

El chancro de encinas y alcornoques causado por *Botryosphaeria* spp. en Andalucía

M.E. SÁNCHEZ, J. VENEGAS, M.A. ROMERO, A.J.L. PHILLIPS, A. TRAPERO

Phytophthora cinnamomi está considerada como el principal agente asociado con el decaimiento de *Quercus* en Andalucía. Sin embargo, frecuentemente aparecen chancros en los árboles que sufren el decaimiento en esta región. En las prospecciones llevadas a cabo en Andalucía en zonas afectadas de decaimiento, se detectó la presencia de áreas alargadas de corteza necrosada en las ramas enfermas. De estas lesiones se aislaron consistentemente tres especies de *Botryosphaeria* o taxones relacionados, *Botryosphaeria stevensii*, *B. dothidea* y *Diplodia sarmentorum*. La inoculación de aislados de las tres especies en ramas cortadas de encina dieron lugar al desarrollo de chancros. Las inoculaciones en ramas de árboles sanos en campo también indujeron la formación de chancros, aunque sólo *B. stevensii* causó lesiones que anillaron y mataron las ramas. La temperatura óptima de crecimiento de *B. stevensii* y *B. dothidea* fue de alrededor de 25°C, con crecimiento lento a 35°C. Por el contrario, *D. sarmentorum* presentó una temperatura óptima de crecimiento alrededor de 21°C y no creció a 35°C. La frecuencia y amplia distribución de estos patógenos, su asociación con los chancros y su capacidad para infectar encinas y alcornoques sugiere su papel como agentes contribuyentes del decaimiento de *Quercus* en Andalucía.

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

A.J.L. PHILLIPS. CREM, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal.

Palabras clave: Bosque mediterráneo, *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria ribis*, *Botryosphaeria stevensii*, Decaimiento, *Diplodia mutila*, *Diplodia sarmentorum*, *Fusicoccum aesculi*, *Othia spiraeae*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas dominados por encinas y alcornoques (montes o dehesas) constituyen la vegetación clímax en gran parte de Andalucía y se caracterizan por su alta capacidad para proteger y crear suelo bajo las condiciones climáticas semi-áridas características de esta región. La diversidad de ecosistemas dominados por los *Quercus* mediterráneos albergan además una rica y variada fauna. Este hecho, junto con su importancia para la economía rural de la región, especialmente

la cría de ganado y la extracción de corcho, justifica ampliamente la necesidad de su conservación (MONTROYA, 1988).

Desde principios del siglo XX, las especies de *Quercus* han sufrido a lo largo de toda Europa varios períodos de decaimiento y mortandad. En la cuenca mediterránea se detectó un severo decaimiento a principios de los años 80. Las especies más afectadas en España son *Quercus suber* y *Quercus ilex*, y en menor medida, *Quercus faginea* y *Quercus pyrenaica* (MONTROYA, 1994). También se ha descrito un decaimiento similar

sobre *Q. suber* en Túnez, Portugal y Marruecos (BRITO DE CARVALHO, 1993; BRASIER, 1996; EL-BADRI y ABADIE, 2000). En Italia las principales especies afectadas son *Quercus cerris*, *Quercus frainetto* y *Quercus pubescens* (RAGAZZI *et al.*, 2000).

Se ha citado un amplio número de factores asociados con los decaimientos de los *Quercus* mediterráneos, como períodos recurrentes de sequía severa, encharcamientos estacionales, cambios en los aprovechamientos tradicionales de las masas, ataques de insectos perforadores, podredumbres radicales causadas por *Phytophthora cinnamomi* y chancros causados por *Biscogniauxia mediterranea* (*Hypoxylon mediterraneum*) y *Botryosphaeria stevensii* (*Diplodia mutila*) (LUQUE y GIRBAL, 1989; RAGAZZI *et al.*, 1989, 2000; MONTOYA, 1992; LUISI *et al.*, 1993; BRASIER, 1996; TUSET *et al.*, 1996; VANNINI *et al.*, 1996; GALLEG0 *et al.*, 1999; LUQUE *et al.*, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2000, 2002 a, 2002 c). Además, la bacteria *Brenneria* (*Erwinia quercina*) también se ha asociado con el decaimiento de *Quercus* en España (SORIA *et al.*, 1997).

Botryosphaeria stevensii se ha descrito como el principal agente fúngico asociado al decaimiento de *Quercus* en Italia (RAGAZZI *et al.*, 1989, 1999, 2000), Marruecos (EL-BADRI y ABADIE, 2000), y nordeste español. De hecho, el chancro del tronco causado por *B. stevensii* se considera como la principal enfermedad causante de muerte de alcornoques en Cataluña (LUQUE y GIRBAL, 1989, LUQUE *et al.*, 2000). Sin embargo, en el sudoeste (Andalucía y Extremadura) la causa principal de muerte de encinas y alcornoques es la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* (BRASIER, 1996; TUSET *et al.*, 1996; GALLEG0 *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2002 a; 2002 c). Este patógeno es responsable de la típica distribución de árboles muertos y moribundos en grandes grupos o focos, y también de la asociación del decaimiento con depresiones topográficas u otras áreas afectadas por encharcamientos estacionales (BRASIER, 1996; SÁNCHEZ *et al.*, 2002 a; TUSET *et al.*, 1996). El chancro carbonoso

causado por *B. mediterranea* es una enfermedad conocida desde antiguo en Andalucía, sobre todo afectando a *Q. suber* (TORRES JUAN, 1985), y también ha sido asociada con el decaimiento en esta región (NAVARRO y FERNÁNDEZ, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Sin embargo no hay referencias de otros chancros fúngicos implicados en el decaimiento de encinas y alcornoques en Andalucía.

Las prospecciones llevadas a cabo en dehesas y montes andaluces afectados de Seca desde 1998 (TRAPERO *et al.*, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2002 c) revelaron la presencia de árboles afectados por un chancro distinto al causado por *B. mediterranea*. Esta enfermedad no siempre aparece asociada con las infecciones radicales causadas por *Phytophthora* (SÁNCHEZ *et al.*, 2002 c). Con estos antecedentes, los objetivos del presente trabajo fueron (i) describir la enfermedad en las masas de *Quercus* en Andalucía, (ii) identificar los agentes causales de la enfermedad y determinar sus temperaturas óptimas de crecimiento y (iii) determinar la patogenicidad de los hongos consistentemente aislados de los chancros. Los resultados preliminares de este trabajo se han expuesto en varios congresos (SÁNCHEZ *et al.*, 2001; VENEGAS *et al.*, 2001; ROMERO *et al.*, 2002).

MATERIAL Y MÉTODOS

Prospecciones y obtención de aislados fúngicos

Desde 1998 se están llevado a cabo prospecciones por toda Andalucía en encinares y alcornocales afectados o no por el síndrome de decaimiento de *Quercus* o Seca de los *Quercus* (TRAPERO *et al.*, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2002 c). Para este trabajo, las tomas de muestras se llevaron a cabo en ocho fincas afectadas de Seca en las provincias de Cádiz, Córdoba, Huelva y Sevilla (Figura 1). Las especies predominantes eran *Quercus ilex* ssp. *ballota* y *Quercus suber*. En cada una de estas fincas se eligió una parcela experimental de 4 ha que incluía un foco de decaimiento. En las parcelas seleccionadas se consignaron los síntomas de la enfermedad y se

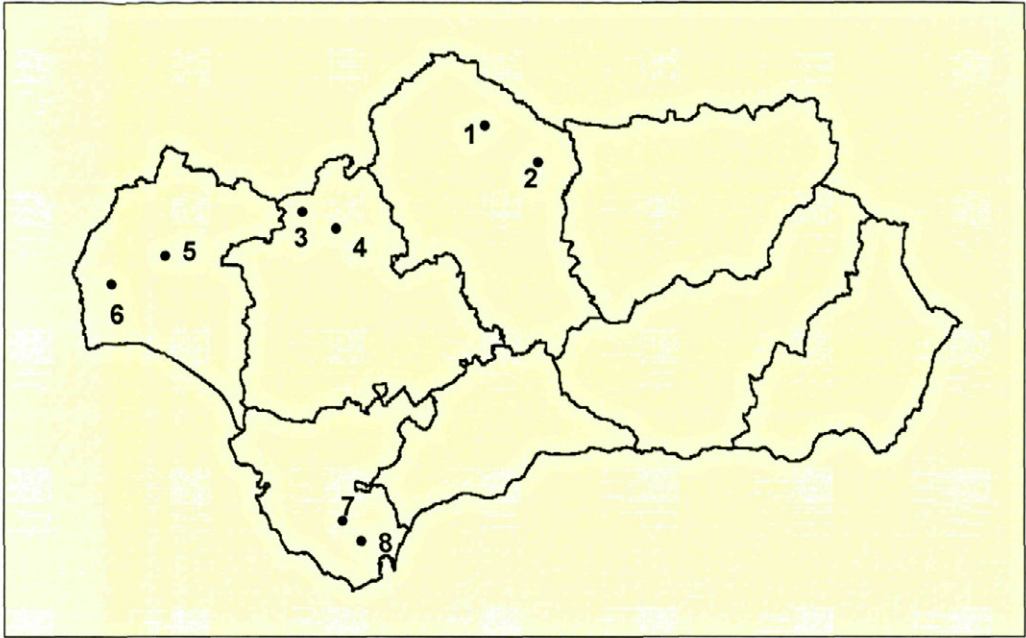


Figura 1. Localización de las parcelas experimentales. 1: La Rozuela (*Quercus ilex*), 2: Viñuela Alta (*Q. ilex*), 3: Los Labrados (*Quercus suber*), 4: Las Navas y el Berrocal (*Q. ilex*), 5: La Encarnación (*Q. ilex*), 6: La Pizarra (*Q. ilex*), 7: Monte Mogeja Luenga (*Q. suber*), 8: San Carlos del Tiradero (*Q. suber*).

realizaron dos tomas de muestras, en primavera (abril-mayo) y otoño (noviembre-diciembre) de 2000.

