

Patogenicidad de *Phytophthora* spp. causantes de podredumbre radical de *Quercus ilex* ssp. *ballota* en viveros forestales

M. E. SÁNCHEZ, S. ANDICOBERRY, A. TRAPERO

Como parte de una línea de investigación sobre calidad de planta para forestación de tierras agrarias, se ha estudiado la etiología de las podredumbres radicales que afectan a la encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota*) en viveros forestales de Andalucía. La sintomatología mostrada por las plántulas afectadas consistió en marchitez foliar asociada a la necrosis extensa de las raicillas absorbentes. A partir de las raíces necróticas se obtuvieron diversos aislados fúngicos que han sido identificados como *Phytophthora cinnamomi*, *P. drechsleri* y *P. cryptogea*. El estudio del crecimiento micelial de los aislados en función de la temperatura, ha mostrado que las tres especies de *Phytophthora* poseen curvas de crecimiento similares, con temperaturas óptimas alrededor de 24° C. Las inoculaciones efectuadas sobre plantones sanos han mostrado claramente el carácter patogénico de todos los aislados ensayados en *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber*, sin que se apreciara especificidad de huésped. Las condiciones de exceso de agua en el sustrato de cultivo resultaron decisivas para el establecimiento de la infección y el desarrollo de la enfermedad radical. *Phytophthora cinnamomi* ha resultado ser la especie más virulenta. También se ha establecido que *Q. ilex* ssp. *ballota* es más susceptible a la infección por *P. cinnamomi* que *Q. suber*. El presente trabajo constituye la primera descripción de *P. cinnamomi*, *P. drechsleri* y *P. cryptogea* como patógenos de plantones de encina en vivero.

M. E. SÁNCHEZ, S. ANDICOBERRY, A. TRAPERO. Dpto. Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080-Córdoba. Dirección de correo electrónico: trapero@uco.es

Palabras clave: *Phytophthora cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *Quercus rotundifolia*, *Q. suber*.

INTRODUCCIÓN

Desde 1993 hasta 1997 fueron forestadas en Andalucía cerca de 120.000 ha dentro del Programa de Forestación de Tierras Agrarias de 1993 (GÓMEZ-JOVER y JIMÉNEZ, 1997). Este programa ofrecía ayudas a la repoblación con especies forestales en parcelas sometidas a un aprovechamiento agrícola previo. La puesta en marcha del Programa generó una demanda de planta forestal a la que respondieron los viveros andaluces con un aumento de la producción de las especies más solicitadas, pero sin fijar unos determinados criterios de calidad de planta. De todas

las especies, las que experimentaron una mayor demanda fueron la encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota*) y el alcornoque (*Q. suber*), ocupando entre ambas alrededor del 70% de las tierras agrarias forestadas dentro de dicho Programa (GÓMEZ-JOVER y JIMÉNEZ, 1997).

La calidad de la planta forestal producida por el viverista va a determinar, en gran medida, el éxito de la plantación, en cuanto al crecimiento y supervivencia de las especies empleadas (NAVARRO *et al.*, 1998). En las condiciones ambientales particulares del vivero se corre el riesgo de que las enfermedades se extiendan e intensifiquen con rapidez, dando lugar a la aparición de problemas

a corto plazo, en el mismo vivero, o a más largo plazo, apareciendo los síntomas de la enfermedad una vez que los plantones infectados ya se han establecido en las parcelas de repoblación (SÁNCHEZ *et al.*, 1999). El control sanitario en los viveros es, pues, clave para conseguir un buen desarrollo de los cultivos y producir una planta de calidad para la repoblación. Se han descrito más de 30 especies fúngicas diferentes causantes de podredumbres radicales de plántulas en especies forestales. Algunos de ellos son parásitos con escasa capacidad saprofítica (*Phytophthora* y *Pythium*), aunque la mayoría son saprofitos facultativos que pueden actuar como patógenos cuando se ven favorecidos por las condiciones ambientales (BUTIN, 1995). En los viveros españoles, la mayoría de los problemas de muerte de plántulas son debidos a enfermedades causadas por hongos, especialmente los causantes de caída de plántulas (damping-off), y los derivados de la aparición de malas hierbas en los cultivos (PEÑUELAS y OCAÑA, 1996). En España, la podredumbre de las raíces causada por *Phytophthora* rara vez ha sido identificada en viveros forestales y normalmente suelen atribuirse las pérdidas a una mala aireación del sustrato (PEÑUELAS y OCAÑA, 1996). Por otra parte, en el género *Quercus* las podredumbres radicales de plantones en vivero no son muy frecuentes, y no está estudiada la incidencia de estas enfermedades en las especies de *Quercus* que se producen en España.

El desconocimiento existente sobre las principales enfermedades de vivero en el contexto específico de las especies más utilizadas en la forestación de tierras agrarias en Andalucía, hace necesario un estudio en profundidad sobre su etiología, como primer paso necesario para establecer un control efectivo de las mismas (SÁNCHEZ *et al.*, 1999).

Por ello, como parte de una línea de investigación sobre calidad de planta en los viveros forestales andaluces, los objetivos del presente trabajo han sido (i) caracterizar la sintomatología de las principales micosis que afectan a los plantones de encina en los

viveros andaluces, (ii) identificar los hongos asociados con las podredumbres radicales de la encina en vivero y (iii) determinar la patogenicidad sobre alcornoque y encina de los hongos consistentemente aislados de las plantas enfermas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Manejo de las muestras

La toma de muestras se realizó en dos viveros forestales de la provincia de Córdoba afectados de muerte de plantones. El primero de ellos (Vivero I) era un vivero de producción propia para forestación de una finca privada ubicada en la sierra de Córdoba. Los plantones de encina afectados crecían en bolsas de polietileno negro de 1 l de capacidad, utilizando como sustrato suelo natural de monte. El otro vivero (Vivero II) está dedicado a la producción comercial intensiva de planta en envase y utilizan como sustrato turba rubia / negra (7/3 en volumen) en bandejas de 9 x 5 alvéolos de 18 cm de altura y 300 cm³ de volumen. En los dos viveros, las plántulas de encina afectadas eran de 1 savia y estaban próximas a su plantación en campo.

Tras consignar la sintomatología aérea de la enfermedad, para el muestreo se tomaron seis plantones sintomáticos en cada vivero, desechando aquellos que aparecían completamente marchitos. Ya en el laboratorio, tras sacar los plantones de sus envases, se procedió a un lavado cuidadoso de las raíces bajo el chorro de agua. Las raíces con síntomas de podredumbre de cada uno de los plantones se trataron separadamente. Se cortaron con escalpelo estéril en pequeños trozos (3-4 mm de longitud) bajo condiciones asépticas, y se sembraron en placas de Petri. Los medios de cultivo empleados para los aislamientos fueron: APDA (medio genérico para el aislamiento de hongos) (SÁNCHEZ *et al.*, 2002c), PARP (específico para el aislamiento de hongos pitiáceos) y PARPH (específico para el aislamiento de especies del género *Phytophthora*) (JEFFERS y MARTIN, 1986). Se sembraron 6 placas de cada medio de cultivo

Cuadro 1. Aislamiento de *Phytophthora* spp. a partir de las raíces necróticas de plantones de encina afectados de podredumbre radical

Vivero	Aislados purificados	Especie fúngica	Aislamiento (%) ^a
I	PV1, PV2	<i>Phytophthora cinnamomi</i> A2	32
II	PV3, PV4	<i>Phytophthora drechsleri</i> A2	17
	PV5	<i>Phytophthora cryptogea</i> A1	34

^a Porcentaje expresado como n° de trocitos de raíz que dieron lugar a una colonia sobre el n° total de trocitos de raíz colocados en medio selectivo (PARP o PARPH).

por plantón. Las placas se incubaron a 22° C en oscuridad durante 4 días. Al cabo de 2 días, las placas que contenían el medio APDA se colocaron bajo luz durante otros 4 días (12 h/día). Las colonias obtenidas se agruparon en función de su morfología y se transfirieron aquellas que presentaron mayor frecuencia de aislamiento, con el fin de obtener cultivos puros (aislados) de cada grupo morfológico. Se seleccionaron 1 ó 2 aislados de cada grupo (Cuadro 1) para su caracterización e identificación.

