

III Reunión del Grupo de Trabajo de Sanidad Forestal

Aislamiento e identificación de oomicetos en focos de podredumbre radical de Andalucía y Extremadura

Ruiz Gómez, F.J.^{1*}, Navarro Cerrillo, R.M.¹, Lara Gómez, M.A.² y Sánchez-Cuesta, R.¹

¹ Grupo Evaluación y Restauración de Sistemas Agrícolas y Forestales (RNM360).

Departamento de Ingeniería Forestal, Universidad de Córdoba. Edificio Leonardo Da Vinci, 1ª Planta.

Campus de Rabanales, CT. N-IVa, km 396. CP 14071 Córdoba.

² IDAF-Centro de Investigaciones Aplicadas al Desarrollo Agroforestal. Edificio Leonardo Da Vinci, Planta baja.

Campus de Rabanales, CT. N-IVa, km 396. CP 14071 Córdoba.

*Autor para correspondencia: g72rugof@uco.es

Resumen

El decaimiento de los *Quercus* sigue siendo uno de los principales problemas de sanidad forestal en España y Portugal. Es difícil cuantificar los ingentes recursos económicos y humanos destinados a la búsqueda de soluciones, sin que se haya podido atajar el avance de la mortalidad en las dehesas. Aunque se señala a *Phytophthora cinnamomi* como agente causal de los episodios más graves, otros oomicetos han sido identificados como agentes relacionados con estos procesos de mortalidad, o como patógenos oportunistas o acompañantes. La complejidad de los sistemas forestales influye en la diversidad de patógenos de podredumbre radical en el suelo, por lo que se debe tener en cuenta el efecto agregativo de la interacción de dichos organismos en la podredumbre radical. En el presente trabajo se colectaron muestras de suelo en dehesas de Córdoba, Sevilla y Cáceres, en áreas de afección por decaimiento. El daño del arbolado se evaluó mediante una escala asimilada de Ferreti. Las muestras se cultivaron en medio selectivo, y se identificaron morfológicamente 26 especies diferentes de oomicetos. *Phytophthora cinnamomi* fue el patógeno que mayor número de aislamientos presentó. El número de especies aisladas en función del grado de daños mostró diferencias significativas, siendo los árboles con grado 2 aquellos en los cuales se identificó el mayor número de especies. La presencia de *P. cinnamomi* no estuvo asociada significativamente con la diversidad de otras especies.

Palabras clave: Decaimiento, interacción *Phytophthora*, *Pythium*, *Quercus ilex*.

1. Introducción

El decaimiento de los *Quercus* en el suroeste de la Península Ibérica sigue siendo uno de los principales problemas de sanidad forestal en España y Portugal, problema que viene afectando gravemente a masas de encina (*Quercus ilex* L.) y alcornoque (*Quercus suber* L.) desde los años 80 (Rupérez y Muñoz, 1980; Torres Juan, 1985). Igualmente se han identificado daños por decaimiento en masas mixtas de *Quercus*, habiéndose observado zonas afectadas por estos procesos dominadas por *Q. pyrenica* Willd., *Q. faginea* Lam., *Q. canariensis* Willd. y *Q. coccifera* L. (Carrasco *et al.*, 2009).

Actualmente resulta difícil cuantificar la ingente cantidad de recursos económicos y humanos destinados a la búsqueda de posibles soluciones a este problema, sin que hasta la fecha se haya podido atajar el avance del decaimiento de las dehesas. Los principales avances se centran en el estudio de las causas de la podredumbre radical (Brasier *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 2002; Navarro-Cerrillo *et al.*, 2004, 2006; Ruiz Gómez *et al.*, 2012, 2015) y en la aplicación de medidas preventivas y de limitación de daños al arbolado no afectado.

Respecto a la causa de la podredumbre radical, son numerosas las publicaciones que señalan al patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands. como principal factor desencadenante de los más graves episodios de decaimiento en dehesas extremeñas y andaluzas (Brasier *et al.*, 1993; Brasier, 1996; Sánchez *et al.*, 2002, 2003; Navarro-Cerrillo *et al.*, 2004, 2006; Corcobado *et al.*, 2013), así como en el montado portugués (Brasier *et al.*, 1993, Sánchez *et al.*, 2002, Moreira y Martins, 2005; Horta *et al.*, 2010; Camilo-Alves *et al.*, 2012).

Sin embargo, *P. cinnamomi* no es el único oomiceto capaz de producir podredumbre radical en dehesas y montados. Otras especies de pitiáceas han sido señaladas en ocasiones como agentes causales importantes en el decaimiento en encinares, como es el caso de *Pythium spiculum* Paul. (Romero *et al.*, 2007), *Phytophthora quercina* Jung., *Phytophthora psycrophila* Jung. y *Phytophthora syringae* Kleb. (Pérez Sierra *et al.*, 2013). En otras ocasiones, se han identificado más especies que actúan como patógenos oportunistas o acompañantes, que aparecen en cuadros sintomatológicos avanzados, agravando el decaimiento. Tal es el caso por ejemplo de *Phytophthora gonapodydes* (H.E. Petersen) Buisman. (Corcobado *et al.*, 2010), *Phytophthora dreschleri* Tucker., *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff. (Sánchez *et al.*, 2005), *Pythium irregulare* Buisman., ó *Phytophthora megasperma* Drechsler. (Pérez Sierra *et al.*, 2013) entre otras.

