

Control de la podredumbre radical de encinas mediante fertilizantes inorgánicos II: efecto *in vitro* del Ca y el K en la capacidad infectiva de *Phytophthora cinnamomi*

M. S. SERRANO, P. DE VITA, P. FERNÁNDEZ-REBOLLO, M. E. SÁNCHEZ

Se ha estudiado el efecto *in vitro* de varios productos de calcio y potasio (CaO, CaCO₃, CaCl₂, Ca(NO₃)₂, CaSO₄, KIO₃, KNO₃, K₂SO₄, KCl y KOH) sobre el crecimiento micelial, la producción de esporangios y clamidosporas y la germinación de esporangios (producción de zoosporas) de *Phytophthora cinnamomi*, principal agente biológico causante de la podredumbre radical que afecta a las encinas que crecen en las dehesas del sur de la Península Ibérica. Aunque ninguno de los productos a valores de pH \approx 6 inhibió el crecimiento micelial del patógeno, el CaO, CaCO₃, CaSO₄, KOH y KIO₃ inhibieron de forma muy efectiva la producción de esporangios, y por tanto, serían capaces de disminuir o incluso anular la producción de zoosporas infectivas, si bien no resultan tan efectivos en la inhibición de la germinación de esporangios ya formados. El CaO, CaCO₃, K₂SO₄ y CaCl₂ además inhibieron eficazmente la producción de clamidosporas. La aplicación de enmiendas calizas (CaO y CaCO₃ fundamentalmente, y también CaSO₄) a los suelos de dehesas infestados por el patógeno, por su elevada capacidad de inhibición de la producción de esporangios y clamidosporas, podrían constituir un tratamiento efectivo para el control de la enfermedad radical, limitando o impidiendo nuevas infecciones de las encinas ya establecidas o evitando la infección radical de los plantones en las repoblaciones de dehesas afectadas por la enfermedad.

M. S. SERRANO, P. DE VITA, M. E. SÁNCHEZ. Dpto. Agronomía (Patología Agroforestal), Universidad de Córdoba. aglsahem@uco.es
P. FERNÁNDEZ-REBOLLO. Dpto. Ingeniería Forestal, Universidad de Córdoba.

Palabras clave: decaimiento, dehesa, *Q. ilex* subsp. *ballota*.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora cinnamomi es el principal causante de la podredumbre radical que afecta a encinas y alcornoques en las dehesas del suroeste de la Península Ibérica (BRASIER *et al.*, 1993; BRASIER, 1996; SÁNCHEZ *et al.*, 2002; 2003). Este patógeno de suelo causa la muerte masiva de las raicillas absorbentes, reduciendo la capacidad del árbol para absorber agua y nutrientes (SÁNCHEZ *et al.*, 2002).

El microorganismo se encuentra en el suelo en forma de estructuras de resis-

cia (clamidosporas) capaces de subsistir durante un tiempo relativamente amplio como propágulos en latencia (SÁNCHEZ *et al.*, 2002; 2003; 2006; ROMERO *et al.*, 2007). Estas esporas germinan produciendo esporangios, que a su vez germinan emitiendo zoosporas móviles. Este proceso de germinación tiene lugar cuando hay humedad en el suelo y su temperatura es relativamente alta (\geq 25 °C), favoreciéndose además en suelos ácidos (ERWIN y RIBEIRO, 1996). La existencia de agua libre en el suelo facilita la dispersión de las zoosporas flageladas, desplazándose activa-

mente por la película de agua que rodea las partículas del suelo, siendo entonces atraídas químicamente por los exudados radicales de las plantas susceptibles. Cuando infecta al huésped, el patógeno desarrolla su micelio en el interior de las raíces y se multiplica rápidamente en sucesivos ciclos de producción de esporangios y emisión de zoosporas, dando lugar a un aumento de su población mientras se mantienen las condiciones de saturación hídrica del suelo (ERWIN y RIBEIRO, 1996). Tras la colonización y muerte de las raíces o cuando las condiciones ambientales no son favorables, el patógeno forma nuevas esporas de supervivencia (clamidosporas) que quedan en el suelo como estructuras de resistencia (ERWIN y RIBEIRO, 1996; ROMERO *et al.*, 2007). Con estas premisas, los métodos de control que sean capaces de limitar la capacidad infectiva del patógeno, actuando sobre la germinación de las clamidosporas, la producción de esporangios y/o la germinación de los mismos, pueden resultar efectivos en la prevención de la enfermedad radical causada por *P. cinnamomi* en encinas y alcornoques, disminuyendo la producción de las zoosporas capaces de infectar las raíces.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto *in vitro* que distintos compuestos de calcio y potasio tienen sobre la capacidad infectiva de *P. cinnamomi* mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento micelial y de la producción de clamidosporas y esporangios y germinación de estos últimos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos aislados de *P. cinnamomi* de la colección fúngica del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba: PE90 y PA25, cada uno de ellos perteneciente a uno de los grupos genéticos descritos para los aislados de *P. cinnamomi* de *Quercus* en el sur de la Península Ibérica (CAETANO *et al.*, 2009).

Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial

Se evaluaron distintas formulaciones de calcio (óxido, nitrato, carbonato, cloruro y sulfato) y de potasio (hidróxido, nitrato, cloruro, iodato y sulfato) para cuantificar su capacidad de inhibición del crecimiento micelial de *P. cinnamomi* en el medio de cultivo genérico Corn Meal Agar (CMA, 17 g x L⁻¹). Las concentraciones ensayadas fueron: 0, 50, 150, 300 y 600 ppm de ión Ca²⁺ o K⁺.

Para cada formulación se preparó una solución madre a 3.000 ppm, de donde se obtuvieron las demás concentraciones por diluciones consecutivas. Los diferentes medios de cultivo se obtuvieron a partir de medio CMA al que, cuando aún estaba templado y fundido, se le añadieron las diferentes soluciones de calcio o potasio. A cada uno de los medios de cultivo así obtenidos se le midió el pH mediante un pHmetro (CRISON, GLP21) y, posteriormente se vertieron en placas de Petri de 9 cm de diámetro y se dejaron enfriar. Las placas con CMA y concentración cero de iones se usaron como control.

En el centro de las placas se colocaron discos de agar de 6 mm de diámetro de cada uno de los dos aislados de *P. cinnamomi* crecidos durante 4 días en medio de cultivo CA (Agar-Zanahoria) (DHINGRA y SINCLAR, 1995), en oscuridad a 22 °C. Se prepararon tres repeticiones (placas) para cada uno de los aislados, compuestos y concentraciones ensayadas. Todas las placas, incluidas las control, se incubaron en cámara de cultivo a 25 °C en oscuridad. Diariamente se midió el crecimiento radial de las colonias, hasta que las colonias del testigo o de alguno de los tratamientos ocuparon toda la placa de Petri.

Aquellas formulaciones que variaron sustancialmente el pH del medio de cultivo, se ensayaron también neutralizando el medio mediante la adición de ácido láctico hasta que el pH era similar al del testigo (CMA).

Inhibición *in vitro* de la producción de esporangios y clamidosporas

Se evaluaron las mismas formulaciones del ensayo anterior (óxido, nitrato, carbonato, cloruro y sulfato cálcico e hidróxido, nitrato, cloruro, iodato y sulfato potásico) para cuantificar su efecto sobre la producción de esporangios y clamidosporas de los aislados PE90 y PA25. Las concentraciones de ión calcio y potasio en este experimento fueron 600 ppm de Ca^{2+} y 50 ppm de K^{+} , lo que corresponde a los valores habituales de fertilización cálcica o potásica que se aplican en dehesas (FERNÁNDEZ-REBOLLO y CARBONERO, 2008).

Para estimular la producción de esporangios se preparó un extracto acuoso de suelo (RIBEIRO, 1978), con un contenido inicial en Ca^{2+} de cambio de $37,91 \text{ meq} \times \text{kg}^{-1}$ y un contenido en K^{+} de cambio de $2,8 \text{ meq} \times \text{kg}^{-1}$. Al extracto obtenido se le añadieron los diferentes compuestos de calcio o potasio a la dosis seleccionada. A todos los extractos de suelo se les midió el pH con el mismo pHmetro que en el ensayo anterior. Para comprobar que la microflora del extracto de suelo, que estimula la producción de esporangios, continuaba viva, se sembraron alícuotas de $300 \mu\text{l}$ de cada extracto de suelo con su correspondiente compuesto de calcio o potasio, en placas de Petri de 6 cm de diámetro con un medio de cultivo genérico para hongos y bacterias, PDA (Patata-Dextrosa-Agar) (DHINGRA y SINCLAR, 1995) y un medio de cultivo genérico para bacterias, NBY (Nutrient Broth Yeast Extract) (WELLER *et al.*, 1984).

Los dos aislados se hicieron crecer separadamente durante 4 días en oscuridad a $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en el medio de cultivo PA (Agar-Guisante) al 20% (TRIONE, 1974). Posteriormente, se transfirieron discos de 6 mm de diámetro a placas de Petri de 6 cm de diámetro vacías y se vertieron en estas placas los extractos de suelo previamente preparados, hasta el margen de los discos (CAETANO, 2007). Se prepararon cuatro repeticiones (placas) por producto y aislado. Estas placas se incubaron en luz constante a $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que alcanzaron la máxima producción de esporangios, a las 50

h del comienzo del ensayo para el aislado PE90 y a las 55 h para el aislado PA25. Trascurrido este tiempo, se determinó la producción de esporangios y clamidosporas mediante observación directa al microscopio invertido y conteo de estructuras maduras.