Caracterización e identificación de los aislados

Morfología de las colonias

Para caracterizar la morfología de la colonia se utilizó el medio de zanahoria-agar (CA) (DHINGRA y SINCLAIR, 1995). Los aislados se incubaron en oscuridad y a 20° C y se observaron a los 4 días de crecimiento. Además, se realizaron observaciones del micelio al microscopio óptico invertido.

Estructuras de reproducción asexual

Para estimular la producción de esporangios, se colocaron trozos de CA colonizados por cada uno de los aislados en un medio líquido de extracto de suelo (RIBEIRO, 1978; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b) a dos temperaturas de incubación: 15 y 20° C, renovando el extracto de suelo cada 24 h. Se realizaron observaciones periódicas desde las 48 h de incubación hasta los 5 días con el microscopio invertido. Cuando se observó la producción de esporangios, se realizaron montajes teñidos con fucsina ácida en lactofenol para su observación en el microscopio óptico. Por cada aislado se observaron y midieron 30 esporangios maduros.

Estructuras de reproducción sexual

Para la producción de gametangios se realizaron cultivos dobles en medio CA con aislados de referencia de tipo de apareamiento A1 y A2, ya que ninguno de los aislados produjo estructuras sexuales en cultivo simple. Para los cruzamientos se utilizaron como aislados de referencia *P. cinnamomi* A1 (proporcionado por la Dra. Pérez Giménez, CIFA, Málaga), *P. cinnamomi* A2 (obtenido de la micoteca del Dpto. de Agronomía de la ETSIAM, Córdoba) y *P. drechsleri* A1 y A2 (proporcionados por el Dr. Brasier, Forestry Commission Research Agency, UK). Se prepararon 3 repeticiones por combinación y las placas se incubaron a 22° C en oscuridad. En las placas donde los cruzamientos tuvieron éxito se procedió a la preparación de montajes microscópicos teñidos con fucsina ácida en lactofenol. Por cada aislado se observaron y midieron 30 oogonios, 30 anteridios y 30 oosporas maduras.

Tasa de crecimiento a distintas temperaturas

Cada uno de los aislados se sembró en el medio CA y las placas se incubaron a 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35° C. Se midió el diámetro medio de la colonia a los 2, 4, 6, 10 y 15 días de incubación a cada temperatura. Con los datos de tres repeticiones por aislado y temperatura, se calculó la tasa máxima de crecimiento diario en función de la temperatura. Estos datos se ajustaron matemáticamente a una curva de regresión, mediante el programa Statistix for Windows (Analytical Software, Tallahassee, USA), eligiendo el modelo que mejor se ajustaba para cada uno de los aislados. Utilizando la ecuación resultante, se calcularon las temperaturas cardinales de crecimiento.

Ensayos de patogenicidad en plantones de encina y alcornoque

Experimento 1: Los dos aislados procedentes del Vivero I (PV1 y PV2) se inocularon en plantones sanos de encina y alcornoque de 1 savia. Se ensayaron tres métodos de inoculación de los plantones: mediante la aplicación de inóculo producido en medio VAV8 (Vermiculita-avena-V8) (WILCOX y MIRCETICH, 1985), sustituyendo el jugo de vegetales V8 por extracto de zanahoria (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b); en medio de mijo (MOREIRA *et al.*, 1997) y en suspensión acuosa (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b).

En todos los casos el inóculo se aplicó al cepellón de los plantones extraídos de sus envases originales, a razón de 100 ml por planta para los medios de vermiculita y sus-

pensión acuosa y de 50 ml para el medio de mijo (Figura 1a, 1b). El cepellón así tratado se introdujo en una maceta previamente desinfectada con lejía y se añadió suelo hasta completar un volumen de 2.5 l por maceta. Este suelo era una mezcla de arena, limo y turba (1:1:1 en volumen) (TRAPERO y JIMÉNEZ, 1985). Se prepararon 6 repeticiones por aislado y tipo de inóculo. Las macetas se colocaron en bandejas, también previamente desinfectadas con lejía, de forma que en cada bandeja sólo hubiera plantas inoculadas con el mismo aislado. Tras una semana de acondicionamiento en cámara de crecimiento, las bandejas se llenaron de agua (Figura 1c), manteniéndose llenas durante todo el experimento, ya que éstas son las condiciones que favorecen la infección radical de la encina y

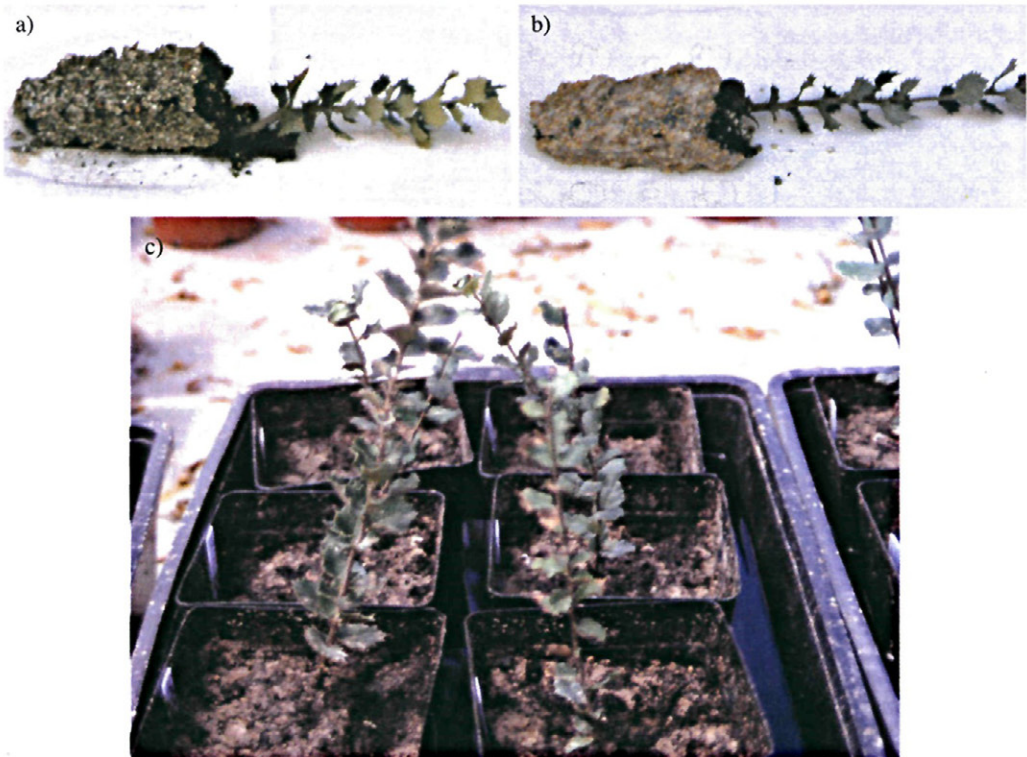


Figura 1: Inoculación de plantones de encina y alcornoque de 1 savia (Experimento 1), a) aplicación al cepellón del inóculo en el medio VAV8 modificado, b) aplicación al cepellón del inóculo en el medio de mijo, c) encharcamiento del sustrato mediante inundación de las bandejas.

el alcornoque por *Phytophthora* spp. (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b). El experimento transcurrió a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ de temperatura y 14 h de luz diaria. Los plantones testigo fueron tratados de la misma manera, salvo por la ausencia de cualquier tipo de inóculo.

Experimento 2: Se ensayó la influencia del contenido hídrico del suelo en la infección. Para ello, los aislados PV2 y PV5 se inocularon en plantones sanos de encina y alcornoque de 1,5 savias. La inoculación se realizó con suspensiones acuosas en dosis de 100 ml por planta. Todos los plantones, incluyendo los testigos, fueron sometidos a tres regímenes hídricos distintos: saturación continua (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b), saturación periódica corta (2 días por semana) y saturación periódica larga (2 días cada 2 semanas). Para ello, todas las plantas fueron colocadas en bandejas de plástico de forma que en cada bandeja sólo hubiera plantas inoculadas con el mismo aislado y tras una semana de acondicionamiento en cámara de cultivo a $22 \pm 2^\circ \text{C}$, se procedió a

la inundación de las bandejas según las condiciones hídricas que les correspondiesen. El experimento se llevó a cabo en umbráculo, con una temperatura máxima media de $31,5^\circ \text{C}$ y temperatura mínima media de $12,2^\circ \text{C}$. Se prepararon 6 repeticiones por aislado y régimen hídrico.

