

## Acción preventiva y curativa del fosfonato en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands en encina y alcornoque

R. M<sup>a</sup>. NAVARRO CERRILLO, A. I. TERÁN BOCERO, M. E. SÁNCHEZ

El fosfonato es un fertilizante con función de fungicida sistémico que ha sido utilizado con éxito en el control de *P. cinnamomi* en varias especies forestales. El objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto preventivo y curativo de la aplicación de fosfonato en brinzales de *Quercus ilex* y *Quercus suber* en el control de *Phytophthora cinnamomi*. El diseño experimental se realizó para verificar si el fosfonato es capaz de prevenir y/o controlar la infección de *P. cinnamomi*, por lo que se optó por un ensayo multifactorial con dos factores, el tipo de fosfonato, y el momento de aplicación. A lo largo del ensayo se midió la altura de la parte aérea, el diámetro del cuello de la raíz, y el peso seco de la raíz secundaria, así como la fluorescencia de la clorofila.

La altura y el diámetro al final del ensayo no mostraron diferencias significativas entre tratamientos tanto para encina como para alcornoque, siendo más sensible el peso de la raíz secundaria. El control inoculado presentó los valores menores de fluorescencia relativa, frente al resto de tratamientos, indicando un mayor estrés. Los tratamientos con fosfonatos y el control presentaron valores superiores. Los resultados de este trabajo parecen confirmar el efecto positivo de los fosfonatos en el control de *Phytophthora* en especies del género *Quercus*.

R. M<sup>a</sup>. NAVARRO CERRILLO, A. I. TERÁN BOCERO. Dpto. Ingeniería Forestal, ETSIAM. Universidad de Córdoba.

M. E. SÁNCHEZ. Grupo de Patología Agroforestal, ETSIAM. Universidad de Córdoba. irInacer@uco.es; Apartado de Correos 3048 (14080 Córdoba-España). Teléfono: 34-957-218657; Fax: 34-957-218563

**Palabras clave:** *Quercus ilex*, *Q. suber*, decaimiento forestal, tratamiento.

### 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 multi-causal, es decir, que en las masas afectadas se da la confluencia de varios factores más o menos conocidos que parecen interactuar entre sí. El proceso se explica actualmente según un modelo que comprende tres tipos de factores: factores de predisposición (crean

una situación de pérdida de vigor que se va manifestando con gran lentitud), factores de incitación o detonadores (actúan en un periodo corto de tiempo y dejan a las masas en una situación de enorme fragilidad) y factores de contribución o catalizadores (son causa directa de la muerte de los árboles). 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).

*Phytophthora cinnamomi* Rands es un hongo Oomiceto de la familia de los Phy-

tophthoraceae 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) aunque sus ataques a estas especies ya se conocían desde 1991 (BRASIER *et al.*, 1993). Es un parásito facultativo que puede vivir en el suelo, de carácter acuático hasta que infecta las raíces del huésped. El proceso de infección tiene lugar cuando hay agua libre en el suelo y su temperatura es relativamente alta (BRASIER *et al.*, 1993). Cuando el hongo penetra en la planta se multiplica rápidamente, produciendo zoosporas infectivas que alcanzan raíces adyacentes, bajo condiciones de saturación hídrica del suelo (COFFEY, 1991).

El control de la enfermedad se basa en impedir la infección y limitar la dispersión mediante medidas culturales, biológicas y químicas (HARDY *et al.*, 2001). 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 *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 en el tronco del árbol enfermo (FERNÁNDEZ-ESCOBAR *et al.*, 1994), y la aplicación de fosfonatos a las plantas y el suelo (FAIRBANKS *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2004).

El fosfonato es un fertilizante con función de fungicida sistémico que ha sido utilizado con éxito en el control de *P. cinnamomi* en varias especies forestales (WILKINSON *et al.*, 2001) y también en especies mediterráneas (NAVARRO *et al.*, 2004). El fosfonato se trasloca a través tanto del floema como del xilema, y una vez dentro del floema es traslocado a través de la planta en relación con los foto-asimilados (GUEST y GRANT, 1991), mostrando una mayor concentración en las

raíces y ramillos terminales. El mecanismo mediante el cual los fosfonatos protegen a estas especies de la acción del hongo no se conoce suficientemente, aunque parece que están relacionados con la acumulación de compuestos fenólicos (CANDELA *et al.*, 1995).