Hansen (2015) llama la atención sobre la influencia de la complejidad de los sistemas forestales en la diversidad de oomicetos de podredumbre radical en el suelo, señalando la importancia del efecto agregativo de la interacción de dichos organismos en el suelo, y la influencia del intercambio de materiales forestales de reproducción en estos procesos. Recurrentemente se describen nuevos efectos negativos de pitiáceas invasivas sobre especies vegetales, como resultado de campañas intensivas de reforestación (Oßwald *et al.*, 2014).

La evaluación de la relación entre la diversidad de patógenos y la incidencia de los procesos de mortalidad de especies forestales debe focalizarse en el estudio de los

síntomas y los grados de afección del arbolado, y en el análisis detallado de posibles relaciones con los agentes causales, considerando la presencia de diversas especies pitiáceas de podredumbre radical sobre la misma masa arbolada. Se asume que *P. cinnamomi* puede ser causa desencadenante de la podredumbre radical en la encina, por las evidencias aportadas de su patogenicidad sobre *Q. ilex* (Gallego et al., 1999), y los experimentos de inoculación realizados sobre plántones (Sánchez et al., 2005). Sin embargo, no se puede obviar el hecho de que, bajo las condiciones ambientales adecuadas, un complejo de especies de oomicetos causantes de podredumbre radical, sería capaz de reproducir los síntomas típicos causados por dicha especie.

El objetivo de este trabajo es evaluar la presencia de especies de pitiáceas causantes de podredumbre radical, diferentes de *P. cinnamomi*, en encinas de dehesas, en focos con síntomas evidentes de decaimiento.

2. Material y métodos

2.1. Localizaciones

Entre el otoño de 2014 y la primavera de 2015, se evaluaron 10 dehesas de encinar con procesos de mortalidad del arbolado, identificadas como posibles zonas de

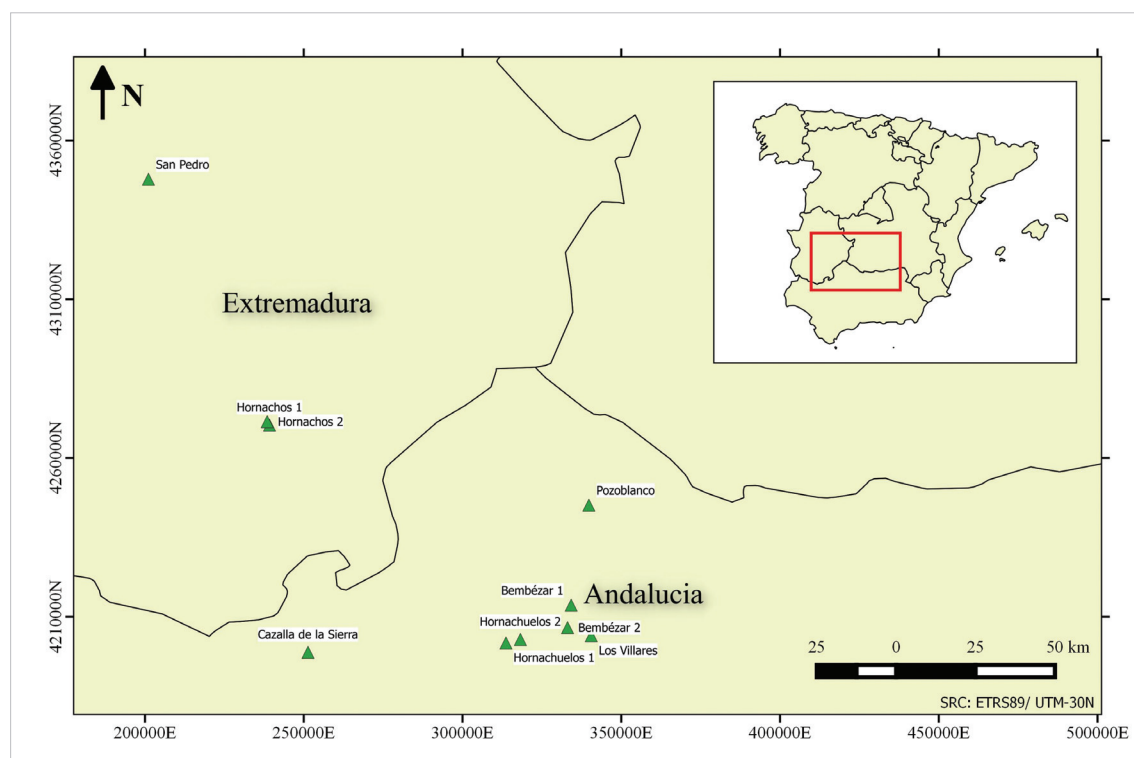


Figura 1. Mapa de situación de las localizaciones estudiadas. Líneas: Límites de comunidad autónoma. ▲: Centro de la localización.

afección por podredumbre radical, en Andalucía y Extremadura (*Figura 1*). Los posibles focos presentes en cada dehesa se determinaron tras un diagnóstico visual de los daños, a través de la identificación de síntomas característicos de podredumbre radical (puntiseado, clorosis, defoliación de la copa, muerte súbita de pies aislados o la presencia de chancros y brotes epicórmicos en el tronco de pies afectados), así como la presencia de patrones espaciales típicos de localización y dispersión de árboles afectados.

