

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



### *Un caso de diagnóstico: encinas con síntomas de decaimiento procedentes de las localidades de Alcoi, Alcublas y Pina de Montalgrao*

**TRABAJO FIN DE GRADO EN:**

Ingeniería Forestal y del Medio Natural

**Alumna:** Rebeca Aleix Amurrio

**Tutora:** Paloma Abad Campos

**Cotutora:** Beatriz Mora Sala

**Curso Académico:** 2014/2015

Valencia, Septiembre de 2015

Tipo Licencia



**TÍTULO:**

Un caso de diagnóstico: encinas con síntomas de decaimiento procedentes de las localidades de Alcoi, Alcublas y Pina de Montalgrao.

**RESUMEN:**

Una de las enfermedades con mayor incidencia en la encina (*Quercus ilex* L.) es la podredumbre radicular debida a su infección por oomicetos del género *Phytophthora*. Los síntomas de la parte aérea de la planta afectada: seca de puntas, marchitez y decaimiento, no son específicos y en su origen pueden estar involucradas múltiples causas. El diagnóstico de la podredumbre radicular asociada a *Phytophthora* spp. se basa en el análisis de raíces y muestras de suelo del entorno de la rizosfera de árboles con síntomas de decaimiento. En este trabajo se analizan muestras de suelo y raíces de encinas decaídas situadas en los términos municipales de Alcoi, Alcublas y Pina de Montalgrao con el objetivo de determinar si estos árboles están infectados por oomicetos patógenos de plantas. Para el aislamiento de estos microorganismos se emplea medios de cultivo semi-selectivos. El crecimiento de los aislados en diferentes medios de cultivo tiene valor informativo para su identificación. La identificación molecular de los oomicetos aislados se basa, mediante el uso de la técnica PCR, en el análisis de la secuencia de la región ITS del ADN ribosómico. Los aislados obtenidos se conservarán en la colección de *Phytophthora* y *Pythium* del IAM de la UPV.

**Palabras clave:**

*Phytophthora*, identificación molecular, PCR, encina.

**Alumna:** Rebeca Aleix Amurrio

**Tutora:** Paloma Abad Campos

**Cotutora:** Beatriz Mora Sala

Valencia, Septiembre de 2015

**TITLE:**

A case of diagnosis: holm oaks with decline symptoms from the towns Alcoi, Alcublas and Pina de Montalgrao.

**ABSTRACT:**

One of the diseases with greater incidence in the holm oak (*Quercus ilex* L.) is the root rot due to the infection by oomycetes belonging to the genus *Phytophthora*. The aerial symptoms of the affected plants: dead twigs, wilting and decline are not specific and multiple causes may be involved in their origin. The diagnosis of the root rot associated to *Phytophthora* spp. is based on the analysis of roots and rhizosphere-soil samples taken from trees showing decline symptoms. In this study has been analysed declined holm oak roots and soil samples collected at Alcoi, Alcublas and Pina de Montalgrao in order to determine if these trees were infected by plant pathogen oomycetes. The use of semi-selective culture media is required to oomycete isolation, and the growth of isolates in other culture media is informative for their identification. Molecular identification of the oomycete isolates is based on sequence analysis of ITS region of ribosomal DNA, using the PCR technique. The isolates will be conserved in the *Phytophthora* and *Pythium* collection of the IAM - UPV.

**Key words:**

*Phytophthora*, molecular identification, PCR, holm oak.

**Student:** Rebeca Aleix Amurrio

**Tutor:** Paloma Abad Campos

**Co-tutor:** Beatriz Mora Sala

Valencia, September of 2015

**TÍTOL:**

Un cas de diagnòstic: alzines amb símptomes de decaïment procedents de les localitats d'Alcoi, les Alcubles i Pina.

**RESUM:**

Una de les malalties amb major incidència en l'alzina (*Quercus ilex* L.) és la podridura radicular deguda a la infecció per oomicets del gènere *Phytophthora*. Els símptomes de la part aèria de la planta afectada: seca de puntes, marciment i decaïment, no són específics i en el seu origen poden estar involucrades múltiples causes. El diagnòstic de la podridura radicular associada a *Phytophthora* spp. es basa en l'anàlisi d'arrels i mostres de sòl de l'entorn de la rizosfera d'arbres amb símptomes de decaïment. En aquest treball s'analitzen mostres de sòl i arrels d'alzines decaigudes situades en els termes municipals d'Alcoi, les Alcubles i Pina amb l'objectiu de determinar si aquests arbres estan infectats per oomicets patògens de plantes.

Per a l'aïllament d'aquests microorganismes s'emprà medis de cultiu semi-selectius. El creixement dels aïllats en diferents medis de cultiu té valor informatiu per a la seua identificació. La identificació molecular dels oomicets aïllats es basa, mitjançant l'ús de la tècnica PCR, en l'anàlisi de la seqüència de la regió ITS de l'ADN ribosòmic. Els aïllats obtinguts es conservaran en la col·lecció de *Phytophthora* i *Pythium* del IAM de la UPV.

**Paraules clau:**

*Phytophthora*, identificació molecular, PCR, alzina.

**Alumna:** Rebeca Aleix Amurrio

**Tutora:** Paloma Abad Campos

**Cotutora:** Beatriz Mora Sala

València, Setembre de 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A Paloma Abad Campos por darme la oportunidad de realizar este bonito trabajo y de adquirir nuevos conocimientos y experiencia en Patología Forestal, por la ayuda que me ha ofrecido en el desarrollo del mismo y por no cerrarme nunca las puertas al saber.

A Beatriz Mora Sala por guiarme en la práctica, por su ayuda y paciencia, y sobre todo por esa dedicación que día a día me ha demostrado y me ha ayudado a llevar a cabo mi trabajo.

A los miembros del Laboratorio de Patología Vegetal del Departamento de Ecosistemas Agroforestales, por estar siempre dispuestos a ayudarme y a facilitarme el trabajo, además de transmitirme parte de sus conocimientos así como la pasión por su trabajo.

A mi familia, mis padres y mi hermana, por enseñarme los valores de la vida, por sus infinitos consejos, su enorme paciencia conmigo y, sobre todo, por darme las fuerzas necesarias para seguir en los momentos más difíciles.

Y a Edu, por ser el gran pilar que me sostiene día a día.

