

Fitotoxicidad del fosfonato en brinzales de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.)

R. M^a NAVARRO CERRILLO, I. JORGE, D. ARIZA, C. PORRAS, J. JORRIN

El fosfonato es un fertilizante foliar que ha sido utilizado con éxito en el control de *P. cinnamomi* en varias especies forestales. Aunque se considera que los fosfonatos tienen un bajo nivel de toxicidad, se han observado síntomas de daños en varias especies y utilizando distintos métodos de aplicación. En este trabajo se estudia la fitotoxicidad de los fosfonatos en brinzales de *Quercus ilex*. Se han ensayado dos concentraciones de fosfonato, 10, y 15 g l⁻¹, y se han realizado medidas de la fluorescencia de la clorofila, la concentración de fosfonatos en hoja y raíz; y la concentración de fenoles en los mismos tejidos. Las plantas mostraron síntomas visuales de fitotoxicidad para una concentración de 15 g l⁻¹ de fosfonato, con necrosis apicales a los 12-13 días después del tratamiento. Sin embargo, los valores de la relación Fv/Fm y la eficiencia fotosintética (PHIE₀) no presentaron diferencias significativas entre mediciones.

La concentración de fosfonatos, tanto en raíz como en hojas, aumentó a medida que aumentaron las concentraciones de las aplicaciones foliares. El nivel de compuestos fenólicos fue siempre mayor en hojas que en raíz, observándose diferencias significativas en raíz a los 14 días para el tratamiento de 10 g l⁻¹ de fosfonato. Parece evidente por los resultados de este trabajo, que los sistemas de defensa asociados a compuestos fenólicos en brinzales de encina han sido activados después de los 7 días del tratamiento como respuesta al tratamiento con fosfonato.

R. M^a NAVARRO CERRILLO, D. ARIZA. Departamento de Ingeniería Forestal-Universidad de Córdoba. Correo electrónico: irlnacer@uco.es; Apartado de Correos 3048 (14080 Córdoba-España). Teléfono: 34-957-218657; Fax: 34-957-218563

I. JORGE, J. JORRIN. Departamento de Bioquímica-Universidad de Córdoba.

C. PORRAS. CIFA Las Torres. Consejería de Innovación y Tecnología. Junta de Andalucía.

Palabras clave: *Phytophthora cinnamomi*, tratamientos, métodos de aplicación.

INTRODUCCIÓN

El principal problema fitosanitario de las masas de *Quercus* en la península ibérica es la afección de la *seca* de encina y alcornoques, que daña gravemente a un gran número de dehesas y bosques desde comienzos de los años 80 (RUPÉREZ y MUÑOZ, 1980). La etiología de la *seca* parece tener un origen multicausal, es decir, que en las masas afectadas se da la confluencia de varios factores que parecen interactuar entre sí (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). Sin embargo, en muchos casos el

diagnóstico de las zonas afectadas ha permitido identificar agentes causales únicos, siendo el caso más frecuente la presencia de *Phytophthora cinnamomi* Rands (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). *P. cinnamomi* es un hongo Oomiceto de la familia *Phytophthoraceae* y está considerado uno de los parásitos de plantas leñosas más agresivo y destructivo del mundo (BRASIER *et al.*, 1993), cuya patogenicidad en encina y alcornoque se demostró en 1996 (TUSET *et al.*, 1996).

El control de la enfermedad se basa en impedir la infección y limitar la dispersión

mediante medidas culturales, biológicas y químicas (SMITH *et al.*, 1992). Entre las medidas culturales se propone la eliminación de los pies infectados, el acotamiento de zonas afectadas y sobre todo la desinfección de las herramientas para las labores al suelo. La lucha biológica consiste en el empleo de organismos antagonistas, habiéndose empleado *Trichoderma* spp y *Mycothecium verrucaria* (PÉREZ DE ALGABA *et al.*, 1990). Los procedimientos químicos son muy diversos: pulverización de la copa del árbol infectado con fungicidas y abonos foliares (GARCÍA y POZO, 1993); inyecciones de fosfonatos en el tronco del árbol enfermo (FERNÁNDEZ-ESCOBAR *et al.*, 1999), y la aplicación de fosfonatos a las plantas y el suelo (FAIRBANKS *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2004; NAVARRO y TERÁN, 2006).