Inhibición *in vitro* de la germinación de esporangios

Se evaluaron las mismas formulaciones y concentraciones del experimento anterior para los aislados de *P. cinnamomi* PE90 y PA25. La capacidad germinativa de los esporangios se determinó mediante la cuantificación de la producción de zoosporas. Para estimular la producción de esporangios, se transfirió a placas de Petri de 6 cm de diámetro el micelio aéreo de cada uno de los dos aislados producido tras 3 días de incubación en oscuridad a $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio de cultivo CA (Agar-Zanahoria al 20%, ERWIN y RIBEIRO, 1996) en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Después, se vertió en estas placas extracto de guisante (TRIONE, 1974). Estas placas se incubaron en oscuridad a $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 días. El micelio formado, ya con esporangios maduros, se transfirió a placas de Petri de 6 cm de diámetro con los extractos de suelo previamente preparados con los diferentes compuestos de calcio y potasio y el extracto de suelo sin ningún producto (testigo), siguiendo la misma metodología que en el apartado anterior. Se realizaron tres repeticiones para cada compuesto y aislado. Las placas se sometieron a un choque frío ($4\text{-}5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 min y vuelta a temperatura ambiente ($22 \text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 2 h, para estimular la germinación de los esporangios y la liberación de zoosporas (RIBEIRO, 1978). Se cuantificó la producción de zoosporas mediante conteo en cámara Neubauer de alícuotas del extracto de suelo.

Análisis de datos

Para cada experimento, los valores obtenidos se refirieron a los correspondientes tes-

tigos sin compuestos de Ca o K (testigos) y se expresaron como porcentaje de inhibición (o en su caso, estimulación) del crecimiento micelial, de la producción de esporangios, de la producción de clamidosporas y de la germinación de esporangios (producción de zoosporas). Los datos se analizaron mediante un ANOVA mediante el programa Statistix (Analytical Software, Tallase, USA).

RESULTADOS

Inhibición del crecimiento micelial

El ensayo terminó a los 3 días, cuando las colonias de algún tratamiento o el testigo, ocuparon toda la placa. Los dos aislados de *P. cinnamomi* (PA25 y PE90) mostraron diferencias significativas entre sí en cuanto a su tasa de crecimiento, pero la interacción aislados por productos no resultó significativa, por lo que el efecto de los productos evaluados fue similar para ambos aislados. Los porcentajes de inhibición calculados con respecto a cada uno de los dos testigos no difirieron entre sí, por lo que los datos que se muestran a continuación corresponden a valores medios de inhibición para ambos aislados.

Las diferencias observadas en los pHs de los distintos medios respecto del pH del medio testigo (pH=5,86) fueron muy marcadas para el CaO y el KOH, llegando a alcanzar a las concentraciones más altas valores de pH de hasta cuatro puntos por encima del testigo (Cuadro 1). Al neutralizar el medio de

estos dos productos con ácido láctico se obtuvieron valores de pH similares al testigo.

Los valores medios de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los diferentes compuestos de calcio y potasio aparecen en la Figura 1. Se observó un gradiente de inhibición del crecimiento micelial a medida que aumenta la concentración de producto en el medio. Considerando como efectivos los compuestos capaces de inhibir el crecimiento micelial al menos en un 50%, solamente el CaO y el KOH cumplen esta premisa a concentraciones elevadas (300 y 600 ppm). Sin embargo, cuando se neutraliza el medio, se obtienen porcentajes de inhibición muy bajos en el caso del CaO neutralizado y algo mayores, aunque no por encima del 50%, para el KOH neutralizado (Figura 1).

Inhibición de la producción de esporangios y clamidosporas

En las placas con medios PDA y NBY sembradas con alícuotas de los extractos de suelo con compuestos de calcio o potasio, se observó el crecimiento de colonias de hongos y bacterias respectivamente, por lo que se comprobó que la microflora del extracto de suelo continuaba viva en todos los casos. Los valores de pH de los distintos extractos de suelo con los productos de calcio y potasio aparecen en el Cuadro 2.

Los dos aislados de *P. cinnamomi* (PA25 y PE90) mostraron diferencias significativas entre sí en la producción de esporangios y

Cuadro 1. pH de los medios CMA tras la adición de los distintos productos de calcio y potasio a las concentraciones ensayadas

Concentración (ppm)	CaO	Ca(NO ₃) ₂	CaCO ₃	CaCl ₂	CaSO ₄	KOH	KNO ₃	KCl	KIO ₃	K ₂ SO ₄
50	8,31	5,71	6,60	5,79	5,88	7,49	5,86	5,79	5,83	5,86
150	10,44	5,65	6,50	5,66	5,88	10,17	5,75	5,77	5,84	5,87
300	11,45	5,59	6,75	5,59	5,72	11,22	5,76	5,75	5,73	5,93
600	11,94	5,41	6,86	5,55	5,70	11,76	5,74	5,61	5,60	6,08