La primera toma de muestras se realizó sobre cuatro árboles con síntomas de chancro. De cada árbol se cortaron tres ramas con chancro aún vivas de 25 a 40 cm de longitud y 1,5 a 3,5 cm de diámetro. En otoño se muestrearon doce árboles por parcela, y se tomaron cuatro ramas sintomáticas por árbol. Los chancros fueron desinfectados superficialmente con etanol. Posteriormente, les fue retirada la corteza externa por medio de un escalpelo estéril y se extrajeron cuñas de 2–3 mm² de tejido cortical necrótico para sembrarlas en placas de Petri conteniendo el medio de Patata-Dextrosa-Agar (DHINGRA y SINCLAIR, 1995) acidificado con ácido láctico (APDA) para inhibir el crecimiento bacteriano. Se sembraron seis cuñas por chancro y placa de Petri. Las placas se incubaron a 22°C en oscuridad durante 2 días, seguidos

de otros 4 días bajo luz-oscuridad (12 h-12 h) a 22°C. Las colonias fúngicas crecidas a partir del tejido cortical necrótico se transfirieron separadamente a nuevas placas de APDA.

Caracterización e identificación de los aislados fúngicos

La identificación se basó parcialmente en las características de los cultivos en APDA, y principalmente en la micromorfología de los aislados en el huésped y en cultivo. La esporulación en el medio APDA se estimuló mediante la incubación de las placas bajo luz fluorescente (12 h / día) a 25°C. Con los conidios y conidias producidos en cultivo puro se realizaron montajes microscópicos teñidos con fucsina ácida en lactofenol al 0,005%. Por medio de un ocular calibrado y a 1000 aumentos, se midió la longitud y anchura de 50 conidias de seis aislados de cada uno de los distintos grupos morfológicos obtenidos. Los ascomas se tomaron

directamente de la corteza infectada para realizar los montajes microscópicos. Se consignó la forma de los ascomas y se midieron las dimensiones de 15 ascas y 30 ascosporas.

Además se determinó la tasa de crecimiento micelial en APDA de los mismos seis aislados de cada grupo morfológico. Para ello, se tomaron cilindros de agar de 7 mm de diámetro del margen de colonias creciendo activamente y se sembraron en el centro de placas de Petri de 9 cm de diámetro. Las placas se incubaron a 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 35°C a razón de tres placas por aislado y temperatura. Tras 2 y 4 días de incubación, se midieron dos diámetros de colonia por placa. Las tasas de crecimiento se expresaron en mm por día. El experimento fue repetido dos veces. Los datos obtenidos de la tasa de crecimiento a cada temperatura ensayada se ajustaron a curvas de regresión por medio del programa Statistix for Windows (Analytical Software, Tallahassee, USA). Sobre estas curvas se calcularon las temperaturas cardinales de crecimiento.

Experimentos de patogenicidad

Se eligieron dos aislados previamente caracterizados de cada grupo morfológico para determinar su patogenicidad en condiciones controladas de laboratorio y en condiciones de campo.

Experimento 1: Inoculación de ramas cortadas. Para los experimentos de inoculación en laboratorio se cortaron ramas de 16 a 32 cm de longitud y 6 a 15 mm de diámetro de encinas adultas y sanas de una parcela experimental localizada en Córdoba. Las ramas recién cortadas se sellaron por ambos extremos con Parafilm para evitar su desecación. El punto de inoculación, situado en el punto medio de cada rama cortada, se desinfectó con etanol y posteriormente se realizó una herida de 7 mm de diámetro con un sacabocados estéril. En esta herida se colocó un cilindro de APDA con el aislado creciendo activamente y se selló con Parafilm. En las ramas testigo se reemplazaron los cultivos fúngicos por cilindros de APDA estéril. Las ramas así inoculadas se incubaron a 15, 20, 25 o 30°C en el interior de cámaras húmedas

con 12h de luz y 12h de oscuridad por día. Se inocularon seis ramas por cada aislado y temperatura ensayada, midiendo la longitud de las lesiones resultantes a intervalos. La severidad de síntomas se expresó como longitud de la lesión / longitud de la rama, en porcentaje. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de la varianza y se calcularon las mínimas diferencias significativas mediante el test protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985) utilizando el programa Statistix for Windows.

Experimento 2: Inoculación de árboles en campo. Este experimento se realizó sobre encinas adultas y sanas creciendo en la misma parcela experimental de donde se obtuvieron las ramas para el Experimento 1. Se realizaron dos inoculaciones, la primera en diciembre de 2000 (inoculación de invierno) y la segunda en marzo de 2001 (inoculación de primavera). Se inocularon ramas de 6 a 15 mm de diámetro utilizando el mismo método ya descrito. Para cada aislado ensayado se inocularon seis ramas elegidas al azar entre varios árboles, de forma que en un árbol individual no se inocularon más de seis ramas. El análisis estadístico de los datos obtenidos (porcentaje de longitud de rama con lesión) fue el mismo que en el Experimento 1.

Al término de cada experimento de inoculación se tomaron las ramas inoculadas y testigo para el reaislamiento en medio APDA. Para ello se cortaron cuñas de tejido cortical a intervalos de 1 cm desde el punto de inoculación en dirección proximal y distal. Las placas se incubaron a 22°C en oscuridad durante 2 días, seguidos por otros 15-30 días de incubación bajo luz-oscuridad (12 h- 12 h) para estimular la esporulación de las colonias obtenidas.

RESULTADOS

Incidencia y sintomatología de la enfermedad

En primavera de 2000, se detectó una desecación y marchitez de ramas de *Quercus* asociada con la presencia de chancros en

Cuadro 1.- Aislamiento de hongos a partir de chancros en ramas de *Quercus*

FINCA	sp ^a	Especies fúngicas aisladas											
		<i>Botryosphaeria stevensii</i>				<i>Diplodia sarmentorum</i>				<i>Botryosphaeria dothidea</i>			
		1 ^a Prospección		2 ^a Prospección		1 ^a Prospección		2 ^a Prospección		1 ^a Prospección		2 ^a Prospección	
Inc ^b (%)	Ais ^c (%)	Inc (%)	Ais (%)	Inc (%)	Ais (%)	Inc (%)	Ais (%)	Inc (%)	Ais (%)	Inc (%)	Ais (%)		
1. La Rozuela	E	0	0	12.5	83.3	75	73.8	16.6	54.1	8.3	45	4.2	49.9
2. Viñuela Alta	E	0	0	27.7	65	0	0	16.6	52.7	100	28	0	0
3. Los Labrados	A	- d	-	4.2	58.3	- c	-	6.3	66.6	-	-	2.1	100
4. Las Navas y El Berrocal	E	-	-	0	0	-	-	8.3	41.6	-	-	4.2	66.6
5. La Pizarra	E	-	-	50	75	-	-	0	0	-	-	0	0
6. La Encarnación	E	33.3	81.5	20	37.5	41.6	28.3	10	33.3	0	0	0	0
7. Moge Luenga	A	100	63.5	() e	()	0	0	()	()	0	0	()	()
8. S Carlos del Tiradero	A	-	-	()	()	-	-	()	()	-	-	()	()

^a Especie dominante: E = encina, A = alcornoque

^b Incidencia, porcentaje de ramas afectadas de chancro de las que se aisló el hongo correspondiente

^c Aislamiento, porcentaje de aislamiento en APDA de cada uno de los hongos a partir del tejido necrótico de las ramas afectadas

^d no se observaron ramas con chancro

^e no se tomaron muestras

cuatro de las ocho fincas prospectadas. Sin embargo, todas las fincas mostraron síntomas de chancro en otoño (Cuadro 1). La sintomatología de la enfermedad fue similar en todas las fincas. Los síntomas foliares consistieron en amarillez, empardecimiento y marchitez en ramas aisladas (Figura 2a, b). Todas las ramas en las que aparecían hojas marchitas aún prendidas a la rama presentaron chancros en la corteza (Figura 2c, d). Estos chancros aparecían como zonas alargadas de corteza necrosada, visibles más fácilmente cuando se retiraba la corteza externa. Sin embargo, no todas las ramas secas y defoliadas necesariamente estaban afectadas de estas lesiones corticales. Los chancros en el tronco fueron frecuentes en las fincas de alcornoque. Las lesiones aparecían como hinchazones o abultamientos en el corcho de 5 a 20 cm de longitud, frecuentemente con una grieta central que dejaba al descubierto la casca necrosada. Estas lesiones se alineaban a lo largo de las líneas de descorche, con un desarrollo muy pobre

del corcho que quedaba circundado por los abultamientos. De esta forma, el área afectada adquiría un aspecto aplanado que incluso llegaba a hacer perder al fuste su forma cilíndrica normal (Figura 3a). A pesar de que en ocasiones el área de corcho afectada podía ser bastante extensa (Figura 3b, c), no se registró ningún caso de anillamiento del tronco que diera lugar a la muerte del alcornoque afectado.