El fosfonato es un fertilizante foliar que ha sido utilizado con éxito en el control de *P. cinnamomi* en varias especies forestales (WILKINSON *et al.*, 2001; HARDY *et al.*, 2001; BARRETT *et al.*, 2003) y también en especies mediterráneas (NAVARRO *et al.*, 2004). El fosfonato es un derivado del ácido fosfórico, que contiene un grupo orgánico P-H (DUNHILL, 1990). Aunque se considera que los fosfonatos tienen un bajo nivel de toxicidad (GUEST y GRANT, 1991), se han observado síntomas de daños en un amplio número de especies utilizando distintos métodos de aplicación. La fitotoxicidad se manifiesta en necrosis en los márgenes de las hojas, abscisión de hojas, crecimientos anormales y clorosis (HARDY *et al.*, 2001). La menor concentración de fosfonatos en la cual se han observado daños en especies forestales ha sido de 5 g l⁻¹ (HARDY *et al.*, 2001) resultando evidentes a partir de 10 g l⁻¹ (ABERTON *et al.*, 1999). Por otro lado, en trabajos previos se ha observado que una concentración de fosfonato de 5 g l⁻¹ controla satisfactoriamente los daños de *P. cinnamomi*, evitando problemas de fitotoxicidad.

El mecanismo mediante el cual los fosfonatos protegen a las plantas huéspedes de la acción del hongo no se conoce suficientemente (HARDY *et al.*, 2001), se le relaciona

con procesos de activación de defensa frente a patógenos tales como la acumulación de compuestos fenólicos (CANDELA *et al.*, 1995). El fosfonato se trasloca a través tanto del floema como del xilema, alcanzando órganos sumidero de forma similar a la de los fotoasimilados (GUEST y GRANT, 1991), observándose principalmente mayores concentraciones en raíces y ramillos terminales. La producción de compuestos fenólicos es una respuesta general de las plantas a estreses bióticos y abióticos (NEMESTOTHY y GUEST, 1990). Estudios realizados por JACKSON *et al.* (2000) demostraron que a dosis fitotóxicas de fosfonato (15 g l⁻¹) se inducía un oscurecimiento del extremo de la raíz, que estaba asociado a la acumulación de compuestos fenólicos solubles.

Un paso previo a la aplicación de fosfonatos en el control de *P. cinnamomi* en especies mediterráneas es evaluar las concentraciones adecuadas para evitar daños en las plantas. El objetivo de este trabajo es estudiar la fitotoxicidad de los fosfonatos en brinzales de *Quercus ilex*, así como la respuesta en la formación de compuestos fenólicos en las plantas tratadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado en este trabajo fueron 36 brinzales de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) de procedencia Sierra Morena Occidental (Región 11 Extremadura), que fueron sembrados en alvéolos individuales con sustrato de turba: perlita (1:1; v/v). Después del cultivo, las plantas se aclimataron durante 15 días (1 al 14 de noviembre de 2005) en una cámara de cultivo en condiciones controladas (fotoperiodo 12 h, 21±1°C de temperatura, 60±5% de humedad relativa y 200 μmol m⁻² s⁻¹ de irradiancia). Una vez finalizado el periodo de adaptación las plantas se colocaron en un cultivo hidropónico, consistente en un recipiente de plástico envuelto con papel de aluminio, que contenía 900 ml de solución nutritiva de Hoagland (HOAGLAND y

ARNON, 1959). La solución nutritiva se mantuvo aireada de forma continua mediante un sistema de aireación forzado por un pequeño compresor. Las plantas crecieron en cultivo hidropónico durante 2 semanas (17 al 31 de marzo) como periodo de adaptación al medio líquido, antes de comenzar el tratamiento con fosfonato.

Diseño experimental

El diseño experimental se realizó para verificar la fitotoxicidad foliar del fosfonato, por lo que se optó por un ensayo unifactorial, utilizando como factor la concentración de producto. El producto utilizado fue fosfonato potásico al 1 % (p/v), elaborado mezclando 2,8 g/100 ml de ácido fosforoso al 1% (p/v) y 2,8 g/100 ml de hidróxido potásico al 1% (p/v) equilibrado a un pH de 6,7. Las distintas concentraciones de fosfonato para realizar el ensayo de dosis-respuesta fueron de 0, 10, y 15 g l⁻¹, y que ya habían sido empleadas en trabajos similares (FAIRBANKS *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 2000; WILKINSON *et al.*, 2001). El número de plantas por tratamiento fue de 12. El día 1 abril de 2005 se procedió a los tratamientos mediante una pistola dosificadora que permite aplicar la solución sobre las hojas. Se hicieron dos repeticiones en las cuales se pulverizaba las hojas con el producto hasta gotear, se dejaba secar y se volvía a pulverizar. Los controles y mediciones de las plantas se realizaron a los 7 (8 de abril) y a los 14 días (15 de abril).