2.2. Evaluación de los focos y toma de muestras

En cada uno de los focos de podredumbre radical se evaluó el daño en el arbolado mediante la adopción de una escala de defoliación asimilada de Ferreti (1994) en intervalos de 5% respecto a un árbol con follaje completo en las condiciones locales (Comisión de las Comunidades Europeas, 1994), agrupándose los pies entre las clases 0 a 4 (*Tabla 1*), de acuerdo a los criterios de evaluación de la Red Europea de parcelas permanentes para el seguimiento intensivo y continuo de los ecosistemas forestales (Red de Seguimiento a gran Escala de Daños en los Bosques-Nivel I, 2013).

Tabla 1. Clases de defoliación de Ferreti (1994), en función del porcentaje de copa defoliada, y código asignado.

Clase defoliación	% defoliación	Código
<i>Defoliación Nula</i>	0-10%	0
<i>Defoliación Ligera</i>	11-25%	1
<i>Defoliación Moderada</i>	26-60%	2
<i>Defoliación Grave</i>	>60%	3
<i>Defoliación Total:</i> <i>Árboles secos o muertos</i>	100%	4

Siguiendo las normas de la Red Europea, no se consideró defoliación las ramas secas por poda natural o la copa muerta, los huecos en la copa que nunca estuvieron cubiertos por ramas, y las hojas decoloradas en las que son frecuentes los tonos amarillos (Red de Seguimiento a gran Escala de Daños en los Bosques-Nivel I, 2013). Por el contrario, y según marcan dichas directrices, se consideró defoliación aquellos crecimientos que, debiendo portar hojas, carecieron de ellas (ramillos portadores), y las hojas secas en la copa con un color rojizo o marrón. De éste modo se consideró defoliación la copa cuando aparecían las hojas secas de manera homogénea, cubriendo los síntomas más característicos de la podredumbre radical, como son el puntiseado y la muerte súbita.

Los focos fueron delimitados, identificando un núcleo donde los daños eran más acusados y, partiendo de la zona más afectada, hacia el exterior del mismo, estableciendo un perímetro de seguridad a partir de los últimos árboles afectados, de 2 filas de árboles con defoliación inferior al 25 %.

En cada foco se muestrearon al menos 2 árboles, el primero en la zona más afectada del foco, identificada como “núcleo”, con grado alto de defoliación (en torno al 60%). El segundo se seleccionó visualmente siguiendo el frente de avance del foco, en función de la dirección de la pendiente, la profundidad teórica de la capa freática y las posibles zonas de encharcamiento, y se muestreó un árbol con sintomatología de afección incipiente, generalmente con un grado de defoliación superior al 40% y con síntomas claros de daño con respecto al resto de árboles presentes a su alrededor, los cuales no presentaban síntomas de decaimiento. Se evitó seleccionar árboles evaluados como grado 4 de defoliación (secos, muertos o con defoliación 100%, incluyendo los pies con síntomas de muerte súbita y copa totalmente atabacada). En total fueron muestreados 26 árboles (*Tabla 2*).

El análisis y la determinación de la presencia de patógenos de podredumbre radical se hizo a partir de una muestra de suelo, recogida bajo la copa de cada uno de los pies seleccionados según la metodología descrita por Zamora Rojas *et al.* (2014).

Tabla 2. Grado de defoliación estimado en los pies seleccionados para la obtención de muestras de suelo, con indicación de la localización a la que pertenece cada uno.

Pie	Grado defoliación	Localización	Pie	Grado defoliación	Localización
26501	2	Los Villares (Córdoba)	141004_2	2	Bembézar 1 (Córdoba)
26502a	3	Los Villares (Córdoba)	141005_1	3	Bembézar 2 (Córdoba)
26502b	1	Los Villares (Córdoba)	141005_2	2	Bembézar 2 (Córdoba)
26503	0	Los Villares (Córdoba)	141005_B	1	Bembézar 2 (Córdoba)
140401	2	Hornachos 1 (Badajoz)	141007_1	3	San Pedro (Cáceres)
140402_1	2	Hornachos 2 (Badajoz)	141007_2	2	San Pedro (Cáceres)
140402_2	3	Hornachos 2 (Badajoz)	141007_3	1	San Pedro (Cáceres)
140402_3	2	Hornachos 2 (Badajoz)	141008_1	3	Cazalla de la Sierra (Sevilla)
141001_1	3	Hornachuelos 1 (Córdoba)	141008_2	3	Cazalla de la Sierra (Sevilla)
141001_2	2	Hornachuelos 1 (Córdoba)	141009	2	Cazalla de la Sierra (Sevilla)
141003_1	3	Hornachuelos 2 (Córdoba)	141010_1_1	2	Pozoblanco (Córdoba)
141003_2	2	Hornachuelos 2 (Córdoba)	141010_1_2	1	Pozoblanco (Córdoba)
141004_1	3	Bembézar 1 (Córdoba)	141010_4	1	Pozoblanco (Córdoba)