Experimento 3: En este ensayo se inocularon plantones de encina y alcornoque de 9 meses de edad con los 5 aislados procedentes de encina más un aislado de referencia de *P. drechsleri* procedente de plántulas de pino carrasco (SÁNCHEZ *et al.*, 2002a), conservado en la micoteca del Dpto. de Agronomía de la Universidad de Córdoba (aislado PPH). Para infectar las plantas se eligió el método de inoculación con suspensiones acuosas. Las plantas inoculadas y las testigo fueron sometidas a condiciones de encharcamiento periódico corto (2 días por semana). El experimento se llevó a cabo en umbráculo, con temperatura máxima media de $33,5^\circ \text{C}$ y temperatura mínima media de $18,1^\circ \text{C}$. Se prepararon 6 repeticiones por aislado inoculado.

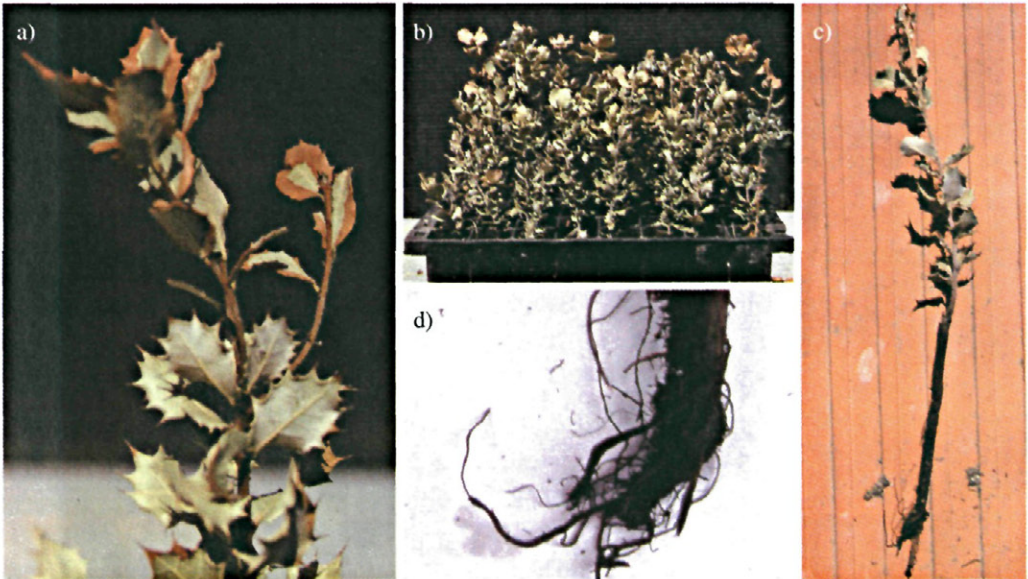


Figura 2: Síntomas de la podredumbre radical en plantones de encina, a) síntomas foliares: marchitez en los márgenes de las hojas, b) marchitez foliar generalizada, c) necrosis de raicillas absorbentes, d) desprendimiento de la corteza externa o síntoma "raíz pelada".

En todos los experimentos se realizó un seguimiento de los síntomas foliares, y se dieron por finalizados cuando las plantas inoculadas mostraron la sintomatología aérea de la enfermedad. En este momento se sacaron las plantas de sus macetas, se lavaron a chorro de agua las raíces y se evaluaron. Se utilizó la escala 0-4 para la evaluación de la severidad de las infecciones en parte aérea y raíz (0 = sin síntomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99%, 4 = 100% de parte aérea o raíz sintomática) (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b). A estos datos se les aplicó el análisis de la varianza y los valores medios fueron comparados mediante el test LSD (mínima diferencia significativa) protegido de Fisher al nivel de significación $P = 0,05$ (STEEL y TORRIE, 1985). Tras la evaluación se realizaron aislamientos de las raicillas en el medio PARPH para determinar el grado de recuperación del patógeno.

RESULTADOS

Sintomatología observada en vivero

Los síntomas observados en los plantones de encina fueron similares en los dos viveros. Las plántulas presentaban clorosis, desecación y marchitez foliar, que comenzaba por los márgenes e iba avanzando hacia el nervio principal hasta la completa marchitez de la hoja (Figura 2a). En algunos casos se

produjo defoliación, pero en general las hojas marchitas permanecían prendidas al tallo (Figura 2b). Los sistemas radicales aparecían reducidos y con necrosis extensas en las raicillas absorbentes aún unidas a la raíz principal leñosa, que sin embargo no presentaba lesiones (Figura 2c). En estas raíces absorbentes necrosadas frecuentemente se apreciaba un desprendimiento de la corteza externa, dando lugar al síntoma denominado "raíz pelada" (Figura 2d) (SÁNCHEZ *et al.*, 1998a; 2000). En los dos viveros el drenaje de los envases era deficiente, por lo que se veían sometidas a encharcamientos periódicos. En el Vivero I, las plántulas estaban dispuestas sobre láminas de polietileno negro sobre un suelo de hormigón. El riego se realizaba diariamente con manguera y el exceso de agua se acumulaba en el suelo, formando charcos que llegaban a cubrir los orificios de drenaje de las bolsas en las que crecían estos plantones. Todas las plántulas de encina de este vivero mostraban en mayor o menor grado síntomas de podredumbre radical. En el Vivero II los problemas de drenaje estaban originados por la alta capacidad de retención hídrica del sustrato utilizado para el cultivo. En este vivero la enfermedad se manifestó en forma de rodales que se distribuían en torno a los aspersores de riego.

De estos dos viveros se obtuvieron cuatro tipos de colonias fúngicas en el medio PARP

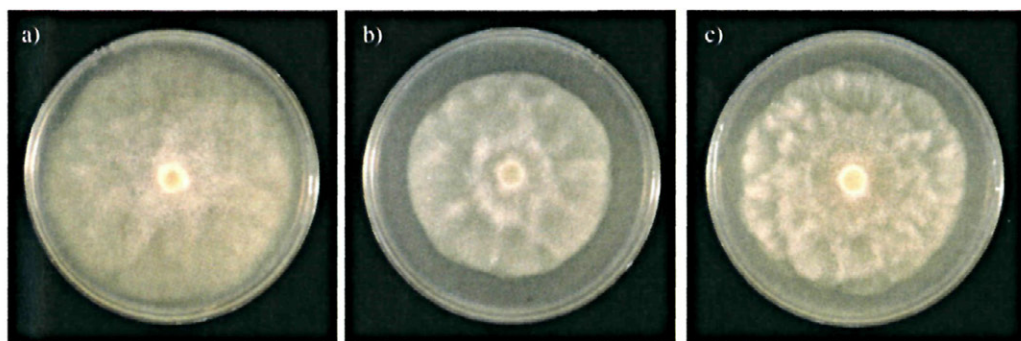


Figura 3: Morfología de las colonias de *Phytophthora* spp. a los 4 días de crecimiento a 20° C en el medio CA, a) colonia petaloide con micelio aéreo algodonoso del aislado PV1, identificado como *P. cinnamomi*, b) colonia tipo roseta del aislado PV5, identificado como *P. cryptogea*, c) colonia tipo crisantemo del aislado PV4, identificado como *P. drechsleri*.

Cuadro 2. Características de los esporangios producidos por los aislados de *Phytophthora* spp. en medio líquido de extracto de suelo

Especie	Aislado	Longitud (L) ^a	Anchura (A) ^a	(L/A)	Ápices truncados (%)
<i>P. cinnamomi</i>	PV1	40,2 ± 10,4	31,5 ± 7,1	1,2	80,0
	PV2	40,4 ± 10,0	30,7 ± 7,7	1,3	43,3
<i>P. drechsleri</i>	PV3	34,7 ± 5,8	27,9 ± 3,0	1,2	10,0
	PV4	39,9 ± 4,3	30,0 ± 3,5	1,3	73,3
<i>P. cryptogea</i>	PV5	35,8 ± 3,4	23,5 ± 3,2	1,5	100

^a Valores expresados en µm. Cada valor es la media de 30 observaciones ± desviación estándar.

y PARPH asociadas a la podredumbre radical, de los cuales se conservaron y caracterizaron 5 aislados. Los porcentajes de aislamiento aparecen reflejados en el Cuadro 1. Además, en el medio PARP se obtuvieron puntualmente algunas colonias pertenecientes al género *Pythium*, y en el medio APDA se aisló esporádicamente alguna

colonia perteneciente a los géneros *Cylindrocarpon* y *Fusarium*.