Síntomas visuales

Las plantas fueron evaluadas con el fin de determinar la aparición de síntomas visuales de fitotoxicidad siguiendo el criterio propuesto por PILBEAM *et al.* (2000), asignándose cuatro categorías: 0. Sin daños, 1. Daños limitados a hojas jóvenes, 2. Daños en hojas jóvenes y adultas con <50% de la planta afectada, y 3. Daños en hojas jóvenes y adultas con >50% de la planta afectada. Se procedió a la medición de síntomas visuales a los 7 (8 plantas), y a los 14 días (4 plantas) después de la aplicación del fosfonato.

Medición de la fluorescencia.

La fluorescencia de la clorofila se determinó utilizando un fluorímetro *Plant Efficiency Analyser* (PEA, Hansatech, Reino Unido). La fluorescencia basal (F_o) se midió con una luz de 650 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y para obtener la emisión máxima de fluorescencia (F_m), se aplicó un pulso saturante de 10.000 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un segundo de duración. Se usaron unas pinzas especiales, que forman parte del equipo del fluorímetro, para el periodo de adaptación a la oscuridad (30 minutos) que permite obtener el máximo grado de oxidación de la quinona A (Q_A). Se determinó la relación entre la fluorescencia variable (F_v) y la máxima (F_m): $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$; y el valor de eficiencia fotosintética según Strasser *et al.* 2000. La razón F_v/F_m es proporcional a la eficiencia fotoquímica máxima de las hojas, y es una de las variables más empleadas por numerosos autores en estudios de respuesta a estrés (STRASSER *et al.*, 2000). Las mediciones se realizaron al mediodía (12:00 hora solar) en cuatro plantas por tratamiento, en la misma hoja seleccionada en el tercio medio de cada planta.

Análisis de fosfonato

Los tejidos vegetales de cada muestra fueron lavados para quitar cualquier resto de fosfonatos depositados en hojas con un detergente libre de fosfatos (Ariel, 2,5 ml detergente por 1 litro de agua), aclarados dos veces en agua de grifo y una vez en agua desionizada. El material vegetal (raíz y hoja) se secó en estufa a 60 °C durante 5 días (50 mg de peso seco aproximadamente), se pulverizó con mortero y maja y se mezcló con 5 ml de agua mQ, dejándolo 24 h (JACKSON *et al.*, 2000). Finalmente, se filtró (filtros millipore de 0,45 μm), y se centrifugó para eliminar restos de tejido. El análisis de fosfonatos se hizo en el Laboratorio de Cromatografía Iónica de la Universidad Autónoma de Madrid mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector de diodo array y espectrómetro de masas siguiendo el método descrito por ROOS *et al.* (1999)

Análisis de compuestos fenólicos

Al igual que con el análisis de fosfonatos, a los 7 y 14 días de la aplicación, se analizó la concentración de compuestos fenólicos solubles en muestras de hoja y raíz de los plantones. La extracción de compuestos fenólicos del material vegetal se realizó siguiendo el método descrito por PRATS (2001). El contenido de fenoles totales se determinó espectrofotométricamente por el método de Folin, siguiendo el protocolo descrito por LÓPEZ-VALBUENA (1980).

Análisis de datos

El análisis estadístico se inició con la comprobación de que los datos cumplen el requisito de normalidad y la homogeneidad de la varianza (homocedasticidad). La normalidad se comprobó mediante el test de Komolgorov-Smirnov, y la homocedasticidad por el test de Levene. Una vez realizada la comprobación de los requisitos básicos de los datos,

se procedió a dos tipos de análisis. En primer lugar se analizaron los resultados para un mismo tratamiento comparando entre fechas mediante una T-student con un nivel de significación del 95%. En segundo lugar se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía entre tratamientos para cada una de las fechas en que se tomaron medidas (26/04/05 y 04/04/05). Cuando el análisis de la varianza fue significativo se realizó un test de Tukey de comparación múltiple de las medias para un nivel de significación del 5% ($P \leq 0,05$). Los resultados se presentan en los cuadros y en las figuras como media y error estándar de cada tratamiento.

RESULTADOS

Síntomas visuales

Las plantas mostraron síntomas visuales de fitotoxicidad en aquellos plantones a los que se les aplicó una concentración de 15 g



Figura 1. Síntomas de fitotoxicidad en hojas de encina en cultivo hidropónico 14 días después de la aplicación de un tratamiento de fosfonato con un concentración de 15 g l⁻¹.

Cuadro 1. Valores de Fv/Fm y eficiencia fotosintética para cada tratamiento en las dos mediciones realizadas durante los días 29 de abril y 26 de julio. Media \pm error estándar.