2.3. Aislamiento e identificación de patógenos

El aislamiento e identificación de patógenos se llevó a cabo a partir del aislamiento de colonias en trampa vegetal mediante “soil baiting”, y el cultivo por dupli-

cado en medios selectivos a base de antibióticos NARPH y PARPBH, específicos para oomicetos de los géneros *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp, según la metodología descrita por Ferguson y Jeffers (1999) y Jeffers y Martin (1986). En los casos en los que inicialmente se aislaron un gran número de especies del género *Pythium* spp., se realizó un segundo análisis tras un tratamiento de secado durante 5 días a temperatura ambiente y humidificación durante 48 h, con el fin de eliminar propágulos de las especies más sensibles al estrés hídrico, y aumentar así la probabilidad de detección de especies poco competitivas en ambiente saprófito debido a una disminución de la competencia por las trampas vegetales, como es el caso de *P. cinnamomi* (Zamora Rojas et al., 2014).

La identificación de las especies del género *Phytophthora* se realizó tras la observación al microscopio de cultivos, y la identificación y caracterización de las estructuras vegetativas, de resistencia y reproductivas de los aislados en medios Carrot Agar (CA) y Potato Dextrose Agar (PDA), la proliferación y caracterización de estructuras reproductivas como esporangióforos y esporangios en “Soil Extract” (SE/PDA), así como, cuando fue necesario, mediante ensayos de “Mating Type” para observar las oosporas de especies heterotálicas, y el estudio de las curvas de crecimiento, siguiendo las indicaciones de Erwin y Ribeiro (1996).

La identificación de las especies del género *Pythium* spp. se llevó a cabo mediante la clasificación por caracteres de van der Plaats-Niterink (1981) una vez identificado el género mediante las claves de Erwin y Ribeiro (1996). Una vez encontrada la coincidencia taxonómica, se comprobó la determinación con el apoyo de las descripciones publicadas para cada una de las especies determinadas.

2.4. Análisis estadístico

Se comprobó la normalidad de los datos mediante el Test de Saphiro-Wilk, estableciendo el nivel de significación en el 5% ($P < 0,05$). La homocedasticidad se comprobó mediante el Test de homogeneidad de varianzas de Levene ($P > 0,05$).

La presencia de diferencias significativas se estudió mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA) ($P < 0,05$). Para evaluar las diferencias entre las medias del número de aislamientos se utilizó el Test de Bonferroni ($P < 0,05$), recomendado para agrupamientos con diferente número de observaciones (Turechek y McRoberts, 2013). El análisis se llevó a cabo mediante el software “R” (The R Foundation, Vienna, 2002).

3. Resultados

3.1. Aislamiento de oomicetos

En el conjunto de las 10 localizaciones muestreadas se identificaron 21 especies de oomicetos (Tabla 3), perteneciendo 5 de ellas a distintas especies del género *Phytophthora* spp. y 16 especies de *Pythium* spp. Además, se obtuvieron 5 aislados per-

tenecientes a especies de *Pythium* spp. que no fue posible identificar mediante la metodología usada en el presente trabajo. El número máximo de especies identificadas en una misma muestra de suelo fue de 5 (*Pythium heterothallicum* Campbell & Hendrix., *Pythium flevoense* van der Plaats-Niterink., *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Sarej., *Pythium adhaerens* Sparrow y *Pythium mamillatum* Meurs.), en una muestra de la localización de Los Villares, en la cual también se determinó la presencia de *P. cinnamomi*.

Tabla 3. Especies de oomicetos identificadas en el conjunto de las parcelas. Las especies de *Pythium* spp. nombradas del 1 al 5, no fue posible identificarlas por caracteres morfológicos. N° Identif.= Número de muestras de suelo en los que se identificó cada especie.

Especie	N° Identif.	Referencia muestras positivas							
<i>Phytophthora cactorum</i>	1	140402_1							
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	8	260502b	141007_1	141007_2	141007_3	141004_1	141004_2	141003_1	141003_2
<i>Phytophthora citrophthora</i>	1	260501							
<i>Phytophthora cryptogea</i>	1	141003_1							
<i>Phytophthora gonapodydes</i>	1	141004_2							
<i>Pythium acanthophoron</i>	1	140009							
<i>Pythium adhaerens</i>	2	260501	141003_2						
<i>Pythium apoleroticum</i>	1	140401							
<i>Pythium aquatile</i>	2	141010_1_1	141003_1						
<i>Pythium diclinum</i>	3	140401	140402_2	140402_3					
<i>Pythium flevoense</i>	1	260501							
<i>Pythium heterotalicum</i>	1	260501							
<i>Pythium irregulare</i>	6	141001_1	141001_2	141005_1	141005_2	141005_B	141004_2		
<i>Pythium mamillatum</i>	1	260501							
<i>Pythium oligandrum</i>	1	140009							
<i>Pythium papillatum</i>	1	141010_1_1							
<i>Pythium perniciosum</i>	2	141008_1	141008_2						
<i>Pythium spiculum</i>	3	260502b	140401	140402_3					
<i>Pythium spinosum</i>	1	140009							
<i>Pythium splendens</i>	1	140009							
<i>Pythium</i> spp. 1	1	260502a							
<i>Pythium</i> spp. 2	1	260503							
<i>Pythium</i> spp. 3	2	140402_1	140402_3						
<i>Pythium</i> spp. 4	2	141007_2	141007_3						
<i>Pythium</i> spp. 5	2	141007_2	141007_3						
<i>Pythium tardicrescens</i>	1	141005_2							

