

## Detección de *Phytophthora cinnamomi* en dehesas de Extremadura afectadas por “seca” y su comportamiento *in vitro*

M.C. RODRÍGUEZ-MOLINA, R. SANTIAGO MERINO, A. BLANCO SANTOS, J.D. POZO QUINTANILLA, M.I. COLINO NEVADO, E.J. PALO NÚÑEZ, L.M. TORRES-VILA

Con el objetivo de determinar la asociación de *P. cinnamomi* con el síndrome de seca en dehesas de Extremadura se realizaron dos prospecciones de focos de seca, la primera de ellas entre el otoño de 1991 y la primavera de 1992, y la segunda entre la primavera del año 1999 y la del año 2000. En la primera prospección se muestrearon 30 focos y *P. cinnamomi* se detectó en 12 (40%) de ellos (9 correspondían a dehesas de encina y 3 a dehesas mixtas de encina y alcornoque). En la segunda prospección se muestrearon 27 focos y *P. cinnamomi* se detectó en 8 (30%) de ellos (5 correspondían a dehesas de encina y los otros 3 a dehesas mixtas de encina y alcornoque). El porcentaje de focos de seca en los que el hongo se encuentra implicado se ha mantenido relativamente estable en el intervalo de tiempo transcurrido entre las dos prospecciones, a pesar de la reactivación de la seca en ese periodo. *P. cinnamomi* fue la única especie de *Phytophthora* detectada en ambas prospecciones.

Se determinó la tasa de crecimiento sobre patata-dextrosa-agar a 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C de 9 aislados de *P. cinnamomi*, 7 de ellos procedentes de suelo de encinar y 2 de suelo de alcornoque. Se observó una gran variabilidad entre aislados en cuanto a temperaturas óptimas de crecimiento y tasas de crecimiento diario, incluso entre aislados procedentes del mismo foco de seca.

Los resultados indican que *P. cinnamomi* desempeña un papel significativo en los procesos de seca en Extremadura y evidencian no sólo una considerable plasticidad fenotípica en relación a la temperatura sino también variabilidad fenotípica entre aislados en la tasa de crecimiento.

M.C. RODRÍGUEZ-MOLINA y E.J. PALO NÚÑEZ: Departamento de Fitopatología, Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Avda. de Portugal s/n, 06800 Mérida, Badajoz.

R. SANTIAGO MERINO, J.D. POZO QUINTANILLA y M.I. COLINO NEVADO: Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Ctra. de San Vicente 3, 06071 Badajoz.

A. BLANCO SANTOS: Servicio Forestal, Caza y Pesca. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Ctra. de San Vicente 3, 06071 Badajoz.

L.M. TORRES-VILA: Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Avda. de Portugal s/n, 06800 Mérida, Badajoz.

**Palabras clave:** *Phytophthora cinnamomi*, encina, alcornoque, dehesa, seca, temperatura, variabilidad fenotípica, plasticidad fenotípica.

### INTRODUCCIÓN

El decaimiento y muerte de algunas especies del género *Quercus*, fenómeno habitualmente denominado “seca” (Fig. 1, Fig. 2 y

Fig. 3), es uno de los principales problemas fitosanitarios que actualmente afecta a las dehesas y bosques españoles. A principios de la década de los 80 del siglo XX se detectaron los primeros focos de seca en nuestro



Fig. 1.- Encinas en ladera con síntomas de "seca": síndrome de muerte súbita.

país, pero fue al final de los 80 y principio de los 90 cuando se produjo una rápida y alarmante expansión de este síndrome, afectan-

do principalmente a encina y alcornoque (COBOS *et al.*, 1993; BRASIER, 1996; ARIAS y DEL POZO, 1997). Así, en el año 1991 se



Fig. 2.- Encinas con síntomas de "seca": síndrome de muerte súbita.



habían detectado en Andalucía, Castilla-La Mancha, Extremadura, Madrid y Castilla-León un total de 1255 focos afectando a más de 20.000 ha. (LECO BERROCAL, 1994). A finales de los 90 se produce una fase de reactivación de la seca, al menos en Extremadura (FERNÁNDEZ CANCIO, 1999). Los datos extraídos de encuestas realizadas por el Servicio de Sanidad Vegetal de Extremadura y por la Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto de Tronco Ibérico (AECERIBER) (VÁZQUEZ, 1999) indican que desde 1995 se han detectado al menos 70 nuevos focos en Extremadura, que hay que añadir a los 409 detectados en 1991 (LECO BERROCAL, 1994).

En 1991 y 1992 se realizaron prospecciones de focos de seca en España y Portugal, aislándose el hongo *Phytophthora cinnamomi* Rands de raíces y rizosfera de encinas y alcornoques con síntomas de decaimiento (BRASIER, 1992; BRASIER *et al.*, 1993). Desde entonces, *P. cinnamomi* se ha considerado como uno de los principales agentes implicados en los procesos de seca, y se ha

comprobado su poder patógeno sobre plántulas de encina y alcornoque (RODRÍGUEZ-MOLINA *et al.*, 2002), así como plantas jóvenes (TUSET *et al.*, 1996; ROBIN *et al.*, 1998; GALLEGO *et al.*, 1999; LUQUE *et al.*, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2000) e individuos adultos de estas especies (TUSET *et al.*, 1996). Sin embargo, en prospecciones realizadas en Extremadura, Andalucía, Castilla-La Mancha, Castilla-León y Madrid, el número de focos en los que se detecta la presencia de *P. cinnamomi* es relativamente bajo, lo que sugiere que el hongo se encuentra muy disperso en las áreas de encinares y alcornocales, y está altamente influenciado por las condiciones climáticas (TUSET *et al.*, 1996).

Las últimas décadas del siglo XX se caracterizaron por la alternancia de episodios de fuertes lluvias y encharcamientos con períodos de sequías severas (BRASIER, 1996; MANRIQUE MENÉNDEZ y FERNÁNDEZ CANCIO, 2000), condiciones éstas que incrementan la susceptibilidad del hospedador y favorecen la actividad de *P. cinnamomi* (BRASIER, 1996). A esta situación hay que



Fig. 3.- Encina con síntomas de "seca": síndrome de decaimiento lento.

añadir el aumento térmico sostenido desde 1970 en gran parte de la Península (FERNÁNDEZ CANCIO, 1999), lo que puede tener efectos tanto sobre la distribución de las especies arbóreas (SARDINERO *et al.*, 2000) como en los daños causados por *P. cinnamomi*, que puede incrementar su actividad con temperatura elevada y/o aprovechar el estrés que ésta causa en la vegetación hospedadora.

