

## Efecto de distintas fertilizaciones de fósforo en la resistencia de brinzales de encina y alcornoque a *Phytophthora cinnamomi* Rands.

R. M.<sup>a</sup> Navarro Cerrillo<sup>1\*</sup>, L. Gallo Ibáñez<sup>1</sup>, M.<sup>a</sup> E. Sánchez Hernández<sup>2</sup>, P. Fernández Rebollo<sup>1</sup> y A. Trapero Casas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Forestal. Universidad de Córdoba. Apdo. Correos 3048. 14080 Córdoba. España

<sup>2</sup> Departamento de Agronomía. Universidad de Córdoba. Apdo. Correos 3048. 14080 Córdoba. España

---

### Resumen

El factor de contribución más virulento en el proceso de decaimiento forestal en el sur de la península ibérica es el Oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Recientes investigaciones avalan el uso de fertilizaciones fosfóricas y fosfitos como fungicida contra *Phytophthora cinnamomi*. El objetivo general de este trabajo es estudiar el efecto de la fertilización fosfórica en brinzales de *Quercus ilex* y *Q. suber* sobre la resistencia a la podredumbre radical producida por *P. cinnamomi*.

Se realizó un ensayo con brinzales de encina y alcornoque que previamente habían sido cultivados con un programa de fertilización fosfórica, dando lugar a cuatro tratamientos: Fosfato-A (3 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por planta), Fosfato-B (6 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por planta), Fosfito (0,15 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por planta) y no fertilizado. El ensayo se realizó en invernadero y tuvo una duración de 7 meses. Consistió en inocular las plantas de los distintos tratamientos con *Phytophthora cinnamomi* Rands. y estudiar la evolución de sus atributos morfológicos (altura, diámetro del cuello de la raíz y biomasa de raíz secundaria) y fisiológicos (contenido foliar de nutrientes). Los resultados mostraron que la fertilización con fosfatos no había mejorado la resistencia a la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi*, mientras que el fosfito logró controlar totalmente la infección del patógeno, dando resultados negativos el reaislamiento de la especie fúngica inoculada en este tratamiento. Las plantas tratadas con fosfito presentaron un estado morfológico y fisiológico igual, y en algunos aspectos mejor, que el Control no inoculado. Se puede concluir que sería posible lograr una acción protectora frente a *P. cinnamomi* mediante el tratamiento con fosfitos durante el cultivo en vivero.

**Palabras clave:** calidad de planta, seca de los *Quercus*, fertilización fosfórica, fungicidas.

### Abstract

#### Effect of phosphoric fertilization on the resistance of holm oak and cork oak to *Phytophthora cinnamomi* Rands.

The oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands is the mean responsible for oak decline in southern Spain. This paper investigates the relationship between phosphoric fertilization of *Quercus ilex* and *Q. suber* seedlings and resistance to the disease caused by *Phytophthora cinnamomi*.

The study was conducted on holm oak and cork oak seedlings previously submitted to a phosphoric fertilization programme involving four different treatments, namely: Phosphate-A (3 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> seedling), Phosphate-B (6 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> seedling), Phosphite (0.15 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> seedling) and No Fertilization. Tests were conducted in greenhouse over a period of 7 months and a number of treatments to plants inoculated with *Phytophthora cinnamomi* Rands. were applied, assessing the changes in their morphological (*viz.* height, root and collar diameter, and secondary root biomass) and physiological characteristics (*viz.* leaf nutrient contents). Based on the results, phosphate failed to improve plant resistance to *P. cinnamomi*; by contrast, phosphite successfully avoided infection by this pathogen. In fact, the phosphite-treated plants exhibited a morphological and physiological status similar to or even better than that of the non-inoculated controls. The protective effect of phosphite against *P. cinnamomi* can be achieved by applying it during seedling cultivation in nurseries.

**Key words:** seedling quality, *Quercus* decline, phosphoric fertilization, fungicide.

---

\* Autor para la correspondencia: ir1nacer@uco.es

Recibido: 00-00-00; Aceptado: 00-00-00.

## Introducción

El agente más virulento en el proceso de decaimiento forestal en el sur de la península ibérica es el Oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. cuya patogenicidad en encina y alcornoque se demostró en 1996 (Tuset *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2003), aunque sus ataques a estas especies ya se conocían desde 1991 (Brasier *et al.*, 1993).