## **ÍNDICE**

<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
I.1. CONDICIONES AMBIENTALES EN LA COMUNIDAD VALENCIANA .....	1
I.2. DESCRIPCIÓN DE LA ENCINA .....	2
I.3. GÉNEROS <i>PHYTOPHTHORA</i> Y <i>PYTHIUM</i> .....	2
I.3.1. Taxonomía .....	2
I.3.2. Patogenicidad .....	3
I.3.3. Características biológicas .....	3
I.3.4. Reproducción asexual y sexual .....	5
I.3.5. Ciclo biológico .....	5
I.3.6. Dispersión y distribución .....	6
I.3.7. Enfermedades de la encina causadas por oomicetos .....	7
I.3.7.1. Sintomatología .....	9
I.3.7.2. Factores abióticos favorables al decaimiento asociado a podredumbre radical .....	9
I.3.8. Prevención y control .....	10
<b>CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
III.1. PROSPECCIÓN DE ENCINARES .....	13
III.2. AISLAMIENTO A PARTIR DE RAÍCES DE <i>QUERCUS ILEX</i> L. ....	13
III.3. AISLAMIENTO A PARTIR DE SUELO MEDIANTE EL USO DE TRAMPAS VEGETALES .....	15
III.4. CRECIMIENTO DE OOMICETOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO .....	15
III.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE OOMICETOS .....	16
III.6. CONSERVACIÓN DE AISLADOS DE <i>PHYTOPHTHORA</i> Y <i>PYTHIUM</i> .....	17
III.7. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS .....	18
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>IV. I. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
IV.I.1. PROSPECCIÓN DE ENCINARES .....	19
IV.I.2. AISLAMIENTO DE OOMICETOS A PARTIR DE RAÍCES DE <i>Q. ILEX</i> L. Y DE MUESTRAS DE SUELO .....	19
IV.I.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS OOMICETOS AISLADOS .....	20
IV.I.4. CRECIMIENTO DE OOMICETOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO .....	22
IV.I.5. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS .....	24
<b>IV.II. DISCUSIÓN</b> .....	<b>25</b>

<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES .....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO VII: ANEJOS .....</b>	<b>38</b>
ANEJO I: MORFOLOGÍA DE LA COLONIA DE OOMICETOS CRECIDOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO (MEA, OA, V8 Y PDA).....	38
ANEJO II: MORFOLOGÍA DE LA COLONIA DE AISLADOS FÚNGICOS CULTIVADOS EN MEDIO PDA.....	40

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1.</b> DATOS METEOROLÓGICOS (TEMPERATURA, HUMEDAD Y PRECIPITACIÓN) DE LAS ESTACIONES METEOROLÓGICAS DE SEGORBE Y CAMP DE MIRRA, CERCANAS A LOS PUNTOS DE MUESTREO .....	1
<b>TABLA 2.</b> PLANTILLA DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS DEL ADN RIBOSÓMICO MEDIANTE PCR .....	16
<b>TABLA 3.</b> CONDICIONES DE TEMPERATURA Y TIEMPO DEL PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS DEL ADN RIBOSÓMICO MEDIANTE PCR .....	17

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1.</b> CICLO DE VIDA DE <i>PHYTOPHTHORA</i> .....	5
<b>FIGURA 2.</b> CICLO DE VIDA DE <i>PYTHIUM</i> .....	6
<b>FIGURA 3.</b> RAÍCES DE <i>QUERCUS ILEX</i> L. CON SÍNTOMAS DE CHANCROS Y PÉRDIDA DE RAICILLAS ABSORBENTES.. .....	14
<b>FIGURA 4.</b> ENCINAS CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO (CLAREO EN LA COPA, COMPLETA DEFOLIACIÓN Y MUERTE DE RAMAS Y RAMILLAS SECAS) .....	19
<b>FIGURA 5.</b> ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS DE AISLADOS OBTENIDOS DE SUELO Y RAÍCES DE ENCINA CON SÍNTOMAS DE DECAIMIENTO.....	20

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

---

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

### **I.1. CONDICIONES AMBIENTALES EN LA COMUNIDAD VALENCIANA**

El clima de la Comunidad Valenciana es de tipo mediterráneo, caracterizado por su aridez estival y suaves temperaturas invernales. La temperatura media anual en la Comunidad Valenciana varía entre los 11° C y los 17° C incrementando progresivamente del interior hacia la costa. El régimen de precipitaciones es escaso y heterogéneo a lo largo del año con cierta frecuencia de episodios torrenciales de gran intensidad, en otoño y en primavera. Este fenómeno dificulta, en gran medida, la infiltración de agua que, junto con el abrupto relieve, contribuye a que el terreno forestal sea más vulnerable a los procesos erosivos. La mayor parte de su suelo forestal (92%) presenta una elevada potencialidad erosiva (PATFOR, 2012).

El ambiente mediterráneo tiene características intermedias entre los ambientes de clima árido, subtropical seco y templado oceánico lo que contribuye a que sus paisajes posean una gran riqueza y diversidad de suelos, tal y como se refleja en el Catálogo de Suelos de la Comunidad Valenciana (Forteza *et al.*, 1995). Muchos de los suelos mediterráneos están afectados por procesos de desertificación además de estar generalmente sometidos a una gran presión humana, lo que contribuye a una pérdida notable de este recurso. En lo que respecta a su composición química, los suelos mediterráneos son básicos o neutros y es habitual la presencia de carbonatos tanto en el suelo como en el subsuelo.

En el presente estudio se han analizado muestras de encina procedentes de tres municipios de la Comunidad Valenciana (Alcublas, Pina de Montalgrao y Alcoi). Los datos climáticos presentados en la Tabla 1 se han obtenido del SIAR (Sistema de Información Agroclimática para el Regadío) de estaciones meteorológicas cercanas a los puntos de muestreo; de la estación meteorológica de Segorbe y de la del Camp de Mirra. Los datos son la media de un promedio de 10-15 años.