Además de *P. cinnamomi*, otros factores, tanto bióticos como abióticos, pueden estar implicados y contribuir en mayor o menor medida a los procesos de decaimiento y seca. Entre los factores bióticos se han señalado los hongos *Hypoxylon mediterraneum* (de Not.) Ces y de Not. (TORRES JUAN, 1985; LUQUE y ÁLVAREZ, 1997) y *Botryosphaeria stevensii* Shoem. (Anamorfo: *Diplodia mutila* Fr. y Mont) (RUPÉREZ y MUÑOZ, 1980; LUQUE y ÁLVAREZ, 1997; LUQUE *et al.*, 2000); la bacteria *Brenneria quercina* (Hildebrand y Schroth) Hauben *et al.* (LÓPEZ *et al.*, 1996; SORIA *et al.*, 1997) o incluso insectos como el coleóptero *Cerambyx cerdo* L. (ROMANIK y CADAHÍA, 1992). Entre los factores abióticos señalar los macro y micro climáticos (SPV, 1990; ALLUÉ, 1995; SSV, 1998; FERNÁNDEZ CANCIO, 1999) y los selvícolas (MONTROYA y MESÓN, 1994; LECO BERROCAL, 1994; SÁNCHEZ *et al.*, 2000).

En este trabajo se presentan los resultados de dos prospecciones de focos de seca en dehesas de Extremadura, la primera de ellas en 1991-1992, y la segunda en 1999-2000, con el objetivo de determinar la asociación de *P. cinnamomi* con el síndrome de seca. Por otra parte, se determina la tasa de crecimiento a distintas temperaturas de una colección de aislados de *P. cinnamomi* procedentes de los focos prospectados, con el objetivo de establecer las preferencias térmicas de los mismos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Prospecciones de focos de seca

Se realizaron dos prospecciones de focos de seca en dehesas de Extremadura, la primera de ellas entre el otoño de 1991 y la pri-

mavera de 1992, y la segunda entre la primavera del año 1999 y la del año 2000.

En la primera prospección se muestrearon 30 focos, de los cuales 21 correspondían a dehesas de encina y 9 a dehesas mixtas de encina y alcornoque (Tabla 1). En cada foco se derribaron 3 árboles afectados, tomándose una muestra de suelo de la rizosfera de cada uno de ellos y raicillas de grosor no superior a 5 mm.

En la segunda prospección se muestrearon 27 focos, 20 de los cuales correspondían a dehesas de encina, 3 a dehesas de alcornoque y 4 a dehesas mixtas de encina y alcornoque (Tabla 1). En cada foco se tomaron muestras de tierra y raicillas al pie de árboles con síntomas de decaimiento (3-5 árboles por foco), a una distancia de 1 m del tronco y a una profundidad variable entre 20 y 50 cm.

### Detección y aislamiento

Para la detección de *Phytophthora* spp. en las muestras de tierra se emplearon pétalos inmaduros de clavel como trampas o cebos vegetales. Después de homogeneizar las muestras, se tomaron submuestras (~ 15 gramos) que se dispusieron en placas de Petri de 90 mm de diámetro, se añadió agua destilada hasta formar una lámina, y flotando sobre ésta se situaron los pétalos inmaduros de clavel (8-10 pétalos por placa de Petri). Las placas se incubaron en oscuridad a 20 °C durante un tiempo variable entre 2 y 15 días, y se examinaron diariamente los bordes de los pétalos con microscopio (100 x) para distinguir los esporangios típicos de *Phytophthora* spp.

Para el aislamiento de *Phytophthora* spp. los pétalos se secaron sobre papel de filtro y posteriormente se sembraron sobre medio Ponchet (PONCHET *et al.*, 1972) o sobre medio PARPH (JEFFERS y MARTIN, 1986), selectivos ambos para *Phytophthora* spp.

Tan sólo en la primera prospección (1991-1992) se realizaron, además de los análisis de tierra, análisis de raicillas necróticas. Para ello, las muestras de raíces se lavaron con agua corriente durante 2 horas. Posteriormente se dejaron secar sobre papel de filtro

Tabla 2.- **Focos de seca muestreados (con indicación de la especie de *Quercus* afectada) y aislamientos positivos de *P. cinnamomi* en las campañas de muestreo 1991-1992 y 1999-2000 en Extremadura.**

Muestreo	Localidad (Provincia)	Especie	Nº de focos	
			muestreados	<i>P. cinnamomi</i> +
1991-1992	Alconchel (BA)	Encina	2	-
	Badajoz (BA)	Encina + alcornoque	1	-
	Herrera del Duque (BA)	Encina + alcornoque	2	-
	Mérida (BA)	Encina	2	-
	Oliva de la Frontera (BA)	Encina	1	1
	San Vicente de Alcántara (BA)	Encina	1	-
	Valencia de Mombuey (BA)	Encina	1	-
	Villanueva del Fresno (BA)	Encina	2	1
	Aldeacentenera (CC)	Encina	3	-
	Berzocana (CC)	Encina	1	-
	Cáceres (CC)	Encina	2	2
	Casas de Don Antonio (CC)	Encina + alcornoque	1	1 <sup>c</sup>
	Collado de la Vera (CC)	Encina + alcornoque	1	1 <sup>b</sup>
	Herrera de Alcántara (CC)	Encina	3	2
	Holguera (CC)	Encina	1	1
	Logrosán (CC)	Encina	2	1
	Portezuelo (CC)	Encina + alcornoque	3	1 <sup>c</sup>
Zorita (CC)	Encina	1	1	
<i>Subtotal muestreo 1991-1992</i>			30	12 (40%)
1999-2000	Alburquerque (BA)	Encina	2	1
	Alconchel (BA)	Encina	1	1
	Badajoz (BA)	Alcornoque	2	-
	Carmonita (BA)	Encina + alcornoque	1	1 <sup>b</sup>
	Cheles (BA)	Encina	1	1
	Fuente de León (BA)	Encina	1	-
	La Nava de Santiago (BA)	Encina	1	-
	La Roca de la Sierra (BA)	Encina + alcornoque	1	1 <sup>b</sup>
	Mérida (BA)	Alcornoque	1	-
	Oliva de la Frontera (BA)	Encina	1	-
	Puebla de la Reina (BA)	Alcornoque	1	-
	Puebla de Obando (BA)	Encina	1	-
	San Vicente de Alcántara (BA)	Encina	1	-
	Usagre (BA)	Encina	1	-
	Valencia de Mombuey (BA)	Encina	1	-
	Villar del Rey (BA)	Encina + alcornoque	3	2 <sup>a</sup>
	Aliseda (CC)	Encina	1	-
	Casas de Don Antonio (CC)	Encina	1	-
	Logrosán (CC)	Encina	1	-
	Portezuelo (CC)	Encina + alcornoque	1	-
	Santiago de Alcántara (CC)	Encina	1	1
	Serrejón (CC)	Encina	1	-
	Zorita (CC)	Encina	1	-
<i>Subtotal muestreo 1999-2000</i>			27	8 (30%)
<b>Total</b>			<b>57</b>	<b>20 (35%)</b>

a Un foco positivo de encina. Un foco positivo de encina y alcornoque, y se aísla de ambos.