El género *Phytophthora*, distribuido por prácticamente todo el mundo, presenta más de 60 especies (Erwin y Ribeiro, 1996). Entre ellas, *P. cinnamomi* es sin duda el principal agente de podredumbres radicales en plantas leñosas. Es un hongo de suelo, de carácter acuático, y posee zoosporas de alta movilidad (Erwin y Ribeiro, 1996) y eficaces estructuras de resistencia (clamidosporas) que le permiten sobrevivir largos periodos de tiempo (a veces muchos años) sin su huésped y con densidades de inóculo relativamente bajas (Coffey, 1991). El proceso de infección tiene lugar cuando hay agua libre en el suelo y su temperatura es relativamente alta (Smith *et al.*, 1992; Brasier *et al.*, 1993). La infección se produce en los ápices radicales o bien, a través de heridas (Kuhlman *et al.*, 1989). Cuando el hongo penetra en la planta se multiplica rápidamente, produciendo nuevas zoosporas infectivas que alcanzan raíces adyacentes, bajo condiciones de saturación hídrica del suelo (Coffey, 1991). Las plantas jóvenes con crecimiento activo y gran proporción de raíces absorbentes son especialmente sensibles, ya que son estas raíces las que se ven atacadas principalmente. Los síntomas secundarios de la enfermedad son marchitez (color marrón atabacado en las hojas, extendiéndose desde los bordes hacia la nerviación), muerte regresiva de la parte aérea, y/o reducción en el tamaño de las hojas, aunque la aparición de estos síntomas puede tardar mucho tiempo si las condiciones ambientales son frescas y húmedas (Sánchez *et al.*, 2000).

El control de la enfermedad se basa en impedir la infección y limitar la dispersión del patógeno mediante medidas culturales, biológicas y químicas (Smith *et al.*, 1992). Los tratamientos químicos propuestos son muy diversos: pulverización de la copa del árbol infectado con fungicidas y abonos foliares (García y Pozo, 1993); inyecciones en el tronco del árbol enfermo (Fernández-Escobar *et al.*, 1999); y aplicación de diferentes productos fungistáticos a las raíces enfermas y el suelo (Navarro y Fernández, 2000). Sin embargo, investigaciones realizadas en Australia avalan el uso del fosfito como fungicida contra *Phytophthora cinnamomi* (Guest

y Grant, 1991; Wilkinson *et al.*, 2001). Los fosfitos  $[(\text{HPO}_3)^{-2}]$  representan una alternativa eficaz para controlar *P. cinnamomi* en cultivos leñosos y en masas naturales tanto con carácter curativo como preventivo (Tynan *et al.*, 2001). Se trata de un fungicida sistémico que se absorbe rápidamente y es translocado inicialmente en el xilema y posteriormente en el floema (Guest y Grant, 1991). Los fosfitos pueden ser aplicados mediante inyecciones, pulverizaciones en la parte aérea o al suelo (Fairbanks *et al.*, 2000). Una alternativa posible es la incorporación del fosfito como parte del programa de fertilización durante el cultivo de la planta en vivero, ya que el control de esta enfermedad es muy difícil una vez que el hongo se instala en el suelo, dificultando las labores de establecimiento de nuevos árboles (Rodríguez-Molina *et al.*, 2002).

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la fertilización fosfórica en brinzales de *Quercus ilex* y *Q. suber* sobre la resistencia a la podredumbre radical producida por *P. cinnamomi*.

## Material y Métodos

### Material vegetal utilizado

Las especies utilizadas en este trabajo han sido la encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) y el alcornoque (*Quercus suber* L.). El material forestal de reproducción utilizado para ambas especies fue de la procedencia Sierra Morena Occidental (ES11e y ES5b, respectivamente). El cultivo de la planta se realizó en el umbráculo de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes (ETSIAM) de la Universidad de Córdoba. La semilla se sembró en diciembre de 2001 en alvéolos forestales, Forest Pot 400 para encina y Forest Pot 300 para alcornoque. El sustrato de cultivo fue una mezcla de turba negra y perlita (3:1 en volumen).

El programa de cultivo se adecuó a la naturaleza del ensayo, manteniéndose la planta en condiciones de riego adecuadas, y sin fertilización hasta agosto de 2002. El análisis del agua de riego indica la existencia de aportes minerales a lo largo del cultivo, aunque no de fósforo (datos no incluidos).

### Tratamientos

La fertilización fue el factor diferenciador entre tratamientos. Se realizó en la fase final del cultivo debi-

do a que los *Quercus* son muy poco sensibles a la fertilización temprana (Del Campo, 2002). El programa de tratamientos se inició el día 1 de agosto de 2002, realizándose aplicaciones cada 15 días (los días 1 y 16 de cada mes). Se hicieron 6 aplicaciones, la última el 16 de octubre de 2002. El producto se aplicó manualmente, regando cada planta con una solución nutritiva según el tratamiento. Los tratamientos ensayados consistieron en tres tipos de fertilizaciones fosfóricas:

1. La primera fertilización consistió en aplicar una dosis de 50 ml de una solución de fosfatos en agua cuya concentración era 10 mg/l ( $P_2O_5$ ) (Tratamiento FOS-A). Esta disolución se consiguió a partir de Potasio di-hidrógeno fosfato,  $KH_2PO_4$ , (Referencia: USP-NF, BP, Ph. Eur., Purísimo-CODEX). Por tanto, el fósforo presente en cada dosis era 0,5 mg de fósforo ( $P_2O_5$ ) por planta.

2. La segunda fertilización consistió en aplicar una dosis de 50 ml de una disolución de fosfatos en agua de concentración 20 mg/l ( $P_2O_5$ ). (Tratamiento FOS-B). Por tanto, el fósforo presente en cada dosis era 1 mg de fósforo ( $P_2O_5$ ) por planta.