Tratamiento Concentración de fosfonatos	Fv/Fm		PHIE ₀ Eficiencia fotosintética	
	26/04/05	04/05/05	26/04/05	04/05/05
0 g l ⁻¹	0,77 (0,002)	0,75 (0,011)	0,40 (0,015)	0,38 (0,035)
10 g l ⁻¹	0,74 (0,017)	0,76 (0,008)	0,35 (0,032)	0,41 (0,029)
15 g l ⁻¹	0,76 (0,005)	0,77 (0,005)	0,42 (0,013)	0,44 (0,013)

l⁻¹ de fosfonato, sin observarse síntomas en el tratamiento de 10 g l⁻¹. En el primer caso las hojas jóvenes mostraron una ligera decoloración 2-3 días después de la aplicación (categoría 1). Posteriormente, se observó necrosis parciales a los 12-13 días después del tratamiento, que afectan tanto a hojas jóvenes y adultas en un porcentaje <50% de la planta (categoría 2), con abscisión parcial de hojas (Figura 1).

Medición de la fluorescencia

Los valores de la relación Fv/Fm y la eficiencia fotosintética (PHIE₀) no presentaron diferencias significativas entre mediciones (T-student para todos los tratamientos Sig>0,05) ni entre tratamientos para cada una de las fechas (ANOVA Sig>0,05) (Cuadro 1). Los valores de fluorescencia en todas las fechas y tratamientos son muy uniformes y próximos a 0,75, siendo algo más variables los valores la eficiencia fotosintética, pero sin un patrón claro.

Concentración de fosfonatos

La concentración de fosfonatos, tanto en raíz como en hojas, aumentó a mayor con-

centración de las aplicaciones foliares, aunque las diferencias observadas entre fechas de medición para un mismo tratamiento no fueron estadísticamente significativas (T-student Sig>0,05) (Cuadro 2). En hoja, los niveles fueron mayores a los 7 que a los 14 días, mientras que en raíces se observó la tendencia contraria, no detectándose fosfonatos en raíz a los 7 días tras la aplicación (Cuadro 2). A los 14 días no se observaron, tanto en raíz (F=0,292; P<0,75) como en hojas (F=0,417; P<0,67), diferencias significativas en el contenido de fosfonatos entre dosis de aplicación.

Concentración de fenoles

El nivel de compuestos fenólicos a lo largo del ensayo fue siempre mayor en hojas que en raíz. La concentración de compuestos fenólicos no mostraron diferencias significativas entre fechas de medición para un mismo tratamiento (T-student Sig>0,05).

La concentración de fenoles en hoja no mostró diferencias significativas ni en la primera (F=3,689; P<0,06), ni en la segunda medición (F=0,485; P<0,63), con variaciones muy pequeñas entre medidas (Fig. 2).

Cuadro 2. Concentración de fosfonatos en hoja y raíz de plantones de encina tras 7 y 14 días de tratamiento con fosfonato a distintas concentraciones (0, 10 y 15 g l⁻¹). Media \pm error estándar.

Concentración de fosfonato en el tratamiento (g l ⁻¹)	Concentración de fosfonato 7 días (μ g g ⁻¹)		Concentración de fosfonato 14 días (μ g g ⁻¹)	
	Raíz	Hojas	Raíz	Hojas
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	396,22 (46,48)	655,77 (193,16)	207,03 (36,03)
15	n.d.	565,61 (142,40)	683,03 (141,65)	295,88 (42,93)

n.d. no detectado.