Caracterización e identificación de los aislados

Morfología de las colonias

A los 4 días de crecimiento a 20° C en el medio CA, los aislados PV1 y PV2 formaron

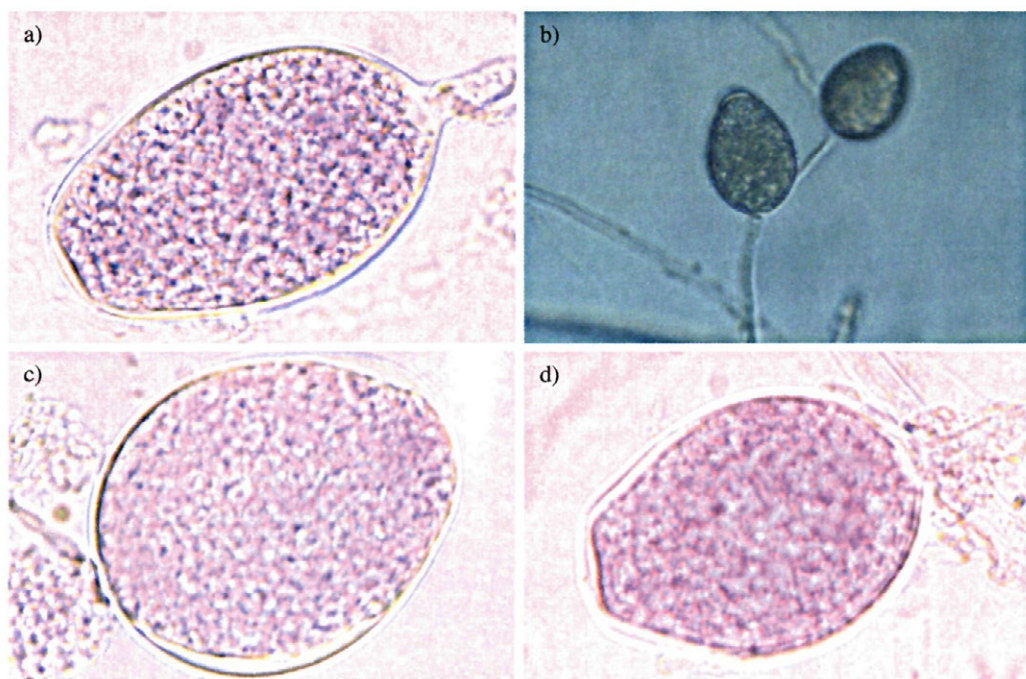


Figura 4: Morfología de las estructuras de reproducción asexual de los aislados de *Phytophthora* spp., a) esporangio elipsoide de *P. cinnamomi*, b) ramificación simpodial de los esporangióforos de *P. cinnamomi*, c) esporangio subsférico de *P. drechsleri*, d) esporangio obpiriforme de *P. cryptogea*.

colonias de color blanco, con abundante micelio aéreo algodonoso y crecimiento uniforme o ligeramente petaloide (Figura 3a). Las colonias de los aislados PV3 y PV5 presentaron formaciones miceliales blanquecinas a modo de pétalos, dando lugar a una colonia tipo "roseta", con micelio aéreo escaso (Figura 3b). Por último, el aislado PV4 formó colonias blancas tipo "crisantemo", con pétalos pequeños e imbricados, micelio aéreo escaso y pulverulento (Figura 3c).

En las observaciones realizadas con el microscopio invertido, todos los aislados presentaron un micelio cenocítico muy ramificado. Los aislados PV1, PV2 y PV5 presentaron ramificaciones botriosas. Los aislados PV1 y PV2 mostraron además hinchazones hifales grandes, esféricas, terminales e intercalares, simples y en racimo.

Caracterización de estructuras de reproducción asexual

De las dos temperaturas ensayadas, la de 20° C fue la más favorable para la formación de esporangios. A esta temperatura el tiempo que tardaron en formarse los esporangios osciló entre las 48 y las 72 h, mientras que a 15° C osciló entre los 4 y 5 días y se produjeron en menor número.

En todos los aislados los esporangios formados fueron persistentes y no papilados. Sus características se recogen en el Cuadro 2.

Los esporangios producidos por el aislado

PV1 fueron de forma ovoide-elipsoide, con un alto porcentaje de esporangios con ápice truncado (Figura 4a). Los esporangióforos fueron en su gran mayoría simples y largos, aunque también los hubo ramificados simpodialmente (Figura 4b). Los esporangios producidos por PV2 fueron similares, aunque en este caso el porcentaje que presentaban el ápice truncado fue menor. PV3 produjo esporangios subsféricos (Figura 4c) y en menor proporción ovoides. Sólo un pequeño porcentaje de los esporangios presentó el ápice truncado. Los esporangióforos fueron en su gran mayoría simples y largos, con proliferación externa, generalmente no ramificados. Los esporangios producidos por el aislado PV4 fueron de forma ovoide o elipsoide. Un alto porcentaje presentó ápice truncado. Los esporangióforos fueron similares a los de PV3. El aislado PV5 produjo esporangios obpiriformes (Figura 4d) y elipsoides con un 100% de ápices truncados y esporangióforos simples.

En todos los aislados se observó la formación de hinchazones hifales en medio líquido de extracto de suelo, siendo más abundantes a 15° C que a 20° C. Éstas fueron en su mayoría esféricas, intercalares y en racimos, aunque también las hubo solitarias y terminales, siendo de mayor tamaño y mucho más abundantes las producidas por los aislados PV1 y PV2.

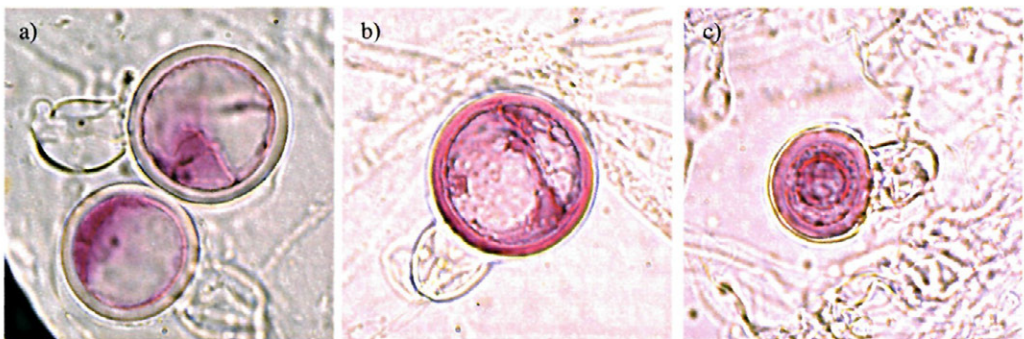


Figura 5: Morfología de las estructuras de reproducción sexual de los aislados de *Phytophthora* spp. obtenidos mediante cruzamientos con aislados de referencia: oosporas pleróticas y anteridios anfiginos de a) *P. cinnamomi*, b) *P. drechsleri*, c) *P. cryptogea*.

Cuadro 3. Formación de estructuras de reproducción sexual de los aislados de *Phytophthora* spp. en cultivo doble con aislados de referencia de ambos tipos de apareamiento (A1 y A2)

Especie	Aislado	Aislado de referencia				Tipo de apareamiento
		<i>P. cinnamomi</i> A1	<i>P. cinnamomi</i> A2	<i>P. drechsleri</i> A1	<i>P. drechsleri</i> A2	
<i>P. cinnamomi</i>	PV1	+	-	+	-	A2
	PV2	+	-	+	-	A2
<i>P. drechsleri</i>	PV3	+	-	+	-	A2
	PV4	+	-	+	-	A2
<i>P. cryptogea</i>	PV5	-	+	-	+	A1

+ = Formación de gametangios en cultivo doble.
 - = Ausencia de gametangios en cultivo doble.

