

El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva

M. E. SÁNCHEZ, P. CAETANO, J. FERRAZ y A. TRAPERO

Durante dos años se ha estudiado la evolución del decaimiento de encinas en tres dehesas de la comarca del Andévalo (Huelva). Se ha observado tanto el síndrome de muerte lenta como el de muerte súbita, con una sintomatología aérea inespecífica asociada a la podredumbre del sistema radical. La caracterización de los aislados fúngicos obtenidos a partir de las raíces necrosadas ha permitido su identificación como *Phytophthora cinnamomi* A2, con temperaturas óptimas de crecimiento elevadas (30.2° C). La patogenicidad de estos aislados en encina y alcornoque se ha puesto de manifiesto en experimentos de inoculación de plantones en condiciones controladas. En ningún caso fue posible localizar síntomas ni signos de otros agentes bióticos implicados en la seca de los *Quercus*, por lo que, en el caso de las dehesas estudiadas, el modelo de decaimiento forestal no ha resultado la mejor explicación para la enfermedad observada. La explicación del problema se podría reducir a una enfermedad de etiología simple, cuyo agente causal es *P. cinnamomi*, y en la que algunos factores, como la sequía o la alternancia de períodos secos y lluviosos, pueden tener una influencia decisiva.

M. E. SÁNCHEZ y A. TRAPERO: Dpto. Agronomía. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080 Córdoba.

P. CAETANO y J. FERRAZ: Unidade de Ciências e Tecnologias Agrarias. Universidade do Algarve. Campus de Gambelas. 8000 Faro (Portugal).

Palabras clave: *Phytophthora cinnamomi*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*, seca de los *Quercus*.

INTRODUCCIÓN

Desde principios del siglo XX y a lo largo de toda Europa, las especies de *Quercus* han mostrado diversos episodios de estrés que en ocasiones han dado lugar al decaimiento y muerte del arbolado (BRASIER, 1996). El decaimiento de *Q. petraea* y *Q. robur* en el norte y centro de Europa en los años 20, 40-50 y también en los 80, estimuló el estudio de sus posibles causas (DELATOUR, 1983; OLEKSYN y PRZBYL, 1987; LUISI *et al.*, 1993). El frecuente aislamiento de *Ophiostoma* o *Ceratocystis* del tejido leñoso de árboles afectados en Centroeuropa (OLEKSYN y PRZYBYL, 1987) parecía apoyar

la teoría, originada en Rumanía y Rusia en los años 40-60 (BRASIER, 1996), de que el decaimiento de estas especies de *Quercus* estaba causado por una enfermedad de etiología simple (micosis vascular) causada por estos hongos. Sin embargo, actualmente esta teoría se tiene por poco probable (BRASIER, 1993; 1996), recayendo la atención principal sobre otros factores bióticos, con un nuevo agente de podredumbre radical asociado (*Phytophthora quercina*) (DONAUBAUER, 1998; HANSEN y DELATOUR, 1999; JUNG *et al.*, 1999) y sobre factores climáticos. En los decaimientos de *Quercus* frecuentemente aparecen implicados episodios de sequía severa, encharcamientos prolongados, rápi-

das fluctuaciones del contenido hídrico del suelo y bajas temperaturas invernales. Todos estos procesos pueden tener gran importancia a la hora de iniciar el síndrome de decaimiento, predisponiendo al arbolado a la invasión por insectos barrenadores y/o por hongos patógenos oportunistas, ya sea a nivel radical o aéreo (BRASIER, 1996). Desde los años 80 se viene observando un decaimiento severo de *Quercus* en la cuenca mediterránea, aunque ya desde principios del siglo XX hay registros escritos sobre una enfermedad de causa desconocida que afectaba a *Q. suber* en Portugal (BRITO DE CARVALHO, 1993). Los primeros estudios sobre las causas de esta enfermedad, además de identificar varios factores predisponentes (sobreexplotación y sequía, fundamentalmente) citan a un hongo asociado que fue identificado como una «estirpe» extremadamente virulenta de *Phytophthora cambivora*, agente de la tinta del castaño (LOPES PIMENTEL, 1946). En 1953, se rectificó la nomenclatura de esta «estirpe» y se identificó como *P. cinnamomi* Rands (VIEIRA NATIVIDADE, 1950; BRITO DE CARVALHO, 1993).

En España y Portugal las especies más afectadas de decaimiento son *Q. suber* y *Q. ilex*, y en menor proporción *Q. faginea* y *Q. pyrenaica* (MONTROYA, J.M., comunicación personal). También se ha detectado el decaimiento de *Q. suber* en Túnez y Marruecos (BRASIER, 1996). En Italia las especies más afectadas son *Q. cerris*, *Q. frainetto* y *Q. pubescens* (BRASIER, 1996). Al igual que en Centroeuropa, se han identificado toda una serie de factores implicados en el decaimiento de los *Quercus* mediterráneos, incluyendo sequías severas y recurrentes, encharcamientos, contaminación atmosférica, cambios en el uso tradicional de las dehesas, ataques de insectos barrenadores del tronco, y de hongos de chancro, como *Hypoxylon mediterraneum* y *Diplodia mutila* (MONTROYA, 1981; 1992; TORRES-JUAN, 1985; RAGAZZI *et al.*, 1989; VANNINI y MUGNOZZA, 1991; LUISI *et al.*, 1993; VANNINI *et al.*, 1996). Más recientemente se ha descubierto la presencia de la bacteria *Brenneria quercina* asociada al

decaimiento de *Quercus* en España (SORIA *et al.*, 1997). En 1991 se investigó la posible introducción en España de *Ceratocystis fagacearum*, agente de la marchitez vascular de *Quercus* en Norteamérica. No se encontró evidencia alguna de la implicación de este patógeno en el decaimiento de *Quercus*, pero se sugirió la posibilidad de que en el sudoeste español las encinas y alcornoques estuvieran sufriendo una enfermedad radical causada por el oomiceto *P. cinnamomi* (BRASIER, 1993; BRASIER *et al.*, 1993). Esta hipótesis venía apoyada por la sintomatología observada: marchitez y muerte súbita de toda la copa a principios de verano o en otoño, aparición de chancros sangrantes en el tronco de algunos pies afectados y producción de brotes adventicios, todo ello indicativo de algún tipo de estrés radical (BRASIER, 1996), y finalmente, el decaimiento crónico que lleva a la muerte del árbol afectado al cabo de una o dos estaciones (RAGAZZI *et al.*, 1989). También se consideró la distribución de las masas afectadas, que incluye la aparición de árboles muertos o moribundos en grandes grupos o focos, la asociación del decaimiento con valles o depresiones topográficas, o con zonas estacionalmente encharcadizas, así como con zonas alteradas, como márgenes de caminos, cortafuegos o áreas que soportan altas cargas ganaderas. Además el decaimiento progresa en las laderas con mayor rapidez en dirección descendente y muestra mayor severidad en exposiciones al sur o suroeste (BRASIER, 1996). Los descálces de árboles afectados a menudo revelan elevados porcentajes de raicillas absorbentes muertas, tanto en *Q. suber* como *Q. ilex*. De estas raicillas necróticas, así como del suelo asociado, se ha aislado *P. cinnamomi* (BRASIER, 1992 a, b; BRASIER *et al.*, 1993; COBOS *et al.*, 1993; TUSET *et al.*, 1996; GALLEGOS *et al.*, 1999). A pesar de que es un hongo difícil de aislar a menos que las lesiones estén frescas (SHEARER y TIPPETT, 1989), los porcentajes de aislamiento obtenidos eran comparables a los de este mismo patógeno en raíces afectadas de *Eucalyptus marginata* en Australia (SHEARER y TIPPETT, 1989). También se ha

aportado una evidencia indirecta de la implicación de *P. cinnamomi*, mediante la recuperación de encinas afectadas de decaimiento tras la inyección al tronco de fungicidas específicos (FERNÁNDEZ-ESCOBAR *et al.*, 1999). No obstante, en otros casos la asociación entre la presencia del hongo en las raíces y la aparición de síntomas, ha resultado más vaga (FERNÁNDEZ y MONTERO, 1993), aunque este hecho puede ser debido a unas condiciones del suelo extremadamente secas en el momento del muestreo (BRASIER *et al.*, 1993; BRASIER, 1996). El objetivo del presente trabajo ha sido esclarecer las causas del decaimiento de *Q. ilex* en tres dehesas de la provincia de Huelva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Prospecciones de campo y toma de muestras

