
Testigo	26.769	A
HO	23.741	AB
Difeno	19.846	ABC
MetTio+Cu	14.429	ABC
Pyraclós	12.615	ABC
Trichoderm	10.701	ABC
MetTio	10.338	ABC
BO	10.077	ABC
Carben	8.692	BC
Cu	6.769	BC
Epoxi	5.559	C
Flusi+Carb	4.923	C
Folpet+Cu	3.648	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.978 Critical Value for Comparison VARIES

5. Evaluación realizada en Mayo de 2007

5.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	11	2.9790	0.27082	1.17	0.3176
TRATAM	12	7.6059	0.63383	2.73	0.0026
Error	124	28.8052	0.23230		
Total	147				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.0734 CV 44.90

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	0.1220	0.12204	0.52	0.4708
Remainder	123	28.6832	0.23320		

Tabla A15. (Continuación)

5.2. Comparación de medias

TRATAM	Mean	Homogeneous Groups
Testigo	1.6732	A
Trichoderm	1.2970	AB
Epoxi	1.2118	B
Flusi+Carb	1.1799	BC
HO	1.1558	BC
Piraclos	1.0810	BC
Carben	0.9948	BC
Cu	0.9544	BC
Folpet+Cu	0.9503	BC
BO	0.9094	BC
Difeno	0.8904	BC
MetTio+Cu	0.8786	BC
MetTio	0.7784	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison VARIES

5.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
BLOQUE	11	16579	1507.22	1.68	0.0853
TRATAM	12	15858	1321.54	1.47	0.1430
Error	124	111231	897.02		
Total	147				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 17.749 CV 168.74

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	2040	2040.28	2.30	0.1321
Remainder	123	109191	887.73		

5.4. Comparación de medias

TRATAM	Mean	Homogeneous Groups
Testigo	43.167	A
HO	26.167	AB
Trichoderm	25.004	ABC
Epoxi	24.903	ABC
Flusi+Carb	18.833	BC
MetTio+Cu	18.104	BC
Piraclos	17.833	BC
Difeno	15.167	BC
BO	14.250	BC
Folpet+Cu	12.771	BC
Cu	6.667	BC
Carben	6.667	BC
MetTio	1.204	C

Alpha 0.06 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.898 Critical Value for Comparison VARIES

Tabla A15. (Continuación)

6. Evaluación realizada en Noviembre de 2007

6.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
Bloque	12	2.0936	0.17447	1.04	0.4180
Tratam	12	6.3698	0.53081	3.16	0.0005
Error	137	23.0275	0.16808		
Total	161				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.0168 CV 40.32

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	2.745E-06	2.745E-06	0.00	0.9968
Remainder	136	23.0275	0.16932		

6.2. Comparación de medias

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
Testigo	1.5646	A
Trichoderm	1.2338	AB
HO	1.1388	BC
MetTio-Cu	1.0398	BCD
Epoxi	1.0144	BCD
Difenoc	0.9737	BCD
Folpet+Cu	0.9734	BCD
Carb	0.9559	BCD
BO	0.9435	BCD
MetTio	0.9135	BCD
Piraclostr	0.8266	CD
Cu	0.8266	CD
Carb+Flus	0.8142	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.977 Critical Value for Comparison VARIES

6.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
Bloque	12	9176	764.66	0.49	0.9150
Tratam	12	21959	1829.90	1.18	0.3004
Error	137	211731	1545.48		
Total	161				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 20.558 CV 191.23

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	260	259.95	0.17	0.6833
Remainder	136	211471	1554.93		

Tabla A15. (Continuación)

6.4. Comparación de medias

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
Testigo	51.154	A
Epoxi	29.446	AB
MetTio-Cu	27.938	AB
Trichoderm	27.177	AB
HO	23.615	AB
Difenoc	21.725	AB
Folpet+Cu	18.615	B
Carb	15.462	B
MetTio	13.662	B
BO	12.462	B
Piraclostr	11.769	B
Carb+Flus	9.308	B
Cu	4.923	B