Caracterización de estructuras de reproducción sexual

Los resultados de los cruzamientos de los aislados a identificar con los aislados de referencia se recogen en el Cuadro 3. Casi todos los aislados produjeron gametangios en cultivo doble con los aislados de referencia A1, por lo que su tipo de apareamiento es A2. La única excepción fue el aislado PV5, que resultó de tipo de apareamiento A1. Para la caracterización de las estructuras sexuales de los aislados con tipo de apareamiento A2, se utilizaron las producidas en los cruzamientos realizados con *P. cinnamomi* A1. Para el aislado PV5, se observaron y midieron los gametangios obtenidos en los cruzamientos realizados con *P. drechsleri* A2. En todos estos casos se produjeron estructuras sexuales en las interfases y en zonas de la placa próximas a la pieza de agar de siembra del aislado a identificar. Los montajes se realizaron con estructuras procedentes de estas

zonas, reduciéndose así la eventualidad de incluir gametangios producidos por los aislados de referencia.

En todos los casos se produjeron oogonios esféricos, de pared lisa y con oosporas pleróticas (Figura 5). Los anteridios fueron en todos los casos anfiginos y unicelulares (Figura 5), salvo algunos pertenecientes a los aislados PV1 y PV2, que fueron bicelulares (Cuadro 4). Las dimensiones de los oogonios, grosor de la pared de las oosporas y tamaño de los anteridios aparecen en Cuadro 4. La relación entre el diámetro de la oospora y la longitud del anteridio (Do/La) para todos los aislados osciló entre 2,3 y 2,6, excepto para el aislado PV5, que fue de 1,2 (Cuadro 4).

Identificación de los aislados

Todos los aislados obtenidos se caracterizaron por ser heterotálicos, con anteridios anfiginos y oosporas pleróticas. Además, los esporangios aparecían en posición terminal

Cuadro 4. Características de las estructuras sexuales de los aislados de *Phytophthora* spp. producidos en cultivos dobles con aislados de referencia

Especie	Aislado	Diámetro del oogonio (Do) ^a	Grosor de la pared de la oospora ^a	Longitud del anteridio (La) ^a	Do/La	Anteridios bicelulares (%)
<i>P. cinnamomi</i>	PV1	41,6 ± 4,8	3,8 ± 0,5	18,1 ± 4,4	2,4	23,3
	PV2	39,7 ± 3,3	3,9 ± 0,3	16,3 ± 2,8	2,5	23,3
<i>P. drechsleri</i>	PV3	30,1 ± 2,5	4,5 ± 0,8	13,1 ± 1,8	2,3	0
	PV4	30,3 ± 2,1	2,5 ± 0,6	11,7 ± 1,7	2,6	0
<i>P. cryptogea</i>	PV5	23,4 ± 2,4	2,2 ± 0,4	19,2 ± 3,1	1,2	0

^a Valores expresados en µm. Cada valor es la media de 30 observaciones ± desviación estándar.

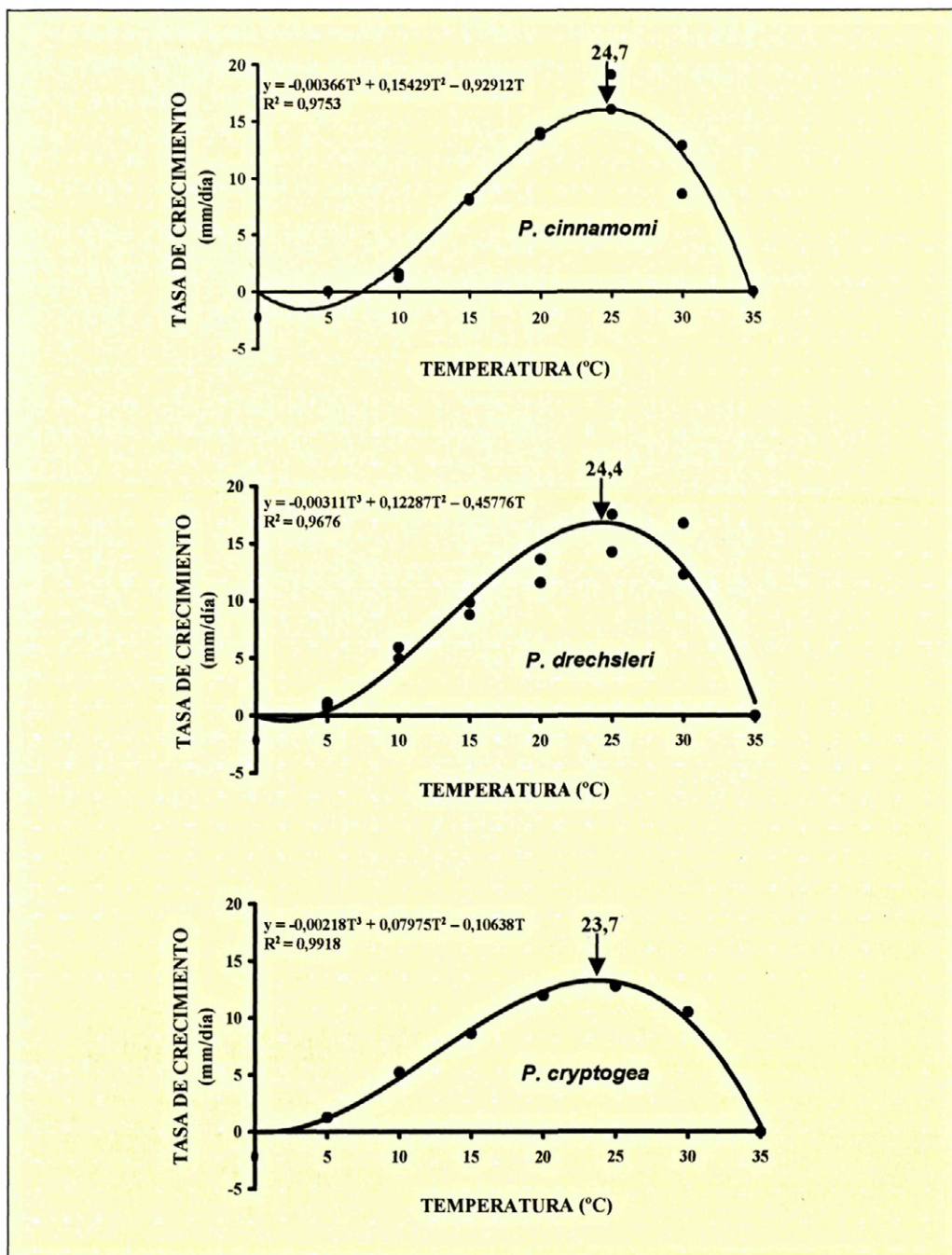


Figura 6. Curvas de crecimiento en el medio de cultivo CA para cada una de las especies de *Phytophthora* causantes muerte de plántulas de encina en vivero. Las flechas indican las temperaturas óptimas de crecimiento estimadas. Los puntos representan los valores medios de tasa de crecimiento de los aislados de cada especie a las distintas temperaturas ensayadas.

Cuadro 5. Temperaturas mínimas y óptimas de crecimiento estimadas para cada especie de *Phytophthora* en el medio de cultivo CA

Especie	T ^a mínima ^a	T ^a óptima ^b
<i>P. cinnamomi</i>	7,3	24,7
<i>P. drechsleri</i>	4,2	24,4
<i>P. cryptogea</i>	1,4	23,7

^a Las temperaturas mínimas fueron determinadas calculando los valores de T para y = 0 de las ecuaciones polinómicas de regresión (Figura 6) ajustadas para cada especie.

^b Las temperaturas óptimas fueron estimadas a partir de la derivación de las ecuaciones polinómicas de regresión (Figura 6) ajustadas para cada especie.

en el esporangióforo, eran no papilados y persistentes. Por todo ello, pertenecen al género *Phytophthora*, dentro del grupo VI de WATERHOUSE (1963). La caracterización de sus estructuras vegetativas y de reproducción sexual y asexual (Cuadros 2 y 4), han permitido su adscripción a diferentes especies morfológicas: PV1 y PV2 han sido identificados como *P. cinnamomi*; PV3 y PV4 como *P. drechsleri* y PV5 como *P. cryptogea*, según las descripciones de WATERHOUSE (1963), STAMPS *et al.* (1990) y ERWIN y RIBEIRO (1996).