En todos los focos de podredumbre radical, excepto uno (Pozoblanco, Córdoba), se aislaron especies de pitiáceas que han sido identificadas como agentes causales de podredumbre radical. En el caso de Pozoblanco, las especies identificadas fueron *Pythium papillatum* V.D. Matthews. y *Pythium aquatile* Höhnk. Del conjunto de muestras, sólo en 3 no se aisló ningún oomiceto, todas pertenecientes a la provincia de Córdoba, 2 en la localización de Pozoblanco y una en Los Villares.

3.2. Diversidad de pitiáceas y podredumbre radical

Phytophthora cinnamomi fue el patógeno que mayor número de aislamientos presentó, con 8 identificaciones positivas en muestras procedentes de 6 parcelas, pertenecientes a 4 localizaciones distintas (Tabla 2). La presencia de éste patógeno en las muestras no se relacionó significativamente con variaciones en la diversidad de pitiáceas aisladas ($F=0,35$; $P=0,71$). Tampoco hubo relación entre la presencia del patógeno y el grado de daño de los pies ($F=0,71$; $P=0,41$).

Los árboles con grado de defoliación “2” presentaron un mayor número de especies diferentes aisladas ($F=3,43$, $p<0,05$) (Figura 2). En el conjunto, sólo un árbol con defoliación nula presentó un único aislamiento.

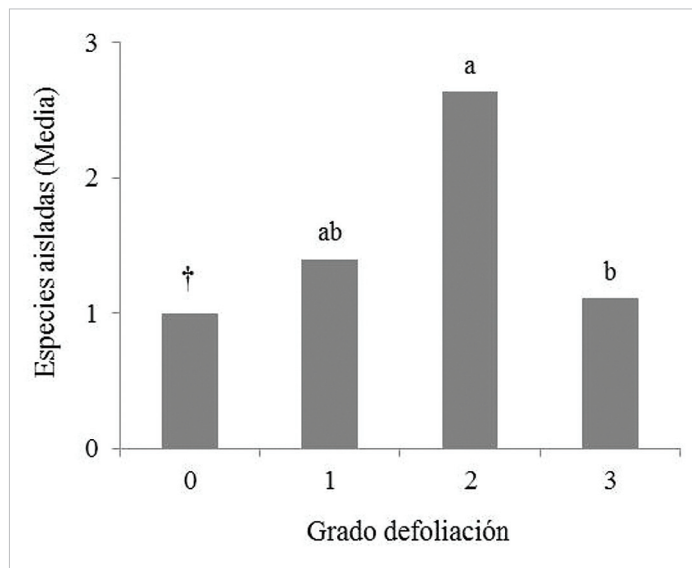


Figura 2. Número de especies identificadas por grado de daño del pie estudiado. Medias con la misma letra: No existen diferencias significativas entre las medias. †: No incluido en el test de diferencias entre medias por ausencia de varianza ($n=1$, $X=1$).

4. Discusión

4.1. Especies aisladas

La mayoría de las especies identificadas han sido descritas como agente causal de podredumbre radical en diferentes especies vegetales, algunas de carácter fores-

tal y otras de carácter agronómico. *Phytophthora cinnamomi* es en la actualidad uno de los patógenos más estudiados de la familia Pythiaceae, junto con *Phytophthora lateralis* Tucker & Milbrath. y *Phytophthora ramorum* Werres. (Hansen, 2015), y sin duda, causante de podredumbre radical en numerosas especies de interés forestal de los géneros *Eucalyptus* spp., *Pinus* spp. y *Quercus* spp. entre otros. *P. citrophthora* se ha identificado como agente causal de *damping-off* en plántulas de árboles y arbustos ornamentales (van der Plaats-Niterink, 1981). *P. irregulare* es un conocido agente de podredumbre radical de especies forestales (*Eucalyptus* spp. y *Cupressus* spp.), causando problemas relevantes en cultivos de invernadero (Katawczik, 2008). *P. cryptogea* es una especie muy extendida a nivel mundial, causante de podredumbre radical en numerosos cultivos leñosos (frutales) y en plantas ornamentales (van der Plaats-Niterink, 1981). Se ha comprobado la patogenicidad de *P. gonapodyides*, tanto en *Q. suber* (Jung et al., 1996; Balci y Halmschlager, 2003), como en *Q. ilex* (Corcobado et al., 2010).