b Se aísla de encina y de alcornoque

c Se aísla sólo de encina

BA: Badajoz, CC: Cáceres

y se trocearon en fragmentos de 3-5 mm. Parte de estos fragmentos se sembraron sobre medio Ponchet (8-10 fragmentos por placa), y otra parte se procesó de forma similar a las muestras de tierra: en placas de Petri de 90 mm de diámetro se dispusieron 8-10 fragmentos de raíces, se añadió agua destilada y pétalos inmaduros de clavel, y las placas se incubaron en oscuridad. El aislamiento de *Phytophthora* spp. a partir de los pétalos se realizó mediante siembra sobre medio Ponchet.

#### **Identificación de los aislados de *Phytophthora* spp.**

La identificación específica de los aislados se realizó en base a las características de los esporangios observados en los bordes de los pétalos de clavel, la morfología de las colonias en los medios patata-dextrosa-agar (PDA) y zanahoria-agar (ZA) (RAPILLY, 1968), así como a las características de los hinchamientos hifales formados en estos medios.

#### **Crecimiento de los aislados de *P. cinnamomi* a distintas temperaturas**

Se determinó el crecimiento a diferentes temperaturas de 9 aislados de *P. cinnamomi*. De éstos, 7 (EC-2, DS-2, EC-5, ET-7, LB, LE-1 y CU-A) se aislaron de muestras de suelo de encinar y 2 (Pcn-1 y Pcn-2) de muestras de suelo de alcornoque que se tomaron durante la prospección de los focos de seca realizada en 1999-2000.

Para cada aislado se determinó la tasa de crecimiento diario a 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Para ello se extrajeron, mediante un troquel cilíndrico previamente esterilizado, discos de inóculo de 10 mm de diámetro de placas conteniendo patata-dextrosa-agar (PDA) en las que se había desarrollado el aislado a estudiar. Cada disco de inóculo se sembró en el centro de una placa de Petri (90 mm de diámetro) conteniendo 18 mm de PDA. Por cada aislado se prepararon cuatro placas (repeticiones), que se mantuvieron en un incubador a la temperatura deseada y en oscuridad. Las mediciones de las colonias se

realizaron a intervalos de 24 h, empezando a las 48 h de la siembra, y en cada una de las placas se midieron dos diámetros perpendiculares de la colonia desarrollada. Dependiendo de la tasa de crecimiento de los aislados estas mediciones se prolongaron entre 11 y 29 días desde la fecha de siembra. Para cada aislado y temperatura se calculó la tasa media de crecimiento en mm/día.

Los efectos sobre la tasa de crecimiento de la temperatura, del aislado y de la interacción temperatura x aislado se estudiaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) Modelo I a dos vías (SOKAL y ROHLF, 1995), al considerar no sólo la temperatura sino también el aislado como factores fijos.

## **RESULTADOS**

#### **Prospecciones de los focos de seca**

*Phytophthora cinnamomi* se detectó en 12 de los 30 (40%) focos prospectados en 1991-1992, de los cuales 9 correspondían a dehesas de encina y 3 a dehesas mixtas de encina y alcornoque; y en 8 de los 27 (30%) focos prospectados en 1999-2000, de los cuales 5 correspondían a dehesas de encina, y los otros 3 a dehesas mixtas de encina y alcornoque (Tabla 1). De los 12 focos positivos en la prospección de 1991-1992, en 5 de ellos se detectó *P. cinnamomi* solamente en muestras de suelo, en 3 de ellos solamente en raicillas sembradas en medio selectivo, y en los 4 restantes se detectó el hongo tanto en las muestras de suelo como en las de raicillas.

#### **Identificación de los aislados de *Phytophthora* spp.**

Todos los aislados de *Phytophthora* spp. procedentes de las muestras de suelo se identificaron como *P. cinnamomi*. Las colonias desarrolladas sobre medio PDA presentaron aspecto de tipo roseta (Fig. 4), mientras que sobre medio ZA su aspecto fue uniforme, sin diferenciar ningún tipo característico. El micelio formado en ambos medios fue de tipo coraloide, con característicos hinchamientos hifales esféricos en racimos (Fig. 5),



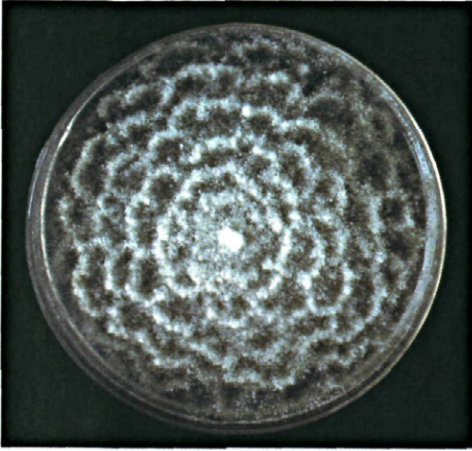


Fig. 4.- *Phytophthora cinnamomi*: colonia tipo "roseta" en medio PDA.

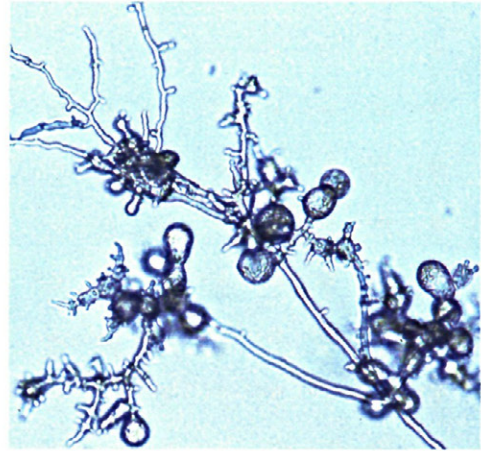


Fig. 5.- *Phytophthora cinnamomi*: micelio coraloide e hinchamientos hifales.

especialmente abundantes en medio ZA. Los esporangióforos formados en los bordes de los pétalos de clavel fueron simples, portando esporangios ovoides o elipsoidales, no papilados y persistentes (Fig. 6). Se observaron ramificaciones subesporangiales de los esporangióforos, y en ocasiones proliferaciones internas del esporangio, tanto en "nido" (Fig. 7) como extendidas, o ambas en el mismo esporangio (Fig. 8).