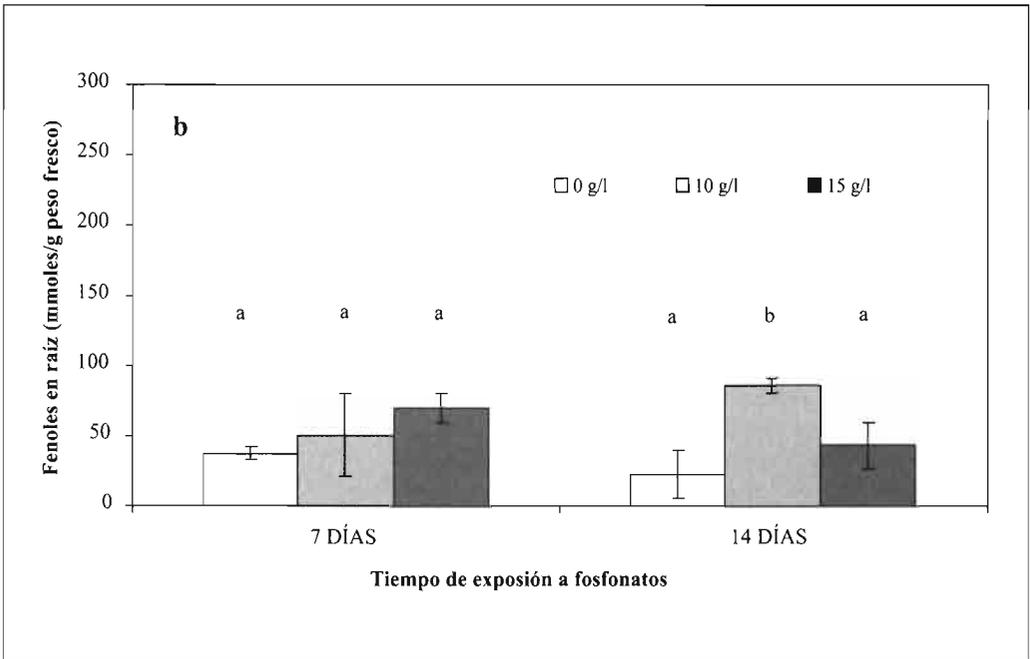
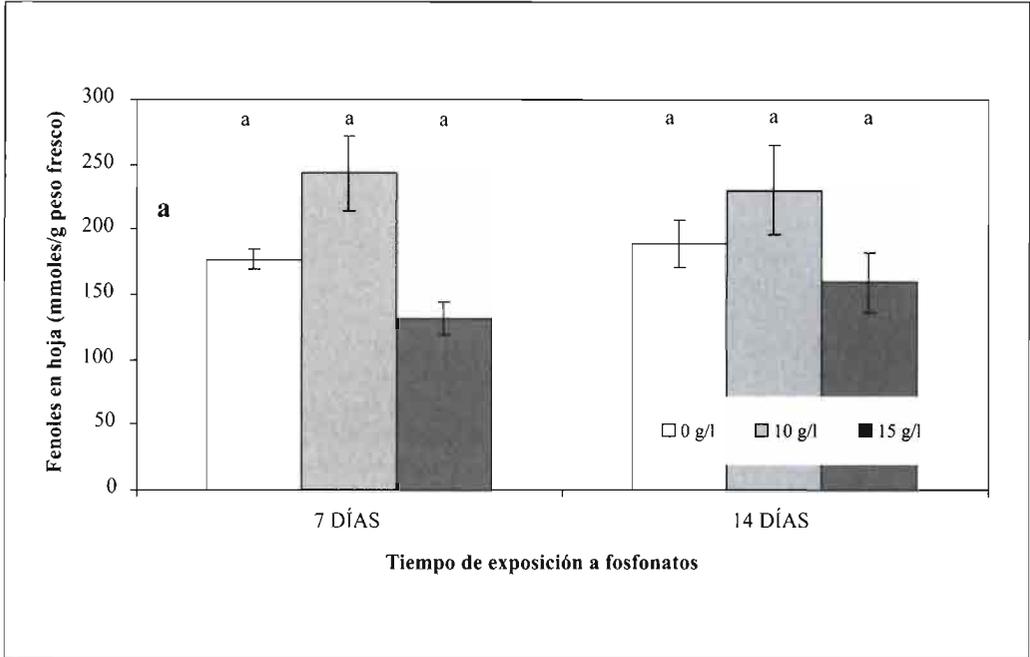


Figura 2. Concertación de compuestos fenólicos en (a) hoja y (b) raíz de plántones de encina tras 7 y 14 días de tratamiento con fosfonato a distintas concentraciones (0, 10 y 15 g l⁻¹). Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.

Sin embargo, la concentración de fenoles en la raíz experimentó cambios más importantes entre las dos fechas de medición. A los 7 días, la concentración de fenoles en raíces en todos los tratamientos fueron similares (Fig. 2), obteniéndose el valor máximo para el tratamiento 15 g l⁻¹, aunque las diferencias no fueron significativas ($F=1,036$; $P<0,39$). En la medida a los 14 días, se produjo una reducción de la concentración radical en el tratamiento de 0 g l⁻¹ y 15 g l⁻¹, aumentando significativamente el valor para el tratamiento de 10 g l⁻¹ ($F=13,488$; $P<0,002$).

DISCUSIÓN

El control de *P. cinnamomi* en condiciones naturales es complicado debido a su amplia gama de huéspedes, al largo período entre el establecimiento de la infección y la aparición de síntomas foliares y a la longevidad de sus estructuras de resistencia en el suelo. Los métodos de control químico presentan una serie de ventajas, como su rapidez de acción, persistencia, efectividad y bajo coste, que hacen que sean una opción interesante. Recientemente, el fertilizante fosfonato, ha demostrado su eficacia en el control de daños de *P. cinnamomi* en brinzales de especies mediterráneas europeas (NAVARRO *et al.*, 2004). El fosfonato es un fertilizante que actúa como un fungicida sistémico, el cual es traslocado en la planta a través del xilema y del floema con los foto asimilados en una relación fuente-sumidero (GUEST y GRANT, 1991).