3. El tercer tratamiento consistió en aplicar una dosis de 50 ml de una disolución de fosfitos en agua de concentración 0,5 mg/l ( $P_2O_5$ ) (Tratamiento FOS-FITO). Esta disolución se obtuvo a partir de Fosfito potásico al 50%, equivalente a Fósforo ( $P_2O_5$ ) 30% pp. y a Potasio ( $K_2O$ ) 20% pp. (Referencia: Panreac Brifos-K). Por tanto, el fósforo presente en cada dosis era 0,025 mg de fósforo ( $P_2O_5$ ) por planta.

Las bajas concentraciones de fósforo se adecuaron a la concentración más baja recomendada por la bibliografía para el fosfito (Fairbanks *et al.*, 2000), manteniendo los valores de fertilización con fósforo en un rango parecido.

## Condiciones del ensayo

El diseño experimental se realizó para evaluar la respuesta de la planta a los tratamientos, por lo que se optó por un ensayo unifactorial cuyo único factor es el tratamiento de fertilización con cuatro niveles (considerando el no tratado como fertilización cero) y un control inoculado. El diseño fue en bloques completos al azar con cuatro repeticiones, donde cada bloque estaba formado por 50 plantas.

Se tomaron 100 plantas de cada especie, 20 de cada uno de los tres tratamientos, y 40 no tratadas. Los tres lotes de plantas tratadas fueron inoculados con *P.*

*cinnamomi*, así como 20 de las plantas no fertilizadas. Las otras 20 plantas no fertilizadas se mantuvieron sin inocular, constituyendo el control.

La inoculación fue llevada a cabo los días 21, 22 y 23 de noviembre de 2002, y se realizó mediante la aplicación a los cepellones de las plantas de una suspensión acuosa de micelio y clamidosporas (Sánchez *et al.*, 2000). Para producir el inóculo se eligió un aislado de *P. cinnamomi* previamente caracterizado y conservado en la micoteca del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. Este aislado (PE 90) fue obtenido en diciembre de 2000, a partir de la rizosfera de una encina afectada de podredumbre radical en la finca La Viñuela, situada en el término municipal de Montoro (Córdoba) (Sánchez *et al.*, 2003). El inóculo se preparó batiendo en agua estéril el micelio de PE 60 producido en medio de extracto de zanahoria (Dhingra y Sinclair, 1995) durante un mes, a 20°C en oscuridad, tras ser separado del medio nutritivo y lavado en agua estéril. La presencia de abundantes clamidosporas se comprobó mediante la preparación de montajes microscópicos de pequeñas cantidades de inóculo teñidas con fucsina ácida en lactofenol al 0,005%, y su posterior observación al microscopio óptico. La concentración del inóculo correspondió a la biomasa producida en 3 placas de Petri/100 ml de agua. Para la inoculación se añadieron 100 ml de esta suspensión al cepellón de cada plantón a inocular, cuidando de que su distribución fuese homogénea (Sánchez *et al.*, 2000). Los plantones inoculados se transplantaron a macetas individuales del tipo Forest Pot 3000 (130 × 130 × 257 mm) previamente desinfectadas con lejía comercial diluida al 10%. El sustrato necesario para completar el volumen de los nuevos envases fue una mezcla formada por turba, arena y limo (1:1:1 en volumen). Las plantas testigo no inoculadas fueron tratadas de la misma manera, añadiendo a sus cepellones 100 ml de agua estéril libre de material fúngico.

Las plantas fueron colocadas en el invernadero de la ETSIAM (Córdoba) donde permanecieron hasta el final del ensayo, que se extendió desde noviembre hasta mitad de junio. El invernadero permitía un mejor control de la temperatura y de la humedad, que son factores fundamentales para el desarrollo de *P. cinnamomi*, cuyo crecimiento óptimo se produce a una temperatura próxima a los 24°C y con el sustrato saturado de agua (Brasier *et al.*, 1993). El aislado PE 90 tiene una temperatura óptima de crecimiento de 25,2°C (Sánchez *et al.*, 2003). Durante todo el ensayo se mantuvo

un programa de riego constante para mantener hidratado el sustrato. Los dos primeros meses (noviembre y diciembre) el riego fue manual, manteniendo las plantas a saturación. En los meses siguientes (enero-junio), se dispuso de un riego automático por goteo, cuya frecuencia y duración fueron adecuadamente programadas según las necesidades de la planta, que fueron aumentando con la llegada del verano.

### Variables medidas

Al final del cultivo se realizó la caracterización de los atributos de calidad de la planta. Los atributos medidos fueron los más frecuentes en el control de cultivo de planta forestal según Navarro *et al.* (1998).

Los atributos morfológicos medidos fueron altura de la parte aérea, diámetro del cuello de la raíz y peso seco de la raíz secundaria. La altura de la parte aérea, entendida como la longitud desde el cuello de la raíz hasta la yema apical, se midió con una cinta métrica semirrígida. El diámetro del cuello de la raíz, entendido como el punto de inserción de la planta en el sustrato, se midió con un calibre digital (Mitutoyo,  $e = \pm 0,01$  mm). Tanto la altura como el diámetro se midieron en cuatro ocasiones (febrero, abril, mayo, junio) a la totalidad de las plantas, y los valores obtenidos se expresaron como Tasas de crecimiento relativo (TCR), aunque en este trabajo sólo se presentan los resultados al final del periodo.