#### Crecimiento de los aislados de *P. cinnamomi* a distintas temperaturas

Las tasas medias de crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados procedentes de suelo de encinar y alcornoque se presentan en la Figura 9. La tasa de crecimiento se vio significativamente afectada por la temperatura, por el propio aislado y por la interacción temperatura x aislado (Tabla 2). Los incrementos de crecimiento diario de los aislados fueron, en general, lineales para cada temperatura (10, 15, 20, 25 y 30 °C), especialmente al excluir las primeras 48 h y las últimas 24 h previas al alcance de los bordes de las placas por las colonias. Ninguno de los aislados estudiados se desarrolló a 35 °C, ni fue capaz de crecer a 25 °C tras 10 días de exposición a 35 °C.

La tasa de crecimiento a 30 °C de los dos aislados de alcornoque fue más elevada que la de los aislados de encinar, y lo mismo ocurrió a 25 °C, (exceptuando el aislado CU-A que a esta temperatura presentó una tasa de crecimiento similar a la de los aislados de alcornoque), por lo que sus curvas de crecimiento resultan, al compararlas con las de los aislados de encinar, "desviadas" hacia el rango de temperaturas elevadas. Señalar el

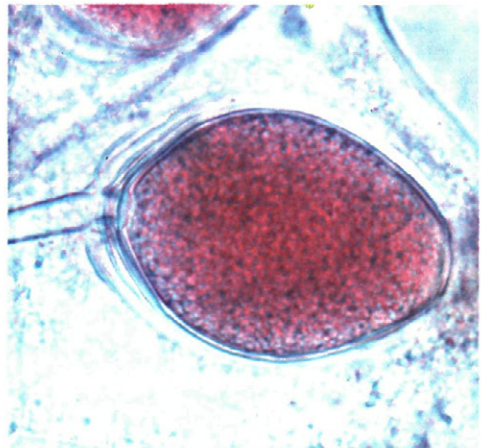


Fig. 6.- *Phytophthora cinnamomi*: esporangio ovoide.

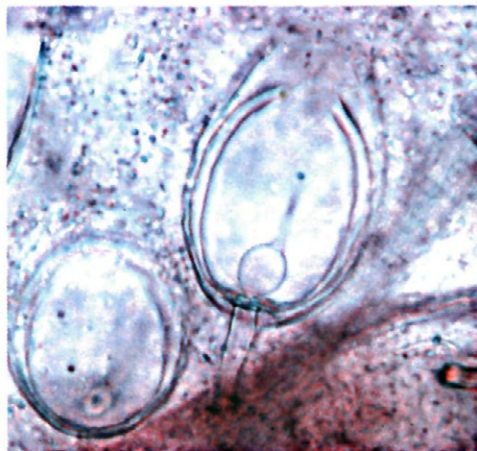


Fig. 7.- *Phytophthora cinnamomi*: esporangio con proliferación en "nido".

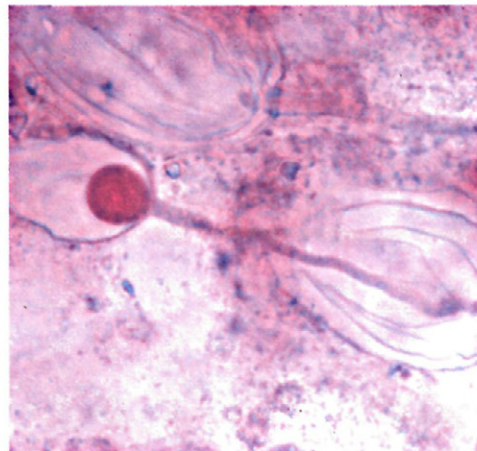


Fig. 8.- *Phytophthora cinnamomi*: esporangio con proliferación en "nido" y extendida.

caso del aislado Pcn-2, que es el único que presenta el óptimo de crecimiento a 30°C, con una tasa de crecimiento a esta temperatura de 14,4 mm/día y que es la máxima tasa de crecimiento observada en el ensayo. Es característico de este aislado el incremento cuasi-lineal de la tasa de crecimiento con la temperatura en el rango de 10 a 30 °C, incremento especialmente acusado (al menos en comparación con el resto de los aislados) al pasar de 10 a 15 °C, así como el escaso margen que existe entre la temperatura óptima de desarrollo y la cardinal máxima.

Los aislados de encinar no difirieron sustancialmente entre sí cuando se consideraron las tasas de crecimiento a 10, 15 y 30 °C. Sin embargo, al considerar los crecimientos a temperaturas intermedias (20 y 25 °C) se pudieron diferenciar dos grupos de aislados: los que presentan tasas de crecimiento rápido (ET-7, LE-1 y CU-A) y lento (EC-2, EC-5, DS-2 y LB). La mayoría de los aislados (6 de los 7 considerados) presentaron un crecimiento óptimo, más o menos variable en torno a 25 °C, y sólo en ET-7 tuvo lugar a 20 °C.

Es preciso señalar que aislados procedentes del mismo foco de seca presentaron temperaturas óptimas de crecimiento sensible-

mente diferentes. Así ocurre con los aislados EC-2 y EC-5, procedentes ambos de un foco en Cheles (Badajoz): mientras que el crecimiento más rápido de EC-2 se produjo claramente a 25 °C, EC-5 presentó un óptimo de crecimiento también en torno a 25 °C, pero mucho menos definido, con escasa diferencia entre las tasas de crecimiento a 20, 25 y 30 °C. Asimismo, los aislados Pcn-1 y Pcn-2, ambos de un foco en Carmonita (Badajoz), presentaron óptimos en torno a 25 y 30 °C, respectivamente.

## DISCUSIÓN

### Prospecciones de focos de seca e identificación de los aislados

En las dos prospecciones realizadas en Extremadura los porcentajes de focos en los que se detectó la presencia de *P. cinnamomi* fueron similares: 40% en la de 1991-1992 y 30% en la de 1999-2000. Estos resultados sugieren que el porcentaje de focos en los que el hongo se encuentra implicado se ha mantenido relativamente estable en el intervalo de tiempo transcurrido entre las dos prospecciones, a pesar de la reactivación de la seca en ese periodo (FERNÁNDEZ CANCIO, 1999).