Las prospecciones se realizaron en tres dehesas de encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota*) situadas en la comarca del Andévalo (Huelva), de entre 400 y 500 ha de superficie y una densidad media de arbolado de 30 árboles por ha. Las tres fincas («El Cuco», «La Pizarra» y «Los Manantiales») están sometidas al mismo tipo de aprovechamiento cinegético basado en la caza menor. El arbolado está constituido por pies bien formados, que no precisan de podas ni ningún otro tipo de tratamiento selvícola de mejora. A pesar de que el manejo de las fincas puede considerarse como correcto, apropiado para este sistema productivo (MONTROYA, 1989), a finales de los años 80 aparecieron focos de unos pocos árboles enfermos que a lo largo de los años han ido ampliándose hasta dar lugar amplios rodales desarbolados (oquedales), en los que los árboles muertos fueron cortados (Figura 2a). En el perímetro exterior, el arbolado muestra síntomas de decaimiento que se van atenuando a medida que nos alejamos del centro del foco (Figura 2b). En los focos en los que no se han efectuado cortas sanitarias aparecen rodales de árboles secos o decrepi-

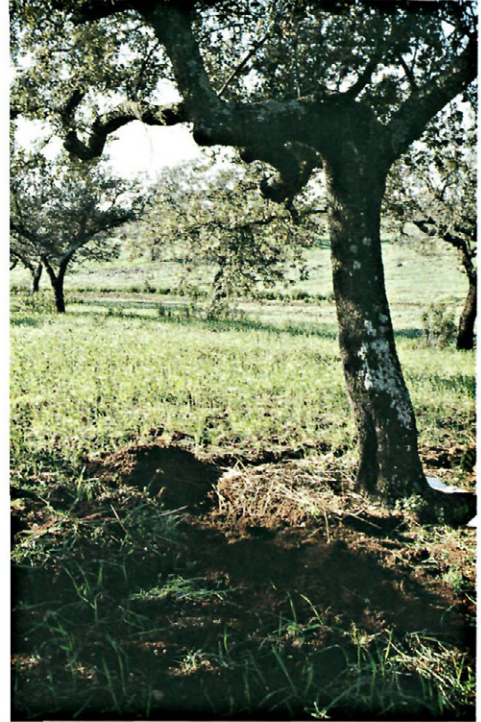


Fig. 1. - Descalce parcial para la toma de muestras de raíz y suelo.

tos y también se aprecia una gradación de la sintomatología de la enfermedad desde el centro hacia el exterior del foco (Figura 2c). En enero de 1998, se prospectaron 4 focos de decaimiento en «El Cuco» y otros 4 en «La Pizarra», con una superficie de árboles afectados entre 1 y 4 ha, excepto uno de los focos de «El Cuco», de más de 10 ha, con unas 4 ha. de oquedal en el centro (Figura 2a). En esta primera prospección se evaluó visualmente el grado de defoliación y/o marchitez foliar de cada uno de los 8 focos según la siguiente escala:

- Clase 0 = 0-10% de defoliación y/o marchitez foliar.
- Clase 1 = 10-25%.
- Clase 2 = 26-75 %.
- Clase 3 = 76-90 %.
- Clase 4 = 91-100 % (incluidos árboles muertos).



a)



b)



c)

Fig. 2. - Focos de árboles afectados. a) oquedal en la finca «El Cuco», b) oquedal en la finca «Los Manantiales», c) foco en la finca «La Pizarra». Nótese la gradación descendente de la severidad de síntomas desde el centro hacia el perímetro externo de los focos.

Para la toma de muestras, se eligieron dos árboles sintomáticos pertenecientes a la clase de defoliación predominante, en cada uno de los focos. Tras un descalce parcial, a 1 m de la base del tronco y hasta 50 cm de profundidad (Figura 1), se tomaron muestras de raicillas absorbentes y suelo de la rizosfera de cada árbol.

Posteriormente, se realizaron nuevas evaluaciones y toma de muestras en un foco de decaimiento elegido en cada una de las fincas: la segunda prospección tuvo lugar en julio de 1998 únicamente en la finca «El Cuco». En diciembre de 1998 se realizó una tercera prospección en ambas fincas y, por último, en junio de 1999, además de estos dos focos, se realizó la evaluación y toma de muestras de un nuevo foco de decaimiento localizado en la finca «Los Manantiales».

En cada una de las prospecciones, las muestras procedentes de cada árbol fueron tratadas separadamente. Las raicillas procedentes de la primera toma de muestras se sembraron en placas de Petri conteniendo los medios de cultivo PDA ácido, MBS (DHINGRA Y SINCLAIR, 1995), PARP y PARPH (JEFFERS Y MARTIN, 1986). Para las muestras procedentes del resto de prospecciones sólo se utilizó el medio PARPH, selectivo para el aislamiento de *Phytophthora* spp. De las muestras de suelo se tomaron 50 g limpios de partículas gruesas, raicillas, etc., se pesaron y se colocaron en estufa a 120°C hasta peso constante para calcular su porcentaje de humedad. Otros 2 g de suelo, también limpios, fueron colocados en recipientes de plástico a los que se añadió agua desionizada (1:6 vol.). A continuación se colocaron trozos de hojas nuevas de alcornoque como cebo (4-5 mm² de superficie, eliminando los bordes del limbo y el nervio principal) y se incubaron a 20°C en luz/oscuridad durante 48 horas. Al cabo de este tiempo, los trozos de hoja se lavaron en agua estéril en cámara de flujo laminar, se secaron con papel de filtro estéril y se colocaron en placas de Petri a razón de 6 trozos por placa. Los medios utilizados fueron PARP y PARPH para las muestras de la primera pros-

pección, y únicamente PARPH para las muestras procedentes de las restantes prospecciones.

Identificación y caracterización de aislados

Las colonias fúngicas obtenidas, tanto de raicillas como de suelo, se agruparon en función de su morfología, procediéndose a la obtención de cultivos puros en placas de extracto de zanahoria-agar (CA) (DHINGRA y SINCLAIR, 1995).

1. Crecimiento a distintas temperaturas

Los aislados crecieron en placas con medio CA a 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C de temperatura, con tres repeticiones por temperatura. Con un calibrador se realizaron medidas del diámetro mayor y menor de la colonia, a los 2, 4, 6, 10 y 15 días tras la siembra y se calculó la tasa de crecimiento diario. Para expresar esta tasa de crecimiento en función de la temperatura se seleccionó el modelo que mejor se ajustaba para todos los aislados, en cuanto a distribución de residuos, coeficiente de determinación (R^2) y significación de los coeficientes de regresión. Utilizando la ecuación resultante, se calculó la temperatura óptima de crecimiento.

Además, se registró la morfología de la colonia a 20°C, la presencia o no de micelio aéreo y el tipo de micelio.