Alpha	0.05	Standard Error for Comparison	VARIES
Critical T Value	1.977	Critical Value for Comparison	VARIES

Tabla A16. Análisis de la varianza y comparación de medias para el valor transformado del número de chancros (valor transformado del número de chancros = número de chancros + 0,5) (Steel y Torrie, 1985) y la longitud de chancros de las evaluaciones realizadas en la parcela de ensayo de la finca Valdeinfierno (Cádiz)

1. Evaluación realizada en Junio de 2006

1.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamien	5	1201.4	240.277	1.06	0.3843
Bloque	26	5680.7	218.489	0.97	0.5180
Error	130	29403.3	226.179		
Total	161	36285.4			

Grand Mean 9.4383 CV 159.34

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	4780.7	4780.70	25.05	0.0000
Remainder	129	24622.6	190.87		

1.2. Comparación de medias

Tratamien	Mean	Homogeneous Groups
Carben 24	15.130	A
MetTio 24	9.500	AB
Testigo	9.019	AB
Carben	8.389	AB
Trichoderm	8.204	AB
MetTio	6.389	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.0932
 Critical T Value 1.978 Critical Value for Comparison 8.0978

1.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamien	5	5946	1189.21	0.38	0.8642
Bloque	23	75147	3267.27	1.03	0.4309
Error	115	363549	3161.29		
Total	143	444642			

Grand Mean 32.493 CV 173.04

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	59639	59639.3	22.37	0.0000
Remainder	114	303909	2665.9		

Tabla A16. (Continuación)

1.4. Comparación de medias

Tratamien	Mean	Homogeneous Groups
Carben 24	45.167	A
MetTio 24	33.500	A
Trichoderm	33.167	A
Testigo	30.792	A
MetTio	27.333	A
Carbenda	25.000	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 16.231
 Critical T Value 1.981 Critical Value for Comparison 32.150

2. Evaluación realizada en Diciembre de 2006

2.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamien	5	1429.7	285.941	1.20	0.3109
Bloque	26	7119.4	273.825	1.15	0.2940
Error	130	30872.6	237.482		
Total	161	39421.8			

Grand Mean 11.870 CV 129.82

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	1578.7	1578.68	6.95	0.0094
Remainder	129	29294.0	227.08		

2.2. Comparación de medias

Tratamien	Mean	Homogeneous Groups
Carben 24	17.648	A
Testigo	11.944	AB
MetTio 24	11.463	AB
Trichoderm	11.352	AB
Carben	11.278	AB
MetTio	7.537	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.1942
 Critical T Value 1.978 Critical Value for Comparison 8.2977

2.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamien	5	9568	1913.62	0.76	0.5791
Bloque	25	64309	2572.38	1.02	0.4423
Error	125	314036	2512.29		
Total	155	387914			

Grand Mean 45.083 CV 111.18

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	1835	1835.31	0.73	0.3949
Remainder	124	312201	2517.75		

Tabla A16. (Continuación)

2.4. Comparación de medias

Tratamien	Mean	Homogeneous Groups
Carben 24	56.423	A
Testigo	51.731	A
Trichoderm	44.462	A
MetTio 24	43.731	A
Carbenda	42.769	A
MetTio	31.385	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 13.902
 Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 27.513

3. Evaluación realizada en Julio de 2007

3.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamien	5	1738.2	347.644	1.27	0.2792
Bloque	26	9724.0	374.000	1.37	0.1281
Error	130	35487.8	272.983		
Total	161	46950.0			

Grand Mean 14.389 CV 114.83

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	2059.7	2059.70	7.95	0.0056
Remainder	129	33428.1	259.13		

3.2. Comparación de medias

Tratamien	Mean	Homogeneous Groups
Testigo	18.537	A
Carben 24	18.352	A
Trichoderm	13.685	AB
MetTio 24	13.537	AB
Carben	13.204	AB
MetTio	9.019	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.4968
 Critical T Value 1.978 Critical Value for Comparison 8.8963