Los síntomas descritos en ramas y tronco también fueron observados en otras zonas de Andalucía, afectadas o no por el síndrome de decaimiento o Seca de los *Quercus*. De hecho, en zonas como en la Sierra Subbética cordobesa, Sierras de Málaga y Cádiz, se han detectado desecaciones de ramas de encinas y alcornoces asociadas a la presencia de chancros, en masas no afectadas por el decaimiento (Fig. 4). Los datos referentes a la presencia de esta enfermedad de los *Quercus* en Andalucía, obtenidos en colaboración con la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, junto con la identifica-

ción de los agentes fúngicos implicados, serán objeto de una publicación posterior (SÁNCHEZ *et al.*, datos no publicados).

Caracterización e identificación de los patógenos

A partir de las muestras de chancros se obtuvo un elevado número de colonias fúngicas (Cuadro 1). En un principio, todas las colonias eran de color blanco en el medio APDA, 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. De un total de 112 aislados obtenidos en cultivo puro, 47 presentaban colonias gris claro con abundante micelio aéreo (Figura 5a). Estos aislados se denominaron DM. Otros 54 aislados formaron colonias de color gris muy oscuro y escasa producción de micelio aéreo (aislados DS) (Figura 5b), mientras que los restantes 11 aislados formaron colonias gris

oscuro con micelio aéreo muy abundante (aislados FA) (Figura 5c). En tres parcelas experimentales (1, 2 y 3) fue posible aislar los tres grupos morfológicos. Sin embargo, en el resto de las parcelas sólo se aisló uno o dos de los grupos morfológicos detectados (Cuadro 1).

Aunque la caracterización se basó en los picnidios formados en cultivos puros, estas estructuras también se observaron en el tejido cortical afectado. Las características microscópicas de los seis aislados seleccionados de cada grupo morfológico permitieron identificar tres especies fúngicas distintas, en clara correspondencia con los tres tipos de colonia descritos.

En los picnidios de los aislados DM (Figura 6a) 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 conidias



Figura 2. Síntomas del chancro de encinas y alcornoques en Andalucía. a, b) Empardecimiento y marchitez foliar en ramas aisladas, c) encina severamente afectada, d) aspecto de la lesión (chancro) en rama de encina



Figura 3. Síntomas del chancro de encinas y alcornoques en Andalucía. a) Corteza necrótica bordeada de abultamientos situados a lo largo de las líneas de descorche. Nótese el aspecto aplanado del tronco afectado, b. c) Chancros extensos que no llegaron a anillar el tronco.

fue holoblástica, formándose una conidia individual en el extremo de la célula conidiógena que posteriormente proliferaba de forma percurrente, dando lugar a 2-3 collaretes, o bien la proliferación ocurría al mismo nivel originando hinchazones periclinales.

Las conidias obtenidas de los cultivos puros no difirieron de las producidas en los estromas del tejido vegetal infectado. En ambos casos fueron hialinas, aseptadas, con pared celular lisa y relativamente gruesa.

Aproximadamente el 80% eran cilíndricas, con el ápice redondeado y la base redondeada o truncada (Figura 6b, c). Sus dimensiones medias fueron $27.9 \pm 2.7 \times 13.2 \pm 1.5 \mu\text{m}$, con una relación longitud / anchura (L/A) de 2.1 ± 0.3 . El 20% restante eran subglobosas (Figura 6b), 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 ± 0.2 . Ocasionalmente se observaron conidias cilíndricas, de color marrón claro y con una septa (Figura 6c). En



Figura 4. Marchitez foliar, chancro y muerte de ramas en encinas no afectadas por el decaimiento o Seca de *Quercus*.

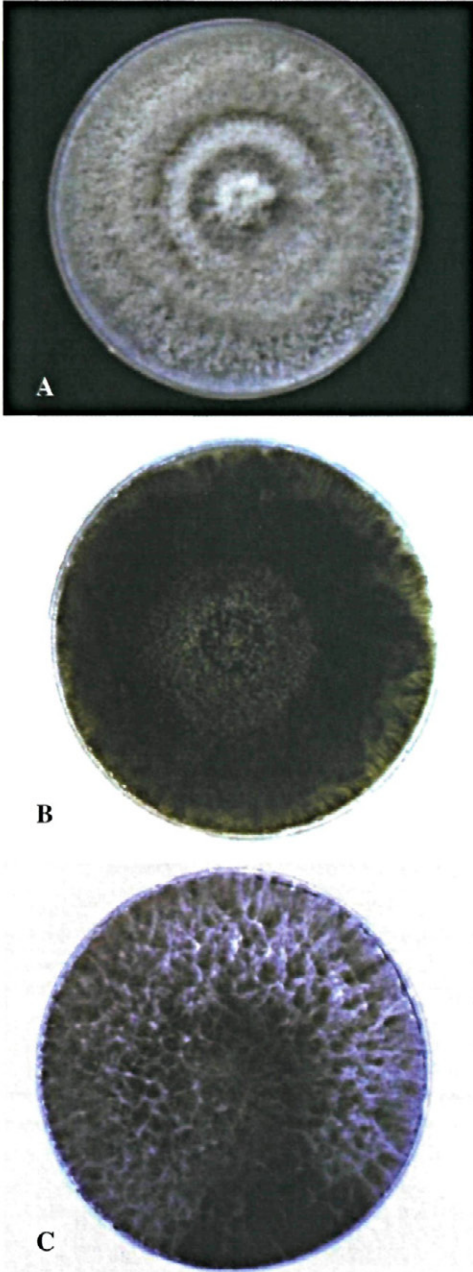


Figura 5. Morfología de las colonias fúngicas a los 15 días de incubación a 22°C en el medio APDA. a) Colonias gris claro con abundante micelio aéreo de los aislados DM, b) colonias de color gris muy oscuro con micelio aéreo escaso de los aislados DS, c) colonias grises con abundante micelio aéreo de los aislados FA

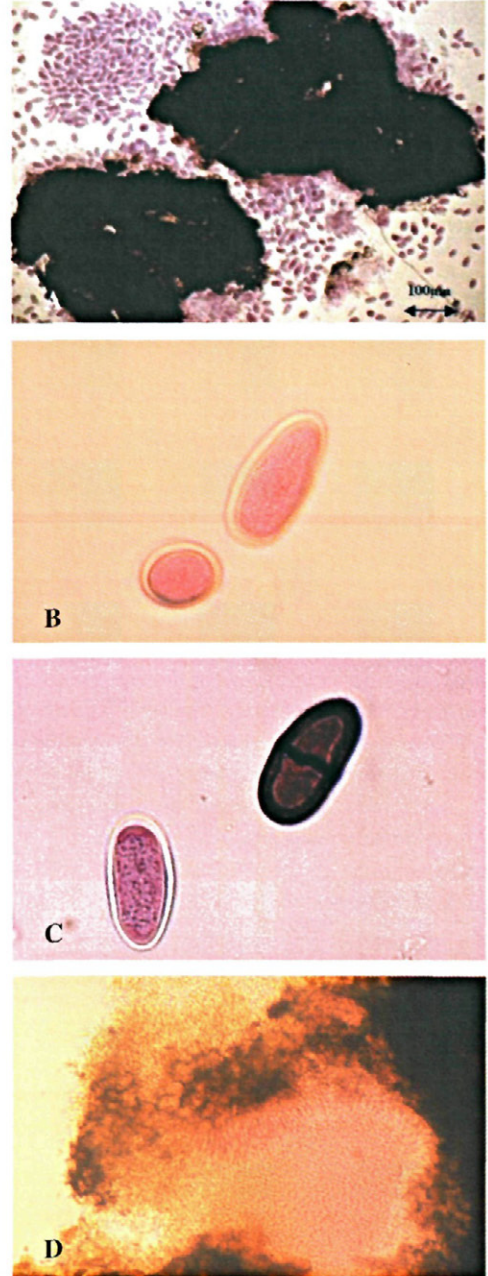


Figura 6. Características microscópicas de los aislados DM, identificados como *D. mutila*. a) Picnidios, b) conidias hialinas aseptadas, cilíndricas (80%) y subglobosas (20%), c) conidias cilíndricas de extremos redondeados, hialinas y aseptadas (80%) y ocasionalmente, oscuras y con una septa, d) espermogonio con espermacias