2. Estructuras vegetativas y reproductivas de los aislados

La producción de estructuras vegetativas (hinchazones hifales) y clamidosporas se observó entre 4 y 30 días de crecimiento en medio CA, procediéndose a realizar preparaciones microscópicas. Se midió el diámetro de 50 clamidosporas por aislado.

En ningún caso tuvo lugar reproducción sexual en cultivo simple. La observación de



Fig. 3. - Síndrome de muerte lenta: defoliación.

gametangios tuvo lugar en cultivos dobles de cada uno de los aislados con *P. cinnamomi* A1 (138C, cultivo suministrado por la Dra. Pérez Jiménez, procedencia: California, USA) o *P. cinnamomi* A2 (PV1, cultivo ais-



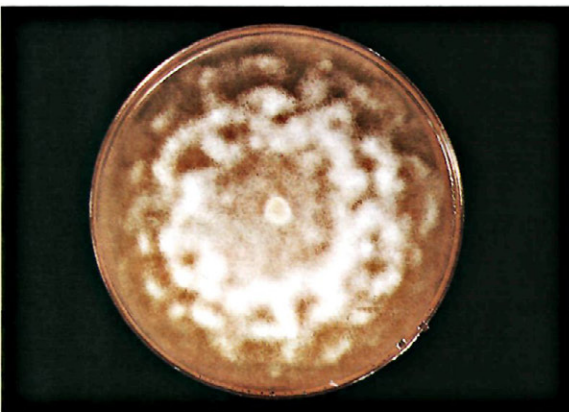
Fig. 4. - Síndrome de muerte súbita o apoplejía: marchitez foliar.



Fig. 5. - Ausencia de otros patógenos: corte de ramas en el que no se observaron síntomas de podredumbre de madera o chancros.



a)



b)

Fig. 6. - Morfología de la colonia de los aislados de tipo A (a) y tipo B (b) a los 4 días de crecimiento a 20° C en el medio CA.

lado de plántulas de vivero por la Unidad de Patología Vegetal de la ETSIAM de la Universidad de Córdoba). Estos cultivos se incubaron a 25°C en oscuridad, realizándose preparaciones microscópicas cuando se observaba la producción de oogonios, anteridios y oosporas en el microscopio invertido. La producción de esporangios tuvo lugar en medio líquido de extracto de suelo (RIBEIRO, 1978). Por cada aislado se observaron y midieron 30 esporangios maduros.

Patogenicidad

Para realizar los ensayos de patogenicidad se seleccionaron 3 aislados previamente caracterizados morfológicamente (Cuadro 2). El material vegetal utilizado fueron plátones sanos de encina y alcornoque de 1-1,5 savias, procedentes de un vivero forestal de Córdoba.

Experimento 1. Las plántulas se infectaron con dos tipos de inóculo: en medio sólido VEAV8 (Vermiculita-avena-V8) (WILCOX y MIRCETICH, 1987) modificado y en suspensión acuosa de micelio (DHINGRA y SINCLAIR, 1995).

Los matraces con medio sólido se inocularon separadamente con cada uno de los aislados y se incubaron a 20°C en oscuridad durante 30 días, agitándolos cada 3-4 días. Tras la incubación, el contenido de los matraces se mezcló por separado con un suelo mezcla de arena, limo y turba (1:1:1 en volumen) (TRAPERO CASAS y JIMÉNEZ DÍAZ, 1985), con una concentración de 35 ml de inóculo por litro de suelo. Las plantas se transplantaron a macetas conteniendo el suelo infestado. Las plantas testigo se prepararon de la misma manera, excepto por la ausencia de hongo infestando el medio de vermiculita-avena.

El inóculo líquido se preparó batiendo en agua estéril el micelio producido en medio de extracto de zanahoria durante un mes a 20°C en oscuridad, tras ser separado del medio nutritivo y lavado con agua estéril. La proporción micelio/agua se ajustó de forma que

Cuadro 1. - Aislamiento de *Phytophthora* spp. en las fincas «El Cuco», «La Pizarra» y «Los Manantiales»

Fecha	Finca	Índice de defoliación medio	Humedad del suelo (%)	Aislamientos positivos de <i>Phytophthora</i> spp.*	
				Suelo (%)	Raíces (%)
1/98	El Cuco	1.5	15.5	41.7	16.7
	La Pizarra	2.0	18.0	8.3	12.5
7/98	El Cuco	3.0	8.0	63.2	29.1
12/98	El Cuco	3.0	4.4	0	6.7
	La Pizarra	1.5	6.0	0	5.1
6/99	El Cuco	3.0	8.2	58.3	27.1
	La Pizarra	1.5	10.2	8.3	16.7
	Los Manantiales	2.0	7.9	29.2	22.9

* Porcentaje expresado como número de trocitos de raíz o cebo de hoja que originaron una colonia sobre el número total de trocitos de raíz o cebo de hoja colocados en medio selectivo (PARP o PARPH).

al añadir 100 ml del inóculo así preparado a cada planta se aportara el micelio contenido de 3 placas de Petri. Se añadieron 100 ml de esta suspensión al cepellón de cada plantón a inocular, cuidando de que su distribución fuese homogénea. Cada plantón inoculado se trasplantó a una maceta conteniendo la misma mezcla de suelo ya mencionada. Las plantas testigo fueron tratadas con agua libre de micelio.

Todas las macetas se colocaron en bandejas, de forma que en cada bandeja sólo hubiese plantones inoculados con el mismo aislado y el mismo tipo de inóculo. Las plantas testigo se colocaron en una bandeja separada. Posteriormente se añadió agua a todas las bandejas, de forma que el nivel se situara unos 5 cm por debajo del borde de las macetas. El diseño experimental fue de 6 repeticiones por cada aislado, tipo de inóculo y especie de planta. La unidad experimental fue la maceta con una planta. El experimento transcurrió en cámara de crecimiento con 228 $\mu\text{E}/\text{cm}^2 \text{ s}$ y 14 h/día de luz, 19-24°C de temperatura y 49-87% de humedad relativa, durante 4 semanas. Al cabo de este tiempo, se

sacaron los plantones de sus macetas, se retiró toda la tierra de las raíces y se evaluaron separadamente los síntomas de la parte aérea y de la raíz.

Experimento 2. Su objetivo fue comparar la patogenicidad de los aislados en condiciones de saturación hídrica del suelo y en condiciones de riego convencional (200 ml de agua por maceta, una vez por semana). Las plántulas de encina y alcornoque se infectaron con suspensión acuosa de micelio. La preparación del inóculo, el método de inoculación y las condiciones ambientales de la cámara de crecimiento fueron las ya descritas para el Experimento 1, salvo que en el caso de las plantas sometidas a un riego semanal, el experimento se prolongó durante 6 meses.

Experimento 3. Tuvo por objeto comparar la patogenicidad de aislados pertenecientes a distintos grupos morfológicos. Para ello se utilizó la suspensión acuosa de micelio y las condiciones de encharcamiento continuo. Los plantones inoculados y testigo se mantuvieron en umbráculo (9 - 27 °C) durante las cuatro semanas que duró el ensayo.