Tabla A16. (Continuación)

3.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamien	5	125445	25089.1	2.37	0.0425
Bloque	27	269439	9979.2	0.94	0.5507
Error	134	1417602	10579.1		
Total	166				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 103.59 CV 99.29

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	29161	29161.4	2.79	0.0970
Remainder	133	1388440	10439.4		

3.4. Comparación de medias

Tratamien	Mean	Homogeneous Groups
Carben 24	152.61	A
Testigo	115.64	AB
MetTio 24	102.89	AB
Trichoderm	97.57	B
Carben	91.03	B
MetTio	61.82	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.978 Critical Value for Comparison VARIES

4. Evaluación realizada en Diciembre de 2007

4.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIEN	5	1603.6	320.717	1.43	0.2180
BLOQUE	27	6901.4	255.606	1.14	0.3067
Error	134	30086.1	224.523		
Total	166				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 13.607 CV 110.12

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	1761.8	1761.81	8.27	0.0047
Remainder	133	28324.3	212.96		

Tabla A16. (Continuación)

4.2. Comparación de medias

TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Carben 24	17.929	A
Testigo	17.036	AB
MetTio 24	14.571	AB
Trichoderm	11.321	AB
Carben	10.824	AB
MetTio	9.964	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.0047 TO 4.0489
 Critical T Value 1,978 Critical Value for Comparison 7.9205 TO 8.0081

4.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIEN	5	180661	36132.1	2.38	0.0415
BLOQUE	27	360106	13337.3	0.88	0.6381
Error	134	2030337	15151.8		
Total	166				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 120.35 CV 102.28

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	12717	12716.6	0.84	0.3616
Remainder	133	2017621	15170.1		

4.4. Comparación de medias

TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Carben 24	183.72	A
Testigo	138.64	AB
MetTio 24	119.54	AB
Trichoderm	98.61	B
Carben	95.93	B
MetTio	85.64	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 32.898 TO 33.261
 Critical T Value 1,978 Critical Value for Comparison 65.066 TO 65.785
 Error term used: TRATAMIEN*BLOQUE, 134 DF

Tabla A16. (Continuación)

5. Evaluación realizada en Noviembre 2008

5.1. Análisis de varianza para la transformada del número de chancros

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIEN	5	90.68	18.1361	1.77	0.1247
BLOQUE	25	301.43	12.0571	1.17	0.2767
Error	123	1263.15	10.2695		
Total	153				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 3.6188 CV 88.55

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	162.82	162.821	18.05	0.0000
Remainder	122	1100.33	9.019		

5.2. Comparación de medias

TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups
Carben 24	4.8846	A
Testigo	4.1154	AB
Trichoderm	3.8846	AB
MetTio 24	3.3077	AB
Carben	2.9459	B
MetTio	2.5749	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison VARIES
 Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison VARIES
 Error term used: TRATAMIEN*BLOQUE, 123 DF
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

5.3. Análisis de la varianza para la longitud de chancro

Source	DF	SS	MS	F	P
TRATAMIEN	5	63047	12609.4	1.58	0.1702
BLOQUE	25	288717	11548.7	1.45	0.0959
Error	122	972509	7971.4		
Total	152				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 72.557 CV 123.05

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	146201	146201	21.41	0.0000
Remainder	121	826308	6829		