En este trabajo se ha evaluado la fitotoxicidad asociada a la aplicación foliar de fosfonatos en encina, así como la traslocación del producto a la raíz. Los resultados indican la susceptibilidad de la encina a concentraciones superiores a 10 g l⁻¹, apareciendo síntomas de fitotoxicidad en encina en concentraciones de 15 g l⁻¹. En otras especies los síntomas de fitotoxicidad comienzan en concentraciones superiores a 5 g l⁻¹, aunque en especies forestales los daños empiezan a observarse a concentraciones superiores a 10 g l⁻¹ en la mayor parte de las especies estu-

diadas (JACKSON *et al.*, 2000; HARDY *et al.*, 2001). Los daños observados se caracterizan principalmente por deformaciones en hojas terminales, y abscisión de hojas adultas, acompañada de una pérdida de crecimiento apical. La necrosis foliar puede ser el resultado de desequilibrios metabólicos, tales como la sobreproducción de compuestos tóxicos como los fenólicos y/o especies reactivas de oxígeno. Estos síntomas coinciden con los observados en especies australianas (JACKSON *et al.*, 2000; HARDY *et al.*, 2001).

La fluorescencia de la clorofila permite estudiar las limitaciones a la fotosíntesis de origen no estomático (STRASSER *et al.*, 2000). Los valores de la fluorescencia a los 7 y a los 14 días no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, alcanzando valores muy parecidos a los obtenidos en otros ensayos para planta de encina no sometida a estrés (NAVARRO *et al.*, 2006). Esto indica que incluso en el tratamiento de 15 g l⁻¹, donde aparecieron síntomas de fitotoxicidad, estos no suponen un aumento del estrés fotoquímico de la planta, lo cual también puede deberse a que las medidas se realizaron en la parte central de hojas situadas en la zona intermedia de la planta que no presentaban síntomas visuales de daños. El comportamiento del valor de la eficiencia fotosintética fue muy similar a de la relación Fv/Fm, no presentando diferencias entre tratamientos.

La concentración de fosfonatos encontradas en las hojas y en la raíz de encina aumentó con la concentración de los tratamientos con fosfonatos, y con el tiempo. Los valores finales fueron similares a los encontrados por TYNAN *et al.* (2001) y BARRETT *et al.* (2003), que encontraron valores próximos a 200 µg g⁻¹ para tratamientos con concentraciones de fosfonato de 5 g l⁻¹ y 10 g l⁻¹ de fosfonato, pero claramente inferiores a las encontradas para otras especies leñosas como *Bankia grandis* o *Eucalyptus marginata* que a las dos semanas del tratamiento presento concentraciones de fosfonato en hoja muy superiores a 1200 µg g para un tratamiento con 5 g l⁻¹ de fosfonato (JACKSON *et al.*, 2000; WILKINSON *et al.*, 2001). Es impor-

tante destacar el claro efecto de traslocación de fosfonatos a la raíz en un periodo relativamente corto, aumentando las concentraciones en los tratamientos con fosfonatos a las dos semanas, y disminuyendo las concentraciones foliares.

No se conocen los procesos mediante los cuales los fosfonatos inducen resistencia a *P.cinnamomi*. postulado que el fosfonato induce la síntesis de compuestos fenólicos tales como fitoalexinas y ligninas, quienes actuarían como barrera física (caso de las ligninas) o como compuestos antifúngicos (caso de las fitoalexinas) (NEMESTOTHY y GUEST, 1990; CANDELA *et al.*, 1995), como se había observado en el caso de *Eucalyptus* sp. (CAHILL *et al.*, 1993). Los resultados de este trabajo parecen indicar que los sistemas de defensa asociados a compuestos fenólicos han sido activados después de los 7 días del tratamiento, dadas las diferencias observadas entre el tratamiento a concentración de fosfonatos de 0 g l⁻¹ y 10 g l⁻¹. En este trabajo se observó traslocación de fosfonato a la raíz en el tratamiento con mayor concentración, pero por el contrario la concentración de compuestos fenolitos al final del ensayo en la raíz fue la menor. La caída de concentración de compuestos fenólicos en el tratamiento de 15 g l⁻¹ de fosfonato, pudo deberse a la fitotoxicidad observada a dosis elevadas del fertilizante BARRETT *et al.*, 2003).