Cuadro 2. - Origen e identificación de los aislados de *Phytophthora* purificados a partir de los aislamientos de campo

Código de aislado	Fecha de aislamiento	Finca	Origen	Grupo morfológico ^a	Tipo de apareamiento
PE1	1/98	El Cuco	Raíz	A	A2
PE8	1/98	El Cuco	Raíz	A	A2
PE10 ^b	1/98	El Cuco	Suelo	A	A2
PE11	1/98	El Cuco	Suelo	A	A2
PE12 ^b	1/98	El Cuco	Suelo	B	-
PE13	1/98	El Cuco	Suelo	A	A2
PE14	1/98	El Cuco	Raíz	A	A2
PE16	1/98	El Cuco	Raíz	A	A2
PE25 ^b	1/98	El Cuco	Suelo	A	A2
PE39	1/98	La Pizarra	Raíz	A	A2
PE40	1/98	La Pizarra	Raíz	A	A2
PE44	1/98	La Pizarra	Raíz	A	A2
PE52	1/98	La Pizarra	Suelo	A	A2
PE58	7/98	El Cuco	Raíz	A	A2
PE59	7/98	El Cuco	Suelo	A	A2
PE60	7/98	El Cuco	Suelo	A	A2
PE63	6/99	Los Manantiales	Raíz	A	A2
PE64	6/99	Los Manantiales	Raíz	A	A2
PE65	6/99	Los Manantiales	Raíz	A	A2
PE66	6/99	Los Manantiales	Suelo	A	A2

^a Los aislados del grupo A fueron identificados como *P. cinnamomi* y el del grupo B como *Phytophthora* sp.

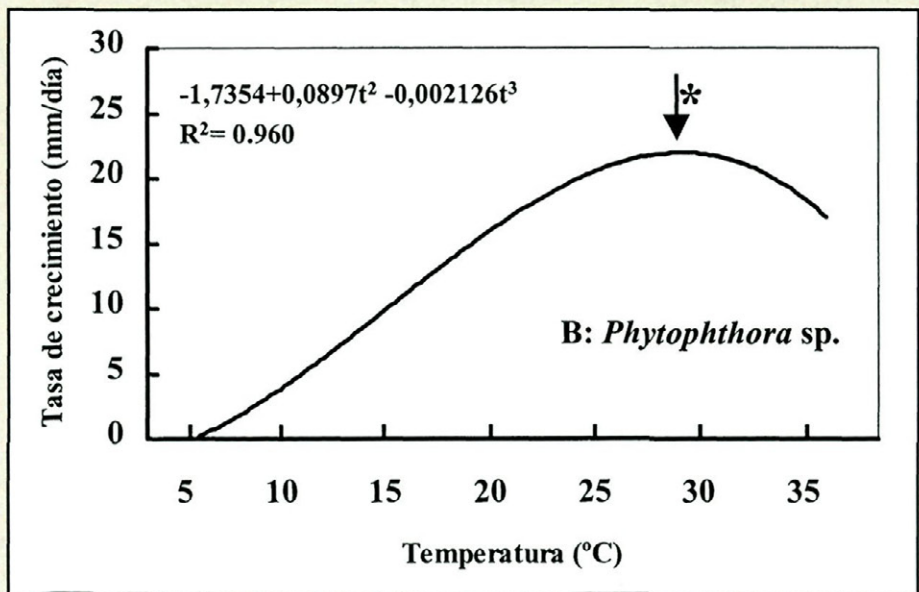
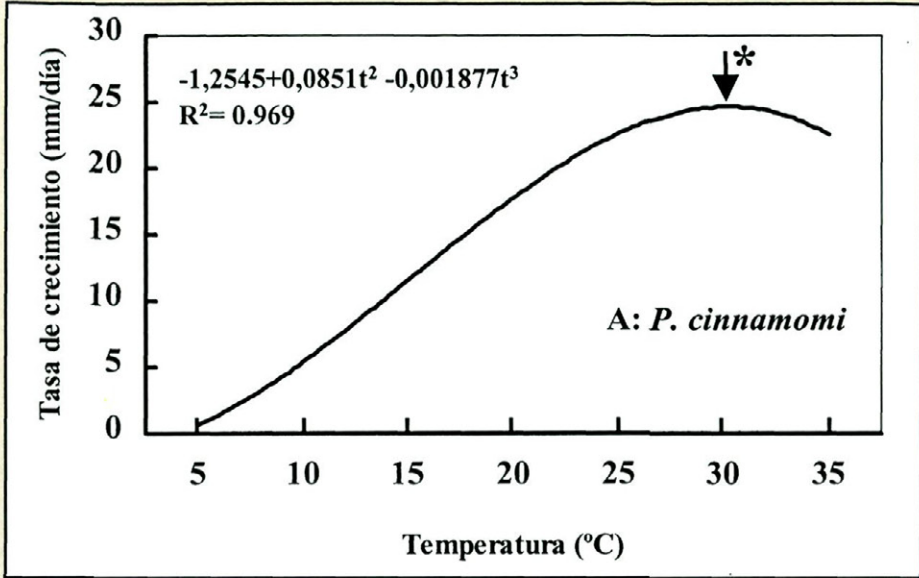
^b Aislados elegidos para realizar los ensayos de patogenicidad.

Al final de cada uno de los tres experimentos se evaluó la severidad de los síntomas, empleando tanto para la parte aérea como para la raíz, la escala 0-4 utilizada en trabajos previos (TRAPERO CASAS y JIMÉNEZ DÍAZ, 1985; SÁNCHEZ HERNÁNDEZ *et al.*, 1998). A los valores de severidad de los síntomas se les aplicó el análisis de la varianza, mediante el programa 'Statistix' (Analytical Software). Los valores medios de severidad se compararon entre sí y con los testigos mediante el test LSD (mínima diferencia significativa) protegido de Fisher (STEEL y TORRIE, 1985). Además se hicieron aislamientos de las raíces en el medio PARPH, para lo cual se eligieron dos plantas por tratamiento más dos plantas testigo. Se observó el crecimiento de las colonias fúngicas y la presencia de estructuras que permitieran la identificación del hongo recuperado.

RESULTADOS

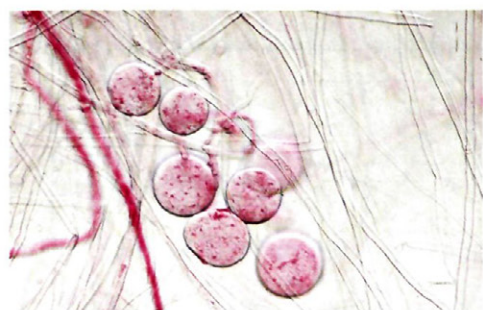
Sintomatología

Los síntomas aéreos observados consistieron en reducción del crecimiento, amarillez foliar, defoliación, muerte regresiva de ramas y muerte del árbol completo. En la primera prospección los árboles sintomáticos presentaban un síndrome de muerte lenta (Figura 3). No se observaron grietas ni otro tipo de daños en el tronco y ramas. En la prospección de diciembre de 1998 aparecieron árboles con síndrome agudo (muerte súbita o apoplejía) caracterizado por una marchitez foliar generalizada (Figura 4). Los descalces efectuados para la toma de muestras revelaron la escasez de raicillas absorbentes, con necrosis extensas en las que permanecían unidas a las raíces leñosas.

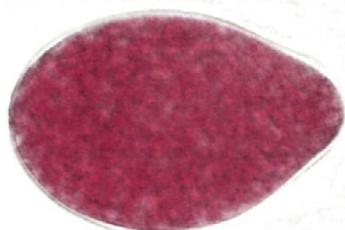


* La flecha indica la temperatura óptima estimada (A: 30.2°C, B: 28.1°C)

Fig. 7. - Curvas de crecimiento de los aislados de *Phytophthora*.



a)



b)



c)



d)

Fig. 8. - Estructuras vegetativas y reproductivas de los aislados de tipo A (*P. cinnamomi*). a) engrosamientos hifales («hyphal swellings»), b) esporangio ovoide, c) esporangio elipsoide, d) estructuras de reproducción sexual obtenidas por cruzamiento con *P. cinnamomi* A1. Obsérvese la oospora plerótica y el anteridio anfígino bicelular.