Pythium flevoense y *P. mamillatum* son conocidos por causar enfermedades en especies cespitosas y gramíneas (van der Plaats-Niterink, 1981), mientras *Pythium aquatile* es un patógeno de raíz de actividad moderada, aunque ha sido aislado en muestras de *Chamaecyparis* spp., *Rhododendron* spp., *Eucalyptus* spp., y *Prunus* spp., con presencia de daños por podredumbre radical (Uzhashi et al., 2008). Otros como *Pythium tardicrescens* Vanterpool., *Pythium aplogeticum* Tokunaga., *Pythium diclinum* Tokunaga., o *P. adhaerens* no han sido descritos hasta la fecha como agentes causantes de podredumbre radical en especies leñosas, aunque sí en otras especies de gramíneas y leguminosas (van der Plaats-Niterink, 1981).

Otras especies aisladas no han sido descritas como agentes causantes de podredumbre radical. *Pythium oligandrum* Drechsler. y *Pythium acanthophoron* Sideris. son considerados micoparásitos, y no tiene actividad fitopatogénica reconocida. *Pythium oligandrum* parasita principalmente ascomicetos, aunque se ha identificado como parásito de *Pythium ultimum* Trow. Algunos estudios indican que su presencia está relacionada con la inhibición del crecimiento de tricodermas (Lutchmeah y Cooke, 1984). Del mismo modo, se considera a la especie *P. acanthophoron* parásito del género *Fusarium*, aunque se ha reconocido su actividad como parásito de *Pythium myriotylum* Drechsler (Lodh y Webster, 1990).

4.2. Causas del decaimiento

En todas las localizaciones analizadas, excepto en el caso de Pozoblanco, se puede determinar que la causa principal de los daños sobre el arbolado está relacionada con la podredumbre radical causada por un complejo de oomicetos. En Pozoblanco se identificaron las especies *Pythium aquatile* y *P. papillatum*, aisladas bajo un pie que presentaba un grado moderado de afección (Grado “2”). Ambas especies son patógenos considerados moderadamente agresivos, y mayormente relacionados con gramíneas y especies agrícolas y ornamentales. Se podría atribuir su presencia al oportunismo, siendo la causa del decaimiento general del arbolado en éste caso diferente a la podredumbre radical.

Los resultados obtenidos indican que los árboles donde se encontró un mayor número de especies causantes de podredumbre radical son aquellos que presentan daños en un grado incipiente o medio, reduciéndose la diversidad de especies patógenas presente en el suelo cuando el estado del árbol se agrava. Esta observación coincide con la apreciación de otros autores como Pérez Sierra *et al.* (2013), que apuntan que los árboles con un grado medio de afección son los más indicados para realizar el aislamiento de pitiáceas.

Un estado avanzado de daños en el arbolado, y un alto grado de defoliación, implican un bajo nivel de actividad de la planta, y por tanto una menor probabilidad de reposición de raíces finas. La inoculación de raíces con *P. cinnamomi* en especies de *Quercus* da lugar a una rápida detención del crecimiento apical (Cahill *et al.*, 1989; Blaschke, 1994), y por otro lado se ha demostrado que éste patógeno coloniza la planta a través de las raíces finas (Ruiz Gómez *et al.*, 2015). El análisis conjunto de ambas evidencias podría explicar la menor presencia de inóculo en aquellos pies muertos o con un estado de decaimiento terminal, donde la cantidad de raíces finas absorbentes (<2mm diámetro) y su proliferación se encuentran limitadas.

La presencia de *P. cinnamomi* en las muestras no se relacionó con una variación en el grado de afección en el arbolado, ni en la diversidad de oomicetos aislados. En éste trabajo, las parcelas se seleccionaron en función de la presencia de daños, y todos los árboles muestreados, excepto uno (*Tabla 2*), se encontraban afectados en mayor o menor medida, presentando un grado de defoliación mayor o igual a 1. No se discute aquí sobre la incidencia de *P. cinnamomi* en el empeoramiento de las condiciones fitosanitarias de los pies donde se encuentra ésta especie, pero en éste trabajo no se puede concluir que los focos donde resultó un aislamiento positivo de dicha especie sufrieran un grado de decaimiento mayor que en el resto de localizaciones donde no se consiguió aislar dicha especie.

En siete de las diez fincas muestreadas, los focos se encontraban dentro de áreas reforestadas, o próximas a una repoblación, y en un caso, la masa de encinar se encontraba en una zona ajardinada donde se habían conservado los pies de encina de la masa anterior a la construcción del área recreativa. En el presente trabajo no se pudo discriminar la influencia de la localización de los focos en áreas repobladas, recreativas o cercanas a éstas, aunque muchas de las especies identificadas han sido descritas en trabajos con plantas ornamentales o en cultivos agronómicos. La presencia de dichas especies parece indicar que la afección del arbolado podría tener, en algunos casos, su origen en el comercio de plantas y el material de repoblación procedente de vivero, coincidiendo con las observaciones de otros autores (Oßwald *et al.*, 2014; Hansen, 2015).