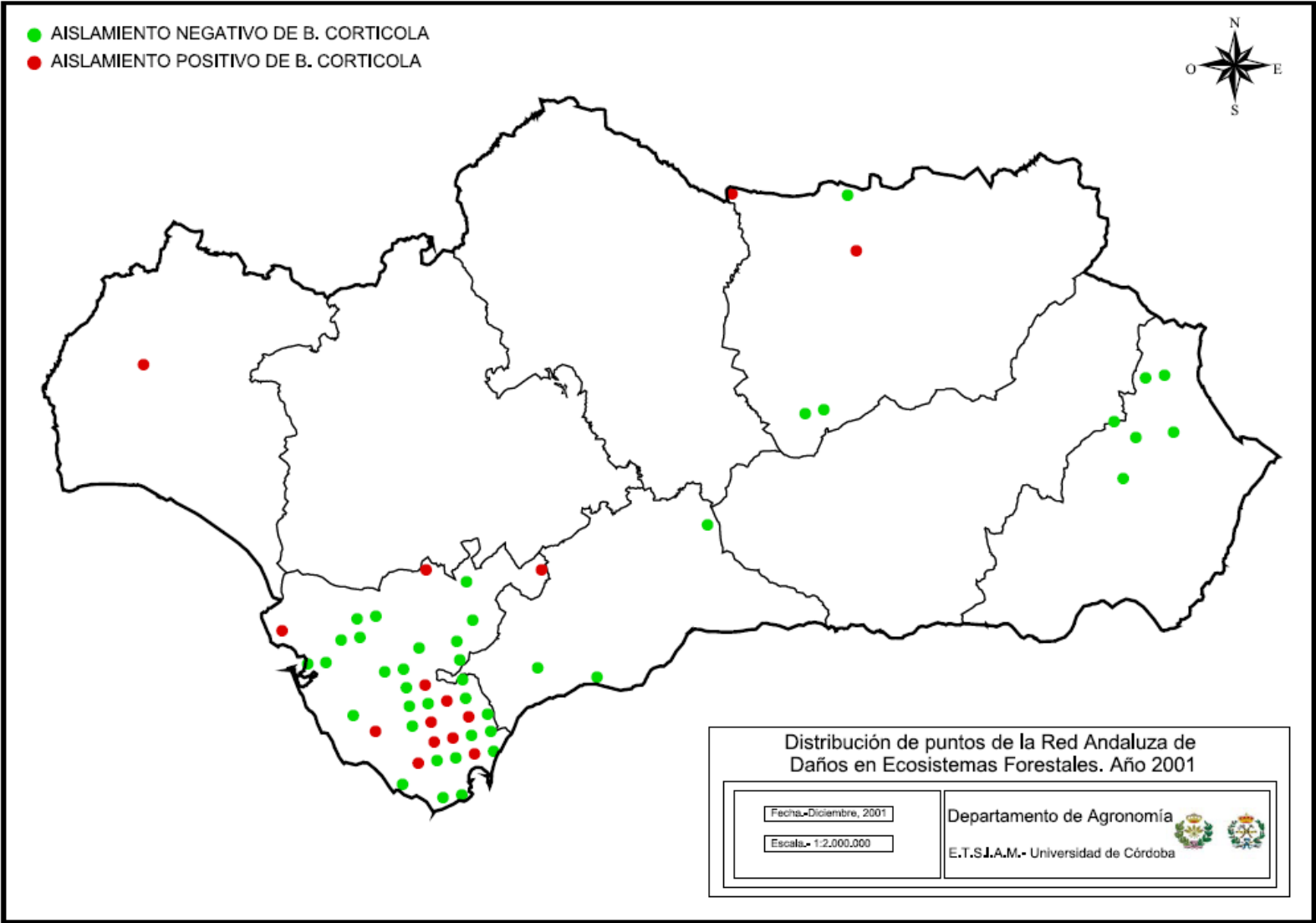
Tabla A16. (Continuación)