En la tercera semana de junio se procedió al levantamiento del ensayo. Para evaluar el desarrollo de la raíz secundaria y/o los síntomas producidos en ella por *P. cinnamomi*, se realizó un estudio de pesos secos. Las raíces de las plantas se lavaron cuidadosamente con agua para eliminar cualquier resto de sustrato, pero evitando dañar las raicillas para no producir pérdida de biomasa radical.

El secado de las plantas se realizó mediante la separación de sus distintas partes. En primer lugar, parte aérea y radical, a su vez en la parte aérea se separaron las hojas y el tallo para que no haya traslocación de nutrientes hacia el tallo, lo que cambiaría el posterior análisis de nutrientes en hoja. En la parte radical se separó la raíz primaria de las secundarias. Todo el material vegetal se introdujo en sobres de papel y éstos en una estufa de convección natural para desecación (P SELECTA), en la que permanecieron durante 72 h a una temperatura de 65°C hasta peso constante. Una vez transcurrido este tiempo se consideró que estaba totalmente

seco, se extrajo y se pesaron las muestras. Se utilizó una balanza de precisión Mettler Toledo PB203 (Máx. =  $\pm 310$  g, min. =  $\pm 0,02$  g,  $e = \pm 10$  mg,  $d = \pm 1$  mg). Los datos registrados fueron los siguientes: peso seco total, peso seco parte aérea, peso seco foliar, peso seco de la raíz secundaria y peso seco de la raíz primaria.

Tras la finalización del experimento y el secado de las plantas, se tomó una muestra de 8 gramos de hoja seca de cada tratamiento, obtenido de la mezcla homogeneizada de las muestras de todas las plantas de cada tratamiento. La muestra fue enviada para el análisis químico al Laboratorio Agroalimentario de Córdoba de la Consejería de Agricultura y Pesca (Junta de Andalucía).

Se determinó la concentración de los macronutrientes nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio, para conocer así el balance de nutrientes de la planta, que es un atributo fisiológico del estado de la misma. El nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl-volumétrico, el fósforo con el método colorimétrico, el potasio con el método fotométrico, y calcio y magnesio mediante espectrofotometría de absorción atómica.

### Reaislamiento de *P. cinnamomi*

La Unidad de Patología Vegetal procedió a realizar reaislamientos de la especie fúngica inoculada a partir de las raicillas absorbentes. Para ello, se eligieron al azar dos plantas de cada tratamiento, incluyendo los testigos inoculados y los no inoculados. De estas plantas se tomó una pequeña porción de raicillas que mostraran síntomas de podredumbre (oscurecimiento y maceración) y se lavaron, separadamente para cada tratamiento, al chorro de agua durante 2 h. Posteriormente, las raicillas se secaron con papel filtro estéril, se cortaron en pequeños fragmentos de unos 3 mm de longitud y se sembraron en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo PARPH, selectivo para especies de *Phytophthora* (Jeffers y Martín, 1986). Tras 4-6 días de incubación a 22°C en oscuridad, las colonias obtenidas se identificaron por observación directa al microscopio invertido y se contabilizaron aquéllas pertenecientes a *P. cinnamomi*.

### Análisis de los datos

El análisis estadístico comenzó comprobando que los datos cumplían el requisito de normalidad y la ho-

**Tabla 1.** Tasa de Crecimiento Relativo en Altura (TCRA) (cm mes<sup>-1</sup>). y en diámetro (TCRD) (mm mes<sup>-1</sup>) para el periodo total del ensayo (febrero-junio) para cada tratamiento de *Quercus ilex* y *Quercus suber*. Valores medios y error típico de la media

Tratamiento	<i>Quercus ilex</i>		<i>Quercus suber</i>	
	TCRA (cm mes <sup>-1</sup> )	TCRD (cm mes <sup>-1</sup> )	TCRA (cm mes <sup>-1</sup> )	TCRD (cm mes <sup>-1</sup> )
Control	0,020 ± 0,003	0,062 ± 0,005	0,022 ± 0,004	0,079 ± 0,004
Fósforo 3 mg	0,041 ± 0,005	0,050 ± 0,004	0,054 ± 0,006	0,094 ± 0,005
Fósforo 6 mg	0,021 ± 0,004	0,041 ± 0,004	0,040 ± 0,005	0,057 ± 0,004
Fosfito 0,15 mg	0,033 ± 0,005	0,044 ± 0,003	0,062 ± 0,005	0,076 ± 0,005
<i>Phytophthora</i>	0,036 ± 0,006	0,035 ± 0,003	0,031 ± 0,004	0,050 ± 0,005

mogeneidad de la varianza (homocedasticidad). La normalidad se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y la homocedasticidad por el test de Levene. Una vez realizada la comprobación de los requisitos básicos de los datos, se procedió a realizar un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para las variables normalizadas. Cuando el análisis de la varianza fue significativo, se realizó un test de Tukey de comparación múltiple de las medias para un nivel de significación del 5% ( $P \leq 0,05$ ). Los resultados se presentan en las tablas y en las figuras como media y error estándar de cada tratamiento. Los datos fueron almacenados y transformados, según el caso, en hojas de cálculo del programa *Microsoft Excel 2000*. El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico *SPSS 8.0*.