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto preventivo y curativo de la aplicación de fosfonato en brinzales de *Quercus ilex* y *Quercus suber* en el control de *Phytophthora cinnamomi*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

El material vegetal utilizado en este trabajo fueron brinzales de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) y de alcornoque (*Quercus suber* L.), de procedencia Sierra Morena Occidental (Región 11 Extremadura). El cultivo de la planta se realizó en el umbráculo de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes (ETSIAM) de la Universidad de Córdoba. Al final de la fase de cultivo en vivero, y previamente al trasplante a los envases definitivos, la planta de encina presentaba una altura de  $35,58 \pm 1,33$  cm., y un diámetro en el cuello de la raíz de  $5,42 \pm 0,64$ , y los de alcornoque tenían una altura de  $35,8 \pm 2,88$ , y un diámetro de  $3,58 \pm 0,27$ .

### *Diseño experimental*

El diseño experimental se realizó para verificar si el fosfonato es capaz de prevenir y/o controlar la infección de *P. cinnamomi*, por lo que se optó por un ensayo multifactorial con dos factores. El primer factor hace referencia al tipo de fosfonato utilizado como fungicida, seleccionándose el Brifos-K (50%) (Panreac) y un fosfonato elaborado que se preparó mezclando 2,8 g/100 ml de ácido fosforoso y 2,8 g/100 ml de KOH. El segundo factor hizo referencia al momento de aplicación del tratamiento con dos niveles, un tratamiento preventivo (anterior a la inoculación) y un tratamiento curativo (posterior a la inoculación) de *P. cinnamomi*. Se

incluyen dos controles, uno regado con agua y otro inoculado de *Phytophthora cinnamomi*, lo que supone seis tratamientos por especie. El número de plantas utilizado en el ensayo fue de 60 para encina y 36 para alcornoque.

El día 11 de Marzo de 2004 se empezó con el tratamiento preventivo. Este tratamiento consistió en aplicar Brifos-K (50%) y la solución preparada de fosfonato en 10 encinas y 6 alcornoques por tratamiento. Para tratar a la totalidad de las plantas se utilizó 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 días 12 y 13 de Marzo de 2004 las plantas fueron inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* en condiciones controladas. A partir del día 14 de Marzo en adelante se empezó a tener un control de riego de todas las plantas inoculadas. El tratamiento curativo, se realizó el día 26 de Marzo de 2004, mediante la aplicación a 10 encinas y 6 alcornoques de Brifos-K y la solución de fosfonato en iguales condiciones que el tratamiento preventivo.

La inoculación se realizó mediante la aplicación a los cepellones de las plantas de una suspensión acuosa de micelio y clamidosporas (SÁNCHEZ *et al.*, 2000, 2003). El inóculo se obtuvo a partir del *P. cinnamomi* (PE-90) caracterizado y conservado en la micoteca del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. El inóculo se preparó batiendo en agua estéril el micelio de PE 60 producido en medio de extracto de zanahoria (SÁNCHEZ *et al.*, 2003) durante un mes a 20° C en oscuridad, tras ser separado del medio nutritivo y lavado en agua estéril. La presencia de abundantes clamidosporas se comprobó mediante la preparación de montajes microscópicos de pequeñas cantidades de inóculo teñidas con fucsina ácida en lactofenol al 0,005%, y su posterior observación al microscopio óptico. La concentración del inóculo correspondió a la biomasa producida en 3 placas de Petri/100 ml de agua. Para la inoculación se añadieron

100 ml de esta suspensión al cepellón de cada plantón a inocular, cuidando de que su distribución fuese homogénea (SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Los plantones inoculados se transplantaron a macetas individuales Teku-Tainer (150 x 150 x 200 mm) previamente desinfectadas con lejía comercial diluida al 10%. El sustrato necesario para completar el volumen de los nuevos envases fue una mezcla formada por turba, arena y limo (1:1:1 en volumen). El suelo no era estéril, aunque la arena y el limo habían sido previamente desinfectados. Las plantas testigo no inoculadas fueron tratadas de la misma manera, añadiendo a sus cepellones 100 ml de agua estéril libre de material fúngico.

Una vez realizados los tratamientos, todas las macetas se colocaron en bandejas, de forma que en cada bandeja sólo hubiese plantones inoculados con el mismo tratamiento y el mismo tipo de inóculo. Las plantas testigo se colocaron en bandejas separadas. Posteriormente se añadió agua a todas las bandejas, de forma que el nivel se situara en unos 5 cm por debajo del borde de las macetas. Las plantas permanecieron encharcadas dos días dentro de las bandejas y el resto de días se sacaban de las mismas, así durante tres meses hasta que empezaron a mostrar alguna sintomatología evidente de afectación.