**Tabla 1. Datos meteorológicos (temperatura, humedad y precipitación) de las estaciones meteorológicas de Segorbe y Camp de Mirra, cercanas a los puntos de muestreo.**

Datos meteorológicos	Segorbe (2002-2014)	Camp de Mirra (2000-2014)
Temperatura media anual (°C)	15,26	14,41
Temperatura máxima anual (°C)	28,63	27,70
Temperatura mínima anual (°C)	3,25	3,01
Humedad media (%)	66,19	65,03
Humedad máxima (%)	97,50	96,27
Humedad mínima (%)	16,61	16,74
Precipitación anual (mm)	480,61 (459,62*)	359,86 (504,40**)

\*Dato de la estación meteorológica de Alcublas (1999-2014)

\*\*Dato de la estación meteorológica Círculo Industrial de Alcoi (2000-2014)

## **I.2. DESCRIPCIÓN DE LA ENCINA**

Los *Quercus* esclerófilos son árboles esenciales en la Comunidad Valenciana. La encina (*Quercus ilex* L.) pertenece a la familia *Fagaceae*, subfamilia *Quercoideae*, género *Quercus*. Es el árbol más característico de España por su elevada variabilidad y adaptabilidad. Tiene una increíble valencia ecológica además de poseer una importancia hegemónica ya que, entre las frondosas, representa el 85% del espacio que éstas ocupan. La encina junto con el alcornoque (*Quercus suber* L.) constituyen los principales *Quercus* de la Península Ibérica y entre ambos cubren, aproximadamente, el 10% de la superficie española. Los ecosistemas arbolados de encina se hallan en toda la región mediterránea, y en la Comunidad Valenciana son dominantes en zonas del interior de Castellón y en el noroeste de Alicante. Los carrascales puros son raros en el interior de Valencia, aunque la especie aparece comúnmente (PATFOR, 2012). La mayor parte de las dehesas de Extremadura y Andalucía presentan a la encina como especie predominante (Ruiz de la Torre, 2006).

Según la definición dada por Ruiz de la Torre (2006), la encina es un árbol corpulento que puede alcanzar los 25 m de altura. Su porte es recto aunque está muy modificado por la acción directa o indirecta del hombre. Su copa es amplia, recogida y ovoide-globosa. Su corteza no es corchosa, siendo dura, gruesa, grisácea o con grietas de color pardo negruzco, alargadas en sentido vertical y su sistema radical es de raíz principal potente, axonomorfa. Al principio no se ramifica, pero después las raíces secundarias profundizan bastante o se hacen someras dando numerosos renuevos para asegurar su anclaje y aprovisionamiento de agua y nutrientes. Alguna de las raíces secundarias puede llegar a desarrollarse superficialmente.

La expansión de la encina está marcada por el régimen de precipitaciones: las anuales han de ser de más de 450 mm; la media anual límite de 300 mm y las estivales como mínimo de 75-100 mm. Las temperaturas también intervienen en el correcto desarrollo de la encina siendo necesaria una media anual de 10-18° C. Los lugares óptimos son aquellos en los que las temperaturas medias de enero oscilan entre 3 y 11° C y las de agosto entre 14 y 18° C, pudiendo resistir las temperaturas máximas absolutas más elevadas de la Península (Ruiz de la Torre, 2001).

El piso bioclimático, según Rivas Martínez (1987), donde habita la encina es el mesomediterráneo; esta especie tolera la continentalidad, es moderadamente termófila y de luz indiferente. Es resistente a la sequía y a las temperaturas extremas y no se da en zonas con humedad excesiva. La encina vive en suelos calizos, silíceos o arenosos, rehúye de los terrenos encharcados y muy compactados y se desarrolla perfectamente hasta los 1300 m (2900 m en el sistema montañoso del Atlas africano).

## **I.3. GÉNEROS *PHYTOPHTHORA* Y *PYTHIUM***

### **I.3.1. Taxonomía**

Los microorganismos de ambos géneros pertenecen al reino *Straminipila*, filo *Oomycota*, clase *Oomycetes*, orden *Pythiales*, familia *Pythiaceae*. En un primer lugar, ambos géneros estaban incluidos en el reino de los hongos (*Fungi*), clase *Phycomycetes* y subclase *Oomycetes*. Más adelante, fundamentándose en sus relaciones filogenéticas se incluyeron en el reino *Chromista* (Cavalier-Smith,

1981), conocido actualmente como *Straminipila* (Dick, 1995). Esta confusión fue debido a la semejanza del micelio e hifas de los oomicetos con los de los hongos.

La identificación morfológica de especies de *Phytophthora* y *Pythium* es compleja debido a que sus características son muy variables y, por ello, es habitual también realizar la identificación molecular de los aislados.

Hoy día, para la identificación molecular de los oomicetos se analiza una serie de regiones del genoma. Los marcadores más utilizados son los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN ribosómico, que ofrecen suficiente variabilidad genética para separar especies próximas. Gracias a la técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR), se puede amplificar en un tubo de ensayo una determinada secuencia de ADN millones de veces, en este caso la región ITS, para analizar su composición.

En la actualidad han sido descritas formalmente 123 especies de *Phytophthora* ([phytophthora database.org](http://phytophthora.database.org)) asociadas todas ellas a plantas enfermas. Según las estimaciones realizadas por Brasier (2009), si la tendencia continúa en la próxima década, el número de especies fitopatógenas de *Phytophthora* descubiertas será superior a 200, existiendo posiblemente unas 100-500 especies desconocidas que afectarían a las plantas forestales y ornamentales (Brasier, 2009). En el género *Pythium* se han descrito aproximadamente unas 150 especies y este género está considerado como el ancestro de *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000).

### **I.3.2. Patogenicidad**

Especies de ambos géneros causan graves daños tanto en cultivos como en ecosistemas forestales. Estos microorganismos se encuentran en el suelo o en el agua, a excepción de algunas especies de *Phytophthora* que también colonizan las partes aéreas de las plantas. Entre ellos existen diferencias según el nivel de patogenicidad. El género *Phytophthora* es más patógeno que el género *Pythium* y raramente sus especies actúan como saprófitos. En cambio, la mayoría de especies de *Pythium* pueden vivir saprófita o parasíticamente y, aunque muchas de sus especies sean patógenos importantes de plantas, el nivel de daño es menor con respecto al de *Phytophthora* (Belbahri *et al.*, 2006), a excepción del *damping-off* (infección en la germinación de las semillas y primeras semanas de vida de la plántula). En cuanto al rango de plantas hospedantes, en *Phytophthora* puede ser amplio o reducido dependiendo de las especies, mientras que en *Pythium* suele ser amplio, aunque el rango de hospedantes de muchas especies de *Pythium* está incompleto.