Figura 7. Características microscópicas de los aislados DS, identificados como *D. sarmentorum*. a) Picnidios, b) conidias oscuras, rectas, ovoides a oblongas, con ápice obtuso y base truncada

los cultivos puros y en los tejidos corticales infectados también se produjeron espermacias hialinas, de 2 μ m de longitud y alrededor de 1 μ m de anchura. Las espermacias aparecían entremezcladas con las conidias o bien se producían en lóculos (espermogonios) independientes (Figura 6d). La mayoría de las características de los aislados DM se corresponden con las descritas para *D. mutila*, el anamorfo de *B. stevensii* (SHOEMAKER, 1964; PHILLIPS, 2000).

En los picnidios de los aislados DS (Figura 7a) 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 μ m. Las conidias obtenidas en cultivo fueron idénticas a las procedentes del tejido enfermo. Inicialmente eran hialinas y aseptadas, con pared gruesa, para posteriormente adquirir una coloración marrón oscuro, con una septa central, lisas externamente y ornamentadas (verrucosas) internamente. De forma recta, ovoide a oblonga, con ápice obtuso y base truncada (Figura 7b). Sus dimensiones medias fueron $23.9 \pm 2.1 \times 9.4$

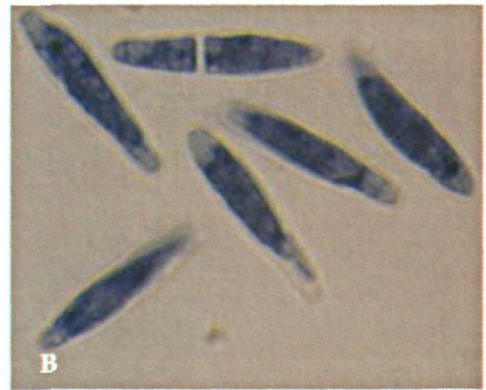
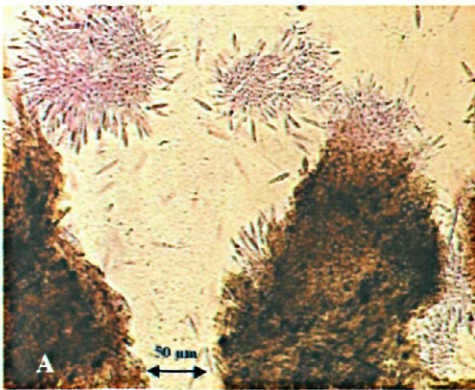


Figura 8. Características microscópicas de los aislados DS, identificados como *F. aesculi*. a) Picnidios, b) conidias fusiformes, hialinas, aseptadas u ocasionalmente con una septa, con ápice sub-agudo y base truncada

$\pm 1.1 \mu\text{m}$, con una relación L/A de 2.6 ± 0.3 . Aunque los aislados DS poseen algunas características que encajan bien en la descripción de *D. mutila* de SUTTON (1980), la correspondencia es mucho mayor con la descripción de la especie *Diplodia sarmentorum*, estado anamórfico de *Othia spiraeae* (BOOTH, 1958).

Los picnidios de los aislados FA (Figura 8a) 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 μm de anchura, holoblásticas, ocasionalmente proliferando al mismo nivel para dar lugar a hinchazones periclinales. Las conidias obtenidas en los cultivos resultaron idénticas a las procedentes de la corteza infectada y fueron hialinas, lisas, de pared delgada, fusiformes a elipsoi-

dales, con contenido granular, ápice subagudo, base truncada con una pequeña protuberancia, más anchas en el tercio superior de la conidia, mayoritariamente aseptadas aunque ocasionalmente presentaban una septa (Figura 8b). 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 ± 1.1 . 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), y el teleomorfo corresponde a *Botryosphaeria dothidea* (PENNYCOOK y SAMUELS, 1985).

Las estructuras de reproducción sexual (ascomas) sólo se observaron inmersas en el tejido cortical afectado procedente del tron-

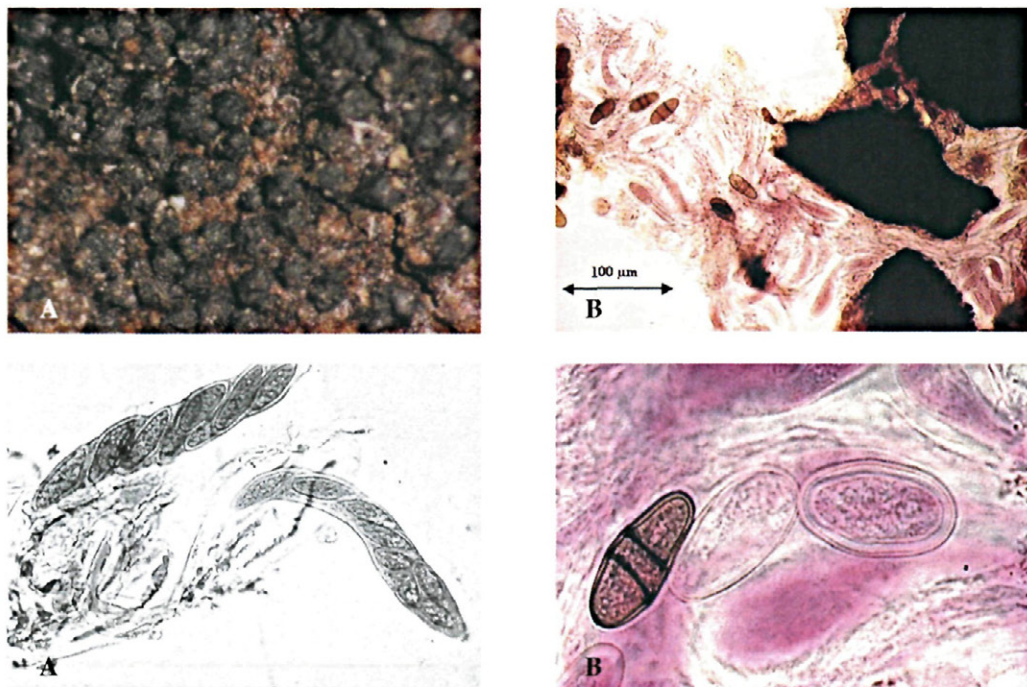


Figura 9. Características microscópicas del estado teleomórfico identificado como *B. stevensii*. a) Ascomas (lóculos) en el tejido cortical de *Q. suber*, b) ascoma mostrando ascas inmaduras y ascosporas hialinas aseptadas y oscuras con dos septas, c) ascas bitunicadas, hialinas y claviformes con ocho ascosporas ovoides, hialinas, lisas y aseptadas, d) detalle del interior de un ascas con dos ascosporas hialinas, aseptadas y una oscura con dos septas

co de alcornoques descorchados 2 años antes del muestreo (Figura 9a). Estos ascomas eran estructuras multiloculares, de color marrón oscuro a negro (Figura 9b). En su interior se encontraban ascas bitunicadas, hialinas y claviformes (Figura 9c), de $112.0 \pm 9.5 \times 25.2 \pm 1.8 \mu\text{m}$. Las ocho ascosporas eran ovoides, mayoritariamente hialinas, lisas y aseptadas, pero también se encontraban en el mismo asca y con menor frecuencia, ascosporas oscuras con dos septas (Figura 9d). Las dimensiones medias de las ascosporas fueron $28.6 \pm 2.1 \times 13.3 \pm 1.7 \mu\text{m}$, con una relación L/A de 2.2 ± 0.3 . Estas características encajan bastante bien con la descripción de *Botryosphaeria stevensii* (SHOEMAKER, 1964; PHILLIPS, 2002). No se observó ningún otro estado teleomórfico en las ramas infectadas ni en las lesiones del tronco. Tampoco se formó ningún tipo de ascoma en cultivo.

La correspondencia entre anamorfo y teleomorfo se estableció mediante la obtención de cultivos del anamorfo desarrollado a partir de ascosporas individuales sembradas en el medio APDA. Se obtuvieron un total de 58 cultivos monoascospóricos mediante el método desarrollado por TRAPERO y KAISER (1992). La morfología de colonia de estos cultivos fue idéntica a la de los aislados DM obtenidos de las lesiones corticales e identificados como *D. mutila*. Además, la forma y

dimensiones de los picnidios y conidias producidos por los monoascospóricos no difirieron de las descritas para los aislados DM.