Se prestó una especial atención a la localización de síntomas y signos de agentes bióticos descritos como asociados con la seca de los *Quercus*, no sólo en los focos de seca sino también en rodales de árboles sanos, con resultado negativo. En ningún caso pudieron localizarse daños producidos por insectos perforadores, incluso en árboles decrepitos o muertos. Tampoco apareció ningún vestigio de ataques del hongo *Hypoxyton mediterraneum* ni ningún otro agente productor de chancros o podredumbre de madera (Figura 5).

Progreso de la enfermedad

En la primera prospección los árboles afectados presentaban índices de defoliación medios (Cuadro 1) y estaban afectados del síndrome de muerte lenta. En la segunda prospección, tras una primavera seca, el número de árboles afectados no había aumentado significativamente, pero sí se comprobó la defoliación total y muerte de árboles que en la primera prospección mostraban índices de defoliación 1 ó 2. La tercera prospección (diciembre de 1998), tras un verano y otoño seco, mostró un aumento en el número de árboles afectados, así como la aparición de pies afectados de muerte súbita. En la cuarta prospección (junio de 1999), tras un invierno y primavera muy secos, el estado del arbolado empeoró. No se apreciaron nuevas muertes, pero sí se observaron síntomas en pies exteriores al foco inicial, que hasta esa fecha permanecían asintomáticos.

Aislamiento de *Phytophthora* spp.

A partir de las muestras de raíz de la primera prospección, sólo se obtuvieron aislamientos en PARP y PARPH. En ambos medios se aislaron colonias de hongos pertenecientes al género *Phytophthora*. En el medio PDA ácido se obtuvieron esporádicamente algunas colonias de los géneros *Fusarium*, *Cylindrocarpon* y *Phoma*. En el medio MBS no se obtuvo ningún aislamiento. El

Cuadro 1 muestra el porcentaje de aislamiento de *Phytophthora* spp. a partir de muestras de suelo y raíz de cada una de las prospecciones. El origen y otras características de estos aislados aparecen en el Cuadro 2.

Caracterización de los aislados

1. Morfología de las colonias y tasa de crecimiento a distintas temperaturas

La morfología de la colonia a 20°C en CA, permitió separar a los aislados de *Phytophthora* en dos grupos (Cuadro 2): la mayoría mostraron una colonia blanquecina de aspecto uniforme o ligeramente petaloide a los 4 días de crecimiento (Figura 6a), con abundante micelio aéreo algodonoso a los 6 días de crecimiento. Todos los aislados que mostraron esta morfología se incluyeron en el grupo A. Un único aislado mostró una colonia tipo «roseta» a los 4 días de crecimiento (Figura 6b), también blanquecina y con micelio aéreo algodonoso, aunque menos abundante a los 6 días de crecimiento que en el caso anterior. Este aislado se incluyó en el grupo B.

Para expresar la tasa de crecimiento en función de la temperatura la ecuación seleccionada fue un polinomio de tercer grado: $y = a + b * T^2 + c * T^3$, donde y es la tasa de crecimiento, T es la temperatura y a , b y c , son los coeficientes de la regresión. Se obtuvieron dos patrones de crecimiento en medio CA (Figura 7), uno con la temperatura óptima en torno a los 30°C y tasas de crecimiento elevadas, correspondiente a los aislados del grupo A, y un segundo patrón de crecimiento con una temperatura óptima estimada de 28°C y una tasa de crecimiento ligeramente más baja, que correspondió al tipo morfológico B.

2. Caracterización de las estructuras vegetativas y reproductivas

En todos los aislados de tipo A se observó la abundante formación en medio CA de engrosamientos hifales («hyphal swe-

llings»), subesféricos, predominantemente terminales y en racimos (Figura 8a). En el aislado de tipo B no se observaron estos engrosamientos, pero fue abundante la producción de clamidosporas esféricas, terminales e intercalares, de pared poco gruesa y diámetro comprendido entre 32.5 y 40.0 µm, con un diámetro medio de 36.15 ± 2.09 µm (Figura 9a). En ningún caso se observó la producción de gametangios en cultivo simple, lo que indica el heterotalismo de las especies estudiadas.

Los esporangios de todos los aislados (A y B) fueron ovoides, persistentes y no papilados (Figuras 8b, 9b). También se observaron esporangios elipsoides, sobre todo en los aislados del tipo A (Figura 8c). Los esporangióforos presentaron en algún caso ramificación simpodial simple. En cuanto a sus dimensiones, los del tipo B variaron entre unas máximas (longitud x anchura) de 37.5 x 25 µm y unas mínimas de 25 x 15 µm. Los del tipo A variaron entre 82.5 x 42.5 µm de máxima y 32.5 x 22.5 µm de mínima. Únicamente los cultivos dobles efectuados con *P. cinnamomi* A1 dieron lugar a la formación de gametangios: oogonios esféricos, de pared lisa, y anteridios anfiginos, ocasionalmente bicelulares. Las oosporas maduras fueron pleróticas (Figura 8d). El aislado tipo B no produjo gametangios en cultivo doble con ninguno de los dos tipos de apareamiento de *P. cinnamomi*.

Identificación de los aislados

Las características observadas en los aislados del grupo A corresponden a la especie *Phytophthora cinnamomi* Rands, tipo de apareamiento A2 (STAMPS *et al.*, 1990; ERWIN y RIBEIRO, 1996). Este es el grupo de aislados asociados a podredumbres radicales en encinas.

Las estructuras de reproducción asexual del aislado del grupo B corresponden a las descritas para *Phytophthora drechsleri* Tucker (STAMPS *et al.*, 1990; ERWIN and RIBEIRO, 1996). No obstante, a falta de caracterizar

sus estructuras sexuales, este aislado será denominado como *Phytophthora* sp.

Patogenicidad

Experimento 1. Para este experimento se eligió el aislado PE25 de *P. cinnamomi* (Cuadro 2). Al cabo de 4 semanas tras el encharcamiento, los plantones inoculados reprodujeron los síntomas de la enfermedad en la parte aérea y radical (Figuras 10a, 10b, 11a, 11b), con abundante pérdida de raicillas absorbentes y podredumbre de la mayor parte de las que aún permanecían unidas a la raíz principal. Los valores medios de severidad de síntomas, tanto aéreos como radicales, se muestran en la Figura 12a. El análisis de la varianza mostró diferencias significativas entre los valores de severidad de las plantas inoculadas con respecto a sus correspondientes testigos, aunque en alcornoque, únicamente a nivel radical. Sin embargo, la severidad de síntomas producida por los dos tipos de inoculación no varió significativamente, por lo que en los siguientes experimentos se eligió la suspensión acuosa de micelio por su mayor facilidad de manejo.

Experimento 2. Para este experimento de nuevo se eligió el aislado PE25 (Cuadro 2). La Figura 12b resume los resultados obtenidos. Al cabo de cuatro semanas, los plantones sometidos a encharcamiento mostraron los síntomas de la enfermedad, con una severidad de síntomas radicales significativamente mayor que la de sus correspondientes testigos. Los plantones sometidos a riego convencional durante seis meses mostraron una baja severidad de síntomas aéreos. Sin embargo, la sintomatología radical era muy severa (Figuras 11c, 11d), difiriendo significativamente de los valores correspondientes a los testigos.