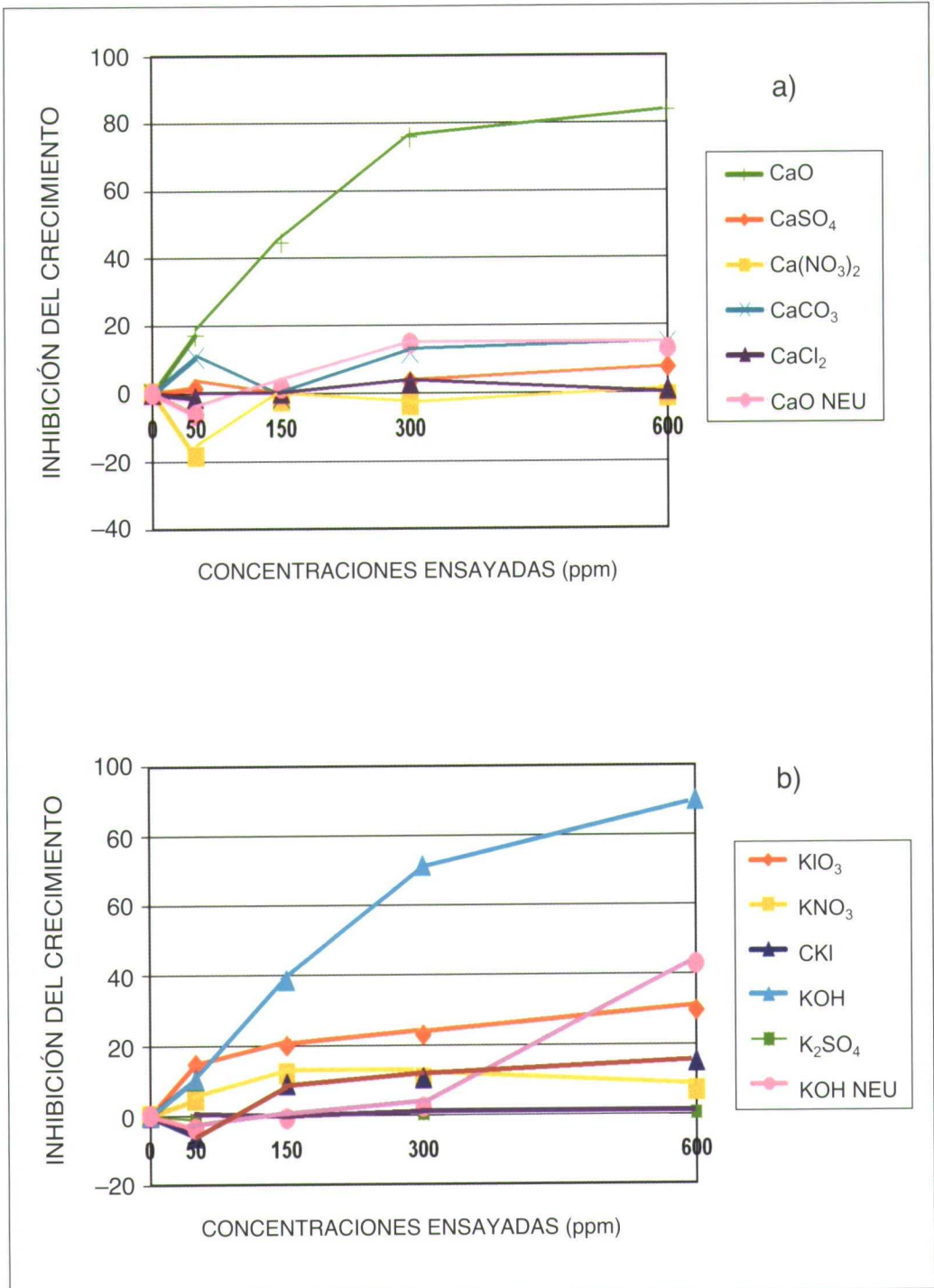


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. cinnamomi* para los diferentes compuestos de calcio (a) y potasio (b) a las distintas concentraciones ensayadas

Cuadro 2. pH de los distintos extractos de suelo ensayados a las concentraciones de 600 ppm para los compuestos de calcio y 50 ppm para los de potasio

Testigo	CaO	Ca(NO ₃) ₂	CaCO ₃	CaCl ₂	CaSO ₄	KOH	KNO ₃	KCl	KIO ₃	K ₂ SO ₄
6,3	12,2	7,37	8,48	6,20	6,35	10,2	8,2	6,8	6,6	6,7

clamidosporas, pero el efecto de los distintos compuestos de calcio y potasio respecto del testigo fue similar para los dos aislados, no apareciendo diferencias significativas en la interacción aislado por compuesto para la inhibición/estimulación de la producción de esporangios y tampoco para la inhibición/estimulación de la producción de clamidosporas.

La Figura 2 muestra los valores medios para ambos aislados del porcentaje de inhibición o estimulación de la producción de esporangios inducida por los distintos productos de calcio y potasio ensayados. Los extractos de suelo con CaO y CaCO₃ inhibieron la producción de esporangios casi al

100%. Considerando como eficaces a aquellos compuestos capaces de inhibir la producción de esporangios en al menos el 50%, además de los ya citados, el KOH, KIO₃ y CaSO₄ también resultaron efectivos. El porcentaje medio de inhibición de los compuestos CaCl₂, KCl y K₂SO₄ fue menor del 50%. Por otra parte, los nitratos de calcio y potasio estimularon la producción de esporangios, llegando incluso a un factor de estimulación del 1,9 en el caso del KNO₃.