### **I.3.3. Características biológicas**

El **micelio** de ambos géneros es cenocítico, produciéndose el crecimiento desde el ápice de las hifas. Éstas tienen un diámetro parecido (diámetro de 5-8  $\mu\text{m}$ ), aunque las del género *Pythium* tienen un patrón de crecimiento menos tortuoso. Presentan una transición desde un rápido crecimiento vegetativo en un medio relativamente rico en nutrientes, a un crecimiento lento cuando la presencia de nutrientes es limitada (Erwin y Ribeiro, 1996). En el género *Pythium*, las colonias pueden tener un crecimiento aéreo con aspecto algodonoso, dependiendo del medio de cultivo, y las hifas presentan septos en los cultivos más viejos. En el género *Phytophthora*, el micelio puede ser liso o con pequeños hinchamientos tipo nudo o tubérculo. La **pared celular** de las hifas de *Phytophthora* está compuesta por  $\beta$ -1,4-celulosa y por  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6-glucanos (Bartnicki-García y Wang, 1983), mientras

que la de los *Pythium* está compuesta por  $\beta$ -1,3-glucanos constituyendo una reserva característica de carbohidratos.

Los **esporangios (zoosporangios)** son estructuras de reproducción vegetativa que originan zoosporas. En el género *Phytophthora* tienen forma ovoide a obpiriforme y rara vez globosos. Pueden ser caducos o persistentes, su posición siempre es terminal y aunque pueden no poseer papila apical, las especies se clasifican en función de la presencia/ausencia de dicha papila y de si está muy o poco diferenciada (Erwin y Ribeiro, 1996). En el género *Pythium* los esporangios son filamentosos, lobulados, esféricos, y rara vez ovoides o piriformes. El esporangio puede ser terminal o intercalar, siempre es persistente y nunca posee papila apical.

Las **zoosporas** son reniformes, uninucleadas y biflageladas. La formación de zoosporas dentro del esporangio es el carácter más distintivo para comparar ambos géneros. En *Phytophthora*, las zoosporas se liberan una a una (Erwin y Ribeiro, 1996). En cambio, en *Pythium* la liberación de las zoosporas se realiza formando un tubo que finaliza en una vesícula, donde éstas permanecerán generando un ligero movimiento que aumentará hasta que la película exterior de la vesícula desaparezca y se dispersen en el medio acuoso (Van der Plaäts-Niterink, 1981). Las zoosporas están consideradas como los propágulos con mayor poder infectivo (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las **clamidosporas** son estructuras de conservación y supervivencia que se distinguen de los hinchamientos hifales porque están delimitadas mediante septos (Erwin y Ribeiro, 1996). Es raro encontrar esta estructura en el género *Pythium*, aunque algunas especies puedan producirlas. Las clamidosporas no se forman en todas las especies, por lo cual su presencia o ausencia es importante para la taxonomía de las mismas. Las clamidosporas restantes en suelos infestados, son unidades infectivas. Cabe señalar, además, que gran parte del éxito como patógeno vegetal de *Phytophthora* es debido a su capacidad para producir esporangios y zoosporas en un periodo de tiempo corto, a partir de las clamidosporas (Erwin y Ribeiro, 1996).

El **anteridio** es el gametangio masculino y el **oogonio** el gametangio femenino. La posición que toma el anteridio con respecto al oogonio va a ser un factor de relevancia en la clasificación de especies, pudiendo ser paragino o anfigino (Zentmyer y Mitchell, 1986) siendo de ambos tipos en el género *Phytophthora* y únicamente paragino en el género *Pythium*. El **oogonio** está separado de la hifa mediante un septo (Erwin y Ribeiro, 1996). En la mayoría de las especies es liso pero puede presentar protuberancias o verrugas en algunos casos (Zentmyer y Mitchell, 1986). Es común que las especies de *Pythium* presenten numerosos anteridios por oogonio, en algunas especies de este género el anteridio puede estar formado en la misma hifa que el oogonio o en otra hifa independiente (Van der Plaäts-Niterink, 1981). También puede presentar en la pared ornamentaciones variadas como "púas" de mayor o menor longitud (Van der Plaäts-Niterink, 1981).

Las **oosporas** son esporas sexuales y su germinación y crecimiento en suelos son similares en ambos géneros. Las oosporas son muy resistentes a condiciones externas. Pueden ser pleróticas o apleróticas, ocupando completa o parcialmente la pared del oogonio, respectivamente. La latencia de la oospora puede ser constitutiva o exógena. En el primer caso, depende de la estructura y/o metabolismo propio de la espora y requiere de condiciones precisas e inusuales para su disrupción. En el segundo caso, depende de propiedades externas a la oospora: humedad, pH, temperatura, presencia de tóxicos, etc. (Van der Plaäts-Niterink, 1981; Erwin y Ribeiro, 1996).

### I.3.4. Reproducción asexual y sexual

La **reproducción asexual** tiene lugar cuando los oomicetos producen, en presencia de agua, zoosporangios que a su vez liberan, bajo la estimulación de ciertas sustancias y condiciones de humedad y temperaturas óptimas, zoosporas biflageladas de distinto tamaño (Erwin y Ribeiro, 1996). Las zoosporas pueden nadar activamente un tiempo limitado, siendo atraídas por exudados de las raíces. Cuando entran en contacto con éstas, desarrollan una pared celular formando un quiste antes de infectar la raíz (Bartnicki-García, 1983).

La **reproducción sexual** se produce tras la unión de los dos gametangios, el anteridio y el oogonio. La transmisión del material genético se realiza desde el anteridio hacia el oogonio y anteriormente a la fecundación se produce la meiosis (Sansome, 1965). El resultado es una oospora de diámetro inferior al oogonio con pared de grosor variable en función de la especie.

En el género *Phytophthora*, las especies pueden ser homotáticas (autofértiles) o heterotáticas (autoestériles) según el tipo de apareamiento que tengan los individuos. En el género *Pythium* las especies son generalmente homotáticas, aunque existen algunas que son heterotáticas (Hendrix y Campbell, 1969).

### I.3.5. Ciclo biológico

Como se ha indicado anteriormente, el ciclo biológico para ambos géneros es diploide al existir una fase de reproducción asexual y otra sexual dependiendo de las condiciones ambientales (Figura 1 y 2).