## Resultados

### Atributos de la planta al final del cultivo

El análisis de la varianza realizado a los atributos de calidad de la planta al final del cultivo (noviembre de 2002) no mostró diferencias significativas para los atributos e índices morfológicos en ninguna de las dos especies (datos no incluidos). La altura de la planta al final del cultivo osciló entre 11,20 cm y 13,56 cm para encina, y entre 24,52 cm y 28,96 cm para alcornoque.

### Altura y diámetro

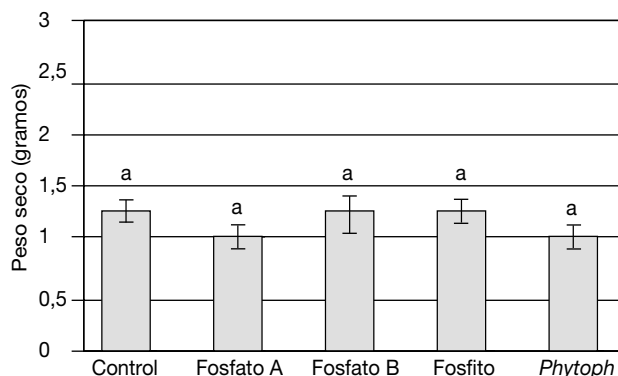
En la tabla 1 se muestran las tasas de crecimiento relativo en altura y diámetro para la encina y el alcornoque al final del periodo del ensayo. El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas entre tra-

tamientos. No obstante, en el caso de la TCR en altura se puede observar un valor sensiblemente mayor en todos los tratamientos de fertilización en comparación con el control, a pesar de estar inoculados con *Phytophthora*. En el caso de las TCR en diámetro la respuesta es la contraria, observándose un descenso de la tasa de crecimiento en todos los tratamientos inoculados frente al control, aunque esto es menos evidente en el caso del alcornoque.

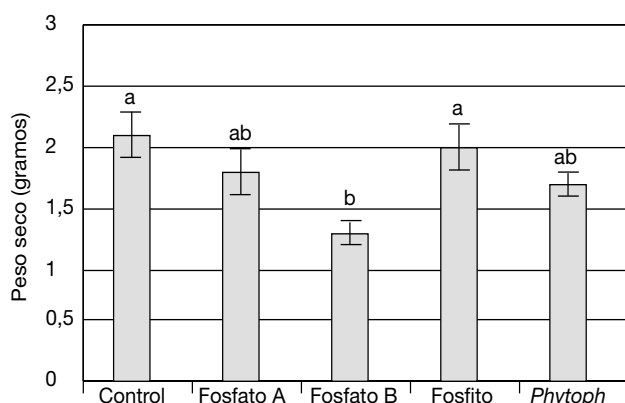
### Desarrollo de la raíz secundaria

Como puede verse en la figura 1, el desarrollo de la raíz secundaria en encina en los tratamientos Fosfito y Control fue superior en un 15% a los tratamientos *Phytophthora* y Fos-A. El tratamiento Fos-B presenta valores intermedios. Sin embargo, el análisis de la varianza no distinguió grupos estadísticamente diferentes.

En el caso del alcornoque encontramos diferencias significativas entre el grupo formado por el tratamiento



**Figura 1.** Valor medio y error típico de la media del peso seco de la raíz secundaria de cada tratamiento de *Quercus ilex*. Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.



**Figura 2.** Valor medio y error típico de la media del peso seco de la raíz secundaria de cada tratamiento de de *Quercus suber*. Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.

Fosfite y el control con respecto al resto de los tratamientos, con un desarrollo similar y en ambos casos superior al tratamiento *Phytophthora* en un 20% aproximadamente (Figura 2). El grupo formado por el tratamiento Fos-A y el tratamiento *Phytophthora* presentan valores intermedios, y el tratamiento Fos-B presenta un valor de biomasa de raíz secundaria un 60% más bajo que el Control.

### Análisis de nutrientes

En la encina encontramos que el tratamiento Fosfite presenta mayores concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio, siendo la más destacable la del P, que es un 60% superior a los demás. El tratamiento *Phytophthora* tiene menor cantidad de potasio y calcio que el resto, mientras que posee una concentración más alta de magnesio (Tabla 2).

En el alcornoque la concentración de nitrógeno es también mayor en el tratamiento Fosfite, estando el resto de valores en un rango parecido (Tabla 3). La

concentración de fósforo aparece claramente más alta en los tres tratamientos fertilizados, entre dos y cuatro veces la concentración que presentan los tratamientos Control y *Phytophthora*. Aunque con menores diferencias, la concentración de potasio también es mayor en los tres tratamientos fertilizados (Tabla 3).