Para expresar la tasa de crecimiento en función de la temperatura, la ecuación seleccionada fue un polinomio de cuarto grado: $y = a + bT + cT^2 + dT^3 + eT^4$, donde y representa la tasa de crecimiento diario (mm día⁻¹), T es la temperatura de crecimiento y a , b , c y d son los coeficientes de regresión (Figura 10). El análisis de la varianza y el test de Fisher mostró diferencias significativas entre las tasas de crecimiento a las distintas temperaturas ensayadas. No obstante, las tasas de crecimiento correspondientes a los aislados de la misma especie no difirieron significativamente entre sí para cada temperatura.

La temperatura óptima de crecimiento estimada para *D. sarmentorum* fue cercana a los 22° C, y resultó más elevada (>25° C) para *B. stevensii* y *B. dothidea*. Además, *B. stevensii* y *B. dothidea* crecieron a 35°C, mientras que *D. sarmentorum* no creció a esta temperatura.

Patogenicidad

Todas las inoculaciones dieron lugar a lesiones corticales. En el Experimento 2 se registró además la presencia de síntomas foliares (marchitez) y muerte de la rama inoculada. Estos síntomas nunca aparecieron en las ramas testigo, por lo que estos valores de severidad de síntomas (siempre 0) no se

Cuadro 2.- Severidad de síntomas^a en ramas cortadas de *Quercus ilex* inoculadas con *Botryosphaeria stevensii*, *B. dothidea* o *Diplodia sarmentorum* e incubadas a diferentes temperaturas

Aislados ^b	Temperatura de incubación			
	15°C	20°C	25°C	30°C
DME1	93.2 a	91.3 a	87.7 a	87.4 a
DMA1	88.4 a	90.5 a	91.6 a	82.3 a
DSE27	68.2 ab	80.7 a	92.5 a	75.5 a
DSE14	45.4 bc	45.7 b	73.2 a	70.8 a
FAE2	27.5 cd	40.0 b	61.0 a	60.9 a
FAE5	8.0 d	23.1 b	86.2 a	64.4 a

^a Expresada como porcentaje de la longitud del chancro / longitud de la rama

^b DME1, DMA1: *Botryosphaeria stevensii*; DSE27, DSE14: *Diplodia sarmentorum*; FAE2, FAE5: *B. dothidea*

Para cada columna, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,05

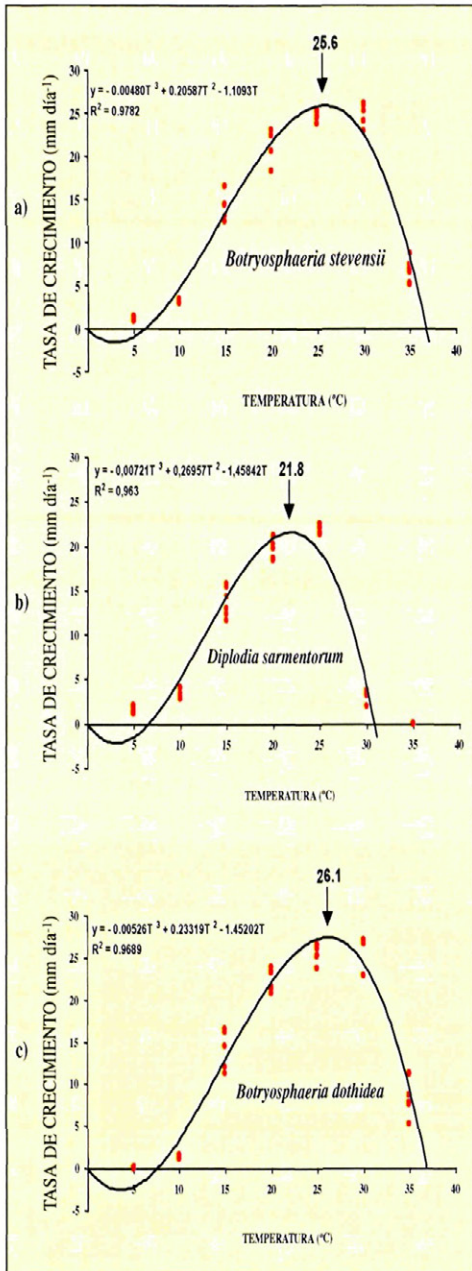


Figura 10. Curvas de crecimiento de los aislados en el medio de cultivo APDA. a) *Botryosphaeria stevensii*, b) *Diplodia sarmentorum*, c) *B. dothidea*. Las flechas indican las temperaturas óptimas de crecimiento estimadas. Los puntos representan los valores medios de tasa de crecimiento de seis aislados de cada especie a las distintas temperaturas ensayadas

incluyeron en los análisis estadísticos. No hubo diferencias entre la extensión de las lesiones en sentido distal y proximal en ninguno de los dos experimentos. En algunos casos, la longitud del chancro alcanzó la longitud total de la rama inoculada. Por este motivo, la severidad de síntomas se expresó como porcentaje de rama con lesión. La especie inoculada se recuperó en todos los casos a partir del tejido necrótico de la lesión, con porcentajes de reaislamiento superiores al 70%. De la misma manera que ocurre con las infecciones naturales, el patógeno se hallaba presente a lo largo de toda la longitud del chancro. Únicamente se aislaron ocasionalmente algunas colonias del género *Fusarium* y de bacterias.

Experimento 1: Inoculación de ramas cortadas. Cuatro semanas tras la inoculación, algunas lesiones corticales ocupaban prácticamente toda la longitud de la rama (16 a 32 cm). Los valores medios del porcentaje de longitud de rama con lesión (severidad de síntomas) aparecen en el Cuadro 3. El análisis de los datos mostró que a las temperaturas de incubación más bajas (15 y 20°C), los aislados de *B. stevensii* y el aislado DSE27 de *D. sarmentorum* produjeron síntomas significativamente más severos que el resto de aislados (Figura 11a). Por el contrario, a las temperaturas más altas (25 y 30°C), los aislados de las tres especies produjeron síntomas severos, no detectándose diferencias significativas entre ellos (Figura 11b).

Experimento 2: Inoculación de árboles en campo. Las evaluaciones de síntomas en campo se prolongaron durante tres meses para la inoculación de primavera y seis meses para la inoculación de invierno.

Seis meses tras la inoculación de invierno, se desarrollaron lesiones en las ramas inoculadas (Figura 12a). Los aislados de *D. sarmentorum* y *B. dothidea* originaron pequeños chancros rodeados por una capa de callo. Sin embargo, los chancros que aparecieron en las ramas inoculadas con *B. stevensii* no desarrollaron callo. En ningún caso se llegaron a expresar síntomas foliares, a pesar de

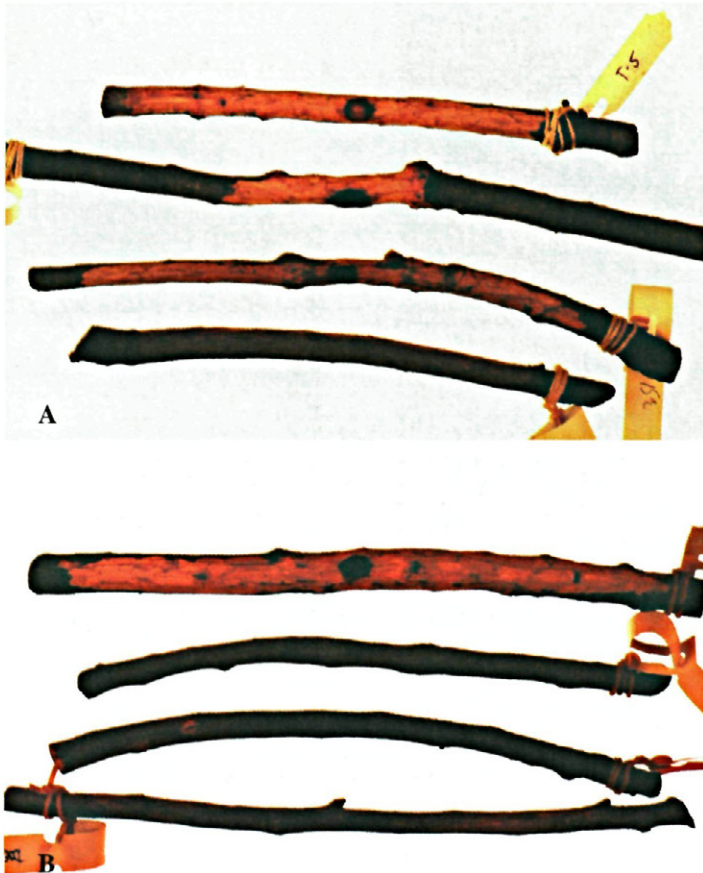


Figura 11. Inoculación de ramas cortadas. a) Necrosis cortical en ramas cortadas de encina incubadas a 15°C. De arriba a abajo, rama testigo, rama inoculada con *B. dothidea*, rama inoculada con *D. sarmentorum* y rama inoculada con *B. stevensii* b) Necrosis cortical en ramas cortadas de encina incubadas a 25°C. De arriba a abajo, rama testigo, rama inoculada con *B. dothidea*, rama inoculada con *D. sarmentorum* y rama inoculada con *B. stevensii*. En todos los casos se ha retirado la corteza externa para apreciar más fácilmente la necrosis cortical

que dos de las ramas inoculadas con *B. stevensii* estaban anilladas.