Respecto a la producción de clamidosporas (Figura 3), de nuevo el CaO resultó el compuesto más eficaz, con una inhibición del 100%. Siguiendo el mismo criterio que en los experimentos anteriores, resultaron eficaces

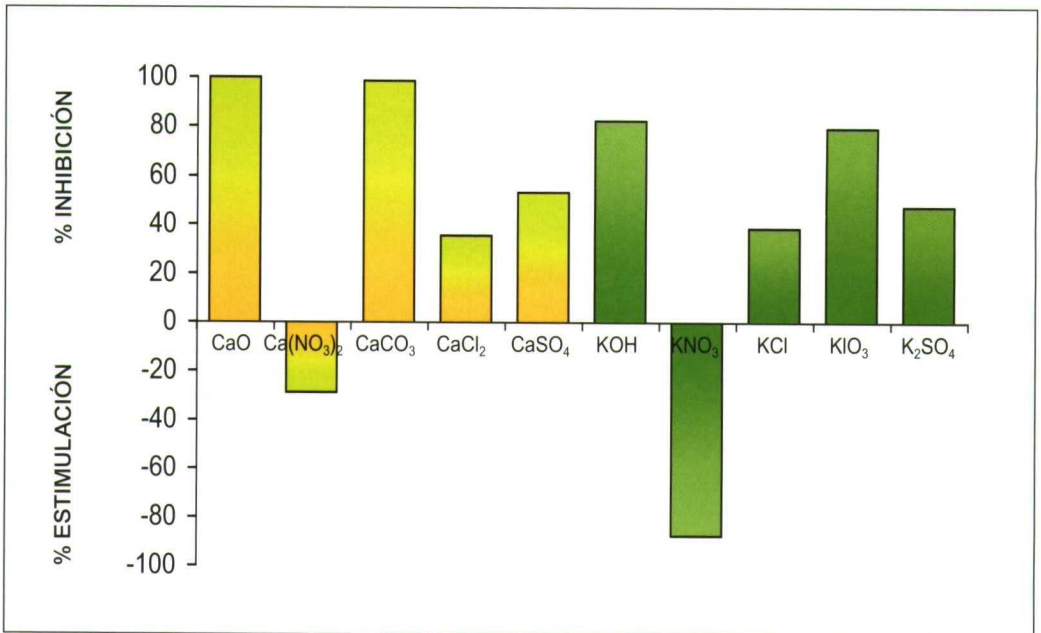


Figura 2. Porcentaje de inhibición de la producción de esporangios de *P. cinnamomi* para cada uno de los compuestos de calcio y potasio ensayados

el CaCO_3 , K_2SO_4 y CaCl_2 , con un porcentaje de inhibición mayor del 50%. El resto de los compuestos no resultaron efectivos e incluso KOH y KIO_3 estimularon la formación de clamidosporas, con un factor de estimulación de 2,0 y 1,3 respectivamente.

Inhibición de la germinación de esporangios (producción de zoosporas)

En valores absolutos, el aislado PE90 mostró una tasa de germinación de sus esporangios significativamente mayor que el PA25, sin embargo el efecto de los productos cálcicos y potásicos respecto del testigo fue similar para ambos aislados. Por lo tanto, en el porcentaje de inhibición de la germinación de esporangios no se observaron diferencias significativas entre los dos aislados.

El porcentaje de inhibición de la germinación de esporangios de los diferentes compuestos de calcio y potasio ensayados para

ambos aislados aparece en la Figura 4. El CaCl_2 resultó claramente eficaz, con un porcentaje de inhibición de la germinación de esporangios (producción de zoosporas) mayor del 80%. El resto de los compuestos no resultaron efectivos, aunque el CaO y CaSO_4 produjeron porcentajes de inhibición cercanos al 50%. Cabe destacar que ninguno de los productos ensayados estimuló la germinación de los esporangios de *P. cinnamomi*.

DISCUSIÓN

Se han llevado a cabo distintos estudios que relacionan el efecto que el calcio y el potasio tienen sobre el crecimiento micelial de diversas especies de *Phytophthora*. Para *Phytophthora nicotianae* el óxido, el propanoato y el carbonato cálcico reducen el crecimiento del patógeno (CAMPANELLA *et al.*, 2002). Para el patosistema *Phytophthora sojae*-soja, se ha demostrado que el KNO_3 y el CaCl_2 son eficaces para disminuir el cre-