Las plantas fueron colocadas en el invernadero de la ETSIAM (Córdoba) donde permanecieron hasta el final del ensayo, que se extendió desde marzo hasta mitad de julio de 2004. El invernadero permitía un mejor control de la temperatura y de la humedad, que son factores fundamentales para el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*, el aislado PE 90 tiene una temperatura óptima de crecimiento de 25,2°C (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). Durante todo el ensayo se mantuvo un programa de riego constante para mantener hidratado el sustrato.

#### *Variables morfológicas*

A lo largo del ensayo se midió en tres ocasiones la altura de la parte aérea, y el diámetro del cuello de la raíz. Los días 28 y 29 de

julio de 2004 se procedió a levantar el ensayo. El desarrollo de la raíz secundaria y/o los daños producidos en ella por *Phytophthora cinnamomi*, se evaluó a través del peso seco. Las raíces de las plantas se lavaron cuidadosamente con agua para eliminar cualquier resto de sustrato, pero evitando dañar las raicillas para no producir pérdida de biomasa radical. Todo el material vegetal se introdujo en sobres de papel y éstos en una estufa de convección natural para desecación (P SELECTA), en la que permanecieron durante 76 horas a una temperatura de 65°C hasta peso constante. Cada fracción de la planta (hojas, tallo y raíz) fue pesada en una balanza de precisión Mettler Toledo PB203 (Máx. = ± 310g, min. = ± 0,02 g, e = ± 10 mg, d = ± 1 mg). Los datos registrados fueron el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la raíz secundaria.

#### *Medición de la fluorescencia.*

La fluorescencia de la clorofila se determinó utilizando un fluorímetro *Plant Efficiency Analyser* (PEA, Hansatech, Reino Unido). La fluorescencia basal ( $F_0$ ) 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 ( $F_m$ ):  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ; 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. La medición de la fluorescencia se realizó en dos ocasiones, 29 de Abril y 26 de Julio de 2004. Las mediciones se realizaron al mediodía, (12:00 hora solar) en cuatro plantas por tratamiento y especie, y se ha medido siempre en la misma hoja seleccionada en el tercio medio de cada planta.

#### *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 ha comprobado mediante el test de Komologorov-Smirnov, y la homocedasticidad por el test de Levene. Una vez realizada la comprobación de los requisitos básicos de los datos, se ha procedido a un análisis de la varianza (ANOVA) para las variables normalizadas. 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 las tablas y en las figuras como media y error estándar de cada tratamiento.

## RESULTADOS

#### *Altura y diámetro*

La altura y el diámetro al final del ensayo no mostraron diferencias significativas entre el control, el control inoculado (*P. cinnamomi*) y los distintos tratamientos tanto para encina como para alcornoque. Las alturas medias obtenidas para cada uno de los tratamientos de encina durante el ensayo oscilaron entre el valor máximo de Brifos Preventivo (BP) ( $h=28$  cm) y el valor mínimo de *Phytophthora* ( $h=22,3$  cm). Tras el análisis de la varianza ANOVA realizado ( $F=1,315$ ,  $P=0,272$ ), no se observaron diferencias significativas entre las distintas medias, por lo que no se distinguió grupos estadísticamente diferentes. No obstante, se observa una reducción del crecimiento de la parte aérea en el tratamiento *P. cinnamomi*.

El máximo diámetro medio correspondió al Control ( $d_{cr}=6,1$  mm), mientras que el valor mínimo medio de este atributo fue obtenido para *Phytophthora* ( $d_{cr}=5$  mm) aunque tampoco para este atributo las diferencias no fueron significativas al igual que ocurre con las alturas ( $F=1,442$ ,  $P=0,224$ ), aunque se mantuvo la tendencia a una pérdida de crecimiento en diámetro del tratamiento de *P. cinnamomi*. También debe destacar-

se la reducción en diámetro de los tratamientos curativos frente a los tratamientos preventivos. En el caso del alcornoque los valores de altura oscilaron entre un máximo alcanzado por *Phytophthora* (h=44,1 cm) y un mínimo valor que lo presenta el tratamiento FP (h=33,9 cm). Las diferencias no fueron significativas (F=0,644, P=0,668). El diámetro también sigue una evolución similar, sin que se detecten diferencias significativas (F=0,741, P=0,599). El Control es el que presenta un valor de diámetro más alto (dcr=5,5 mm) mientras que es el FC el que presenta un valor mínimo (dcr=4 mm). En el alcornoque la respuesta a la inoculación no parece producir un efecto depresor de la altura y el diámetro tan evidente frente a los tratamientos con fosfonatos.