5.4. Comparación de medias

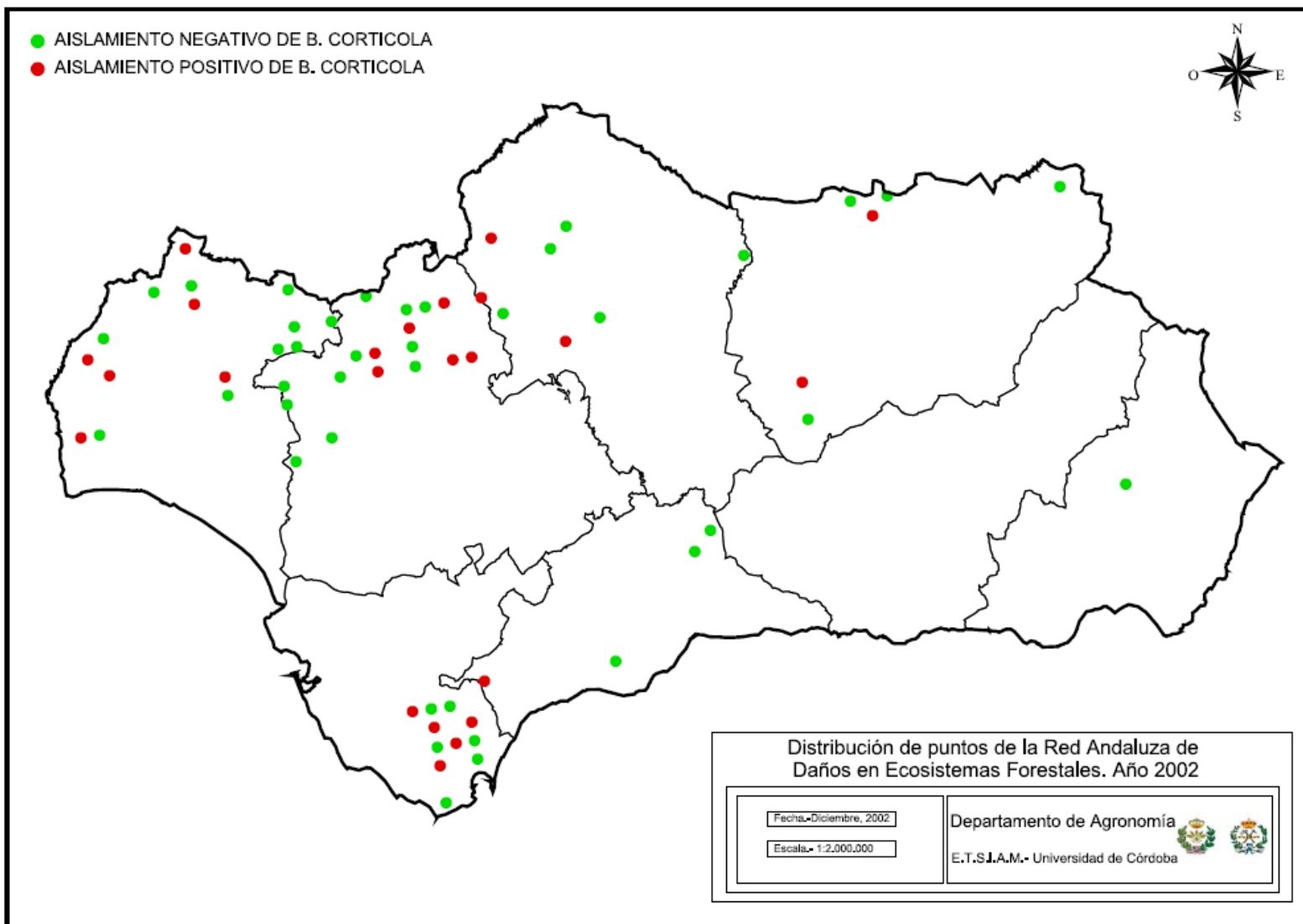
TRATAMIEN	Mean	Homogeneous Groups		
Carben 24	108.00	A		
Testigo	79.88	AB		
MetTio 24	77.43	AB		
Trichoderm	70.00	AB		
Carben	57.82	B		
MetTio	42.21	B		
Alpha	0.05		Standard Error for Comparison	VARIABLES
Critical T Value	1.980		Critical Value for Comparison	VARIABLES

Figura A1. Mapas anuales de la RASDEF con la distribución de puntos en los que se aislaron *B. corticola*. Período 2001-2005.