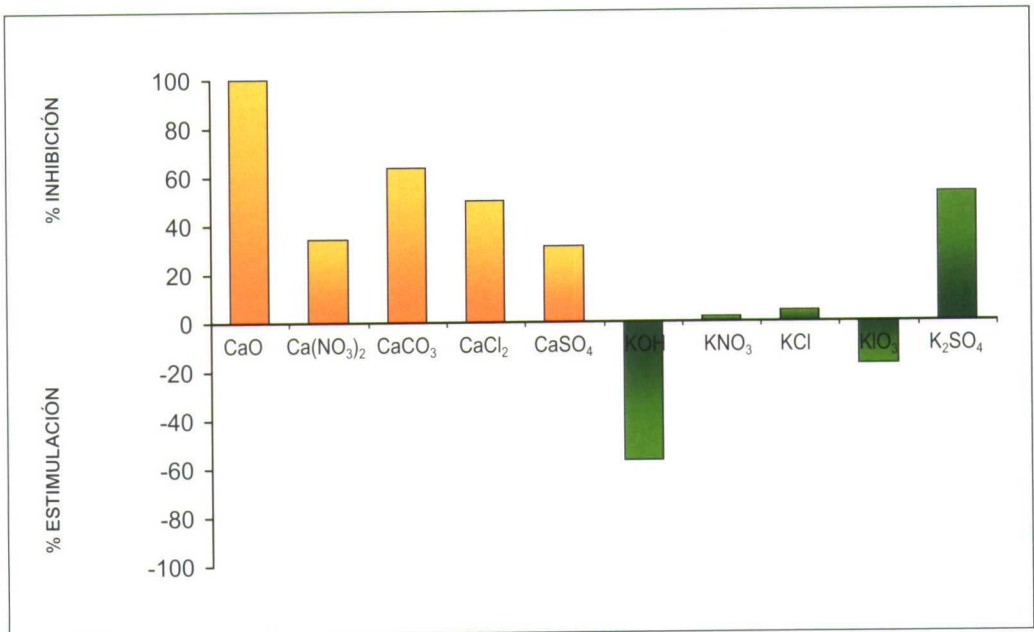


Figura 3. Porcentaje de inhibición de la producción de clamidosporas de *P. cinnamomi* para cada uno de los compuestos de calcio y potasio ensayados

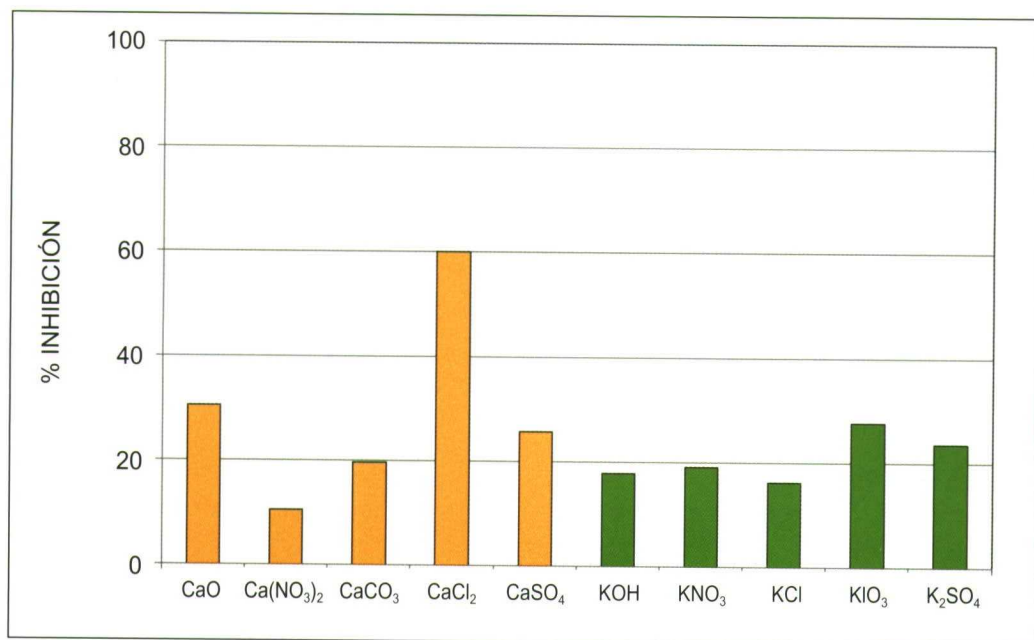


Figura 4. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporangios (producción de zoosporas) de *P. cinnamomi* para cada uno de los compuestos de calcio y potasio ensayados.

cimiento micelial de *P. sojae*, inhibiendo además la infección del huésped (SUGIMOTO *et al.*, 2005). Según nuestros resultados, el efecto inhibitorio del CaO y el KOH sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi* se puede deber más al efecto del aumento del pH del medio que al del propio ión Ca²⁺ o K⁺. Además algunos de los productos ensayados (CaCl₂, KCl, K₂SO₄ y CaO y KOH neutralizados a bajas concentraciones, y Ca(NO₃)₂ a cualquier concentración) estimulan el crecimiento micelial, lo que concuerda con otros trabajos realizados por HALSALL y FORRESTER (1977), DUVENHAGE y KOTZÉ (1991) y DUVENHAGE *et al.* (1992). No obstante la capacidad de *P. cinnamomi* para producir enfermedad no depende del crecimiento saprofítico del patógeno, sino de su capacidad infectiva vía zoosporas (ERWIN y RIBEIRO, 1996).