Tres meses después de la inoculación de primavera, las ramas inoculadas con ambos aislados de *B. stevensii* mostraban marchitez foliar, anillamiento y muerte de la rama (Figura 12b, c). Sin embargo, en las ramas inoculadas con *D. sarmentorum* y *F. aesculi*, las lesiones corticales no llegaron a anillar (Figura 12d) y por tanto, no hubo expresión de síntomas foliares. No se detectó producción de callo en ninguna de las lesiones,

independientemente de la especie inoculada.

El análisis global de la varianza de la severidad de síntomas, expresada como porcentaje de longitud de rama con lesión cortical, mostró diferencias significativas en función del aislado inoculado, del momento de inoculación (invierno-primavera) y de la interacción entre ambos factores. La severidad de síntomas fue significativamente mayor en las ramas inoculadas con ambos aislados de *B. stevensii* que en las inoculadas con las otras dos especies. También se obtu-



Figura 12. Inoculación de árboles en campo. a) Chancro desarrollado en rama de encina inoculada con *B. stevensii* en invierno b) ramas de encina inoculadas con *B. stevensii* en primavera, mostrando marchitez foliar, anillamiento y muerte de la rama, c) detalle de rama de encina inoculada con *B. stevensii* en primavera, d) chancro desarrollado en rama de encina inoculada con *B. dothidea* en primavera

vieron valores de severidad significativamente mayores en las inoculaciones de primavera que en las de invierno.

El análisis estadístico individualizado para cada momento de inoculación (Cuadro

3), mostró que en la inoculación de invierno la severidad de síntomas fue significativamente mayor en las ramas inoculadas con el aislado DME1 de *B. stevensii* (Cuadro 3), procedente de *Q. ilex*, que con los otros dos

Cuadro 3.– Severidad de síntomas en ramas de *Quercus ilex* inoculadas en campo con *Botryosphaeria stevensii*, *B. dothidea* y *Diplodia sarmentorum*.

Aislados ^b	Severidad de síntomas ^a	
	Inoculación de invierno	Inoculación de primavera
DME1	14.4 a	54.3 a
DMA1	7.5 ab	27.1 b
DSE14	1.1 b	20.2 c
DSE27	0.9 b	13.5 c
FAE2	1.2 b	11.0 c
FAE5	0.9 b	18.5 c

^a Expresada como porcentaje de la longitud del chancro / longitud de la rama

^b DMA1, DME1: *Botryosphaeria stevensii*; DSE27, DSE14: *Diplodia sarmentorum*; FAE2, FAE5: *B. dothidea*
Para cada columna, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,05

patógenos. En la inoculación de primavera, esta mayor patogenicidad del aislado DME1 fue más acusada, difiriendo significativamente incluso del aislado DMA1, obtenido de *Q. suber* (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Las encinas y alcornoques afectados de marchitez foliar y muerte cortical en Andalucía occidental, invariablemente presentaban lesiones o chancros en sus ramas. Sin embargo, la presencia de ramas defoliadas no asociadas a la presencia de chancros, también fue muy frecuente en las fincas prospectadas. De hecho, en seis de las ocho parcelas experimentales muestreadas, los árboles también sufrían la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* (SÁNCHEZ *et al.*, 2002 c), enfermedad que produce síntomas secundarios inespecíficos, como defoliación y puntiseado de ramas. Por otra parte, la enfermedad se ha detectado en masas de encina y alcornoque que no sufren decaimiento (SÁNCHEZ *et al.*, datos no publicados).

A partir de la corteza necrótica se aislaron consistentemente tres especies diferentes del género *Botryosphaeria* o géneros relacionados. Dado que los teleomorfos de *Botryosphaeria* son morfológicamente muy similares, las especies se diferencian en función de las características de los anamorfos. Algunas características, como el color o la septación de las conidias o la morfología del estroma picnidial, son muy plásticas (JACOBS y REHNER, 1998; DENMAN *et al.*, 2000). De hecho, el color y la septación de las conidias varía con su edad, por lo que es difícil describirlas adecuadamente. A pesar de que la proliferación percurrente de las células conidiógenas se ha considerado como más típica del género *Sphaeropsis* (SUTTON, 1980), este carácter también se da en *Diplodia* (PHILLIPS, 2002). Se han citado cinco especies distintas de *Diplodia* causando enfermedad en *Quercus* spp., *D. longispora*, *D. mutila*, *D. quercina*, *D. sarmentorum* y *D. suberina* (SHOEMAKER, 1964; FARR *et al.*, 1989; FRISULLO *et al.*, 2000). El género *Diplodia* incluye alrededor

de 1000 especies y no se ha abordado una revisión taxonómica adecuada (HAWKSWORTH *et al.*, 1995; DENMAN *et al.*, 2000). Por tanto, para evitar confusiones asociadas a la nomenclatura de los anamorfos, normalmente se utiliza el nombre del holomorfo para nombrar a estos hongos, y esta es la regla que se sigue en este trabajo.

En nuestro estudio, la especie más frecuentemente aislada se identificó como *B. stevensii*. El estado sexual fue identificado a partir de los chancros presentes en el tronco de alcornoques descorchados en 1998. Los ascomas nunca se produjeron en cultivo, como previamente comprobaron SINCLAIR *et al.* (1987) para este género. Algunas características del estado anamórfico de nuestros aislados coinciden con los de *B. quercuum*. Por ejemplo, las conidias subglobosas se consideran más típicas de *B. quercuum* que de *B. stevensii*. El principal carácter utilizado para distinguir entre estas dos especies (SHOEMAKER, 1964) es la forma de la conidia, expresada como relación L/A. Las conidias de nuestros aislados resultaron dimórficas, y se produjeron tanto conidias subglobosas como cilíndricas. La relación L/A de las conidias subglobosas fue de 1,2, lo que está muy cerca del valor referido por SHOEMAKER (1964) para *B. quercuum* (1,5). Sin embargo, la relación L/A obtenida para las conidias cilíndricas fue de 2,1, valor más cercano a *B. stevensii* (SHOEMAKER, 1964). Como únicamente el 20% de las conidias fueron subglobosas, hemos basado la identificación de estos aislados en las características de las conidias mayoritarias, que son cilíndricas, y por lo tanto, hemos identificado a esta especie como *B. stevensii*. Las relaciones filogenéticas que se han establecido entre las distintas especies de *Botryosphaeria* y taxones relacionados en base a la secuenciación de las regiones ITS del rDNA, sugieren que el nombre *B. stevensii* ha sido aplicado a más de una especie, y que aislados que se han identificado como *B. quercuum* deberían incluirse en la misma especie que otros que han sido nombrados como *B. stevensii* (ZHOU y STANOSZ, 2001).

La segunda especie más frecuente de las consistentemente asociadas a los chancros de *Quercus*, se ha identificado como *D. sarmentorum* (STEVENS, 1936), especie que se ha considerado como el estado anamórfico de *O. spiraeae* (BOOTH, 1958; SIVANESAN, 1984). Como refirió LAUNDON (1973), *D. sarmentorum* está claramente relacionada con los anamorfos del género *Botryosphaeria*, lo que pone en duda la validez del género *Othia*. Este punto de vista también ha sido respaldado por DENMAN *et al.* (2000), que sugieren que *Othia* podría ser considerado como sinónimo del género *Botryosphaeria*, aunque se necesitan más estudios morfológicos y moleculares antes de establecer esta sinonimia. El teleomorfo de *D. sarmentorum* no ha sido observado en el presente estudio, por lo que no nos es posible confirmar si estos aislados son una especie de *Othia* o de *Botryosphaeria*. Consecuentemente, en el presente trabajo nos referimos a estos aislados mediante el nombre del anamorfo.