Tasa de crecimiento a distintas temperaturas

Los valores de tasa diaria máxima de crecimiento en función de la temperatura para los distintos aislados se ajustaron a un modelo polinómico de 3^{er} grado forzado en

el origen, cuya expresión general es: $y = a * T^3 + b * T^2 + c * T$, donde y representa la tasa de crecimiento máximo diario, T es la temperatura de crecimiento y a, b y c son los coeficientes de regresión. Las curvas de crecimiento para cada una de las especies identificadas aparecen en la Figura 6. A partir de las ecuaciones obtenidas se estimaron las temperaturas mínimas y óptimas de crecimiento (Cuadro 5). Las temperaturas óptimas de crecimiento difirieron poco entre especies y estuvieron alrededor de 24° C. Por otra parte, se estimó la temperatura mínima de crecimiento para cada especie, que se ajustó en todos los casos a las observaciones experimentales, estimándose temperaturas mínimas superiores a 5° C para *P. cinnamomi* e inferiores a 5° C para *P. drechsleri* y *P. cryptogea* (Cuadro 5). Las temperaturas

Cuadro 6. Influencia del método de inoculación en la patogenicidad de aislados de *P. cinnamomi* sobre plántones de encina y alcornoque (Experimento 1)

Aislado	Tipo de inóculo	Severidad media de síntomas ^a			
		Encina		Alcornoque	
		Foliar	Radicales	Foliar	Radicales
PV1	Suspensión acuosa	3,4 a	3,5 ab	3,9 a	3,5 ab
	Mijo	2,9 a	3,6 ab	3,8 a	3,0 b
	VAV8	3,2 a	3,5 ab	3,3 a	3,4 ab
PV2	Suspensión acuosa	2,3 a	3,9 a	3,2 a	3,7 a
	Mijo	3,7 a	3,3 b	3,8 a	3,6 ab
	VAV8	3,0 a	3,8 ab	3,4 a	3,2 ab
Testigo	-	0,6 b	1,2 c	2,6 a	1,1 c

^a La escala utilizada para evaluar la severidad de los síntomas fue: 0 = sin síntomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99%, 4 = 100% del tejido afectado. Para cada columna, medias seguidas de una letra común, no difieren significativamente (P = 0,05), según el test de la mínima diferencia significativa (LSD) protegido de Fisher (Steel y Torrie, 1985).

máximas de crecimiento estimadas para cada especie excedieron del intervalo de temperaturas ensayado, por lo que no se consideraron.

Ensayos de patogenicidad

En todas las condiciones ensayadas, en las dos especies de *Quercus*, con las distintas técnicas de inoculación y aislados inoculados, se reprodujeron los síntomas de la enfermedad observados en vivero (Figura 7). En ningún caso se observó esta sintomatología en las plantas testigo utilizadas en los diferentes ensayos, con lo cual, los resultados que se exponen a continuación muestran claramente el carácter patógeno de todos los aislados en las dos especies de *Quercus* inoculadas. En todos los experimentos se recuperó el hongo inoculado a partir de las raíces necróticas de las plantas inoculadas, mientras que el porcentaje de recuperación de *Phytophthora* spp. en las raíces de las plantas testigo fue del 0% en todos los casos.

Experimento 1: Se dio por concluido al cabo de 4 semanas. La severidad de los síntomas aéreos y radicales correspondientes a las diferentes especies de planta, aislados y técnicas de inoculación, se recogen en el Cuadro 6. También aparecen los análisis de la varianza y comparaciones de medias individualizados por especie de planta. El análisis global de la varianza para la severidad de síntomas aéreos mostró diferencias significativas entre las plantas inoculadas y las testigo sin inocular. También se apreciaron diferencias significativas en función de la especie de planta inoculada, así como en la interacción aislado-planta. Sin embargo, no existieron diferencias en función de los distintos métodos de inoculación empleados, los aislados ensayados, ni en la interacción entre ambas variables A nivel radical sólo hubo diferencias significativas entre plantas testigo e inoculadas.

Experimento 2: La duración de este ensayo fue de 4 semanas para las plantas sometidas

Cuadro 7. Influencia del contenido hídrico del suelo en la patogenicidad de aislados de *Phytophthora* spp. sobre plantones de encina y alcornoque (Experimento 2)

Aislado	Tipo de encharcamiento ^b	Severidad media de síntomas ^a			
		Encina		Alcornoque	
		Foliares	Radicales	Foliares	Radicales
(P. <i>cinnamomi</i>)	Continuo	4,0 a	4,0 a	3,7 a	2,3 abc
	Periódico corto (2 días por semana)	1,1 cd	2,9 bc	1,4 cd	2,6 ab
	Periódico largo (2 días cada 2 semanas)	0,5 d	2,6 bc	0,7 de	2,2 bc
(P. <i>cryptogea</i>)	Continuo	2,7 b	3,1 b	2,5 b	3,0 a
	Periódico corto (2 días por semana)	0,9 cd	2,5 c	2,5 b	2,2 bc
	Periódico largo (2 días cada 2 semanas)	1,4 c	2,4 c	1,0 cde	1,9 cd
Testigo	Continuo	0,5 d	0,7 e	0,5 e	0,6 e
	Periódico corto (2 días por semana)	0,5 d	1,3 d	1,7 bc	1,3 de
	Periódico largo (2 días cada 2 semanas)	0,5 d	1,4 d	1,3 cde	0,8 e

^a La escala utilizada para evaluar la severidad de los síntomas fue: 0 = sin síntomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99%, 4 = 100% del tejido afectado. Para cada columna, medias seguidas de una letra común, no difieren significativamente (P = 0,05), según el test de la mínima diferencia significativa (LSD) protegido de Fisher (Steel y Torrie, 1985).

^b Para el encharcamiento continuo, valores a las cuatro semanas tras la inoculación. Para el resto, el tiempo transcurrido fue de ocho semanas.



Figura 7: Síntomas expresados por los plantones inoculados en los experimentos de patogenicidad. Experimento 3, a) marchitez foliar y necrosis radical en plantón de encina inoculado con *P. cinnamomi* (PV1), a la izquierda plantón testigo b) síntomas foliares y necrosis radical en plantones de alcornoque. De izquierda a derecha: plantón testigo, inoculado con *P. cinnamomi* (PV1), inoculado con *P. cinnamomi* (PV2), inoculado con *P. drechsleri* (PV4).

das a encharcamiento continuo y de 8 semanas para las encharcadas periódicamente. En este experimento, el análisis global de la varianza mostró diferencias significativas en la severidad de síntomas aéreos y radicales en función de las condiciones de encharca-

miento, entre plantas inoculadas y testigo y entre las dos especies de plantas, así como en las interacciones entre las condiciones de encharcamiento y cada una de las demás variables. Así, los encharcamientos continuo y periódico corto resultaron los más favora-

Cuadro 8. Patogenicidad de los aislados de *Phytophthora* spp. sobre plantones de encina y alcornoque (Experimento 3)

Especie	Aislado	Severidad media de síntomas ^a			
		Encina		Alcornoque	
		Foliares	Radicales	Foliares	Radicales
<i>P. cinnamomi</i>	PV1	3,7 a	3,8 a	2,2 a	3,1 a
	PV2	3,5 a	3,6 a	2,3 a	3,0 a
<i>P. drechsleri</i>	PV3	1,5 b	2,3 c	2,4 a	2,4 bc
	PV4	1,7 b	3,0 b	2,1 a	2,7 ab
	PPH ^b	3,3 a	3,6 a	2,2 a	2,0 c
<i>P. cryptogea</i>	PV5	1,6 b	2,6 c	2,2 a	2,4 bc
	Testigo	0,2 c	0,6 d	0,6 b	0,6 d

^a La escala utilizada para evaluar la severidad de los síntomas fue: 0 = sin síntomas, 1 = 1-33%, 2 = 34-66%, 3 = 67-99%, 4 = 100% del tejido afectado. Para cada columna, medias seguidas de una letra común, no difieren significativamente ($P = 0,05$), según el test de la mínima diferencia significativa (LSD) protegido de Fisher (Steel y Torrie, 1985).