#### *Pesos secos*

Los pesos secos de parte aérea no presentaron diferencias significativas. El valor máximo y mínimo de las medias tanto para encina como para alcornoque lo alcanzó el tratamiento Control y el tratamiento *Phytophthora* respectivamente. En el caso de la encina (F=2,189, P=0,069), el valor máximo de la media para el Control presenta un valor de peso seco aéreo de 5,2 g y el valor mínimo correspondiente a *Phytophthora* con de 3,3 g. El alcornoque tampoco presentó diferencias significativas (F=0,621, P=0,685), correspondiendo el valor máximo también al control con un valor de peso seco aéreo de 6,4 g y el valor mínimo al control inoculado con *Phytophthora* (peso de 4 g). Al igual que con los anteriores atributos morfológicos, los

pesos secos parecen indicar una reducción del crecimiento para el tratamiento inoculado, frente a los tratamientos con fosfonatos. Por otro lado, y aunque con diferencias entre especies y tratamientos, parece mantenerse la tendencia de un mayor peso seco de los tratamientos preventivos frente a los curativos.

En cuanto a los valores de la raíz secundaria para encina se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (F=4,309, P=0,01) (Cuadro 1). El tratamiento Brifos K preventivo (peso seco raíz secundaria de 5,5 g) alcanzó el máximo valor con respecto al resto de tratamientos, presentando el resto de los tratamientos con fosfonatos valores intermedios de aproximadamente 3,4 g. El valor mínimo correspondió al control inoculado con *Phytophthora* (2,7 g). En el caso del alcornoque también se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (F=3,004, P=0,017). El valor máximo de raíz secundaria lo presentó también el tratamiento Brifos K preventivo (10,9 g) y el valor mínimo correspondió también al control inoculado (3,9 g). El resto de tratamientos presentan valores intermedios ( $\approx$  6 g), con un valor ligeramente inferior para el caso del tratamiento con fosfonato curativo (4,6 g) (Cuadro 1).

#### *Medición de la fluorescencia*

En el caso de la encina (Figura 1) se observa como los valores de la relación Fv/Fm fueron menores en la segunda medición en todos los tratamientos. En la segunda medida las diferencias fueron estadísticamente significativas, siendo el control el que

Cuadro 1. Peso seco de raíz secundaria y error típico para cada tratamiento de *Quercus ilex* y *Q. suber* al final del ensayo. Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.

Tratamiento	<i>Quercus ilex</i>	<i>Quercus suber</i>
Control	4,87 (0,27)ab	6,65 (0,89)ab
Control inoculado	2,71 (0,47)c	3,99 (0,63)b
Brifos K preventivo	5,53 (1,41)a	10,97 (4,38)a
Brifos K curativo	3,37 (0,79)abc	6,08 (2,22)ab
Fosfonato preventivo	3,53 (0,79)abc	5,99 (0,67)ab
Fosfonato curativo	3,50 (1,77)abc	4,68 (0,78)b

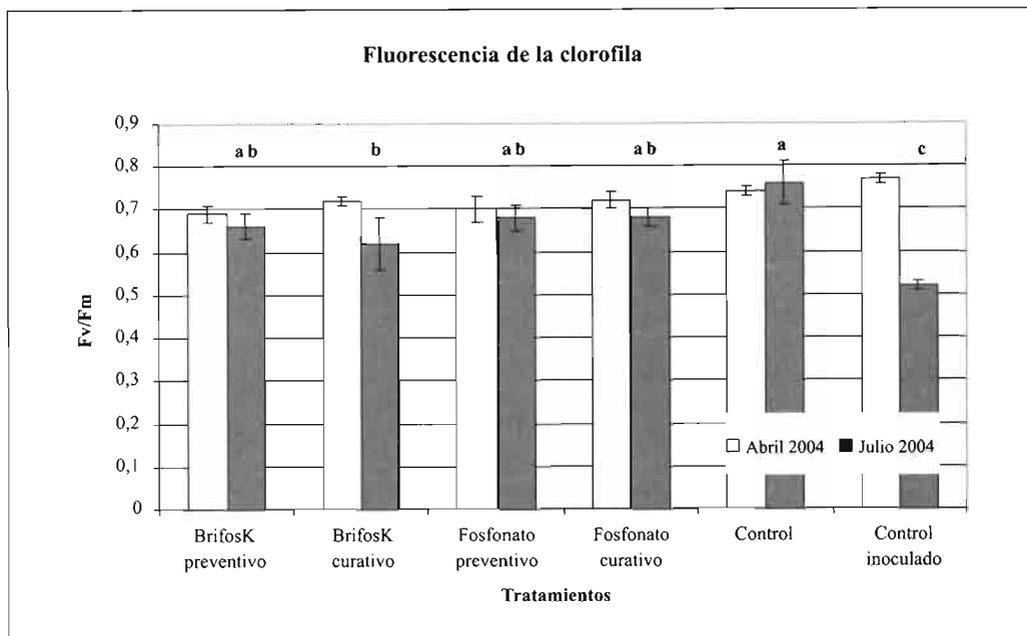


Figura 1. Valor medio de  $F_v/F_m$  y error típico para cada tratamiento de *Quercus ilex* en las dos mediciones realizadas durante los días 29 de abril y 26 de julio. Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.