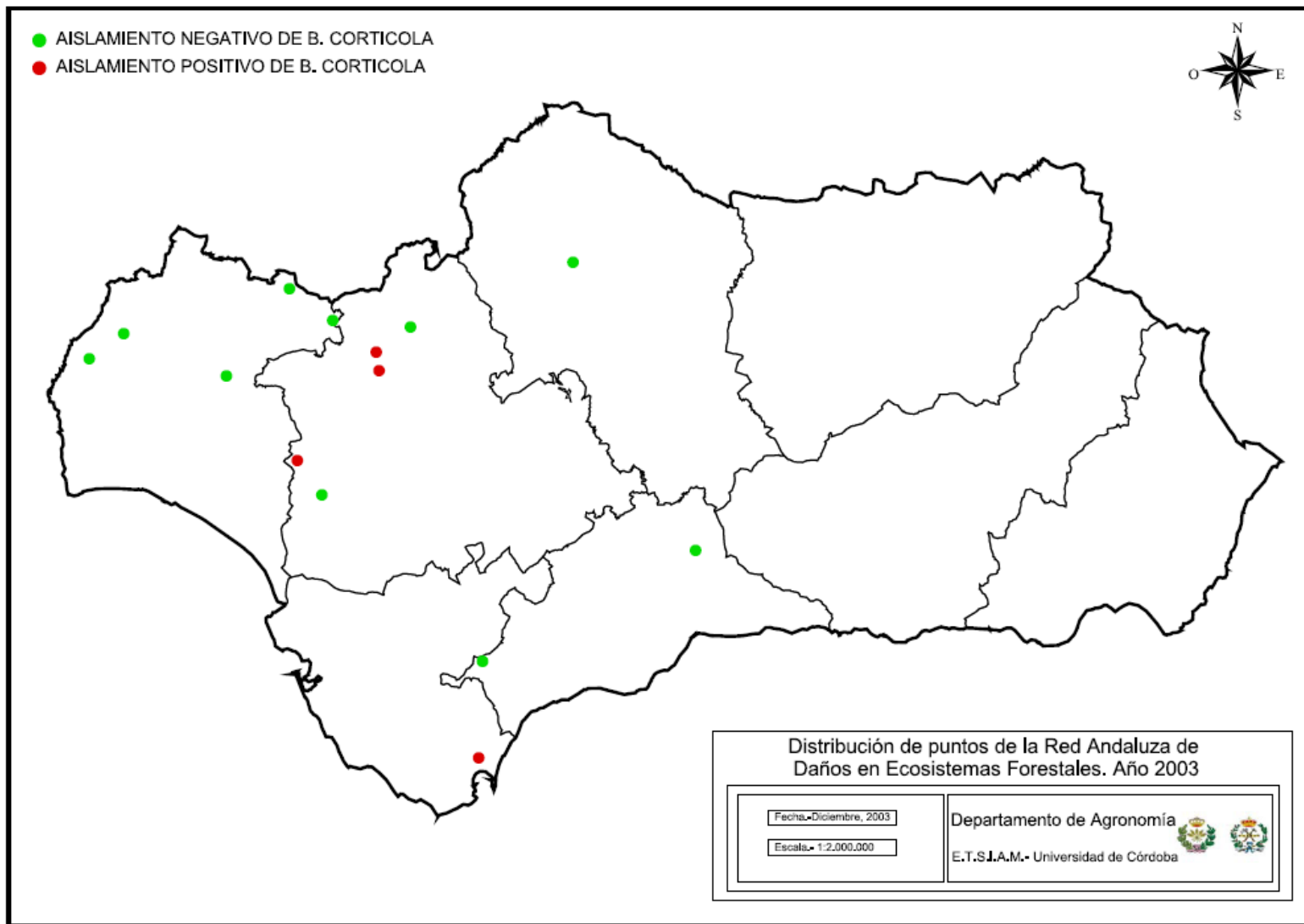
1. Año 2001



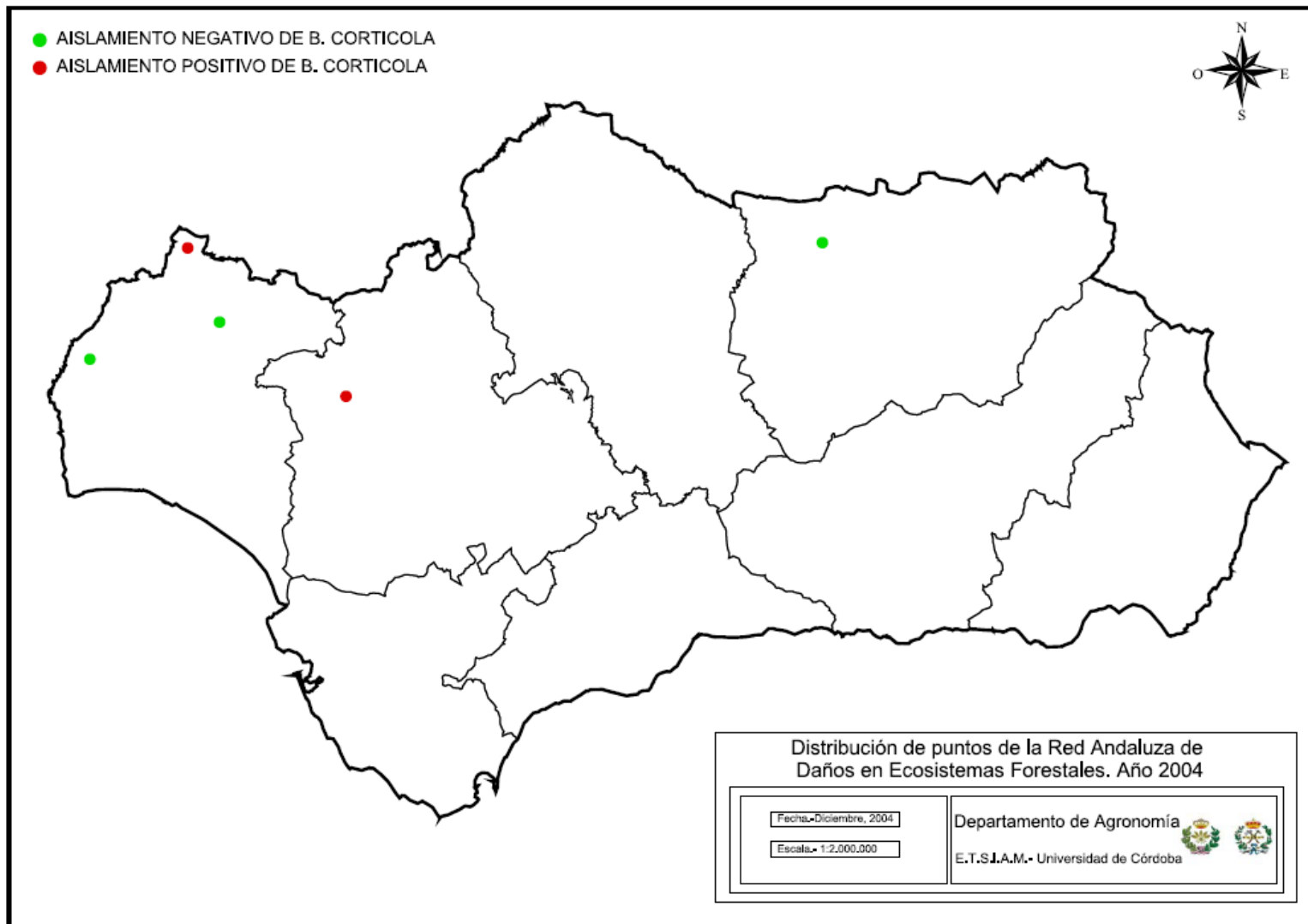
2. Año 2002



3. Año 2003.



4. Año 2004



5. Año 2005