5. Conclusiones

La presencia de un mayor número de especies de oomicetos causantes de podredumbre radical en árboles con síntomas moderados de decaimiento, pone en evidencia que un complejo diverso de pitiáceas puede causar en el arbolado, bajo

las condiciones apropiadas, los síntomas asociados a los procesos de mortalidad producidos por la podredumbre radical. Estos daños se dan en los focos muestreados con independencia del aislamiento de *P. cinnamomi* en las muestras analizadas.

La presencia de daños en el arbolado en aquellos focos donde se aislaron especies de pitiáceas diferentes a *Phytophthora cinnamomi* se pueden, por tanto, asociar a problemas de podredumbre radical. Es por ello, que el estudio de la mortalidad de encina (y otros *Quercus*) no debe focalizarse únicamente en la especie *P. cinnamomi*. Las determinaciones que se practican rutinariamente en los laboratorios de patología vegetal deberían tener en cuenta la importancia de describir el mayor número de especies posible para realizar un mejor diagnóstico.

6. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer el apoyo recibido por parte de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Junta de Andalucía, a través de la Agencia de Medio Ambiente y Agua (AMAYA), así como la ayuda y colaboración durante la realización del trabajo por IDAF y TSDehesa. El trabajo se ha realizado con la ayuda del Proyecto QUERCUSAT (“Detección temprana de procesos de decaimiento de *Quercus ilex* a partir de la integración de datos hiperespectrales y ecofisiológicos”), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2013-40790-R). El primer autor es beneficiario de una Ayuda para la Formación del Profesorado Universitario (FPU13/00231) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España.

7. Bibliografía

- Balci, Y., Halmschlager, E., 2003. Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline. *Forest Pathology*, 33:157-174. doi: 10.1046/j.1439-0329.2003.00318.x
- Brasier, C.M., Robredo, F., Ferraz, J.F.P., 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in iberian oak decline. *Plant Pathology*, 42:140-145. doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01482.x
- Camilo-Alves C.D.E.P., da Clara M.I.E., Ribeiro N.M.C.D., 2013 Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review. *European Journal of Forest Research* 132:411–432. doi: 10.1007/s10342-013-0688-z
- Carrasco, A., Fernández Cancio, A., Trapero Casas, A., López Pantoja, G., Sánchez Osorio, I., Ruiz Navarro, J.M., Jiménez Molina, J.J., Domínguez Nevado, L., Romero Martín, M.A., Carbonero Muñoz, M.D., Sánchez Hernández, M.E., Lucas Caetano, P.C., Gil Hernández, P., Fernández Rebollo, P., Navarro Cerrillo, R.M., Sánchez-Cuesta, R., Raposo Llobet, R., Rodríguez Reviriego, S., 2009. *Procesos de Decaimiento Forestal (La Seca), Situación del Conocimiento*. Ed. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Córdoba.

- Comisión de las Comunidades Europeas, 1994. *Reglamento 1091/94 de 29/04/94 (DOCE L125 de 18/05/94)*. En: Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L 125 de 18/05/1994, pp 1-94.
- Corcobado, T., Cubera, E., Pérez-Sierra, A., Jung, T., Solla, A., 2010. First report of *Phytophthora gonapodydes* involved in the decline of *Quercus ilex* in xeric conditions in Spain. *New Disease Reports*, 22:33. doi: 10.5197/j.2044-0588.2010.022.033
- Corcobado, T.; Solla, A.; Madeira, M.A.; Moreno, G., 2013. Combined effects of soil properties and *Phytophthora cinnamomi* infections on *Quercus ilex* decline. *Plant Soil* 373: 403–13. doi: 10.1007/s11104-013-1804-z
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K., 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathology Society, St Paul.
- Ferguson, A.J. and Jeffers, S.N., 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries. *Plant Disease* 83:1129-1136. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.12.1129
- Ferretti, M., 1994. *Especies forestales mediterráneas. Guía para la evaluación de las copas*. Publicaciones de la Comisión de las Comunidades Europeas. Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa. Bruselas, Ginebra.
- Gallego, F.J., Pérez de Algaba, A., Fernández-Escobar, R., 1999. Etiology of oak decline in Spain. *European Journal of Forest Pathology*, 29:17-27. doi: 10.1046/j.1439-0329.1999.00128.x
- Hansen, E., 2015. *Phytophthora* species emerging as pathogens of forest trees. *Current Forestry Reports*, 1:16-24. doi: 10.1007/s40725-015-0007-7
- Horta, M., Caetano, P., Medeira, C., Maia, I., Cravador, A., 2010. Involvement of the beta-cinnamomin elicitor in infection and colonisation of cork oak roots by *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology*, 127:427-436. doi: 10.1007/s10658-010-9609-x
- Jeffers, S.N., Martin, S.B., 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, 70:1038-1043. doi: 10.1094/PD-70-1038
- Jung, T., Blasche, H., Neumann, P., 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology*, 26:253-272. doi: 10.1111/j.1439-0329.1996.tb00846.x
- Katawczik, M., 2008. *Pythium irregulare*: PP728. Soilborne *Plant Pathogens*, NCSU Fall (<http://www.cals.ncsu.edu>)
- Lodha, B.C., Webster, J., 1990. *Pythium acanthophoron*, a mycoparasite, rediscovered in India and Britain. *Mycological Research*, 94:1006-1008. doi: 10.1016/S0953-7562(09)81323-3
- Lutchmeah, R.S., Cooke, R.C., 1984. Aspects of antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Transactions of the British Mycological Society*. 83:696-700. doi: 10.1016/S0007-1536(84)80191-6
- Moreira, A.C. and Martins, J.M.S., 2005. Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in Cork Oak Stands in Portugal. *Forest Pathology*, 35: 145-162. doi: 10.1111/j.1439-0329.2005.00397.x
- Navarro-Cerrillo, R.M., Fernández, P., Trapero, A., Caetano, P., Romero, M.A., Sánchez, M.E., Fernández, A., Sánchez, I., López, G., 2004. *Los procesos de decaimiento de encinas y alcornoques*. Dirección general de gestión del medio natural. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.