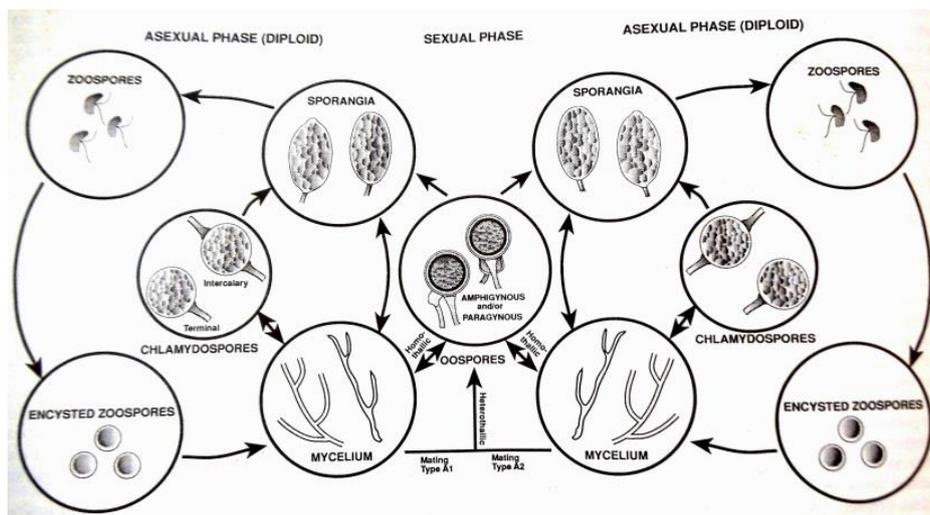


Figura 1. Ciclo de vida de *Phytophthora* (Erwin y Ribeiro, 1996).

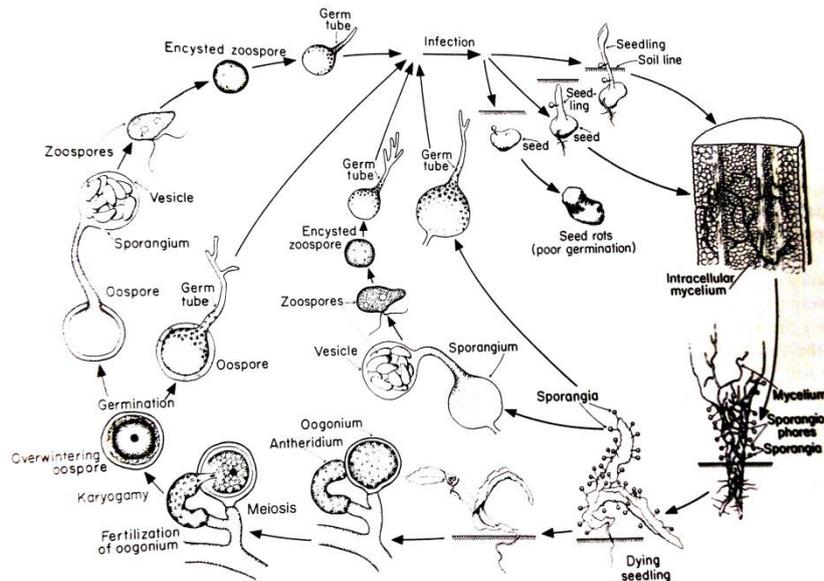


Figura 2. Ciclo de vida de *Pythium* (Agrios, 1997).

### I.3.6. Dispersión y distribución

A larga distancia, el modo primario de dispersión de patógenos y plagas exóticas es el movimiento comercial de plantas vivas y productos vegetales entre zonas biogeográficas (Brasier, 2009). Se pueden transportar, también, suelo u hojas infestados en el calzado, vehículos y animales, sobre todo en aquellos ambientes que son húmedos o saturados (Goheen *et al.*, 2006). Los movimientos de tierra asociados al uso agrícola o a la transformación de carreteras (Weste y Taylor, 1971) contribuyen también a la dispersión de patógenos.

En Europa, mediante prospecciones realizadas en numerosos viveros y plantaciones forestales se han detectado especies de *Phytophthora* no nativas, lo que supone, para un futuro, una amenaza para los bosques (Jung *et al.*, 2012). Así pues, la distribución geográfica de muchas especies se ha visto incrementada por el hombre, a través de la dispersión de los cultivos a los que las especies de *Phytophthora* estaban asociadas o por el intercambio de material vegetal, con la consiguiente introducción en ecosistemas naturales de los individuos provenientes de viveros (Jung y Blaschke, 2004).

El género *Pythium* se distribuye mundialmente, hay especies adaptadas a climas tropicales y otras a climas templados y fríos. Se presentan con mayor abundancia en suelos cultivados cerca de la zona de las raíces de las capas superficiales, aunque también se han encontrado especies en suelos de tierras labradas, pastos, bosques, pantanos, viveros, ciénagas y aguas. Incluso han aparecido en suelos secos y arenosos aunque no sea lo común (Van der Plaäts-Niterink, 1981) ya que dichas zonas son generalmente pobres en *Pythium*, lo mismo en bosques secos y en marismas saladas.

A corta distancia, el principal agente de dispersión son las zoosporas que nadan a través de la película de agua del suelo o de la superficie de hojas o tallos, se fijan, germinan y penetran en la planta (Goheen *et al.*, 2006). La zoospora es la etapa más susceptible del ciclo de vida de *Phytophthora* y en la que el control contra el patógeno es más eficiente (Lange y Olson, 1983). El patógeno aumenta su capacidad de causar enfermedad ya que las zoosporas infectivas se producen

rápidamente, con lo que el número de infecciones se incrementa de forma exponencial, siempre y cuando las condiciones de saturación hídrica del suelo se mantengan.

Las especies homotáticas se dispersan a través de material vegetal hospedante, siendo cualquier tejido de la planta un buen sustrato para la producción de oosporas (Goodwin, 1997), constituyendo otro modo de dispersión en suelos y en partes secas de vegetales. Otro mecanismo de dispersión es por medio del movimiento del inóculo a las raíces y de las raíces al suelo y a través de la diseminación del inóculo en superficie (Workneh *et al.*, 1998). Otras especies se diseminan mediante salpicaduras de agua desde el suelo a las hojas, tallos y frutos del hospedante (Erwin y Ribeiro, 1996). A pequeña escala, las especies de *Phytophthora* se pueden transmitir por la acción de algunos invertebrados y roedores (Konam y Guest, 2004), como el caso de las moscas *Drosophila* (Hunter y Buddenhagen, 1969), hormigas (El-Hamalawi y Menge, 1996) y caracoles (Álvarez *et al.*, 2008). Estos últimos transportarían estructuras de conservación como clamidosporas y micelio.