presentó un nivel mínimo de estrés ( $F_v/F_m = 0,75$ ) ( $F = 3,620$ ,  $P = 0,008$ ). Comparando entre tratamientos se ve como el descenso fue mucho mayor en el caso del control inoculado con *Phytophthora* (0,52), mientras que el control no inoculado presentó un descenso muy poco acusado. Los tratamientos con fosfonatos presentaron en todos los casos un patrón similar ( $F_v/F_m \approx 0,64$ ), excepto para Brifos-K curativo (0,56) que tuvo valores similares al control inoculado.

En el alcornoque (Figura 2) también se produjo un aumento progresivo del estrés en todos los tratamientos, y por tanto una disminución del valor de la fluorescencia relativa entre la medida de julio respecto a abril, excepto en el tratamiento Brifos Preventivo ( $F_v/F_m \approx 0,70$ ) en el cual se observó que la relación  $F_v/F_m$  fue casi idéntica en ambas medidas. En la medición de abril todos los tratamientos presentaron un valor similar ( $F_v/F_m \approx 0,70$ ), con un ligero incremento en

el caso del control inoculado con *Phytophthora* ( $F_v/F_m \approx 0,73$ ), aunque las diferencias no fueron significativas ( $F=0,39$ ,  $P=0,846$ ). La medición de fluorescencia durante la segunda medición mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $F=7,56$ ,  $P<0,001$ ). Al igual que con la encina, el control inoculado presentó los valores menores de fluorescencia relativa ( $F_v/F_m=0,57$ ), frente al resto de tratamientos. Los tratamientos con fosfonatos y el Control presentaron valores de  $F_v/F_m$  superiores a 0,67, excepto el Brifos-K curativo que tuvo valores menores ( $F_v/F_m=0,63$ ), próximos al tratamiento control inoculado.

## DISCUSIÓN

Recientemente, el fungicida fosfonato, ha demostrado su eficacia en el control de daños de *P. cinnamomi* en brinzales de especies mediterráneas europeas (NAVARRO *et al.*,

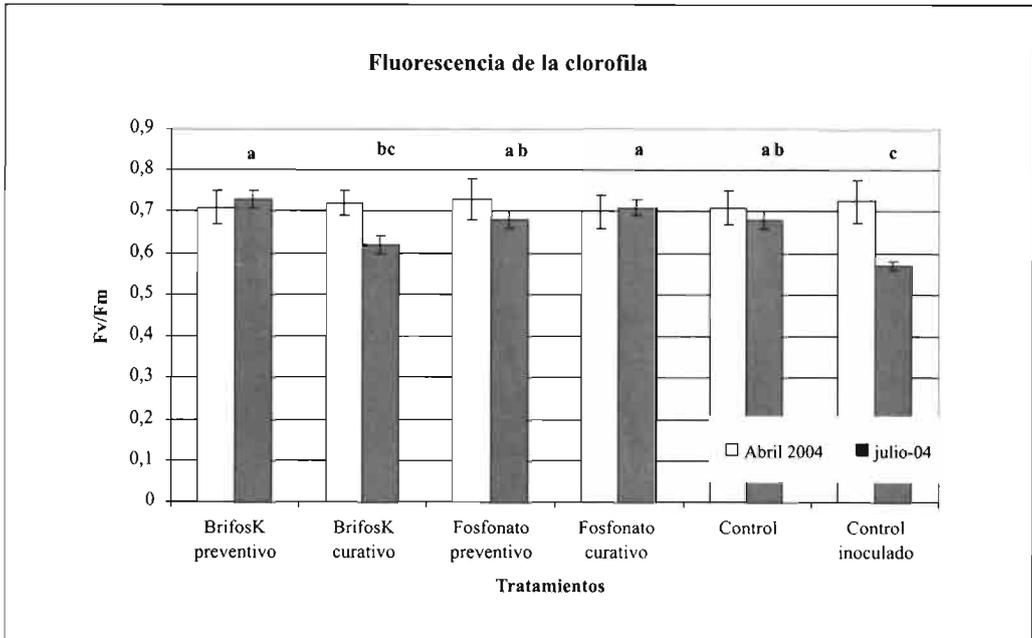


Figura 2. Valor medio de Fv/Fm y error típico para cada tratamiento de *Quercus suber* en las dos mediciones realizadas durante los días 29 de abril y 26 de julio. Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.