En *P. nicotianae* el óxido y el propionato cálcico disminuyen la producción de zoosporas (CAMPANELLA *et al.*, 2002). Para *P. cinnamomi* hemos comprobado que esta dis-

minución mediada por el óxido de calcio se debe más bien a la inhibición de la producción de esporangios que a un efecto directo sobre su germinación. Según VON BROEMSEN y DEACON (1997), el CaCl₂ reduce significativamente la liberación de esporas infectivas de *Phytophthora parasitica*, a pesar de que genera una mayor producción de esporangios. Nuestros resultados indican el mismo efecto del CaCl₂ en *P. cinnamomi* inhibiendo la liberación de zoosporas y además, al contrario de lo observado para *P. parasitica*, también inhibe la producción de esporangios, aunque esta inhibición no llega al 50%. En el caso de *P. sojae*, concentraciones bajas (0,4-10 mM) de CaCl₂ y Ca(NO₃)₂ en el medio inducen la liberación de zoosporas, mientras que concentraciones mayores (20-30 mM) la inhiben significativamente (SUGIMOTO *et al.*, 2005). En estudios realizados con *Aphanomyces*, la aplicación de CaCl₂ o Ca(NO₃)₂ al medio de cultivo disminuye la concentración de zoosporas, aunque producen un incremento del cre-

cimiento micelial. También las soluciones saturadas de CaCO_3 y CaSO_4 eliminan prácticamente la producción de zoosporas, pero no la producción de micelio (HEYMAN *et al.*, 2007).

En cuanto al efecto estimulador de la producción de esporangios de *P. cinnamomi* producido por los nitratos cálcico y potásico, VON BROEMSEN y DEACON (1997) observaron que para *P. parasitica*, a pesar de que el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ genera una mayor producción de esporangios, reduce significativamente la movilidad de las zoosporas, produciendo un rápido enquistamiento de las mismas al liberarse de los esporangios y por tanto, las desactiva como estructuras infectivas. Aunque este punto no ha sido estudiado en el presente trabajo, es una cuestión a considerar.

En cuanto a la producción de clamidosporas, no se han encontrado referencias en la literatura consultada. Nuestros resultados indican que el CaO es muy eficaz, inhibiendo su producción al 100%, aunque también resultaron eficaces el CaCO_3 , K_2SO_4 y CaCl_2 . Por el contrario, el KOH y el KIO_3 estimularon la formación de clamidosporas.

De todo lo expuesto podemos concluir que el CaO , CaCO_3 , CaSO_4 , KOH y KIO_3 son compuestos que inhiben de forma efectiva la producción de esporangios de *P. cinnamomi*, y como consecuencia, capaces de anular o en cualquier caso disminuir la producción de zoosporas infectivas. Los porcentajes de inhibición alcanzados por el CaO y el CaCO_3 (100%) limitarían por completo la capacidad del microorganismo para producir estas estructuras de reproduc-

ción asexual, por lo que no sería posible la formación y liberación de zoosporas infectivas para la raíz de las encinas en dehesas. Sin embargo, la producción de zoosporas de *P. cinnamomi* a partir de los esporangios previamente formados sólo se ve inhibida de forma efectiva por el CaCl_2 , producto que, si bien también inhibe la producción de esporangios, no lo hace en porcentajes que podamos considerar efectivos. Además, el CaO y el CaCO_3 también inhiben la producción de las esporas de resistencia en el suelo, las clamidosporas. Estos resultados sugieren que la aplicación de enmiendas calizas (CaO y CaCO_3 fundamentalmente, aunque también hay que considerar al CaSO_4) a los suelos de dehesas infestados por el patógeno puede ser una vía a considerar como un tratamiento efectivo para el control de la enfermedad radical. Las enmiendas calizas pueden impedir o limitar nuevas infecciones de las raíces de las encinas ya establecidas o, aplicándolas al hoyo de plantación, evitar la infección radical de los plantones con los que se intenta repoblar los oquedales generados por la muerte de encinas debido a la podredumbre radical causada por *P. cinnamomi* en las dehesas andaluzas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto AGL2009-00530) y la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

ABSTRACT

SERRANO, M. S., P. DE VITA, P. FERNÁNDEZ-REBOLLO, M. E. SÁNCHEZ. 2011. Control of the root rot of holm oaks by inorganic amendments II: effect *in vitro* of Ca and K in the infectivity of *Phytophthora cinnamomi*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 37: 109-118.