En resumen, todos los oomicetos tienen un tiempo de generación corto y una gran capacidad reproductiva (Erwin y Ribeiro, 1996). Las malas prácticas sanitarias y los controles inadecuados de las importaciones de plantas, de madera y de sus derivados han contribuido a dicha dispersión. Una vez que una especie invasora se introduce en un nuevo ecosistema, puede que nunca llegue a ser erradicada, lo que supone una amenaza imprevisible para nuestros bosques, ecosistemas naturales y espacios públicos (Brasier, 2008).

### **1.3.7. Enfermedades de la encina causadas por oomicetos**

En especies forestales, el género *Phytophthora* causa más del 66% de las enfermedades de raíces finas y más del 90% de las necrosis en la base del tronco (Jung, 2011).

El daño causado por *Phytophthora cinnamomi* se conoce desde 1922 en Sumatra (Indonesia). A partir de entonces se realizaron numerosos estudios, destacando los de Zentmyer y Mitchell (1986), que sugieren que este patógeno tiene su origen en Asia pero que se extendió al resto del mundo debido a las migraciones del ser humano.

A finales de los años 80 y principios de los 90, en España hubo una fuerte sequía a la que se le atribuyó el aumento de defoliación y muerte de especies de *Quercus*, concretamente alcornoque (*Q. suber* L.) y encina (*Q. ilex* L.) (Brasier *et al.*, 1993) El deterioro de la encina se observó en Castilla-La Mancha (Romeralo, 2008), Extremadura (Solla *et al.*, 2009) y Andalucía (Sánchez *et al.*, 2006), territorios que se corresponden con la mayor concentración de dehesas de encinas. Los síntomas asociados eran similares a los que las plantas presentan cuando sufren estrés hídrico, pero no los patrones de distribución de árboles individuales o en focos (Navarro *et al.*, 2004), junto con la observación del síndrome de muerte súbita (Sánchez *et al.*, 2003) por lo que se llegó a pensar que los agentes bióticos estaban implicados en la sintomatología observada.

Se aisló *P. cinnamomi* de las raíces de numerosas encinas afectadas; para confirmar su patogenicidad se realizaron numerosos estudios inoculando esta especie en plántulas, plantas jóvenes y adultas del género *Quercus* (Sánchez *et al.*, 2002b; Luque *et al.*, 2002). Así pues, quedó demostrado que *P. cinnamomi* provoca el decaimiento y muerte de encinas y alcornoques en el sur y centro de la península Ibérica, así como en el norte de Europa y África en otras especies de *Quercus* (Brasier, 1996).

Actualmente, extensas áreas de encinares y alcornoques portugueses y españoles presentan síntomas de decaimiento. Por tanto, la presencia y diseminación de este patógeno puede ser uno de los principales factores que contribuyan a la “Seca” de los *Quercus* mediterráneos. *P. cinnamomi* también ha sido descrita como agente causal de la “tinta” del castaño (Sánchez *et al.*, 2002a). El número de aislados obtenido indica que el patógeno está muy disperso e influenciado por las condiciones climáticas.

Existen tres tipos de factores involucrados en el decaimiento o “Seca” de la encina y alcornoque (Carrasco *et al.*, 2009): los factores que predisponen son de tipo selvícola (Navarro *et al.*, 2004) y están ligados al sobrepastoreo, al cultivo y a la acumulación de biomasa; los factores incitantes están relacionados a las variaciones climáticas, veranos más secos y aumento de la temperatura estival, sufridas en los últimos años (Carrasco *et al.*, 2009), que repercuten negativamente en el estado de las coberturas vegetales determinando la distribución del arbolado (Sardinero *et al.*, 2000), además de estimular a los patógenos por las nuevas condiciones climáticas (Brasier, 1996) así como a las interacciones planta-patógeno (Brasier y Scott, 1994); y los factores contribuyentes que son de tipo biótico, enfermedades y plagas de insectos, que intervienen en las últimas fases del decaimiento provocando la muerte de los árboles.

*P. cinnamomi* también es capaz de causar un síndrome de muerte súbita, sin que exista un debilitamiento previo de los árboles, cuando la humedad del suelo es muy elevada debido a una podredumbre radical extensiva (Sánchez *et al.*, 2006).

En cuanto a la susceptibilidad o resistencia de los *Quercus* mediterráneos a *P. cinnamomi*, los diversos estudios realizados muestran algunas diferencias entre regiones de procedencia, pero sin que ninguna población evaluada llegue a mostrar cierto grado de tolerancia, resultando todas susceptibles o muy susceptibles (Navarro *et al.*, 2009).

Por otra parte, no sólo se encuentra a *P. cinnamomi* como el patógeno causante de las más graves podredumbres radicales de encina (Sánchez *et al.*, 2003), ya que *Pythium spiculum* también las provoca (Romero *et al.*, 2007) pero en menor grado.

Los aislados de *Py. spiculum* se obtuvieron de la rizosfera de *Q. ilex* y *Q. suber* en el año 2003 (Romero *et al.*, 2007) en el sur de la Península Ibérica, demostrando en los test de patogenicidad ser un patógeno agresivo de raíces, que provoca una marchitez extendida en la parte aérea del vegetal. Los aislados obtenidos de suelos de bosques decaídos se aislaron con la misma frecuencia que *P. cinnamomi*. Por tanto, *Py. spiculum* se tiene que tener en cuenta como un factor probable de decaimiento y más en los casos en los que las raíces son sintomáticas y los aislamientos de *Phytophthora* son muy escasos o inexistentes. Más que un factor activo del decaimiento, esta especie podría representar un riesgo potencial para los bosques de *Quercus* en el centro de España (Romero *et al.*, 2007). Cabe señalar que existe otra especie del género *Pythium*, *Py. sterilum*, que afecta también a la encina pero con una agresividad menor que la que presenta *Py. spiculum* (Romero *et al.*, 2007).

Los chancros también intervienen en el decaimiento de la encina, principalmente los provocados por especies del género *Botryosphaeria* (Romero, 2012), por la bacteria *Brenneria quercina* (sinónimo de *Erwinia quercina*) (Biosca *et al.*, 2003) y por *Biscogniauxia mediterranea* (sinónimo de *Hypoxylon*

*mediterraneum*). Al decaimiento también se han asociado plagas de insectos perforadores de troncos y ramas, destacando los coleópteros de los géneros *Cerambyx* y *Prinobius* (Carrasco *et al.*, 2009).