La efectividad de los fosfonatos parece que aumentan cuando se aumenta su concentración hasta valores fototóxicos. En este trabajo los fosfonatos parecen mostrar fenómenos de fitotoxicidad en encima de concentración de 15 g l. El escaso numero de tratamientos no permite estudiar los valores óptimos de aplicación, lo cual requiere trabajar con un rango de concentraciones más ajustados, tal y como recomiendan otros autores (HARDY *et al.*, 2001). A partir de las medidas de concentración de fosfonato en hoja y raíz, parece que la protección del fosfonato podría estar relacionada con una rápida traslocación

desde las hojas a la raíz. Podría ser interesante estudiar el efecto de aplicaciones sucesivas (2 al año) de fosfonatos en concertaciones de 5-10 g l⁻¹ para estudiar los efectos de fitotoxicidad y concertación de fosfonatos en las diferentes fracciones de la planta. En otras especies un incremento del pH de la solución a 7,2 redujo la toxicidad en hojas (LEONARDI y WHILEY, 1999), lo cual podría ser efectivo en condiciones naturales. Alternativamente, se pueden utilizar otras estrategias como el uso de surfactantes, y la mejora de los equipos de dosificación, lo que podría mejorar la absorción de fosfonatos en especies mediterráneas. Sería bueno investigar los rangos mínimos de aplicación y la frecuencia entre tratamientos para garantizar la acción protectora del fosfonato, que diversos autores la sitúan alrededor de los 6 meses, aunque varía con muchos factores (WILKINSON *et al.*, 2001). Su efecto en individuos adultos, y posteriormente en masas naturales y repoblaciones, deben ser estudiados, ajustando las dosis adecuadas para evitar problemas de fitotoxicidad (WILKINSON *et al.*, 2001), y desarrollando los procesos operativos más adecuados para su aplicación en campo de forma sencilla y económica (HARDY *et al.*, 2001).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con el apoyo del Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía a través del Convenio *Seguimiento de los daños de seca sobre masas de Quercus en Andalucía. Propuesta de soluciones, y Selección de individuos resistentes a procesos de decaimiento* financiado por la Fundación Caja el Monte, así como el proyecto AGL2002-00530 *Bases biológicas, epidemiológicas y selvícolas para el control de las principales enfermedades asociadas a la seca de los Quercus en Andalucía. decaimiento* financiado por la Fundación Caja el Monte.

ABSTRACT

NAVARRO CERRILLO R. M^a, I. JORGE, D. ARIZA, C. PORRAS, J. JORRIN. 2007. Phosphonate phytotoxicity in saplings of *Quercus ilex*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 33: 111-120.

Phosphonate is a foliar fertilizer which has been successfully used in the control of *P. cinnamomi* in several forest species. Although phosphonates are considered to have a low toxicity level, lesion symptoms in several species using different application methods have been observed. In this work, phosphonate phytotoxicity was studied in saplings of *Quercus ilex*. Chlorophyll fluorescence and phosphonate and phenol concentration were evaluated in leaf and root tissues at two concentrations of phosphonate, 10, and 15 g l⁻¹. The plants showed visual phytotoxicity symptoms at a concentration of 15 g l⁻¹ of phosphonate, with apical necroses at 12-13 days after the treatment. However, the values of the Fv/Fm ratio and the photosynthetic efficiency (PHIE₀) did not reveal any significant differences between measurements.

Phosphonates concentration in root and leaf was increased as the foliar application concentrations did. The level of phenolic compounds was always higher in leaf than in root, with significant differences being observed in root at 14 days for the treatment of 10 g l⁻¹ of phosphonate. This work showed that the defence systems associated with phenolic compounds were activated after 7 days of treatment with phosphonate.

Palabras clave: *Phytophthora cinnamomi*, treatments, application methods.