La morfología de la especie de *Botryosphaeria* menos frecuentemente aislada corresponde a los anamorfos del género *Fusicoccum* (SUTTON, 1980; PENNYCOOK y SAMUELS, 1985; JACOBS y REHNER, 1998; CROUS y PALM, 1999; DENMAN *et al.*, 2000). Las características de estos anamorfos se corresponden muy bien con la descripción de la especie-tipo *F. aesculi*, que es el anamorfo de *B. dothidea* (CROUS y PALM, 1999). Sin embargo, también coinciden en gran parte con el anamorfo de *Botryosphaeria ribis*, *Fusicoccum* sp. (PUNITHALINGAM y HOLLIDAY, 1973; MAAS y UECKER, 1984), a pesar de que sus conidias son más estrechas que las descritas para esta especie en otros huéspedes (PUNITHALINGAM y HOLLIDAY, 1973; SUTTON, 1980; MORGAN-JONES y WHITE, 1987; SÁNCHEZ *et al.*, 2002 b). De nuevo, en nuestro estudio no fue posible obtener el teleomorfo en cultivo y tampoco se observó en material de campo infectado. En ocasiones *B. dothidea* y *B. ribis* se han considerado sinónimos (SHAHIN y CLAFLIN, 1980; MAAS y UECKER, 1984; SIVANESAN, 1984; CLINE, 1994), pero también han sido tratadas

como dos especies diferentes (VON ARX, 1987, FARR *et al.*, 1989). De hecho, *B. dothidea* se considera como un complejo de especies que han de ser convenientemente separadas en base a sus características morfológicas y moleculares (PENNYCOOK y SAMUELS, 1985; PHILLIPS *et al.*, 2002). Aunque algunos estudios morfológicos acerca del complejo *B. dothidea/B. ribis*, junto con estudios filogenéticos basados en las secuencias ITS del rDNA, apoyan la sinonimia de las dos especies (PENNYCOOK y SAMUELS, 1985; PHILLIPS y LUCAS, 1997; JACOBS y REHNER, 1998; CROUS y PALM, 1999; DENMAN *et al.*, 2000), otros estudios similares establecen la diferenciación entre ellas (ZHOU y STANOSZ, 2001). Mientras se resuelve esta controversia, hemos preferido considerar las dos especies como sinónimos y utilizar la nomenclatura más antigua, *B. dothidea* (1863) para referirnos a nuestros aislados.

Las curvas de crecimiento en función de la temperatura de incubación obtenidas para los aislados de *B. dothidea* se ajustan bastante bien a las descritas anteriormente para *Fusicoccum* aislada de *Cistus ladanifer* en Andalucía (SÁNCHEZ *et al.*, 2002 b), que crecen lentamente a 10 y a 35°C, con temperaturas óptimas alrededor de los 28°C. Sin embargo, otros aislados de *Fusicoccum* obtenidos de otros huéspedes no crecen a 35°C (BROOKS y FERRIN, 1994; JACOBS y REHNER, 1998). No obstante, hay que destacar que las temperaturas óptimas de crecimiento para aislados de *Fusicoccum* procedentes de arbustos nativos de California fueron también similares a las obtenidas en este estudio (BROOKS y FERRIN, 1994). Esto sugiere que los distintos aislados difieren en sus temperaturas óptimas de crecimiento en función de su origen geográfico. Los aislados de *Botryosphaeria stevensii* crecieron a 35°C, en contraste con los datos de JACOBS y REHNER (1998) para esta especie. Únicamente *D. sarmentorum* no creció a 35°C.

Las ecuaciones polinómicas que hemos utilizado para describir el crecimiento de los hongos en función de la temperatura no tie-

nen necesariamente una significación biológica, pero resultan útiles para determinar sus temperaturas cardinales de crecimiento. Así, las curvas de crecimiento en función de la temperatura obtenidas para *B. stevensii* y *B. dothidea* sugieren que estas dos especies podrían estar mejor adaptadas que *D. sarmenorum* para colonizar la corteza de *Quercus* a las temperaturas generalmente altas que se registran durante la primavera y el verano en Andalucía.

La patogenicidad de los aislados se demostró en cada uno de los experimentos realizados, cumplimentándose los postulados de Koch. La inoculación de ramas cortadas de encina indica que las tres especies presentan una gran capacidad para infectar y sobrevivir en el tejido cortical debilitado a temperaturas superiores a 25°C. Las diferencias en virulencia entre especies y aislados sólo se detecta a temperaturas más bajas. Este comportamiento de *Botryosphaeria* y especies relacionadas como patógenos de debilidad, e incluso como saprofitos oportunistas, ha sido observada frecuentemente (SCHOENEWEISS, 1975, 1981; WENE y SCHOENEWEISS, 1980; SINCLAIR *et al.*, 1987; GILBERT y STEVEN, 1996; RAYACHHETRY *et al.*, 1996).

Sin embargo, las inoculaciones en árboles vigorosos en condiciones de campo (Experimento 2), sugieren que la debilidad del huésped no es una condición necesaria para que se desarrollen las lesiones en la corteza infectada. En el caso de los aislados de *B. stevensii*, el desarrollo de los chancros estuvo claramente favorecido por las altas temperaturas (inoculación de invierno-inoculación de primavera), y varía significativamente con el aislado inoculado. LUQUE *et al.* (2002) mostraron que la longitud de las lesiones en plántulas de *Q. suber* estaba directamente relacionada con la temperatura mínima en el momento de la inoculación; las lesiones de mayor tamaño se desarrollaron en los plantones inoculados en el período más cálido del año (agosto). En nuestros experimentos, sólo las inoculaciones de pri-

mavera con *B. stevensii* dieron lugar a los síntomas secundarios de la enfermedad, esto es, el anillamiento y muerte de la rama y la subsecuente marchitez foliar. Estos resultados sugieren que *B. stevensii* es un patógeno primario de la encina y el alcornoque en Andalucía, como fue descrito por LUQUE y GIRBAL (1989) para *Q. suber* en Cataluña y FRISULLO *et al.* (2000) para diferentes especies de *Quercus* en Italia. *Botryosphaeria stevensii* también se ha citado como uno de los principales factores bióticos implicados en el decaimiento de *Quercus* en Cataluña (LUQUE *et al.*, 2000), Italia (RAGAZZI *et al.*, 2000) y Marruecos (EL-BADRI y ABADIE, 2000). Las otras dos especies fúngicas consideradas en este trabajo han mostrado su capacidad para producir necrosis corticales extensas en ramas de encina debilitadas, pero aunque produjeron lesiones, no fueron capaces de anillar ramas de árboles vigorosos. Este último hecho también se ha observado para estos hongos en especies de *Quercus* italianas (FRISULLO *et al.*, 2000).

De todo lo expuesto se puede concluir que aunque únicamente *B. stevensii* se ha mostrado como un patógeno primario de *Q. ilex* y *Q. suber*, las tres especies estudiadas deben ser consideradas como factores contribuyentes del decaimiento de *Quercus* en Andalucía.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a Francisca Gutiérrez y Jonatan E. Sánchez por su colaboración en las tareas de laboratorio y campo. Este trabajo ha sido financiado por el Programa FEDER de la UE. (proyecto 1FD97-0911-CO3-03), el MCyT (proyecto AGL2002-00530) y 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 de investigación del programa "Ramón y Cajal" del MCyT.

ABSTRACT

SÁNCHEZ M.E., J. VENEGAS, M.A. ROMERO, A.J.L. PHILLIPS, A. TRAPERO. 2003. *Botryosphaeria* canker of holm and cork oak in Andalucía (southern Spain). *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 593-612.

Root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* is considered to be the main disease associated with oak decline in southwestern Spain. However, cankers are frequently observed on declining Mediterranean *Quercus* species in this region. In surveys carried out in declining oak forests in southern Spain, strips of necrotic bark were common on diseased branches. Three *Botryosphaeria* or related species, namely *Botryosphaeria stevensii*, *B. dothidea* and *Diplodia sarmentorum*, were consistently isolated from affected branches. Isolates of all three species caused cankers when inoculated onto excised oak branches. Inoculations on healthy branches in the field also induced canker development, but only *B. stevensii* caused lesions that girdled and killed the branches. The optimum temperature for growth of *B. stevensii* and *B. dothidea* was above 25°C, with slow growth at 35°C. In contrast, *D. sarmentorum* had an optimum temperature for growth of about 21°C, and did not grow at 35°C. The common occurrence and wide distribution of these pathogens, their association with cankers and their ability to infect oaks suggests that they may contribute to the decline of *Quercus* in southwestern Spain.

Key words: *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria ribis*, *Botryosphaeria stevensii*, *Diplodia mutila*, *Diplodia sarmentorum*, *Fusicoccum aesculi*, Mediterranean forest, oak decline, *Othia spiraeae*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*.