Phytophthora cinnamomi is the main biological agent that causes root rot affecting holm oak growing in rangelands at the south of the Iberian Peninsula. We studied the *in vitro* effectiveness of several calcium and potassium products (CaO , CaCO_3 , CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaSO_4 , KIO_3 , KNO_3 , K_2SO_4 , KCl and KOH) on *Phytophthora cinnamomi* mycelial growth, sporangial and chlamydospore production and sporangial germination (production of zoospores). Although none of the products inhibited the mycelial growth at $\text{pH} \approx 6$, CaO , CaCO_3 , CaSO_4 , KOH and KIO_3 were very effective for inhibition of

sporangial production and, therefore, they would be able to reduce or even avoid production of infective zoospores, since do not resulted effective in the inhibition of sporangial germination. CaO, CaCO₃, CaCl₂ and K₂SO₄ also effectively inhibited chlamydospore production. Because of its high capacity to inhibit the production of sporangia and chlamydospores, limestone amendments (mainly CaO and CaCO₃, and CaSO₄) to soils infested by the pathogen, may constitute an effective treatment for control the root disease, limiting or preventing new infections of established oaks or preventing root infections of seedlings in the forestation of *dehesas* affected by the disease.

Key words: Decline, *Q. ilex* subsp. *ballota*, rangelands.

REFERENCIAS

- BRASIER, C. M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. Sci. For.*, **53**: 347-358.
- BRASIER, C. M., ROBREDO, F., FERRAZ, J. F. P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathol.*, **42**: 140-145.
- CAETANO, P. C. L. 2007. *Envolvimento de Phytophthora cinnamomi no declínio de Quercus suber e Q. rotundifolia: estudo de influência de factores bióticos e abióticos na progressão da doença. Possibilidades de controlo químico do declínio*. Tesis Doctoral. Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve. Faro, Portugal.
- CAETANO, P., ÁVILA, A., SÁNCHEZ, M. E., TRAPER, A., COELHO, A. C. 2009. *Phytophthora cinnamomi* populations in *Quercus* forests from Spain and Portugal. En: *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*. USDA-Forest Service. General Technical Report PSW-GTR-221: 261-269.
- CAMPANELLA, V., IPPOLITO, A., NIGRO, F. 2002. Activity of calcium salts in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. *Crop Protect.*, **21**: 751-756.
- DHINGRA, O. D., SINCLAR, J. B. 1995. *Basic plant pathology methods*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press.
- DUVENHAGE, J. A., KOTZÉ, J. M. 1991. The influence of calcium on saprophytic growth and pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* and on resistance of avocado to root rot. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, **14**: 13-14.
- DUVENHAGE, J. A., KOTZÉ, J. M., MAAS, E. M. C. 1992. The influence of nitrogen and calcium on mycelial growth and disease severity of *Phytophthora cinnamomi* and the effect of calcium on resistance of avocado to root rot. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, **15**: 12-14.
- ERWIN, D. C., RIBEIRO, O. K. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, MN.
- FERNÁNDEZ REBOLLO, P., CARBONERO, M. D. 2008. La dehesa como hábitat natural para el Cerdo Ibérico. En: Forero, J (ed). *El Cerdo Ibérico. Una revisión transversal*. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía-Fundación Caja Rural del Sur: 103-133.
- HALSALL, D. M., FORRESTER, R. I. 1977. Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora* zoospores. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium and iron ions. *Can. J. Microbiol.*, **23**: 994-1001.
- HEYMAN, F., LINDAHL, B., PERSSON, L., WIKSTRÖM, M., STENLID, J. 2007. Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. *Soil Biol. Biochem.*, **39**: 2.222- 2.229.
- RIBEIRO, O. K. 1978. *A sourcebook of the genus Phytophthora*. Vaduz, J Cramer.
- ROMERO, M. A., SÁNCHEZ, J. E., JIMÉNEZ, J. J., BELBAHRI, L., TRAPER, A., LEFORT, F., SÁNCHEZ, M. E. 2007. New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. *J. Phytopathol.*, **155**: 289-295.
- SÁNCHEZ, M. E., CAETANO, P., FERRAZ, J., TRAPER, A. 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. *For. Pathol.*, **32**: 5-18.
- SÁNCHEZ, M. E., SÁNCHEZ, J. E., NAVARRO, R. M., FERNÁNDEZ, P., TRAPER, A. 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 87-108.
- SÁNCHEZ, M. E., CAETANO, P., ROMERO, M. A., NAVARRO, R. M., TRAPER, A. 2006. *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. En: *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. Brasier C, Jung T, Oßwald W (Eds). Farnham, UK: 149-154.
- SUGIMOTO, T., AINO, M., SUGIMOTO, M., WATANABE, K. 2005. Reduction of *Phytophthora* stem rot disease on soybeans by the application of CaCl₂ and Ca(NO₃)₂. *J. Phytopathol.* **153**: 536-543.
- TRIONE, E. J. 1974. Sporulation and Germination of *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology*, **64**: 1.531-1.533.
- VON BROEMSEN, S. L., DEACON, J. W. 1997. Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solution. *Phytopathology*, **87**: 522- 528.
- WELLER, D. M., COOK, R. J., WILKINSON, H. T. 1984. Methods for screening bacteria and application thereof for field control of diseases caused by *Gaeumannomyces graminis*. *U. S. patent*, 4: 456.684.

(Recepción: 15 octubre 2010)

(Aceptación: 28 febrero 2011)