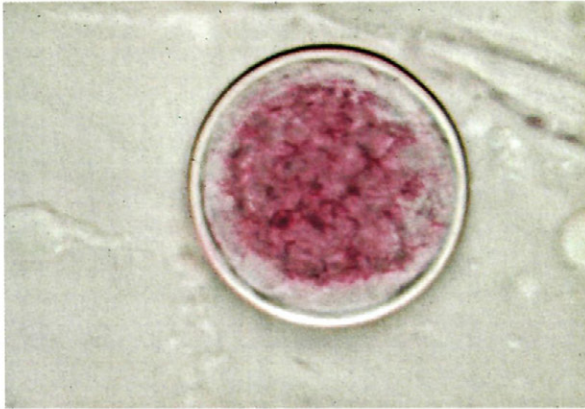
Experimento 3. En este experimento se escogieron dos aislados: PE10 (identificado como *P. cinnamomi*) y PE12 (identificado provisionalmente como *Phytophthora* sp.). Al cabo de 4 semanas la severidad de síntomas radicales mostró diferencias significati-

vas respecto a los testigos no inoculados (Figura 12c), pero estas diferencias no se dieron entre los dos aislados ensayados para ninguna de las dos especies de planta. No obstante, los síntomas foliares en encina fueron significativamente más elevados en las plantas inoculadas con el aislado de *P. cinnamomi*. Hay que resaltar que en este experimento el alcornoque sufrió una defoliación muy intensa, que llegó a ser severa incluso en las plantas testigo, a pesar de que las raíces de éstas mostraban niveles bajos de severidad de síntomas.

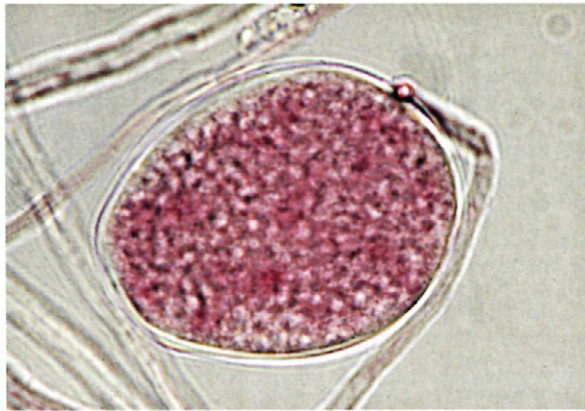
En todos los experimentos se recuperó consistentemente el hongo inoculado a partir de las raíces necróticas de las plantas inoculadas, permaneciendo las plantas testigo libres de patógenos.

DISCUSIÓN

El aislamiento de *P. cinnamomi* resultó positivo en todos los focos muestreados, obteniéndose en algunos casos porcentajes de aislamiento en suelo elevados para esta especie (SHEARER y TIPPET, 1989). Este hecho es especialmente llamativo en los aislamientos de suelo de la finca «El Cuco», donde únicamente en la tercera prospección no se obtuvieron aislados, probablemente debido a la baja humedad del suelo junto con las bajas temperaturas de esas fechas, factores que dificultan el aislamiento de *P. cinnamomi* (BRASIER, 1996). A pesar de que se prestó una atención especial en el reconocimiento de síntomas y signos asociados a otros agentes implicados en el decaimiento de *Q. ilex*, únicamente en la primera prospección se localizaron síntomas leves del «repilo de la encina», originado por el hongo *Spilocaea quercus-ilicis* (MUÑOZ y RUPÉREZ, 1987; NAVARRO, 1997), en encinas no afectadas de decaimiento situadas en la finca «La Pizarra». Este hongo nunca se ha descrito como agente asociado a la seca de los *Quercus*. De hecho se localizó fuera de los focos de seca como una infección esporádica y leve, que no llegaba a producir la



a)



b)

Fig. 9. - Estructuras vegetativas y reproductivas del aislado de tipo B (*Phytophthora* sp.). a) clamidospora, b) esporangio ovoide.

caída de las hojas afectadas. En las restantes prospecciones ya no se observó ninguna incidencia de este patógeno foliar, probablemente debido a las condiciones mucho más secas.

De los aislados obtenidos de las raicillas necróticas, el grupo morfológico identificado como *P. cinnamomi* es el que se ha aislado mayoritariamente del suelo y el único aislado de raíces enfermas. La caracterización del crecimiento micelial ha mostrado que este grupo de aislados puede crecer en un amplio rango de temperaturas, con una temperatura óptima estimada (30,2°C) situada en la zona alta del rango de las temperaturas óptimas descritas para esta especie, entre 20



a)



b)

Fig. 10. - Síntomas aéreos en plantones de 1 año inoculados con *Phytophthora cinnamomi*. a) marchitez foliar en encina (dcha), b) flaccidez foliar y defoliación en alcornoque (dcha). A la izquierda, plantones testigo.

y 32.5°C (ERWIN y RIBEIRO, 1996), aunque su capacidad de invadir los tejidos vegetales se ve favorecida por temperaturas entre 25 y 30°C, con óptimos de alrededor de 30°C (SHEARER y TIPPET, 1989). Esto sugiere una



Fig. 11. - Síntomas radicales en plantones inoculados con *Phytophthora cinnamomi* en condiciones de saturación hídrica del suelo (a, b) y en condiciones hídricas normales (c, d) a-c) encina, b-d) alcornoque. A la izquierda, plantones testigo.

adaptación del patógeno a las condiciones térmicas de la zona, caracterizada por las elevadas temperaturas que se registran en el suelo durante el verano (SARDINERO *et al.*, 2000), que lo hacen especialmente virulento (BRASIER, 1996). Además, puede suponer una baja competencia con otros hongos del suelo a la hora de infectar y causar necrosis en las raíces de la encina. El único aislado de tipo **B**, procedente de suelo, también presenta una temperatura óptima de crecimiento elevada, aunque nunca ha sido obtenido a partir de raíces enfermas.

Por otra parte, los tres ensayos de patogenicidad efectuados muestran claramente el carácter patógeno de *P. cinnamomi* en encina y en alcornoque. Si bien la saturación hídrica del suelo favorece la infección radical y acelera la expresión de los síntomas de la enfermedad (CRANDALL *et al.*, 1945; ZENTMYER, 1980; SHEARER y TIPPET, 1989), el segundo experimento de patogenicidad muestra que en condiciones de un solo riego semanal, que conlleva un cierto déficit hídrico con únicamente un corto espacio de tiempo en el que el suelo se encuentra saturado, el hongo es capaz de infectar y causar la podredumbre de la raíz de ambas especies arbóreas. Estas son las condiciones más favorables para la infección y desarrollo de la enfermedad en campo: periodos cortos de abundantes lluvias en los que se produce la infección de las raíces, seguidos por largos periodos calurosos y secos (SHEARER y TIPPET, 1989). En condiciones de campo, los episodios de sequías severas y prolongadas, intercaladas con periodos cortos de fuertes lluvias y encharcamientos son frecuentes en el sur de España y Portugal a lo largo de los últimos 15 años, con una clara tendencia al incremento de estas condiciones extremas (BRASIER, 1996; SARDINERO *et al.*, 2000). Además, el incremento de la temperatura en verano no sólo está teniendo un efecto directo en el desarrollo y distribución de las especies arbóreas (SARDINERO *et al.*, 2000), sino que también incide directamente en la actividad de plagas y patógenos, además de su acción indirecta en la interacción planta-

patógeno (BRASIER y SCOTT, 1994). Las lluvias abundantes, incluso excesivas para el sudoeste español, parecen el principal factor climático que está favoreciendo las infecciones de *P. cinnamomi*. A finales de 1998, cuando comenzó nuestro estudio, el suelo de las fincas presentaba un contenido de humedad aún elevado. Sin embargo, a partir de ese momento las precipitaciones fueron muy escasas y la humedad del suelo fue disminuyendo progresivamente. En estas condiciones de sequía, que incrementan el desarrollo de *P. cinnamomi* en los tejidos infectados del huésped (CAHILL *et al.*, 1986; MARÇAIS *et al.*, 1993) y que reducen críticamente la tolerancia del género *Quercus* a la infección por el hongo (GRIFFIN *et al.*, 1993), se ha podido comprobar cómo la enfermedad radical ha seguido extendiéndose a partir de los focos existentes, mientras que el arbolado no infectado ha resistido la escasez de precipitaciones sin mostrar síntomas de decaimiento. No obstante, las zonas libres de enfermedad son muy vulnerables, puesto que un nuevo periodo de abundantes lluvias volvería a favorecer la dispersión del patógeno en el suelo y la infección de las raíces de árboles sanos.