Tabla 1.- ANOVA Modelo I a dos vías del efecto de la temperatura, del aislamiento y de su interacción sobre la tasa de crecimiento de *P. cinnamomi*

Fuente	gl	CM	F	P
Temperatura	4	526.16	1918.2	<0.001
Aislamiento	8	55.34	201.8	<0.001
Temperatura x Aislamiento	32	10.63	38.8	<0.001
Error	135	0.2743		

Los datos obtenidos a 35 °C se excluyeron del análisis ya que en los 9 aislamientos estudiados la tasa de crecimiento a esta temperatura fue cero. gl: grados de libertad. CM: cuadrados medios.

Por otra parte, estos porcentajes de aislamiento de *P. cinnamomi* son comparables a los obtenidos en otras prospecciones. Así, en las realizadas en 1991 en varias Comunidades Autónomas la presencia del hongo se detectó en el 47% de los focos correspondientes a alcornoque y del 17% de los correspondientes a encina (COBOS *et al.*, 1993); y en los muestreos realizados por ROBIN *et al.* (1998) en 24 zonas de encina y alcornoque del sudeste de Francia con diversos grados de decaimiento se aisló *P. cinnamomi* en 7 (29%) de las zonas muestreadas. Sin embargo estos porcentajes son claramente inferiores al 85% de focos positivos reportado por Brasier a raíz de las prospecciones realizadas en 1991 y 1992 en zonas de seca de encina y alcornoque en el sudoeste de la Península Ibérica (BRASIER, 1992; BRASIER *et al.*, 1993). Esta disparidad de resultados podría deberse, en parte, a la localización topográfica particular de los focos muestreados por Brasier, la mayoría de ellos distribuidos a lo largo de arroyos, valles o depresiones, o bien en zonas planas con acumulación de agua superficial en primavera o en zonas de alteración reciente del suelo; así como al estado húmedo del suelo en el momento del muestreo en casi todos los casos. Además, a los 9 focos prospectados personalmente por Brasier se sumaron 4 focos adicionales en los que otros colegas detectaron *P. cinnamomi*, sin aportar información sobre el porcentaje que suponen respecto al total de focos prospectados por ellos. Todo ello pudo producir una considerable sobre-estimación del porcentaje de focos de seca positivos en esos estudios.

En cualquier caso, el hecho de no encontrar *Phytophthora* en el suelo debe ser interpretado con precaución, ya que el fracaso en su detección no implica necesariamente su ausencia (ERWIN y RIBEIRO, 1996). De hecho son varios los factores que pueden influir y determinar el éxito o fracaso en la detección: la efectividad de los métodos de aislamiento, el modelo de distribución del patógeno, el nivel de muestreo y la densidad de inóculo en el suelo (ROBIN *et al.*, 1998).

Respecto a los métodos de detección señalar que, tanto en la prospección de 1991-1992 como en la de 1999-2000, se emplearon pétalos inmaduros de clavel como cebos para el aislamiento de *Phytophthora*. Una de las razones para utilizar este cebo fue su poca especificidad dentro del género, por lo que su empleo permitiría la "captura" tanto de *P. cinnamomi* (TELLO *et al.*, 1991; MUÑOZ *et al.*, 1996; GALLEGO *et al.* 1999; LUQUE *et al.* 2000) como de otras especies que pudieran estar asociadas a la rizosfera de encinas o alcornoques con síntomas de seca. De hecho los pétalos inmaduros de clavel se han mostrado eficaces en el aislamiento de *P. capsici* Leon. y *P. parasitica* Dastur (PONCHET *et al.*, 1972), e incluso *P. cactorum* (Leb. y Cohn) Schroet. y *P. cryptogea* Pethybr. y Laff. (TELLO *et al.*, 1991). En cualquier caso, como señala TSAO (1983), el éxito en la detección mediante cebos vegetales depende tanto de factores intrínsecos al cebo (susceptibilidad y edad o madurez de los tejidos) como de las condiciones de incubación (temperatura, luz, aireación, calidad del agua y proporción agua / suelo). En la prospección de 1991-1992 el empleo de

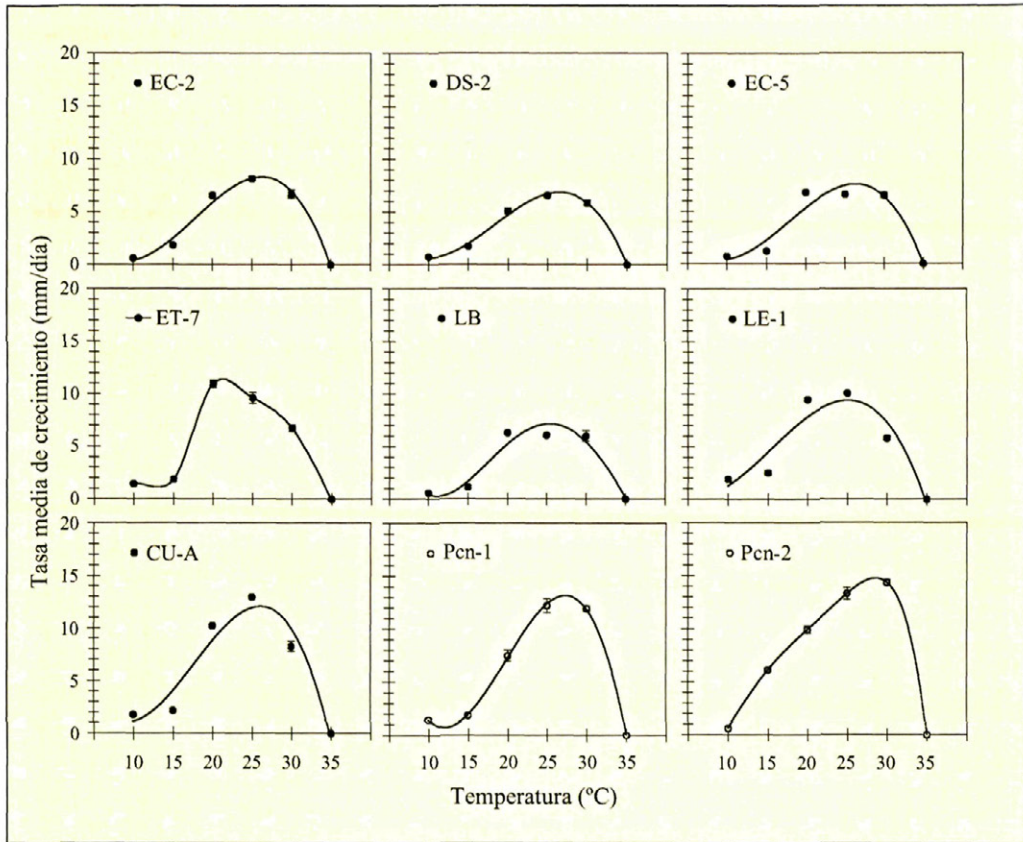


Fig. 9.- Tasa media de crecimiento (mm/día) en función de la temperatura de 9 aislados de *Phytophthora cinnamomi* procedentes de suelos de encinar (EC-2, DS-2, EC-5, ET-7, LB, LE-1 y CU-A) y alcornocal (Pcn-1 y Pcn-2). Las líneas verticales indican el error estándar de la media.