2004). El fosfonato es un fertilizante que actúa como un fungicida sistémico, el cual es trasladado en la planta a través del xilema y del floema y es trasladado a través de la planta en asociación con los foto asimilados en una relación fuente-sumidero (GUEST y GRANT, 1991). Los foto asimilados, y de la misma manera el fosfonato, parecen concentrarse más en las partes de la planta que presentan un mayor crecimiento, tales como las raíces finas y los crecimientos apicales (WHILEY *et al.*, 1995).

En este trabajo se ha evaluado la eficacia de dos tratamientos de fosfonatos (Brifos-K y fosfonato elaborado) con carácter preventivo y curativo en la encina y el alcornoque. La respuesta a estos tratamientos se ha estudiado a través de atributos morfológicos y fisiológicos. La morfología de los brinzales no se vio afectada significativamente tras la fertilización con fosfonatos, lo que coincide con los resultados obtenidos en ensayos previos

(BROWN, 2002; NAVARRO *et al.*, 2004), aunque las concentraciones empleadas han sido muy inferiores a las recomendables para especies forestales (HARDY *et al.*, 2001) y la duración del ensayo fue sólo de siete meses. Los incrementos de alturas y diámetros, no manifestaron diferencias significativas entre el control, y ninguno de los diferentes tratamientos incluido el control inoculado. Estudios realizados con ejemplares adultos muestran que la infección de *P. cinnamomi* produce parada de crecimiento y pérdidas de biomasa aérea (MAUREL *et al.*, 2001). Sin embargo, la falta de efecto en este caso puede deberse a que en los brinzales de *Quercus*, especialmente en la encina, se puede explicar porque éstas se producen en fases avanzadas de la enfermedad, y en este ensayo la duración total fue sólo de siete meses. El escaso crecimiento del diámetro y de la altura, dificultarían apreciar diferencias asociadas a la podredumbre radical en las fases iniciales de la enfermedad.

El atributo morfológico más afectado por la inoculación con *P. cinnamomi* fue el peso seco de la raíz secundaria. El análisis de la biomasa radical secundaria mostró diferencias significativas entre los tratamientos, tanto en encina como en alcornoque, aunque la separación entre grupos no fue muy clara. *P. cinnamomi* actúa sobre el sistema radical en general, pero especialmente sobre las raicillas finas (MARKS y SMITH, 1992). Los resultados obtenidos indican que el hongo sí infectó el sistema radical, aunque no se mostraran síntomas aéreos. En ambas especies, el tratamiento Brifos K preventivo alcanzó una mayor biomasa de raíz secundaria frente al control, lo que indica que *P. cinnamomi* no ha causado daños en el sistema radical de los brinzales que han recibido este tratamiento. Estos resultados coinciden con las experiencias de control de *P. cinnamomi* mediante fosfonato realizadas por otros autores (WILKINSON *et al.*, 2001; TYNAN *et al.*, 2001). Los tratamientos Brifos curativo, fosfonato preventivo y fosfonato curativo presentan entre ellos unos valores muy parecidos y ligeramente más bajos que el control, por lo que parece que el efecto protector ha sido menor, en particular en el caso del alcornoque. En conjunto para esta especie, no se ha producido una diferencia tan clara entre el desarrollo del control y el resto de tratamientos en términos de biomasa de raíz secundaria. La diferencia es mayor en el caso de la encina, por lo que parece confirmarse los resultados de RODRÍGUEZ MOLINA *et al.* (2002), que señalan a la encina como más sensible a *P. cinnamomi*, si bien, hay que tener en cuenta que en ese trabajo se trataba de ejemplares adultos, mientras que en este ensayo se trabajó con brinzales.