Con respecto al aislado de tipo **B**, identificado provisionalmente como *Phytophthora* sp. también resultó patógeno en encina y alcornoque, si bien este hongo no se ha aislado de raíces enfermas y no hay ninguna evidencia de que produzca podredumbre radical de encinas en condiciones de campo.

Aunque las inoculaciones se han realizado únicamente en plántones jóvenes de encina y alcornoque, la peculiaridad de los ataques de *P. cinnamomi* afectando exclusivamente, al menos en suelos secos (BRASIER, 1996), a las raicillas absorbentes, hecho que hemos confirmado tanto en las inoculaciones artificiales como en las observaciones de campo, permite extrapolar nuestros resultados a árboles adultos. Por ello, podemos concluir que el modelo de decaimiento forestal en el que participan numerosos factores intercambiables de forma encadenada (MANION, 1991), no ha

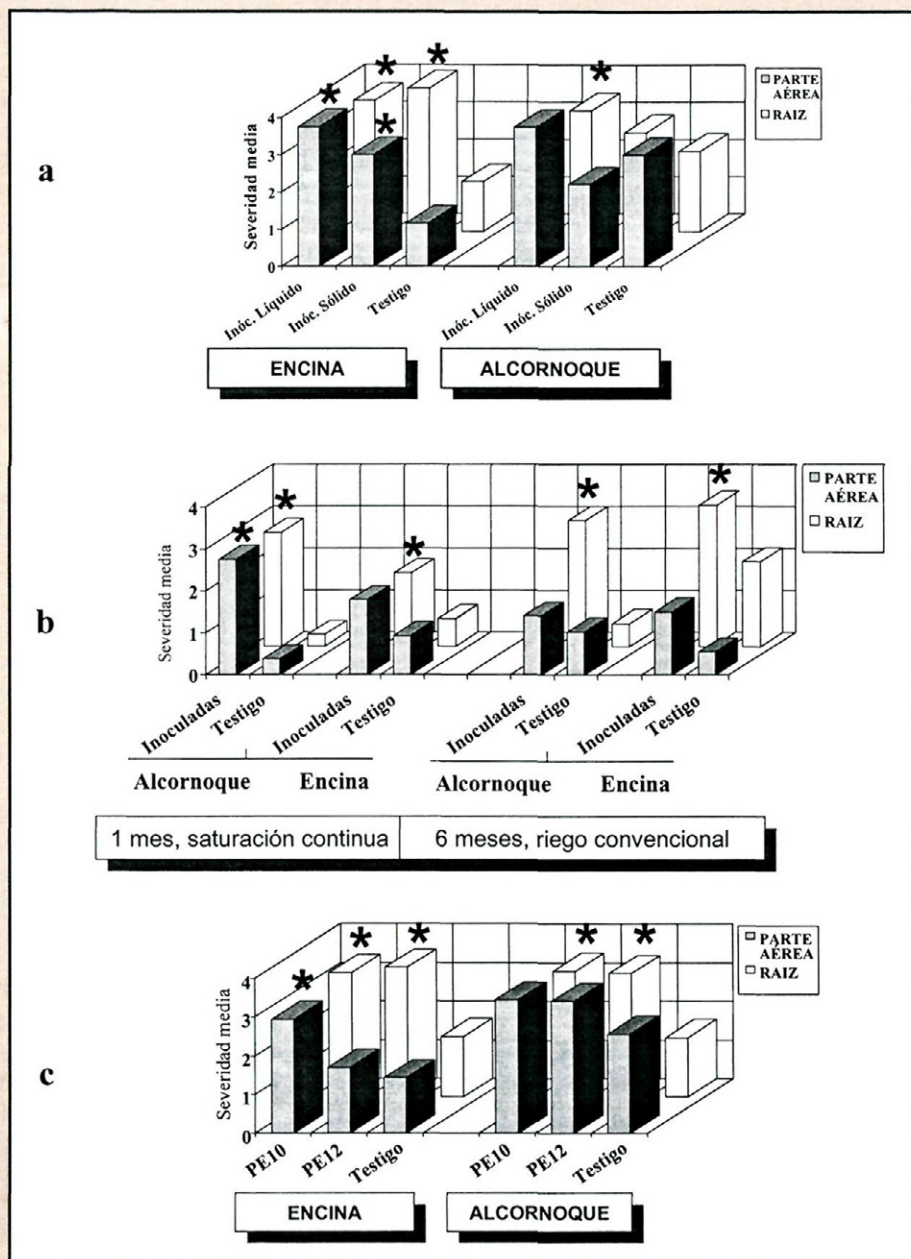


Fig. 12. - Patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* (PE25). a) en plantones infectados con distinto tipo de inóculo, b) en diferentes condiciones de contenido hídrico del suelo, c) patogenicidad de *P. cinnamomi* (PE10) y *Phytophthora* sp. (PE12). Escalada de severidad de síntomas: 0 = sin síntomas; 4 = 100% tejido afectado.

* Valores que difieren significativamente del testigo correspondiente (LSD, $P = 0.05$).

resultado adecuado para explicar el decaimiento de las encinas en las fincas estudiadas, sino que parece tratarse de una enfermedad radical de etiología simple, cuyo agente causal es *P. cinnamomi*, y en la que factores de tipo abiótico, como la sequía, o más bien la alternancia de períodos secos y lluviosos, podrían tener un papel fundamental.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se enmarca dentro de los contratos suscritos por el Dpto. de Agronomía de la Universidad de Córdoba con la empresa Comercializadora de Fincas S.A. (COFISA) y con el Proyecto de Investigación 14/REGII/91 del programa INTERRREG II de la UE.

ABSTRACT

M. E. SÁNCHEZ, P. CAETANO, J. FERRAZ y A. TRAPERO: Holm oak decline and mortality in three field plots of southern Spain.

Oak decline affecting three holm oak plots in Huelva has been studied along the last two years. Syndromes of dieback and sudden death have been observed. In both cases, unspecific aerial symptoms were associated with root rot. Characterisation of fungal isolates from necrotic roots led us to identify *Phytophthora cinnamomi* A2 consistently associated with the disease. Optimum growth temperatures of these isolates were very high (30.2°C). Inoculation tests under controlled conditions demonstrated the pathogenicity of the isolates in holm and cork oak seedlings. Symptomatology associated with other biotic factors of oak decline were never recorded, so in this case, forest decline model has not been the best choice to explain the disease observed. In fact, oak defoliation and mortality can be well explained as a disease of single aetiology caused by *P. cinnamomi*. Nevertheless, some abiotic factors as drought or the alternancy of drought and wet periods in the region seem to play an important role.

Key words: *Phytophthora cinnamomi*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*, oak decline.