trampas vegetales para el aislamiento del suelo se complementó con la siembra de raicillas sobre medio agarizado selectivo, y aunque lo más frecuente fue la detección sólo en el suelo (5 de los 12 focos positivos) o en el suelo y las raicillas (4 de los 12 focos positivos), en 3 de los focos el hongo sólo se detectó en las raicillas y no en el suelo. Esto indica el interés de combinar, cuando es posible, los dos métodos de detección.

Por otro lado, según ROBIN *et al.* (1998) la probabilidad de capturar *P. cinnamomi* con el nivel de muestreo empleado (3-5 árboles por foco) es baja, especialmente si su distribución en el suelo no es uniforme sino agre-

gada, como demostraron DESPREZ-LOUSTAU y DUPUIS (1994).

En cuanto a la densidad del inóculo, ésta puede cambiar, desde indetectable hasta elevada, en un corto período (ERWIN y RIBEIRO, 1996). Así, en los suelos del oeste de Australia *P. cinnamomi* se detecta raramente por trapeo durante gran parte del año, particularmente durante los meses secos de verano (OLD, 1979; WESTE, 1983). De hecho, BRASIER (1992) atribuye los fallos en el aislamiento de esta especie en dos de los puntos muestreados por él en el sudoeste de la Península Ibérica a las condiciones secas del suelo en el momento del muestreo. El hongo

sobrevive los períodos secos en el suelo o en las raíces como clamidosporas de pared engrosada, o bien en las capas profundas del perfil del suelo alrededor de raíces infectadas (SHEARER y TIPPET, 1989). En estas condiciones, la profundidad a la que se toman las muestras de suelo se presenta como un factor determinante del éxito en la detección.

### **Crecimiento de los aislados de *P. cinnamomi* a distintas temperaturas**

Es preciso indicar que las comparaciones de las temperaturas cardinales y de crecimiento óptimo, así como de las tasas de crecimiento obtenidas en este estudio, con las indicadas por otros autores, deben ser interpretadas con precaución, ya que para un mismo aislado pueden variar según la composición del medio de cultivo empleado (SHEPHERD y PRATT, 1974; ZENTMEYER *et al.*, 1976), según la profundidad del agar (LEONIAN, 1934) e incluso según el método de aislamiento (SHEPHERD y FORRESTER, 1977).

SHEPHERD y PRATT (1974) determinaron las temperaturas cardinales y de crecimiento óptimo de 50 aislados de *P. cinnamomi* de Australia sobre varios medios de cultivo, entre ellos PDA. Sobre este medio, la temperatura mínima oscilaba entre 5 y 10 °C, la máxima entre 32,5 y 35 °C, mientras que la óptima se encontraba entre 25 y 25,7 °C. Nuestros resultados no permiten fijar con exactitud el intervalo de temperatura mínima, pero sí afirmar que la temperatura máxima de crecimiento de los 9 aislados estudiados es inferior a 35 °C, y que el intervalo de temperatura óptima de los aislados extremeños (entre 20 y 30 °C) es más amplio que el obtenido por SHEPHERD y PRATT (1974). Señalar sin embargo que el intervalo de temperatura óptima determinado por SHEPHERD y PRATT (1974) sobre PDA es más estrecho que sobre otros medios de cultivo, similarmente a los obtenidos por ZENTMEYER *et al.* (1976) sobre medio mínimo sintético (21-30 °C) y por ERWIN y RIBEIRO (1996), que oscila entre 20 y 32,5 °C. La temperatura óptima estimada por SÁNCHEZ *et al.* (2000) sobre medio zanahoria-agar para aislados de *P.*

*cinnamomi* procedentes de zonas de seca de encinas en Huelva fue de 32,2 °C, pero este valor se obtuvo a partir de una regresión curvilínea agrupando varios aislados, por lo que su rango de variación es desconocido.

Ninguno de los aislados estudiados se desarrolló a 35 °C, ni fue capaz de crecer a 25 °C después de 10 días de exposición a 35 °C. Esta situación contrasta con otros estudios en los que algunos aislados de *P. cinnamomi* fueron capaces de crecer a temperaturas superiores a 34 °C sobre PDA (ZENTMEYER *et al.*, 1976) o sobre otros medios agarizados (HAASIS *et al.*, 1964; SHEPHERD *et al.*, 1974; SÁNCHEZ *et al.*, 2000), pero es similar a la descrita por HÜBERLI *et al.* (2001), ya que ninguno de los 73 aislados estudiados por ellos fue capaz de crecer a 32 °C sobre PDA y el 75% de dichos aislados murieron tras 16 días de exposición a esa temperatura. Es preciso señalar el caso del aislado Pcn-2 por el escaso margen que existe entre la temperatura óptima de desarrollo (30 °C) y la cardinal máxima (35 °C).

Respecto a las tasas medias de crecimiento diario, las obtenidas a 25 °C (5,8- 13,3 mm/día) son inferiores a las determinadas por ZENTMEYER *et al.* (1976) a esta misma temperatura y también sobre PDA para 187 aislados de diferentes procedencias, y que oscilaron entre 11,2 y 21 mm/día. Sin embargo, son superiores a las determinadas por HÜBERLI *et al.* (2001) a 24 °C sobre PDA para 73 aislados procedentes de bosques de eucaliptos en Australia. Desafortunadamente no es posible comparar las tasas de crecimiento diario con las obtenidas por otros autores, ya que los medios de cultivo empleados son diferentes y esto, como ya se ha señalado, puede influir en la velocidad de crecimiento.