REFERENCIAS

- ABERTON, M. J.; WILSON, B. A.; CAHILL, D. M. 1999. The use of potassium phosphonate to control *Phytophthora cinnamomi* in native vegetation at Anglesca, Victoria. *Australasian Plant Pathology*, 28: 225-234.
- BARRETT, S. R., SHEARER, B. L., HARDY, G. E. 2003. The efficacy of phosphite applied after inoculation on the colonisation of *Banksia brownii* stems by *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology*, Vol. 32, (1):1-7.
- BRASIER, C. M., ROBREDO, F., FERRAZ, J. F. P., 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, 42: 140-145.
- CANDELA, M. E., ALCÁZAR, M. D., ESPIN, A., EGEA, C., ALMELA L., 1995. Soluble phenolic acids in *Cap-sicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, 44: 116-123.
- CAHILL, D. M.; BENNETT, I. J.; MCCOMB, J. A. 1993. Mechanism of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathology*, 42: 865-872.
- CANDELA, M. E., ALCÁZAR, M. D., ESPIN, A., EGEA, C., ALMELA L., 1995. Soluble phenolic acids in *Cap-sicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, 44: 116-123.
- DUNHILL, R. H. 1990. The manufacture and properties of phosphonic (phosphorous) acid. *Australasian Plant Pathology*, 19: 138-139.
- FAIRBANKS, M., HARDY, G., MCCOMB, J. A. 2000. Comparisons of phosphite concentrations in *Corymba (Eucalyptus) calophylla* tissues after spray, mist or soil drench applications with the fungicide phosphite. *Australasian Plant Pathology*, 29: 96-101.
- FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R., GALLEGU, F. J., BENLLOCH, M., MEMBRILLO, J., INFANTE, J., PÉREZ DE ALGABA, A., 1999. Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials. *Eur. J For Pathol.*, 29: 29-38.
- GARCÍA, F., POZO, J. D. 1993. Ensayo de eficacia de un fungicida y un abono foliar para el control de "seca de la encina". Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Comercio. Junta de Extremadura. 10 pp.
- GUEST, D. I., GRANT, B. R., 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Review*, 66: 159-87.
- HARDY, G. E., BARRETT, S. R., SHEARER, B. L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soil-borne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, Vol. 30, (2): 133-139.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, A. I. 1959. The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347, Berkeley, 1950. 32 pages.
- JACKSON TJ, BURGESS T, COLQUHOUN I, HARDY GE. 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol.*, 49: 147-154
- LEONARDI, J., WHILEY, A.W.: 1999. Progress on the use of foliar applications of phosphonate for the control of *Phytophthora* root rot in avocados. *Talking avocados*, 10: 18-21.
- LÓPEZ-VALBUENA R. 1980. Efectos del mildiu (*Plasmo-para halstedii*) en el metabolismo de compuestos fenólicos en girasol. Tesis Doctoral. UCO. Córdoba, España
- NAVARRO CERRILLO, R M; GALLO, L.; SÁNCHEZ, E.; TRAPERU, A.; FERNÁNDEZ, P. 2004. Efecto de distintas fertilizaciones de fósforo en la resistencia de brinzales de encina y alcornoque a *Phytophthora cinnamomi*.

- mi Rands. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales*, Vol. 13 (3): 550-557.
- NAVARRO CERRILLO, R M; TERÁN BOCERO, A. 2006. Acción preventiva y curativa del fosfonato en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands en encina y alcornoque. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 685-694.
- NEMESTOTHY, G. S.; GUEST, D. I. 1990. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susc eptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36: 207-219.
- PÉREZ DE ALGABA, A., CABEZUELO, P., FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, J. 1990. La "seca de la encina". Experiencia con *Phytophthora cinnamomi* y *Trichoderma harzianum* en distintos tipos de suelo. Sección de Sanidad Vegetal. Delegación Prov. De Agricultura y Pesca (Córdoba). Junta de Andalucía. 15 pp.
- PILBEAM, R. A.; COLQUHOUN, I. J.; SHEARER, B.; HARDY, G. E. 2000. Phosphite concentration: its effect on phytotoxicity symptoms and colonisation by *Phytophthora cinnamomi* in three understory species of *Eucalyptus marginata* forests. *Australasian Plant Pathology*, 29: 86-95.
- PRATS E. 2001. Importancia de las cumarinas y otros compuestos fenólicos en la defensa del girasol frente a patógenos. Tesis Doctoral. UCO. Córdoba, España
- ROOS G. H. P., LOANE C. DELL B, HARDY G. E. 1999. Facile high performance ion chromatographic analysis of phosphite and phosphate in plant samples. *Communicat. Soil Sci. Plant Anal.* 30: 17-18
- RUPÉREZ, A., MUÑOZ, M. 1980. Grave enfermedad de las encinas. *Bol. San. Veg. Plagas*, 6: 107-108.
- SÁNCHEZ, M. E., SÁNCHEZ, J. E., NAVARRO, R. M.; FERNÁNDEZ, P.; TRAPERO, A. 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 87-108.
- SMITH, I. M., DUNEZ, J., LELLIOTT, R. A., PHILLIPS, D. H., ARCHER, S. A. 1992. Manual de Enfermedades de las Plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 671 pp.
- STRASSER, R., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. En: M. Junus, U. Parte y P. Mohantray (eds.), *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. 445-483 pp.
- TUSET, J., HINAREJOS, C., MIRA, J., COBOS, J. 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques. *Bol. San. Veg. Plagas*, 22: 491-499.
- TYNAN, K.M., WILKINSON, C.J., HOLMES, J.M., DELL, B., COLQUHOUN, I., MCCOMB, J.A., HARDY, G.E. 2001. The long-term ability of phosphite to control *Phytophthora cinnamomi* in two native plant communities of Western Australia. *Australian Journal of Botany*, Vol. 49, (6): 761-770.
- WILKINSON, C. J., HOLMES, J. M., TYNAN, K. M., COLQUHOUN, I., MCCOMB, J. A. HARDY, G. E., DELL, B. 2001. Ability of phosphite applied in a glasshouse trial to control *Phytophthora cinnamomi* in five plant species native to Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, Vol. 30, (4): 343-351.

(Recepción: 8 noviembre 2006)

(Aceptación: 18 enero 2007)