REFERENCIAS

- BRASIER, C. M., 1992a: *Phytophthora cinnamomi* involved in Mediterranean oak decline. Report on forest research 1991. HMSO, London, 39 pp.
- BRASIER, C. M., 1992b: Oak tree mortality in Iberia. *Nature Lond.* **360**:539.
- BRASIER, C. M., 1993: *Phytophthora cinnamomi* as a contributory factor on European oak declines. In: *Recent advances in studies on oak decline* (N. Luisi, P. Lerario y A. Vannini, eds.), Brindisi, pp. 49-58.
- 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., y SCOTT, J., 1994: European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* **24**:221-232.
- BRASIER, C. M.; ROBREDO, F., y FERRAZ, J. F. P., 1993: Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathol.* **42**:140-145.
- BRITO DE CARVALHO, J. H., 1993: «Stress» do Sobreiro e da Azinheira ou a Doença de Lopes Pimentel? CIDER, Univ. Algarve, Faro. 24 pp.
- CAHILL, D.; WESTE, G., y GRANT, B., 1986: Changes in cytokinin concentrations in xylem extrudate following infection of *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm with *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Plant Physiol.* **81**:1103-1109.
- COBOS, J. M.; MONTROYA, R., y TUSET, J. J., 1993: New damage to *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*. In: *Recent advances in studies on oak decline* (N. Luisi, P. Lerario y A. Vannini, eds.), Brindisi, pp. 163-170.
- CRANDALL, B. S.; GRAVATT, G. F., y RYAN, M. M., 1945: Root disease of *Castanea* species and some coniferous and broadleaf nursery stocks caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **35**:162-180.
- DELATOUR, C., 1983: Les dépérissements de chênes en Europe. *Biologie et Forêt* **35**:265-282.

- DHINGRA, O. D., y SINCLAIR, J. B., 1995: *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Boca Raton. 434 pp.
- DONAUBAUER, E., 1998: The role of pathogens in the present oak decline in Europe - A literature review. *Eur. J. For. Path.* **28**:91-98.
- ERWIN, D. C., y RIBEIRO, O. K., 1996: *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, MN. 562 pp.
- FERNÁNDEZ, J., y MONTERO, G., 1993: Prospección de secas en *Quercus* de Extremadura y la Mancha. *Montes* **32**:32-37.
- FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; GALLEGU, F. J.; BENLLOCH, M.; MEMBRILLO, J.; INFANTE, J., y PÉREZ DE ALGABA, A., 1999: Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials. *Eur. J. For. Path.* **29**:29-38.
- GALLEGU, F. J.; PÉREZ DE ALGABA, A.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R., 1999: Etiology of oak decline in Spain. *Eur. J. For. Path.* **29**:17-27.
- GRIFFIN, D. H.; MANION, P. D., y KRUGER, B. M., 1993: Mechanisms of disease predisposition by environmental stress. In: *Recent advances in studies on oak decline* (N. Luisi, P. Lerario y A. Vannini, eds.), Brindisi, pp. 123-138.
- HANSEN, E., y DELATOUR, C., 1999: *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. *Ann. For. Sci.* **56**:539-547.
- JEFFERS, N. S., y MARTIN, J. B., 1986: Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* **70**:1038-1043.
- JUNG, T.; COOKE, D. E. L.; BLASCHKE, H.; DUNCAN, J. M., y OBWALD, W., 1999: *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycol. Res.* **103**:785-798.
- LOPES PIMENTEL, A. A., 1946: O sobreiro também é parasitado pela *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis., agente da «doença da tinta» do castanheiro. *Publ. Dir. Ger. Serv. Flor. e Aquic.* **13**: 45-49.
- LUISI, N.; LERARIO, P., y VANNINI, A. (eds.), 1993: *Recent advances in studies on oak decline*. Proc. Int. Congress, Brindisi, Italy 13-18 September 1992.
- MANION, P. D., 1991: *Tree Disease Concepts*. Prentice-Hall Ed., Londres. 402 pp.
- MARÇAIS, B.; DUPUIS, F., y DESPREZ-LOUSTAU, M. L., 1993: Influence of water stress on susceptibility of red oak (*Quercus rubra* L.) to *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Eur. J. For. Path.* **23**:295-305.
- MONTOYA, R., 1981: Silvicultura mediterránea de los suelos de pseudogley. *Bol. Estac. Cen. Ecol.* **10**:3-10.
- MONTOYA, J. M., 1989: *Encinas y encinares*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 131 pp.
- MONTOYA, J. M., 1992: Mortandad de *Quercus*, la perspectiva selvícola y los antecedentes climáticos. *Ecología* **6**:123-130.
- MUÑOZ, M. C., y RUPÉREZ, A., 1987: La patología de la encina (*Quercus ilex* L.) en España. *Bol. San. Veg. Plagas* **13**:203-212.
- NAVARRO, N., 1997: *Gama de huéspedes y supervivencia de Spilocaea oleagina*. Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 122 pp.
- OLEKSYN, J., y PRZBYL, K., 1987: Oak decline in the Soviet Union-Scale and hypotheses. *Eur. J. For. Path.* **17**:321-336.
- RAGAZZI, A.; FEDI, I. D., y MESTURINO, L., 1989: The oak decline: a new problem in Italy. *Eur. J. For. Path.* **19**:105-110.
- RIBEIRO, O. K., 1978: *A source book of the genus Phytophthora*. J Cramer, Vaduz. 417 pp.
- SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, M. E.; RUIZ DÁVILA, A.; PÉREZ DE ALGABA, A.; BLANCO LÓPEZ, M. A., y TRAPERO CASAS, A., 1998: Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**:347-357.
- SARDINERO, S.; FERNÁNDEZ CANCIO, A.; PEREIRA, I., y MANRIQUE, E., 2000: *Oak decline and vegetation dynamics in Southwestern Spain*. INIA Report for Research Project 1FD97-0911-C3-1, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Spain. 10 pp.
- SHEARER, B. L., y TIPPET, J. T., 1989: *Jarrah dieback: the dynamics and management of Phytophthora cinnamomi in the Jarrah (Eucalyptus marginata) forest of south-western Australia*. Department of Conservation and Land Management, western Australia. Research Bulletin No. 3, 1-76.
- SORIA, S.; LÓPEZ, M., y 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.
- STAMPS, D. J.; WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J., y HALL, G. S., 1990: *Revised tabular key to the species of Phytophthora*. Mycological Papers **162**: 28 pp.
- STEEL, G. D., y TORRIE, J. H., 1985: *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Mc Graw-Hill, Bogotá. 622 pp.
- 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 CASAS, A., y JIMÉNEZ DÍAZ, R. M., 1985: Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. *Phytopathology* **75**: 1146-1151.
- TUSET, J.; HINAREJOS, C.; MIRA, J., y 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., y MUGNOZZA, G. S., 1991: Water stress: a predisposing factor in the pathogenesis of *Hypoxylon mediterraneum* on *Quercus cerris*. *Eur. J. For. Path.* **21**:193-201.
- VANNINI, A.; VALENTINI, R., y LUISI, N., 1996: Impact of drought and *Hypoxylon mediterraneum* on oak decline in the Mediterranean region. *Ann. Sci. For* **53**:753-760.
- VIEIRA NATIVIDADE, J., 1950: *Subericultura*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, DGF, Lisboa. 387 pp.
- WILCOX, W.F. y MIRCETICH, S.M., 1987: Pathogenicity and relative virulence of seven *Phytophthora* spp. on Mahaleb and Mazzard cherry. *Phytopathology* **75**: 221-226.
- ZENTMYER, G. A., 1980: *Phytophthora cinnamomi and the diseases it causes*. Monogr. No. 10. APS Press, St Paul, MN. 96 pp.