La fluorescencia de la clorofila permite estudiar las limitaciones a la fotosíntesis de origen no estomático (WERNER *et al.*, 2001). La fluorescencia relativa  $F_v/F_m$  es un índice adecuado para la evolución del nivel de estrés de una planta (STRASSER *et al.*, 2000). El parámetro más frecuentemente utilizado es la relación  $F_v/F_m$  (STRASSER *et al.*, 2000). Los valores de la fluorescencia entre los días de medición (29 de abril y 26 de julio) en

este trabajo presentaron un descenso de la relación  $F_v/F_m$  en todos los tratamientos. Esto indica que el estrés aumentó con la llegada del verano, y el incremento de la demanda hídrica de las plantas, encontrándose diferencias significativas entre tratamientos en la segunda medición. En la encina, los valores de fluorescencia ( $F_v/F_m$ ) disminuyeron a medida que progresó el ensayo y la planta aumentó su nivel de estrés. El control inoculado con *Phytophthora*, junto con el tratamiento Brifos K curativo presentaron un nivel máximo de estrés, aunque las diferencias fueron muy pequeñas respecto al resto de los tratamientos. Por otra parte, el resto de tratamientos mantuvieron unos niveles de estrés menor, presentando el control en julio un nivel de estrés moderado. En el alcornoque los valores de fluorescencia ( $F_v/F_m$ ) variaron de forma parecida a la encina. El control inoculado con *Phytophthora* alcanzó el valor máximo de estrés, seguido del tratamiento Brifos K curativo, presentando el resto de tratamientos un valor de estrés moderado. Los resultados de fluorescencia obtenidos parecen corroborar los resultados obtenidos para raíz secundaria, pudiéndose establecer una relación entre afectación al sistema de raíces finas de la planta y nivel de estrés hídrico expresado a través de la fluorescencia relativa.

La efectividad de los fosfonatos parece que aumenta cuando se aplica con carácter preventivo, aunque MARKS y SMITH (1992) encontraron un efecto positivo en la reducción de daños de *P. cinnamomi* en *Leucadendron* cuando se hacen los tratamientos de forma simultánea a la infección, e incluso se ha documentado el efecto protector de los fosfonatos cuando se aplican 24 horas después de la infección (ROHRBACH y SCHENCK, 1985). En este trabajo los fosfonatos como tratamiento preventivo parecen haber contribuido a controlar la acción de *P. cinnamomi*, en particular cuando se ha utilizado Brifos-K con carácter preventivo. La escasa diferencia de tiempo entre el tratamiento curativo y la infección parece demostrar que el uso de fosfonato protege a la raíz de la invasión del patógeno.

no de forma casi inmediata, debido posiblemente a la rápida actividad del fosfonato (GUEST y GRANT, 1991). Aunque en este trabajo no se han medido las concentraciones de fosfonato en ningún tejido vegetal, parece que la protección del fosfonato podría estar relacionada con una rápida traslocación desde las hojas a la raíz. Sin embargo, DAVIS (1989) encontró que el efecto del fosfonato decrece cuando el intervalo de tiempo entre el tratamiento y la inoculación aumenta por lo que los tratamientos curativos pueden ser poco eficaces. La protección frente a *Phytophthora parasitica* fue mínima cuando el tratamiento de fosfonato se aplicó 3-4 semanas después de la inoculación, incluso cuando se hicieron aplicaciones múltiples (DAVIS, 1989).

Los resultados de este trabajo parecen confirmar el efecto positivo de los fosfonatos en el control de *Phytophthora* en especies del género *Quercus*. En cuanto al tiempo que dura la acción protectora del fosfonato, diversos autores la sitúan alrededor de los 6 meses, aunque varía con muchos factores (WILKINSON *et al.*, 2001). En este caso, entre el tratamiento preventivo y la inoculación pasaron pocos días, pero el efecto se mantuvo durante los 7 meses que duró el ensayo. El carácter

preventivo observado en este ensayo parece recomendar el uso de la fertilización con fosfonatos en especies del género *Quercus* dada el efecto preventivo contra daños de *P. cinnamomi*, de acuerdo a lo que se viene realizando con otras especies forestales. Su efecto en individuos adultos, y posteriormente en masas naturales y repoblaciones, deben ser estudiados, ajustando las dosis adecuadas para evitar problemas de fototoxicidad (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 los proyectos AGL2002-00530. Bases biológicas, epidemiológicas y selvícolas para el control de las principales enfermedades asociadas a la seca de los *Quercus* en Andalucía.

## ABSTRACT

NAVARRO CERRILLO R. M<sup>a</sup>, A. I. TERÁN BOCERO, M. E. SÁNCHEZ. 2006. Preventive and curative effect of the application of phosphonate in the control of *Phytophthora cinnamomi* Rands in holm and cork oak seedlings. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 685-694.