REFERENCIAS

- ARX, J.A. VON 1987. Plant pathogenic fungi. J. Cramer, Berlín.
- BOOTH, C. 1958. Studies of pyrenomycetes. III. *Othia spiraeae* (Fuckel) Fuckel, syn. *Diplodia sarmentorum* (Fr.) Fr. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **41**: 335-340.
- BRASIER, C.M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. Sci. For.*, **53**: 347-358.
- BRITO DE CARVALHO, J.H. 1993. "Stress" do Sobreiro e da Azinheira ou a Doença de Lopes Pimentel? CIDER, Univ. Algarve, Faro.
- BROOKS, F.E., FERRIN, D.M. 1994. Branch dieback of southern California chaparral vegetation caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology*, **84**: 78-83.
- CLINE, W.O. 1994. Infection of cold-injured blueberry stem by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis.*, **78**: 1010.
- CROUS, P.W., PALM, M.E. 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia*, **52**: 167-175.
- DENMAN, S., CROUS, P.W., TAYLOR, J.E., KANG, J.C., PASCOE, I., WINGFIELD, M.J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, **45**: 129-140.
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. 1995. Basic Plant Pathology methods. CRC Press, Boca Raton.
- EL-BADRI, N., ABADIE, M. 2000. Observations on the dynamic of *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. development on the cork-oak, *Quercus suber* L., in Morocco. *Cryptog. Mycol.*, **21**: 235-248.
- FARR, D.F., BILLS, G.F., CHAMURIS, G.P., ROSSMAN, A.Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, St. Paul, MN.
- FRISULLO, S., CAMELE, I., CARLUCCI, A., LOPS, F. 2000. *Botryosphaeria* and *Botryosphaeria*-like micromycetes on declining oaks in Apulia and Basilicata. *Petria*, **10**: 1-10.
- GALLEGO, F.J., PÉREZ DE ALGABA, A., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. 1999. Etiology of oak decline in Spain. *Eur. J. For. Path.*, **29**: 17-27.
- GILBERT, G.S., STEVEN, D. 1996. A canker disease of seedlings and saplings of *Tetragastris panamensis* (*Burseraceae*) caused by *Botryosphaeria dothidea* in lowland tropical forest. *Plant Dis.*, **80**: 684-687.
- HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C., PEGLER, D.M. 1995. Dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford, Oxon.
- 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.
- LAUNDON, G.F. 1973. *Botryosphaeria obtusa*, *B. stevensii* and *Othia spiraeae* in New Zealand. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **61**: 369-374.
- LUISI, N., LERARIO, P., VANNINI, A. (eds.) 1993. Recent advances in studies on oak decline. Proceedings of the International Congress Recent Advances in Studies on Oak Decline, Brindisi, Italy. September 13-18, 1992.
- LUQUE, J., GIRBAL, J. 1989. Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *Eur. J. For. Path.*, **19**: 7-13.
- LUQUE, J., PARLADÉ, J., PERA, J. 2000. Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *For. Path.*, **30**: 247-263.

- LUQUE, J., PARLADÉ, J., PERA, J. 2002. Seasonal changes in susceptibility of *Quercus suber* to *Botryosphaeria stevensii* and *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol.*, **51**: 338-345.
- MAAS, J.L., UECKER, F.A. 1984. *Botryosphaeria dothidea* cane canker of thornless blackberry. *Plant Dis.*, **68**: 720-726.
- MONTOYA, J.M. 1988. Los alcornoques. Manuales Técnicos SEA. MAPA, Madrid.
- MONTOYA, J.M. 1992. Mortandad de *Quercus*, la perspectiva selvícola y los antecedentes climáticos. *Ecología*, **6**: 123-130.
- 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.
- MORGAN-JONES, G., WHITE, J.F. 1987. Notes on the Coelomycetes. II. Concerning the *Fusicoccum* anamorph of *Botryosphaeria ribis*. *Mycotaxon*, **30**: 117-125.
- NAVARRO, R.M., FERNÁNDEZ, P. 2000. El síndrome de la seca del encinar. Propuesta de solución para el Valle de los Pedroches. Fundación Ricardo Delgado Vizcaíno, Pozoblanco, Córdoba.
- PENNYCOOK, S.R., SAMUELS, G.J. 1985. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon*, **24**: 445-458.
- PHILLIPS, A.J.L. 2000. Excoriase, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens. *Phytopathol. Medit.*, **39**: 341-356.
- PHILLIPS, A.J.L. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathol. Medit.*, **41**: 3-18.
- PHILLIPS, A.J.L., FONSECA, F., POVOA, V., CASTILHO, R., NOLASCO, G. 2002. A reassessment of the anamorphic fungus *Fusicoccum luteum* and description of its teleomorph *Botryosphaeria lutea* sp. nov. *Sydowia*, **54**: 59-77.
- PHILLIPS, A.J.L., LUCAS, M.T. 1997. The taxonomic status of *Macrophoma flaccida* and *Macrophoma reniformis* and their relationship to *Botryosphaeria dothidea*. *Sydowia*, **49**: 150-159.
- PUNITHALINGAM, E., HOLLIDAY, P. 1973. *Botryosphaeria ribis*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 395, Kew.
- RAGAZZI, A., FEDI, I.D., MESTURINO, L. 1989. The oak decline: a new problem in Italy. *Eur. J. For. Pathol.*, **19**: 105-110.
- RAGAZZI, A., MORICCA, S., DELLAVALLE, I. 1999. Water-stress and development of canker by *Diplodia mutila* on *Quercus robur*. *J. Phytopathol.*, **147**: 425-428.
- RAGAZZI, A., MORICCA, S., DELLAVALLE, I., TURCO, E. 2000. Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali. Firenze.
- RAYACHHETRY, M.B., BLAKESLEE, G.M., CHARUDATTAN, R. 1996. Susceptibility of *Melaleuca quinquenervia* to *Botryosphaeria ribis*, a potential biological control agent. *Plant Dis.*, **80**: 145-150.
- 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 Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, Almería.
- SÁNCHEZ, M.E., NAVARRO, R.M., TRAPERO, A., FERNÁNDEZ, P. 2000. La "seca" de encinas y alcornoques: una visión histórica. *Montes*, **62**: 29-39.
- 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 of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Évora, Portugal.
- SÁNCHEZ, M.E., CAETANO, P., FERRAZ, J., TRAPERO, A. 2002 a. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *For. Pathol.*, **32**: 5-18.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, M.E., GUTIÉRREZ-GARCÍA, J., TRAPERO-CASAS, A. 2002 b. *Botryosphaeria* canker of *Cistus ladanifer*. *Plant Pathol.*, **51**: 364-372.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, M.E., SÁNCHEZ SOLANA, J.E., NAVARRO CERRILLO, R.M., FERNÁNDEZ REBOLLO, P., TRAPERO CASAS, A. 2002 c. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 87-108.
- SCHOENEWEISS, D.F. 1975. Predisposition, stress, and plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **13**: 193-211.
- SCHOENEWEISS, D.F. 1981. The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Dis.*, **65**: 308-314.
- SHAHIN, E.A., CLAFLIN, L.E. 1980. Twig blight of Douglas-fir: A new disease caused by *Dothiorella dothidea*. *Plant Dis.*, **64**: 47-50.
- SHOEMAKER, R.A. 1964. Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Can. J. Bot.*, **42**: 1297-1301.
- SINCLAIR, W.A., LYON, H.H., JOHNSON, W.T. 1987. Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press, London.
- SIVANESAN, A. 1984. The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs. J. Cramer, Vaduz.
- SORIA, S., LÓPEZ, M., LÓPEZ, M. 1997. Presencia, sintomatología y daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación con la seca de la encina. *Ecología*, **11**: 295-301.
- STEEL, G.D., TORRIE, J.H. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. Mac Graw-Hill, Bogotá.
- STEVENS, N.E. 1936. Two species of *Physalospora* in England. *Mycologia*, **28**: 330-336.
- SUTTON, B.C. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- TORRES JUAN, J. 1985. El *Hypoxylon mediterraneum* (De Not) Mill y su comportamiento en los encinares y alcornoques andaluces. *Bol. San. Veg. Plagas*, **11**: 185-191.
- TRAPERO, A., KAISER, W.J. 1992. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopathology*, **82**: 1261-1266.
- TRAPERO, A., SÁNCHEZ, M.E., VARO, M.R., ROMERO, M.A., GUTIÉRREZ, J. 2000. Enfermedades de especies forestales en Andalucía. *Agricultura*, **821**: 822-824.
- TUSET, J.J., HINAREJOS, C., MIRA, J.L., COBOS, J.M. 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques. *Bol. San. Veg. Plagas*, **22**: 491-499.
- VANNINI, A., VALENTINI, R., LUISI, N. 1996. Impact of drought and *Hypoxylon mediterraneum* on oak

- decline in the Mediterranean region. *Ann. Sci. For.*, **53**: 753-760.
- 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, Granada.
- WENE, E.G., SCHOENEWEISS, D.F. 1980. Localized freezing predisposition to *Botryosphaeria* canker in differentially frozen woody stem. *Can. J. Bot.*, **58**: 1455-1458.
- ZHOU, S.G., STANOSZ, G.R. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia*, **93**: 516-527.

(Recepción: 11 febrero 2003)
(Aceptación: 25 febrero 2003)