### Reaislamiento de *P. cinnamomi*

En cuanto a la frecuencia de reaislamientos de *P. cinnamomi* a partir del tejido necrótico de las raicillas, varió entre el 80-100% para todos los tratamientos, excepto el testigo no inoculado y el tratamiento fosfite. A la vista de los resultados se repitió la siembra de raicillas en PARPH para el tratamiento fosfite, obteniéndose de nuevo la ausencia total de reaislamiento de *P. cinnamomi*. Únicamente se obtuvieron algunas colonias bacterianas, sin consistencia ninguna, al igual que sucedió en las placas correspondientes a los testigos no inoculados (Tabla 4).

### Discusión

La morfología de los brinzales no se vio afectada significativamente tras la fertilización fosfórica, lo que coincide con los resultados obtenidos en ensayos previos (Brown, 2002; Navarro *et al.*, 2003), aunque las concentraciones empleadas han sido inferiores a las recomendables para especies forestales y la duración del ensayo de 7 meses (Landis *et al.*, 1989).

En cuanto a los ensayos de inoculación se observó que el único atributo morfológico de las plantas afectado por *P. cinnamomi* ha sido la biomasa de raíz secundaria. Los incrementos de alturas y diámetros, no manifestaron diferencias significativas entre el Control y *Phytophthora*, ni tampoco con ninguno de los diferentes tratamientos. Estudios realizados con ejemplares adultos, muestran que la infección de

**Tabla 2.** Concentración de nutrientes en hoja para los tratamiento de fertilización fosfórica en *Quercus ilex*

Tratamiento	N (mg g <sup>-1</sup> )	P (mg g <sup>-1</sup> )	K (mg g <sup>-1</sup> )	Ca (mg g <sup>-1</sup> )	Mg (mg g <sup>-1</sup> )
Control	6,4	0,5	4,1	12,2	2,5
Fósforo 3 mg	6,4	0,5	4,3	12,7	2,7
Fósforo 6 mg	6,4	0,5	4,9	13,8	2,8
Fosfite 0,15 mg	7,8	0,8	5,1	13,3	2,8
<i>Phytophthora</i>	6,9	0,5	3,5	11,2	3,2

**Tabla 3.** Concentración de nutrientes en hoja para los tratamiento de fertilización fosfórica en *Quercus suber*

Tratamiento	N (mg g <sup>-1</sup> )	P (mg g <sup>-1</sup> )	K (mg g <sup>-1</sup> )	Ca (mg g <sup>-1</sup> )	Mg (mg g <sup>-1</sup> )
Control	9,5	0,7	4,7	14	3,6
Fósforo 3 mg	10,6	1,4	7,1	12,3	3,4
Fósforo 6 mg	9,2	2,4	6,1	12,7	3,7
Fosfito 0,15 mg	11,2	1,7	6,7	12,6	3,2
<i>Phytophthora</i>	10,5	0,7	5,7	14,5	3,3

*P. cinnamomi* produce parada de crecimiento y pérdidas de biomasa aérea (Maurel *et al.*, 2001). Sin embargo, en el caso de este ensayo, la ausencia de pérdidas de biomasa aérea se puede explicar porque este efecto se produce en fases avanzadas de la enfermedad y la duración de nuestro ensayo sólo ha sido de siete meses. La falta de diferencias en el crecimiento es más sorprendente, pues es lógico pensar que plantas con el sistema radical dañado presenten menor crecimiento que otras sanas, al ver reducida su capacidad de tomar agua y nutrientes y, por tanto, de mantener un estado fisiológico adecuado (Maurel *et al.*, 2001). La falta de efecto puede deberse a que en los brinzales de *Quercus*, especialmente en la encina, el crecimiento en las primeras etapas parece estar más relacionado con las sustancias nutritivas almacenadas en la bellota y raíz principal (Navarro *et al.*, 2003), siendo muy bajas las tasas de fotosíntesis. Asimismo, en el caso de la encina, el destino principal de los recursos se dirige al desarrollo del sistema radical, siendo escaso el crecimiento de la parte aérea (Del Campo, 2002). El pobre crecimiento inicial del diámetro y la

**Tabla 4.** Reaislamiento de *Phytophthora cinnamomi* a partir de raíz absorbente al término del experimento

Huésped	Tratamiento	Reaislamiento (%) <sup>1</sup>
Encina	Control	0
	Fósforo 3 mg	100
	Fósforo 6 mg	92
	Fosfito 0,15 mg	0
	<i>Phytophthora</i>	100
Alcornoque	Control	0
	Fósforo 3 mg	86
	Fósforo 6 mg	81
	Fosfito 0,15 mg	0
	<i>Phytophthora</i>	88

<sup>1</sup> Porcentaje expresado como n.º de muestras obtenidas de una raíz que dieron lugar a una colonia de *P. cinnamomi* sobre el .º total de muestras de una raíz sembrados en medio selectivo PARPH.

altura en estas especies dificultarían apreciar diferencias asociadas a la podredumbre radical en las fases iniciales de la enfermedad. No obstante, el crecimiento relativo en diámetro en encina se ve ligeramente disminuido en el tratamiento *Phytophthora*, indicando una pérdida de crecimiento de la raíz.