^b PPH = Aislado de *P. drechsleri* causante de podredumbre radical en plántulas de *Pinus halepensis* (Sánchez *et al.*, 2002a).

bles para el desarrollo de la enfermedad. No se apreciaron diferencias significativas entre el aislado de *P. cinnamomi* (PV2) y el de *P. cryptogea* (PV5). Este análisis también mostró una mayor severidad de síntomas radicales en encina, si bien los síntomas secundarios de la enfermedad, es decir, los síntomas aéreos, fueron significativamente más severos en alcornoque. En el Cuadro 7 se muestran los resultados del experimento y los análisis de la varianza y comparaciones de medias individualizadas por especie de planta.

Experimento 3: Se dio por concluido a las 8 semanas. El análisis global de la varianza para la severidad de síntomas aéreos y radicales y su comparación de medias permitió establecer diferencias de patogenicidad entre los distintos aislados ensayados, resultando los aislados PV1 y PV2, identificados como *P. cinnamomi*, los más patogénicos tanto en encina como en alcornoque (Cuadro 8). El aislado de referencia de *P. drechsleri* (PPH) resultó igualmente muy patogénico en encina, aunque no así para el alcornoque. En este experimento no se apreciaron diferencias significativas a nivel aéreo entre encinas y alcornoques, aunque sí las hubo a nivel radical (Figura 7), siendo de nuevo las encinas las que mostraron síntomas más severos.

DISCUSIÓN

El síndrome de muerte de plantones observado en los dos viveros afectados se corresponde plenamente a la enfermedad conocida como "colapso tardío" o "damping-off tardío", según la denominación de BUTIN (1995).

Los hongos asociados a la podredumbre radical pertenecen en todos los casos al género *Phytophthora*. De las tres especies identificadas (*P. cinnamomi*, *P. drechsleri* y *P. cryptogea*), sólo *P. cinnamomi* ha sido descrita causando enfermedades radicales en pies adultos de *Q. ilex* ssp. *ballota* y *Q. suber* (BRASIER, 1996; TUSET *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1997; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b).

Todos los aislados presentaron curvas de crecimiento muy parecidas, con elevadas

tasas de crecimiento y temperaturas óptimas alrededor de 24° C. Estas temperaturas contrastan con las temperaturas óptimas descritas para *P. cinnamomi* (30° C) procedentes de aislamientos realizados en Andalucía de raíz de encinas adultas (SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b), sugiriendo una cierta adaptación de los aislados a las condiciones específicas del vivero.

Los experimentos de patogenicidad realizados han demostrado que todos los aislados de *Phytophthora* son claramente patógenos de encina y alcornoque en vivero y reproducen los síntomas de podredumbre radical y marchitez foliar en todas las condiciones ensayadas. Además, la patogenicidad de *P. cinnamomi*, *P. drechsleri* y *P. cryptogea* viene determinada por el contenido hídrico del suelo, ya que la aparición de la enfermedad en los viveros estudiados estuvo asociada a un estado de saturación hídrica periódica de los sustratos en los que crecían los plantones. Estas condiciones de encharcamiento favorecen la aparición de este tipo de enfermedades (JUZWIK *et al.*, 1998; PETTIT *et al.*, 1998; SÁNCHEZ *et al.*, 1998b; 2000; 2001; 2002b). El bajo nivel de síntomas mostrados por las plantas testigo en todos los experimentos, significativamente menores que los valores de severidad mostrados por las plantas inoculadas, indica que el efecto del encharcamiento, en ausencia de patógeno, no es el responsable de los síntomas observados en las plantas inoculadas. Tal y como ya se demostró en el caso de la podredumbre radical del olivo causada por *Phytophthora megasperma* (SÁNCHEZ *et al.*, 1998b; 2001), los resultados obtenidos sugieren que lo que se viene considerando como alta sensibilidad de los *Quercus* a la asfixia radical (PEÑUELAS y OCAÑA, 1996) por encharcamiento de los sustratos de cultivo, se debe contemplar más apropiadamente como una muy elevada susceptibilidad a estos patógenos en las condiciones de saturación hídrica que favorecen la infección de las raíces.

Los aislados reprodujeron la enfermedad en las dos especies de *Quercus* inoculadas,

no pudiéndose apreciar especificidad de huésped, tal y como cabía esperar de hongos causantes de "damping-off" (MANION, 1991; BUTIN, 1995).

En el primer ensayo de patogenicidad (Experimento 1) los tres tipos de inóculo dieron lugar a la infección radical de los plantones, sin que se apreciaran diferencias significativas en cuanto a la severidad de síntomas radicales obtenida. DHINGRA y SINCLAIR (1995) consideran más efectivos los métodos de inoculación de raíces en los cuales el inóculo se añade suspendido en un medio nutritivo. En nuestro caso, la ausencia de nutrientes en el medio de inoculación (suspensión acuosa), resultó tan efectivo como los otros dos tipos de inóculo, en los cuales el hongo se añadía colonizando granos de avena y partículas de vermiculita (medio VAV8 modificado) o granos de mijo. Este hecho puede ser debido a la gran capacidad infectiva que muestran los aislados cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables. Por este motivo, se eligió la suspensión acuosa para posteriores inoculaciones, por ser el método de inoculación más sencillo en cuanto a su preparación y posterior manejo.

El Experimento 2 tuvo como objetivo conocer la influencia de la saturación hídrica del suelo en el desarrollo de la enfermedad. La mayoría de autores señalan las condiciones de encharcamiento periódico como las mejores para el desarrollo de las infecciones producidas por *Phytophthora* en huéspedes leñosos (RIBEIRO, 1978; BROWNE y MIRCE-TICH, 1988). En nuestros ensayos, las condiciones de encharcamiento continuo resultaron las más favorables, ya que dieron lugar a infecciones más severas y además, la sintomatología de la enfermedad se desarrolló en un tiempo menor. Los plantones testigo sometidos a encharcamiento continuo mostraron unos valores de necrosis radical bajísimos, incluso menores que los ya bajos valores obtenidos para los plantones testigo encharcados periódicamente. No obstante, para los siguientes experimentos se optó por someter a los plantones a encharcamiento periódico

corto, por ser éstas las condiciones que más se asemejan a las condiciones reales de vivero.

El Experimento 3 mostró diferencias de patogenicidad entre los distintos aislados ensayados. En este sentido, atendiendo a la sintomatología primaria de la enfermedad, *P. cinnamomi* resultó ser la especie más virulenta para ambas especies de *Quercus*. En encina, el aislado PPH procedente de pino, identificado como *P. drechsleri* (SÁNCHEZ *et al.*, 2002a), dio lugar a una sintomatología tan severa como los aislados de *P. cinnamomi*, en contraste con el resto de aislados de *P. drechsleri*, que dieron lugar a una severidad de síntomas menor, a pesar de haber sido obtenidos de raíces enfermas de encina. Es importante señalar que, en las condiciones de este experimento, los alcornoques presentaron una menor severidad de síntomas foliares que las encinas, aunque las diferencias no fueron tan marcadas a nivel radical. La mayor susceptibilidad de la encina a la infección radical por *P. cinnamomi* ya había sido puesta de manifiesto en inoculaciones artificiales sobre plantones (MOREIRA *et al.*, 1997; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b).

En cuanto al posible origen de la enfermedad en los viveros estudiados, hay que diferenciar la situación de cada uno de ellos. En el Vivero I, el suelo de monte utilizado como sustrato para el cultivo aparece como la fuente de inóculo más probable. El hecho de que *P. cinnamomi*, patógeno extremadamente virulento, haya sido aislado únicamente bajo estas condiciones especiales, hace pensar que no debe tratarse de un agente que habitualmente cause pérdidas en vivero. En cuanto al Vivero II, es más difícil determinar el posible origen del inóculo, que pudo llegar al vivero con el sustrato de cultivo o con el agua de riego. Hay que señalar que en este vivero se utiliza el mismo sustrato y régimen de riegos para la producción de encinas y alcornoques y, sin embargo, sólo las primeras se vieron afectadas por la enfermedad radical, a pesar de que nuestros experimentos muestran que el alcornoque también es susceptible a *Phytophthora* spp. Esta aparente contradicción puede explicarse si

tenemos en cuenta las diferencias que existen en el cultivo de ambas especies. La época de siembra es más tardía para el alcornoque, mientras que el endurecimiento (preacondicionamiento hídrico) de esta especie ocurre antes, con objeto de evitar portes demasiado elevados (NAVARRO *et al.*, 1998). De esta manera, el tiempo que el alcornoque pasa en las condiciones de saturación hídrica periódica que favorecen la enfermedad es sensiblemente menor que en el caso de la encina. Este hecho, unido a la menor susceptibilidad del alcornoque a la infección por *Phytophthora*, podría justificar la ausencia de síntomas en alcornoque en el vivero, al tiempo que no nos permite descartar el sustrato o el agua como el origen del inóculo. En cualquier caso, no debe olvidarse la semilla como otra posible vía de entrada al vivero del inóculo inicial.