Así pues, se está perdiendo gran cantidad de arbolado que, junto con la falta de regeneración, provoca un ahuecamiento progresivo de las dehesas, con una pérdida total de arbolado en algunas zonas (Carrasco *et al.*, 2009). La vitalidad de las masas forestales está disminuyendo por lo que son más susceptibles a la introducción de otras plagas y a los incendios forestales. Además, la bellota depende en gran parte del buen estado fitosanitario de la encina y ésta a su vez es la base de las principales actividades productivas de la dehesa (Fernández Rebollo *et al.*, 2008). Hoy día se están produciendo graves pérdidas en la producción de bellota y, en el caso del alcornoque, de corcho debido a la podredumbre radical asociada a los oomicetos mencionados.

Por último, el desarrollo de una enfermedad infecciosa y su manifestación dependen del nivel de ataque y de las condiciones que predominan mientras se mantiene la interacción hospedante-patógeno. Por ello, es necesario ahondar en el conocimiento de esta enfermedad que afecta a la encina, tanto en la sintomatología y epidemiología como en su diagnóstico y, de este modo, se podrá actuar de forma preventiva a través de los métodos de control, además de buscar métodos de valoración de la progresión de la enfermedad en el hospedante bajo diferentes condiciones.

#### **1.3.7.1. Sintomatología**

La sintomatología aérea de los árboles afectados es muy inespecífica y por tanto poco útil para el diagnóstico (Sánchez *et al.*, 2002b). En general, los síntomas que se observan en las encinas afectadas son similares para ambos patógenos (*P. cinnamomi* y *Py. spiculum*): amarilleo y marchitez foliar, defoliación y muerte regresiva de ramas -puntisecado. El sistema radical se reduce, aparecen necrosis y muerte de las raicillas absorbentes (Romero *et al.*, 2007).

Los síntomas del decaimiento se podrían dividir en aéreos y en subterráneos, de forma gradual o de muerte súbita. Los síntomas más llamativos son:

- Decaimiento lento: caída gradual de las hojas y presencia de ramas parcial o totalmente defoliadas. El proceso de muerte puede durar varios años, especialmente en climas frescos y húmedos. (= síndrome de muerte lenta).
- Decaimiento rápido: secado de ramas, hojas muertas sujetas un tiempo a las ramas y árboles muertos, ausencia de raicillas absorbentes que provocan el colapso repentino de los árboles (= síndrome de muerte rápida).

Otros síntomas del árbol infectado son la aparición de lesiones de color pardo al retirarle la corteza y la producción de pequeñas lesiones en el tronco que exudan un fluido oscuro gomoso y negruzco (sangraduras). Este último síntoma no es frecuente y ocurre si la infección se propaga hasta las raíces leñosas o hasta la base del tronco. Los árboles afectados pueden producir, aunque no siempre, rebrotes de pequeño tamaño a lo largo de las ramas gruesas y del tronco que pueden sobrevivir varios años.

#### **1.3.7.2. Factores abióticos favorables al decaimiento asociado a podredumbre radical**

La gravedad del decaimiento debido a la podredumbre radical varía según el área geográfica y la orografía de la misma. La climatología influye en la incidencia de la enfermedad, en los síntomas que muestran los árboles afectados así como en la distribución de la misma. Los factores abióticos

asociados a esta enfermedad son principalmente la sequía y las inundaciones en zonas topográficamente bajas como valles, vaguadas y laderas de colinas. Los suelos arcillosos, pesados, compactos, con baja capacidad de infiltración, favorecen el encharcamiento y la escorrentía, favoreciendo la diseminación superficial del patógeno (Carrasco *et al.*, 2009). Los suelos arenosos, con niveles freáticos altos, favorecen la dispersión vertical del patógeno y la infección del arbolado.

El impacto de la misma es más elevado en suelos con una buena capacidad de retención de agua o en los que han sufrido encharcamientos produciéndose la pérdida de las raicillas absorbentes y llegando a provocar la muerte del árbol. Cabe decir que aunque éste último no sea el responsable de los síntomas (Peñuelas y Ocaña, 1996), concretamente, el encharcamiento estacional, estimula la germinación de clamidosporas y la producción de esporangios, facilitando la dispersión de zoosporas. Dependiendo de la cantidad de agua se producen daños con más o menos intensidad.

Los daños más graves se producen también en zonas secas, sobre todo cuando después de una primavera lluviosa se pasa a veranos y otoños secos con altas temperaturas. Tanto en las condiciones de estrés hídrico como en las de saturación, con el sistema radical infectado, los árboles no son capaces de superar el estrés ocasionado por el déficit hídrico y, por consiguiente, mueren.

Por último, esta enfermedad puede estar influenciada por la vegetación del maquis asociada a encinas y alcornoques, así como a su mayor o menor efecto en un área considerada. Esta idea no está confirmada pero la sustenta la presencia de plantas de *Cistus*, *Lavandula*, *Genista*, *Erica*, etc. desecadas y muertas alrededor de árboles afectados por la “seca” (Brasier *et al.*, 1993).

### **I.3.8. Prevención y control**

El control de esta enfermedad es complicado debido al amplio rango de hospedantes de *P. cinnamomi*, al período en ocasiones largo entre el establecimiento de la infección y la manifestación de los síntomas, y a la supervivencia de las estructuras de resistencia del patógeno en el suelo (Erwin y Ribeiro, 1996).

Aunque la información disponible en el patosistema *Quercus/P. cinnamomi* sea escasa, se pueden tomar las siguientes medidas de prevención y control:

En primer lugar, para prevenir la enfermedad en ecosistemas naturales se han de destruir los árboles infectados, eliminando los tocones, y evitar el movimiento del suelo infestado con el calzado, maquinaria, ganado, etc. eliminando o limitando en la mayor medida posible el laboreo en los focos de enfermedad (Fernández Rebollo *et al.*, 2008). En vivero, se tiene que evitar la acumulación de agua y el encharcamiento periódico de los sustratos debido a excesos de riego, uso de sustratos poco porosos, instalaciones inadecuadas, etc. (Sánchez *et al.*, 2005).

El cultivo de la encina necesita una buena aireación y drenaje haciendo uso de contenedores, sustratos y semillas libres de patógenos (Sánchez *et al.*, 2010).

Una medida de control a tener en cuenta es la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo. La incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora* se reduce gracias a los ácidos húmicos y fúlvicos que contiene la materia orgánica (Erwin y Ribeiro, 1996). La aplicación de estiércoles en suelos infestados ha dado buenos resultados en el control de la enfermedad en condiciones controladas (Vicente *et al.*, 2009).