El análisis de la biomasa radical secundaria sí mostró diferencias importantes entre los tratamientos en alcornoque, siendo las diferencias estadísticamente significativas del tratamiento con fosfito frente al resto de los tratamientos inoculados. *Phytophthora cinnamomi* actúa sobre el sistema radical en general, pero especialmente sobre las raicillas finas (Smith *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos indican que el hongo sí infectó el sistema radical, aunque no se mostraran síntomas aéreos, produciendo pérdidas significativas de raíz secundaria en ambas especies, un 15% menos de biomasa de raíces secundarias en encina y un 20% en alcornoque. El tratamiento con fosfito presenta en ambas especies un valor similar al control, lo que indica que *P. cinnamomi* no ha causado daños en el sistema radical de los brinzales que han recibido este tratamiento, lo cual coincide con las experiencias de control de *P. cinnamomi* mediante fosfito previamente realizadas (Fairbanks *et al.*, 2000; Wilkinson *et al.*, 2001). Los tratamientos de fertilización con fosfatos presentaron una biomasa radical menor. Por tanto, parece que los fosfatos no han logrado mejorar el desarrollo y/o el vigor del sistema radical, o si lo han hecho, no ha resultado eficaz ante el ataque de *P. cinnamomi*.

Los resultados obtenidos del análisis de nutrientes indican que el tratamiento fosfito induce un incremento de la concentración foliar de nitrógeno, fósforo y potasio, siendo la más destacable la del P, superior en ambas especies a los demás tratamientos. Este aumento del P no se puede atribuir a un efecto fertilizador del fosfito, puesto que la cantidad total de P que incorporo a la planta fue de sólo 0,15 mg. Por tanto, debemos pensar que el fosfito induce algún cambio en

la asimilación y/o el uso del P, y quizás también en el N y K, cuyos valores de concentración final son superiores que el control. Los efectos observados de reducción de la concentración de N y de P en encinas adultas afectadas por *P. cinnamomi* (Maurel *et al.*, 2001) no se han observado en nuestro ensayo, debido posiblemente, al igual que con los patrones de crecimiento, a que se trata de individuos jóvenes.

El efecto positivo del fosfito ha quedado demostrado por la ausencia de reaislamiento del hongo en el sustrato de la planta tratada. Bajas concentraciones de fosfito en el interior de las raíces estimulan la defensa enzimática de la planta ante ataques del hongo e inhiben directamente en el sustrato el desarrollo de *P. cinnamomi* impidiendo que llegue a afectar a la planta (Jackson *et al.*, 2000). Los resultados de este trabajo parecen confirmar dicha hipótesis en especies del género *Quercus*. En cuanto al tiempo que dura la acción protectora del fosfito, diversos autores la sitúan alrededor de los 6 meses, aunque varía con muchos factores (Wilkinson *et al.*, 2001) En nuestro caso, entre la aplicación del fosfito y la inoculación pasaron pocas semanas, pero el efecto se mantuvo durante los 7 meses que duró el ensayo. El carácter preventivo observado en este ensayo parece recomendar el uso de la fertilización con fosfitos en el cultivo de especies del género *Quercus*, dado el efecto preventivo contra daños de *P. cinnamomi*. En particular, en aquellos viveros que suministren planta para repoblaciones en zonas susceptibles a ataques de este patógeno. El efecto de este fungicida sobre otros aspectos del cultivo deberían ser estudiados, aunque en dosis adecuadas parece que no presentar problemas de fototoxicidad (Wilkinson *et al.*, 2001), ni sobre los procesos de micorrización (Howard *et al.*, 2000).

## Conclusiones

La fertilización fosfórica no ha producido cambios significativos en los atributos morfológicos y fisiológicos de los brinzales de encina y alcornoque al final de su cultivo en vivero. Sin embargo, después de la inoculación con *P. cinnamomi* se ha producido una pérdida significativa en la biomasa del sistema radical secundario de los brinzales de encina y alcornoque, excepto en el control sin inóculo y el tratamiento con fosfito. La fertilización con fosfatos no parece mejorar la resistencia a ataques de *P. cinnamomi* en brin-

zales de encina y alcornoque en las dosis ensayadas en este trabajo; sin embargo, el tratamiento con fosfito inhibe a corto plazo los ataques de *P. cinnamomi* en brinzales de encina y alcornoque, por lo que parece recomendable su generalización durante la fase final del cultivo en vivero de brinzales encina y alcornoque en áreas con riesgo de daños por esta enfermedad.

## Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado con el apoyo del Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía a través del Convenio *Seguimiento de los daños de seca sobre masas de Quercus en Andalucía. Propuesta de soluciones*. El trabajo forma parte de las conclusiones del proyecto AGL2002-00530. M.E. Sánchez disfruta de un contrato del Programa Ramón y Cajal del MC y T.