Independientemente del origen del inóculo, la constatación de que el exceso de agua es la condición fundamental que favorece la infección de las raíces, implica que la mejor medida de control contra la enfermedad en el contexto del vivero consistirá en evitar los encharcamientos periódicos que sufren los plantones (BLOOMBERG, 1985; ERWIN y RIBEIRO, 1996), bien por instalaciones inadecuadas, excesos de riego, empleo de sustratos poco porosos y/o con gran capacidad de retención de agua, etc.

Hasta el momento, sólo una especie de *Phytophthora* (*P. cinnamomi*) ha sido descrita como agente causal de podredumbres radicales en encinas y alcornoces (BRASIER, 1996; TUSET *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1997; SÁNCHEZ *et al.*, 2000; 2002b), aunque nunca en plantones de vivero. Este trabajo constituye la primera descripción de *P. cinnamomi*, *P. drechsleri* y *P. cryptogea* como agentes de podredumbre radical tardía de *Q. ilex* ssp. *ballota* en vivero. También se ha demostrado que las tres especies de *Phytophthora* constituyen un peligro potencial para la producción en vivero de *Q. suber*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a los Dres. Brasier (Forestry Commission Research Agency, UK) y Pérez Giménez (CIFA, Málaga) por habernos proporcionado los cultivos de referencia para los cruzamientos de *Phytophthora* spp. Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos de Investigación FO96-006 y AGL2002-00530, así como por el Convenio suscrito entre la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y la Universidad de Córdoba para el estudio de la Seca de *Quercus* en Andalucía. M.E. Sánchez disfruta de un contrato del Programa "Ramón y Cajal" del MCyT.

ABSTRACT

SÁNCHEZ M.E., S. ANDICOBERRY, A. TRAPERO. 2004. Pathogenicity of *Phytophthora* spp. causing root rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota* in forest nurseries. *Bol. San. Veg. Plagas*, 30: 385-401.

Within a research project on quality of plants for forestation of agricultural lands, we studied the etiology of a root rot affecting holm oak (*Quercus ilex* ssp. *ballota*) seedlings in two forest nurseries in southern Spain. Major disease symptoms were foliar wilting and necrosis of feeder roots. Three fungal species, *Phytophthora cinnamomi*, *P. cryptogea* and *P. drechsleri*, were isolated from necrotic roots of holm oak. Isolates of the three species showed similar growth patterns at different temperatures with optimum temperatures near 24 °C. Selected isolates of the three *Phytophthora* species were pathogenic to *Quercus ilex* ssp. *ballota* and *Q. suber* seedlings in artificial inoculations. Soil flooding conditions were essential for infection and root rot development. There was not host specificity among fungal species, being the isolates of *P. cinnamomi* the most virulent in all inoculated plants. In these inoculations, *Q. ilex* ssp. *ballota* plants were more susceptible

than those of *Q. suber* were. This work is the first report of *P. cinnamomi*, *P. drechsleri* and *P. cryptogea* affecting *Q. ilex* ssp. *ballota* in forest nurseries.

Key words: *Phytophthora cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *Quercus rotundifolia*, *Q. suber*.

REFERENCIAS

- BLOOMBERG W.J. 1985. The epidemiology of forest nursery diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23: 83-96.
- BRASIER, C.M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. Sci. For.*, 53: 347-358.
- BROWNE, G.T., MIRCETICH, S.M. 1988. Effects of flood duration of the development of *Phytophthora* root and crown rots of apple. *Phytopathology*, 78: 846-851.
- BUTIN, H. 1995. Tree diseases and disorders. Oxford Univ. Press, Oxford.
- ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. 1995. Basic plant pathology methods. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- GÓMEZ-JOVER, F., JIMÉNEZ, F. J. 1997. Forestación de tierras agrícolas. MAPA-Universidad de Córdoba, Madrid.
- JEFFERS, N.S., MARTIN, J.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.*, 70: 1038-1043.
- JUZWIK, J., GUST, K.M., ALLMARAS, R.R. 1998. Influence of cultural-practices on edaphic factors related to root disease in *Pinus* nursery seedlings. *Plant and Soil*, 207: 195-208.
- MANION, P.D. 1991. Tree diseases concepts. Prentice-Hall, London.
- MOREIRA, A.C., FERRAZ, J.F.P., CLEGG, J.M. 1997. Susceptibility of *Quercus suber* and *Q. rotundifolia* to infection to *Phytophthora cinnamomi*. Proceedings del 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Montpellier. pp: 427-431.
- NAVARRO, R.M., CAMPO, A. D. DEL, ALEJANO, R., ALVAREZ, L. 1998. Caracterización de calidad final de planta de encina, alcornoque, algarrobo y acebuche en cinco viveros en Andalucía. *Informaciones Técnicas* 53/98. Junta de Andalucía, Sevilla.
- PENUELAS, J. L., OCAÑA, L. 1996. Cultivo de plantas forestales en contenedor. MAPA. Mundi-Prensa, Madrid.
- PETTTIT, T.R., FINLAY, A.R., SCOTT, M.A., DAVIES, E.M. 1998. Development of a system simulating commercial production conditions for assessing the potential spread of *Phytophthora cryptogea* root rot of hardy nursery stock in recirculating irrigation water. *Ann. Appl. Biol.*, 132: 61-75.
- RIBEIRO, O.K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer, Vaduz.
- SÁNCHEZ, M.E., PÉREZ DE ALGABA, A., BLANCO, M.A., TRAPERO, A. 1998a. La "seca" de olivos jóvenes I: Sintomatología e incidencia de los agentes asociados. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24: 551- 572.
- SÁNCHEZ, M.E., RUIZ, A., PÉREZ DE ALGABA, A., BLANCO, M.A., TRAPERO, A. 1998b. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104:347-357.
- SÁNCHEZ, M.E., VARO, M.R., ANDICOBERRY, S., TRAPERO, A. 1999. Enfermedades que afectan a la producción de planta forestal en viveros andaluces. *Agricultura*, 809: 1030-1034.
- SÁNCHEZ, M.E., CAETANO, P., FERRAZ, J., TRAPERO, A., 2000. El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva. *Bol. San. Veg. Plagas*, 26: 447-464.
- SÁNCHEZ, M.E., MUÑOZ, M., BRASIER, C.M., TRAPERO, A. 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. *Plant Dis.*, 85: 411-416.
- SÁNCHEZ, M.E., ANDICOBERRY, S., TRAPERO, A. 2002 a. *Phytophthora* root rot of Aleppo pine seedlings in a forest nursery in Spain. *Plant Dis.*, 86: 563.
- SÁNCHEZ, M.E., CAETANO, P., FERRAZ, J., TRAPERO, A. 2002b. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *For. Path.*, 32: 5-18.
- SÁNCHEZ, M.E., GUTIÉRREZ, J., TRAPERO, A. 2002c. Botryosphaeria canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathol.*, 51: 364-372.
- STAMPS, D.T., WATERHOUSE, G.M., NEWHOOK, F.J., HALL, G.S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. CAB International, Kew, Surrey.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. McGraw-Hill, Bogotá.
- TRAPERO, A., JIMÉNEZ, R.M. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. *Phytopathology*, 75: 1146-1151.
- TUSET, J., HINAREJOS, C., MIRA, J.L., 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.
- WATERHOUSE, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. CMI Mycological Papers 92, Kew.
- WILCOX, W.F., MIRCETICH, S.M. 1985. Pathogenicity and relative virulence of seven *Phytophthora* spp. on Mahaleb and Mazzard cherry. *Phytopathology*, 75: 221-226.

(Recepción: 28 julio 2003)

(Aceptación: 19 abril 2004)