En cualquier caso, y a pesar de que el número de aislados de *P. cinnamomi* estudiado por nosotros es relativamente reducido (n=9), los resultados indican claramente una gran variación tanto en la temperatura óptima de crecimiento como en la tasa de crecimiento diario. Además, como se ha indicado, estos parámetros variaron incluso entre ais-



lados procedentes del mismo foco de seca. El efecto significativo de la temperatura sobre la tasa de crecimiento sugiere cierta plasticidad fenotípica de los aislados. Por otro lado, las diferencias observadas entre aislados en la tasa de crecimiento indica la existencia de variabilidad fenotípica. La convivencia en el mismo lugar geográfico de aislados con distintas preferencias de temperatura y diferentes tasas de crecimiento sugiere distintas estrategias adaptativas del patógeno a las condiciones térmicas de un medioambiente, predecible o impredecible, pero siempre fluctuante. Además, el significativo efecto de la interacción temperatura x aislado indica que la respuesta de los aislados extremeños, en términos de tasa de crecimiento, fue distinta según la temperatura. SHEPHERD y PRATT (1974) también observaron amplias diferencias en las tasas de crecimiento entre y dentro de poblaciones regionales de *P. cinnamomi* de Australia.

En resumen, la implicación de *P. cinnamomi* en los procesos de seca, si bien compleja, está actualmente fuera de duda y nuestros resultados corroboran que el hongo representa un papel significativo en los epi-

sodios de seca de encinas y alcornoques en Extremadura. Además, nuestro estudio relativo al crecimiento de los aislados extremeños a distintas temperaturas muestra el importante efecto regulador del medioambiente (temperatura) sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*, y evidencia una considerable variabilidad tanto fenotípica como en la plasticidad fenotípica, que se traduce en normas de reacción diversas en la tasa de desarrollo moduladas por la temperatura (PIGLIUCCI, 2001). El punto crucial que queda por determinar es si tal variabilidad puede estar correlacionada con el potencial patogénico de los aislados de *P. cinnamomi*.

## AGRADECIMIENTOS

A I. Sayago Hernández por su valiosa ayuda en el procesado de muestras, a J. Matamoros Portillo y a los Agentes Forestales del S.O.F. por su ayuda en la localización de focos y toma de muestras y a todos los propietarios de las fincas prospectadas por su amable colaboración. El presente trabajo fue financiado, en parte, por el Proyecto FEDER 1FD97-0911-C03-01.

## ABSTRACT

RODRÍGUEZ-MOLINA M.C., R. SANTIAGO MERINO, A. BLANCO SANTOS, J. D. POZO QUINTANILLA, M. I. COLINO NEVADO, E. J. PALO NÚÑEZ, L. M. TORRES-VILA. 2003. Detection of *Phytophthora cinnamomi* in declining Mediterranean open woodlands (*dehesas*) in Extremadura (SW Spain) and its growth *in vitro*. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 627-640.

Two surveys for the presence of *P. cinnamomi* in declining holm and cork oak stands in Extremadura (SW Spain) were performed. The first survey was carried out between autumn 1991 and spring 1992, and the second between spring 1999 and spring 2000. Thirty foci were sampled in the first survey and *P. cinnamomi* was detected in 12 (40%) of them (9 holm oak stands and 3 holm and cork oak stands); 27 foci were sampled in the second survey and *P. cinnamomi* was detected in 8 (30%) of them (5 holm oak stands and 3 of holm and cork oak stands). The percentage of decline foci where *P. cinnamomi* is involved has remained relatively stable in the lapse of time between the two surveys, despite of the oak decline reactivation during that period. *P. cinnamomi* was the only *Phytophthora* species isolated in both surveys.

Growth rates on potato-dextrose-agar at 10, 15, 20, 25, 30 and 35 °C were determined for 9 *P. cinnamomi* isolates, 7 of them from holm oak stands and 2 of them from a cork oak stand. Considerable variation in optimum growth temperatures and in daily growth rates occurred among isolates, even between isolates from the same decline focus.

Results show that *P. cinnamomi* plays a significant role in oak decline processes in Extremadura and evidence not only a considerable phenotypic plasticity in relation to temperature but also phenotypic variation among isolates in growth rate.

**Key words:** *Phytophthora cinnamomi*, holm oak, cork oak, *dehesa*, oak decline, temperature, phenotypic variation, phenotypic plasticity.