- Navarro-Cerrillo, R.M., Terán, A.I., Sánchez, M.E., 2006. Acción preventiva y curativa del fosfonato en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands. en encina y alcornoque. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*, 32:685-694.
- Oßwald, W., Fleischmann, F., Rigling, D., Coelho, A.C., Cravador, A., Diez, J., Dalio, R.J., Horta Jung, M., Pfanz, H., Robin, C., Sipos, G., Solla, A., Cech, T., Chambery, A., Diamandis, S., Hansen, E., Jung, T., Orlikowski, L.B., Parke, J., Prospero, S., Werres, S., (2014). Strategies of attack and defence in woody plant–*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology*, 44:169-190. doi: 10.1111/efp.12096
- Pérez Sierra, A., López-García, C., León, M., García-Jiménez, J., Abad Campos, P., Jung, T., 2013. Previously unrecorded low-temperature *Phytophthora* species associated with *Quercus* decline in a Mediterranean forest in eastern Spain. *Forest Pathology*, 43: 331-339. doi: 10.1111/efp.12037
- Red de Seguimiento a gran Escala de Daños en los Bosques (Red de Nivel I), 2013. Manual de Campo. Área de Inventario y Estadísticas Forestales de la Dirección General de Desarrollo Rural y Política Forestal. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, 2013.
- Romero, M.A., Sánchez, J.E., Jiménez, J.J., Belbarhi, L., Trapero, A., Lefort, L., Sánchez, M.E., 2007. *New Pythium* taxa causing root rot on mediterranean *Quercus* species in south-west Spain and Portugal. *Journal of Phytopathology*, 155:289-295. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01230.x
- Ruiz Gómez, F.J., Sánchez de la Cuesta, R., Navarro Cerrillo, R.M., Pérez de Luque, A., 2012. A method to quantify infection and colonization of holm oak (*Quercus ilex*) roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Methods*, 8:39. doi: 10.1186/1746-4811-8-39
- Ruiz Gómez, F.J., Navarro Cerrillo, R.M., Sánchez de la Cuesta, R., Pérez de Luque, A., 2015. Histopathology of infection and colonization of *Quercus ilex* fine roots by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 64:605-616. doi: 10.1111/ppa.12310
- Rupérez, A., Muñoz, M., 1980. Grave enfermedad de las encinas. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*, 6:107-107.
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J., Trapero, A., 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology*, 32:5-18. doi: 10.1046/j.1439-0329.2002.00261.x
- Sánchez, M.E., Sánchez, J.E., Navarro-Cerrillo, R., Fernández, P., 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*, 29:87-108.
- Sánchez, M.E., Andicoberry, S., Trapero, A., 2005. Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *Forest Pathology*, 35:115-125. doi: 10.1111/j.1439-0329.2004.00392.x
- Torres Juan, J., 1985. El *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill. Y su comportamiento en los encinares y alcornocales andaluces. *Boletín del Servicio de Plagas*, 11:185-191.
- Turechek, W.W., McRoberts, N. 2013. Considerations of scale in the analysis of spatial pattern of plant disease epidemics. *Annual Review of Phytopathology*, 51:453-472. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173017
- Uzuhashi, S., Tojo, M., Kobayash, S., Tokura, K., Kakishima, M., 2008. First records of *Pythium aquatile* and *P. macrosporum* isolated from soils in Japan. *Mycoscience* 49:276–279. doi: 10.1007/S10267-008-0416-6
- Van der Plaats-Niterink, A.J., 1981. Monograph of genus *Pythium*. *Studies in Micology*, 21.

Zamora Rojas, E., Andicoberry, S., Sánchez, M.E., 2014. *El decaimiento y la podredumbre radical en las dehesas andaluzas*. En: Ecosistemas de dehesa: Desarrollo de políticas y herramientas para la gestión y conservación de la biodiversidad. Anexo A.1.IV. LIFE11/BIO/ES/000726 (www.uco.es/biodehesa).