## Referencias bibliográficas

- BRASIER C.M., ROBREDO F., FERRAZ J.F.P., 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathol* 42, 140-145.
- BROWN K.R., 2002. Effects of Phosphorus Additions on growth, mineral nutrition, and gas exchange of Red Alder (*Alnus rubra*) seedlings grown in outdoor sandbeds. *Western journal of applied forestry* 17 (4), 209-215.
- COFFEY M.D., 1991. Strategies for integrated control of soil borne *Phytophthora* species. In: *Phytophthora*. Lucas J.A., Shattock R.C., Shaw D.S., Cooke L.R.I (eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 411-432.
- DEL CAMPO GARCÍA A.D., 2002. Régimen de cultivo, desarrollo en vivero, calidad de planta y respuesta al establecimiento en cuatro especies de frondosas mediterráneas. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Forestal. 292 pp.
- DHINGRA O.D., SINCLAIR J.B., 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. CRS Press, Boca Ratón.
- ERWIN D.C., RIBEIRO O.K., 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, MN. 562 pp.
- FAIRBANKS M., HARDY G., McCOMB J.A., 2000. Comparisons of phosphite concentrations in *Corymba (Eucalyptus) calophylla* tissues after spray, mist or soil drench applications with the fungicide phosphite. *Australasian Plant Pathology* 29, 96-101.
- FERNÁNDEZ-ESCOBAR R., GALLEGU F.J., BELLLOCH M., MEMBRILLO J., INFANTE J., PÉREZ DE ALGABA A., 1999. Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials. *Eur J For Path* 29, 29-38.



- GARCÍA F., POZO J.D., 1993. Ensayo de eficacia de un fungicida y un abono foliar para el control de «seca de la encina». Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Comercio. Junta de Extremadura.
- GUEST D., GRANT B., 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biology Review* 66, 159-187.
- HOWARD K., DELL B., HARDY, G.E., 2000. Phosphite and mycorrhizal formation in seedlings of three Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany* 48, 725-729.
- JACKSON T.J., BURGESS T., COLQUHOUN I., HARDY G.E., 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 59(1), 147-154.
- JEFFERS N.S., MARTIN J.B., 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis* 70, 1038-1043.
- KUHLMAN E.G., GRAND L.F., HANSEN E.M., 1989. *Phytophthora* root rot of conifers. In: Forest nursery pests. USDA Agriculture Handbook 680, pp. 60-61.
- LANDIS T.D., TINUS R.W., McDONALD S.E., BARNETT J.P., 1989a. Seedling nutrition and irrigation, Vol. 4, The Container Tree Nursery Manual. Agric. Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. 119 pp.
- MAUREL M., ROBIN C., CAPRON G., DESPREZ-LOUSTA M.L., 2001. Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass accumulation, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak and chestnut species. *Forest Pathology* 31(6), 353-369.
- NAVARRO R.M., FERNÁNDEZ P. 2000. El síndrome de la seca del encinar. Propuesta de solución para el Valle de los Pedroches. Ed. Fundación Ricardo Delgado Vizcaino. Córdoba 172 pp.
- NAVARRO CERRILLO R.M., GÁLVEZ C., CONTRERAS V., CAMPO A., 1998. Protocolo para la caracterización del cultivo de plantas forestales en contenedor. Conserjería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía Sevilla. 190 pp.
- NAVARRO R.M., ARRIBAS M.A., GALLEGOS V., ALCÁNTARA E., 2003. Deficiencias minerales en plantas de una savia de dos especies de frondosas mediterráneas (*Quercus suber* L. y *Ceratonia siliqua* L.). *Invest Agrar: Sist Recur For* 12(1), 61-73.
- RODRÍGUEZ-MOLINA M.C., TORRES-VILA L.M., BLANCO-SANTOS A., NÚÑEZ E.J.P., TORRES-ÁLVAREZ E., 2002. Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Pathology* 32(6), 365-372
- SÁNCHEZ M.E., CAETANO P., FERRAZ J., TRAPERO A., 2000. El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 26, 447-464.
- SÁNCHEZ M.E., SÁNCHEZ J.E., NAVARRO R.M., FERNÁNDEZ P., TRAPERO A. 2003., Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 29, 87-108.
- SMITH I.M., DUNEZ J., LELLIOTT R.A., PHILLIPS D.H., ARCHER S.A., 1992. Manual de Enfermedades de las Plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 671 pp.
- TUSET J., HINAREJOS C., MIRA J., COBOS J., 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques. *Bol San Veg Plagas* 22, 491-499.
- TYNAN K.M., WILKINSON C.J., HOLMES J.M., DELL B., COLQUHOUN I., MCCOMB J.A., HARDY G.E., 2001. The long-term ability of phosphite to control *Phytophthora cinnamomi* in two native plant communities of Western Australia. *Australian Journal of Botany* 49(6), 761-770.
- WILKINSON C.J., HOLMES J.M., TYNAN K.M., COLQUHOUN I., MCCOMB J.A., HARDY G.E., DELL B., 2001. Ability of phosphite applied in a glasshouse trial to control *Phytophthora cinnamomi* in five plant species native to Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 30(4), 343-351.