Phosphonate is a fertilizer with a systemic fungicidal function, which has been successfully used in the control of *P. cinnamomi* in several forest species. The main objective of this work was to study the preventive and curative effect of the application of phosphonate in seedlings of *Quercus ilex* and *Quercus suber* in the control of *Phytophthora cinnamomi*. The experiment was designed so as to verify if the phosphonate was capable of preventing and/or controlling *P. cinnamomi* infection, for which a multifactorial assay was opted for with two factors, the type of phosphonate and the moment of application. Throughout the trial, measurements were made of the aerial part, the diameter of the root neck and the dry weight of the secondary root, as well as the chlorophyll fluorescence.

At the end of the experiment no significant differences were observed in height or diameter between treatments, either for the ilex or the cork oak, the secondary root weight being the most sensitive. The inoculated control had the lowest relative fluorescence values compared to the rest of the treatments, indicating greater stress. The treatments with phosphonates and the control showed higher values. The results of this work seem to confirm the positive effect of phosphonates in the control of *Phytophthora* in species of the genus *Quercus*.

**Key words:** *Quercus ilex*, *Q. suber*, forest decline, treatment.

## REFERENCIAS

- BRASIER, C. M., ROBREDO, F., FERRAZ, J. F. P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, **42**: 140-145.
- BROWN, K. R. 2002. Effects of Phosphorus Additions on growth, mineral nutrition, and gas exchange of Red Alder (*Alnus Rubra*) seedlings grown in outdoor sandbeds. *Western Journal of Applied Forestry*, **17**, (4): 209-215.
- CANDELA, M. E., ALCÁZAR, M. D., ESPIN, A., EGEA, C., ALMELA L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, **44**: 16-123.
- COFFEY, M.. 1991. Strategies for integrated control of soilborne *Phytophthora* species. En: *Phytophthora*. Lucas, J.A., Shattock, R.C., Shaw, D.S., Cooke, L.R.I (Eds). Cambridge Univ. Press, Cambridge. 411-432 pp.
- DAVIS RM. 1989. Effectiveness of fosetyl-AI against *Phytophthora parasitica* on tomato. *Plant Disease*, **73**: 215-217.
- 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., GALLEGÓ, 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. Path.*, **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*, **30**, (2): 133-139.
- MARKS, G. C., SMITH, I. W., 1992. Metalaxyl and phosphonate as prophylactic and curative agents against stem infection of *Leucadendron* caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **32**: 255-259.
- MAUREL, M., ROBIN, C., CAPRON, G., DESPREZ-LOUSTAU, M. L. 2001. Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass accumulation, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak and chestnut species. *Forest Pathology*, **31** (6): 353-369.
- NAVARRO CERRILLO, R. M; GALLO, L.; SÁNCHEZ, E.; TRAPERÓ, A.; FERNÁNDEZ, P. 2004. Efecto de distintas fertilizaciones de fósforo en la resistencia de brinzales de encina y alcornoque a *Phytophthora cinnamomi* Rands.. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales*, **13** (3): 550-557.
- 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.
- RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C., TORRES-VILA, L.M., BLANCO-SANTOS, A., NÚÑEZ, E.J.P. y TORRES-ÁLVAREZ, E. 2002. Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Pathology*, **32** (6): 365-372.
- ROHRBACH, K.G., SCHENCK, S., 1985. Control of pine-apple heartrot, caused by *Phytophthora parasitica* and *P. cinnamomi*, with metalaxyl, fosetyl-AI, and phosphorous acid. *Plant Disease* **69**: 320-343.
- RUPÉREZ, A., MUÑOZ, M. 1980. Grave enfermedad de las encinas. *Bol. San. Veg. Plagas*, **6**: 107-108.
- SÁNCHEZ, M.E., CAETANO, P., FERRAZ, J. y TRAPERÓ, A. 2000. El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 447-464.
- SÁNCHEZ, M.E., SÁNCHEZ, J.E., NAVARRO, R.M.; FERNÁNDEZ, P.; TRAPERÓ, A. 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 87-108.
- 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*, **49**, (6): 761-770.
- WERNER, C., RIEL, R.J., CORREIA, O., BEYSCHLAG, W. 2001. Effects of photoinhibition on whole plant carbon gain assessed with a photosynthesis model. *Planta Cell Environ*, **24**: 27-40.
- WHILEY AW, HARGREAVES PA, PEGG KW, DOOGAN VJ, RUDDLE LJ, SARANAH JB, LANGDON PG, 1995. Changing sink strengths influence translocation of phosphonate in avocado (*Persea americana* Mill.) trees. *Australian Journal of Agricultural Research*, **46**: 1079-90.
- 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*, **30** (4): 343-351.

(Recepción: 2 junio 2006)

(Aceptación: 16 agosto 2006)