## REFERENCIAS

- ALLUÉ, J.L., 1995. El cambio climático y los bosques españoles. *Cuad. SECF*, **2**: 35-74.
- ARIAS GIRALDA, A., DEL POZO QUINTANILLA, J.D., 1997. *Informe del Servicio de Sanidad Vegetal sobre la "seca" de la encina y del alcornoque en Extremadura*. Reunión de coordinación sobre el decaimiento de las quercíneas. Informe INIA (Inédito), Badajoz 5 y 6 de Noviembre.
- BRASIER, C.M., 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature*, **360**: 539.
- 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.
- COBOS, J.M., MONTROYA, R., TUSET, J.J., 1993. New damage to *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*. *En: Recent Advances in Studies on Oak Decline* (Luisi, N., Lerario, P., Vannini, A., Eds.), pp. 163-170, Putignano, Tipolitografía Radio, Brindisi.
- DESPREZ-LOUSTAU, M.L., DUPUIS, F., 1994. Spatial distribution and pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* isolates originating from soil and infested red oak stand. *Colloq. INRA*, **68**: 79-91.
- ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K., 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- FERNÁNDEZ CANCIO, A., 1999. El fitoclima y la seca de los *Quercus*. *En: Congreso sobre Forestación en las Dehesas*, IPROCOR, Mérida.
- GALLEGU, F.J., PÉREZ DE ALGABA, A., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R., 1999. Etiology of oak decline in Spain. *Eur. J. For. Path.*, **29**: 17-27.
- HAASIS, F.A., NELSON, R.R., MARX, D.H., 1964. Morphological and physiological characteristics of mating types of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, **54**: 1146-1151.
- HÜBERLI, D., TOMMERUP, I.C., DOBROWOLSKI, M.P., CALVER, M.C., HARDY, G.E. ST J., 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycol. Res.*, **105**: 1053-1064.
- JEFFERS, N.S., MARTIN, J.B., 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.*, **70**: 1038-1043.
- LECO BERROCAL, F., 1994. La seca de los encinares y alcornocales de Extremadura. ¿Cuestión física o humana?. *Aegyptus*, **12**: 23-30.
- LEONIAN, L.H., 1934. Identification of *Phytophthora* species. *W. Va. Agric. Exp. Stn. Bull.*, **262**: 1-36.
- LÓPEZ, M.M., GARCÍA, M., ROSELLÓ, M., MORENTE, C., ORELLANA, N.+ FERRER A., LÓPEZ F., SORIA S., LÓPEZ M.J., 1996. Primera identificación en España de *Erwinia chrysanthemi* en patata, *E. quercina* en encina y rebollo, *E. rubrifaciens* en nogal y *Rhodococcus fascians* en coliflor. *En: Resúmenes del VIII Congreso de la SEF*, pp. 122, SEF, Córdoba.
- LUQUE, J., ÁLVAREZ, I., 1997. Patogenicidad de hongos aislados del alcornoque en Cataluña. *En: II Congreso Forestal Español - I Congreso Forestal Hispano-Luso* (Tomo V), pp. 423-430, SECF, Madrid.
- LUQUE, J., PARLADÉ, J., PERA, J., 2000. Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *For. Path.*, **30**: 247-263.
- MANRIQUE MENÉNDEZ, E., FERNÁNDEZ CANCIO, A., 2000. Extreme climatic events in dendroclimatic reconstructions from Spain. *Climatic Change*, **44**: 123-138.
- MONTROYA, J.M., MESÓN, M., 1994. Los factores catalizadores de la "seca de los *Quercus*". *Ecología*, **8**: 185-191.
- MUÑOZ LÓPEZ, M.C., COBOS SUÁREZ, P., MARTÍNEZ SAAVEDRA, G., SOLDEVILLA PUGA, C., DÍAZ LORENTE, M., 1996. *Micoflora y Patología del Alcornoque* (*Quercus suber* L.). M.A.P.A., Madrid.
- OLD, K.M. (Ed.), 1979. *Phytophthora and Forest Management in Australia*. C.S.I.R.O., Melbourne.
- PIGLIUCCI, M., 2001. *Phenotypic Plasticity Beyond Nature and Nurture*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- PONCHET, J., RICCI, P., ANDREOLI, C., AUGÉ, G., 1972. Méthodes sélectives d'isolement du *Phytophthora nicotianae* f. sp. *parasitica* (Dastur) Watherh. a partir du sol. *Ann. Phytopathol.*, **4**: 97-108.
- RAPILLY, F., 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Épiphyt*, **19** (hors série): 1-101.
- ROBIN, C., DESPREZ-LOUSTAU, M.L., CAPRON, G., DELATOUR, C., 1998. First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. *Ann. Sci. For.*, **55**: 869-883.
- RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C., TORRES-VILA, L.M., BLANCO-SANTOS, A., PALO-NÚÑEZ, E.J., TORRES-ÁLVAREZ, E., 2002. Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. *For. Path.*, **32**: 365-372.
- ROMANYK, N., CADAHIA, D. (Eds.), 1992. *Plagas de Insectos de las Masas Forestales Españolas*. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- RUPÉREZ, A., MUÑOZ, M.C., 1980. Grave enfermedad de las encinas. *Bol. San. Veg. Plagas*, **6**: 108-.
- SÁNCHEZ, M.E., ANDICOBERRY, S., TRAPERU, A., 1999. Muerte de plántulas de encina causada por *Phytophthora* spp. en viveros de la provincia de Córdoba. *En: Congreso sobre Forestación en las Dehesas*, IPROCOR, Mérida.
- SÁNCHEZ, M.E., CAETANO, P., FERRAZ, J., TRAPERU, A., 2000. El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 447-464.
- SARDINERO, S., FERNÁNDEZ CANCIO, A., PEREIRA, I., MANRIQUE, E., 2000. *Oak decline and vegetation dynamics in Southwestern Spain*. Report for Research Project 1FD97-0911-C3-1. INIA, Madrid.
- SHEARER, B.L., TIPPET, J.T., 1989. Jarrah dieback: the dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi*.

- mom* in the Jarrah (*Eucalyptus marginata*) forest of south-western Australia. Department of Conservation and Land Management Western Australia Research Bulletin, 3: 1-76.
- SHEPHERD, C.J., PRATT, B.H., 1974. Temperature-growth relations and genetic diversity of A2 mating-type isolates of *Phytophthora cinnamomi* in Australia. *Aust. J. Bot.*, 22: 231-249.
- SHEPHERD, C.J., FORRESTER, R.I., 1977. Influence of isolation method on growth rate characteristics of populations of *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.*, 25: 477-482.
- SHEPHERD, C.J., PATT, B.H., TAYLOR, P.A., 1974. Comparative morphology and behaviour of A1 and A2 isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Aust. J. Bot.*, 22: 461-470.
- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J., 1995. *Biometry*. Freeman, New York.
- SORIA, S., LÓPEZ, M., LÓPEZ, M., 1997. Presencia, sintomatología y daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación con la seca de la encina. *Ecología*, 11: 295-301.
- SPV, 1990. Dehesa: Muerte de encinas. Boletín Fitosanitario de Avisos e Informaciones, Servicio de Protección de los Vegetales, Junta de Extremadura, nº 26 (1990).
- SSV, 1998. Dehesa: Un nuevo episodio de la "seca de encinas y alcornoques". Boletín Fitosanitario de Avisos e Informaciones, Servicio de Protección de los Vegetales, Junta de Extremadura, nº 23 (1998). [[http://www.juntaex.es/consejerias/aym/dgpifa/sanidad%20vegetal/1998/bol\\_23.htm](http://www.juntaex.es/consejerias/aym/dgpifa/sanidad%20vegetal/1998/bol_23.htm)]
- TELLO, J.C., VARES, F., LACASA, A., 1991. Análisis de muestras. *En: Manual de Laboratorio: Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nemátodos Fitopatógenos*, pp. 39-48, M.A.P.A., Madrid.
- 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.
- TSAO, P.H., 1983. Factors affecting isolation and quantitation of *Phytophthora* from soils. *En: Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology* (Erwin, D.C., Bartnicki-García, S., Tsao, P.H., Eds.), pp. 219-236, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- TUSET, J.J., HINAREJOS, C., MIRA, J.L., COBOS, J.M., 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques. *Bol. San. Veg. Plagas*, 22: 491-499.
- VÁZQUEZ, F.M., 1999. *Aproximación al conocimiento actual del estado de la "seca" en Extremadura*. I Reunión de coordinación del proyecto "Causas del decaimiento y seca de las masas de *Quercus* mediterráneas: Técnicas de amortiguamiento (Inédito).
- WESTE, G., 1983. Population dynamics and survival of *Phytophthora*. *En: Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology* (Erwin, D.C., Bartnicki-García, S., Tsao, P.H., Eds.), pp. 237-257, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- ZENTMEYER, G.A., LEARY, J.V., KLURE, L.J., GRANTHAM, G.L., 1976. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology*, 66: 982-986.

(Recepción: 13 marzo 2003)

(Aceptación: 2 junio 2003)