Otra alternativa es buscar antagonistas entre los hongos que forman micorrizas con *Quercus* spp. En los últimos años, se ha ampliado las nociones sobre estas asociaciones simbióticas mutualistas con la encina y el alcornoque (Morcillo *et al.*, 2007), pero no ha sido investigada su posible utilización para el control de *P. cinnamomi*.

La aplicación de carbonato cálcico y el encalado pueden ser efectivas para tratar los suelos muy infestados, pues incrementan el pH del suelo y disminuyen la viabilidad de las esporas (Serrano *et al.*, 2010), inhibiendo la formación de esporangios. Su aplicación se recomienda para desinfestar previamente el suelo en el que el patógeno haya estado presente y así poder reforestar zonas que han perdido el arbolado y donde el establecimiento de nuevos plantados es inviable (Rodríguez-Molina *et al.*, 2002).

Por último, respecto a la aplicación de productos sistémicos, se opta por métodos que aseguren su presencia en el área de infección en concentraciones adecuadas. Algunos experimentos realizados con aplicación al suelo (Navarro *et al.*, 2006) o por inyección al tronco con fosfonatos en encinas y alcornoques afectados (Sánchez *et al.*, 2006) muestran resultados esperanzadores, aunque todavía no existe una evidencia experimental suficiente que permita recomendar dosis y tratamientos precisos.

## **CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## **CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El decaimiento se define como un fenómeno complejo que implica la combinación e interacción de factores abióticos y bióticos (Manion, 1991). Desde el inicio de los años 80, se ha observado en España el decaimiento de *Quercus* spp., provocando la muerte o decaimiento de un número elevado de individuos y afectando tanto a árboles aislados como en grupos (Cobos *et al.*, 1993). En los últimos años, los daños causados por oomicetos patógenos en Europa se han incrementado siendo una de las causas importantes de decaimiento y muerte de muchos árboles.

La encina es una especie sensible al ataque de oomicetos. Diversos estudios han detectado la implicación de *P. cinnamomi* y de otros oomicetos patógenos tales como *Py. spiculum* y *Py. sterilum* en la enfermedad de la “seca” de la encina. La mayor parte de los estudios han sido realizados en las regiones donde se concentra un mayor número de focos: Andalucía, Extremadura y Castilla-La Mancha.

En la Comunidad Valenciana se han observado algunas fisiopatías sobre *Quercus* spp. que podrían asociarse a dicha enfermedad, lo que supone un grave problema en las masas forestales de estas frondosas, ya que las debilita causándoles la muerte. Dicho fenómeno se ve favorecido por la climatología típica del Mediterráneo. En la actualidad, en la Comunidad Valenciana son escasos los estudios relativos a la mayor o menor incidencia de *Phytophthora* y *Pythium* en el decaimiento de las encinas en ecosistemas naturales. En el período de 2000-2011 se realizaron prospecciones específicas gracias a la colaboración de la Conselleria de Medio Ambiente y del I.V.I.A. (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias), en diferentes municipios de la Comunidad Valenciana para estudiar la posible incidencia de *P. cinnamomi*, aunque no se aisló (CITMA, 2015). Cabe destacar que las escasas precipitaciones registradas en la Comunidad Valenciana en los últimos años pueden representar un factor fundamental en el debilitamiento de las masas de *Quercus* spp. Sin embargo, en un encinar de elevado valor ecológico (Parque Natural Carrasgar de la Font Roja, Alcoi) y con síntomas patentes de decaimiento, investigadores del IAM- UPV en colaboración con Dr. Thomas Jung aislaron diversas especies de *Phytophthora* a partir de la rizosfera de encinas y quejigos (*Quercus faginea*), y aunque no se detectó la presencia de *P. cinnamomi*, la patogenicidad de *Phytophthora quercina* y *Phytophthora psychrophila* quedó demostrada mediante inoculación de estos oomicetos en plantas de una savia de *Q. ilex* y *Q. faginea*, siendo más susceptible el primero de estos nuevos hospedantes (Pérez-Sierra *et al.*, 2013).

En el presente estudio se han analizado muestras del entorno de la rizosfera de encinas con síntomas de decaimiento localizadas en los municipios de Alcoi, Alcublas y Pina de Montalgrao. La finalidad de este trabajo es llevar a cabo el diagnóstico de casos concretos de encinas que mostraban síntomas de decaimiento, aplicando técnicas de aislamiento y de identificación de oomicetos. La hipótesis de trabajo es confirmar la presencia de oomicetos en las raíces de estos árboles como un factor contribuyente de su decaimiento.

## **CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS**

## **CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS**

### **III.1. PROSPECCIÓN DE ENCINARES**

La prospección se realizó en encinares situados en tres municipios de la Comunidad Valenciana: Alcoi (provincia de Alicante), Alcublas (provincia de Valencia) y Pina de Montalgrao (provincia de Castellón) entre finales del 2014 y principios del 2015. En Alcoi, el encinar prospectado forma parte del Parque Natural Carrascar de la Font Roja, espacio protegido por su alto valor ecológico y en el que ya se ha detectado la presencia de *Phytophthora* spp. en años anteriores. En Alcublas, se prospectó una formación boscosa con abundantes carrasacas denominada Los Molinos y en Pina de Montalgrao, el encinar visitado está situado en Sierra Espina. Los árboles elegidos para el muestreo eran representativos, en cada lugar prospectado, de la problemática observada. Para ello, se recogieron muestras de raíces de *Q. ilex* y suelo del entorno de su rizosfera de árboles con síntomas de decaimiento. Los síntomas observados en el PN Carrascar de la Font Roja y el encinar de Pina de Montalgrao incluían seca de brotes o puntas, cierto grado de defoliación, marchitez y muerte de ramas, característicos del decaimiento. En Alcublas, personal técnico del ayuntamiento recogieron muestras en árboles que manifestaron una súbita marchitez, solicitando su análisis en el Laboratorio de Patología Vegetal del Dpto. Ecosistemas Agroforestales de la UPV.

Alrededor de cada árbol sintomático se tomaron 4 submuestras dispuestas en direcciones opuestas, a 1 m de distancia de la base del tronco y a 30 cm de profundidad, retirando la capa de hojarasca pero no el horizonte A. El contenido de las submuestras de cada árbol se mezcló siendo consideradas como una única muestra. La muestra de raíces y suelo de cada encina se guardó en una bolsa de plástico etiquetada para su traslado al laboratorio. Las muestras se preservaron a 10-20° C hasta el momento de realizar los aislamientos.

El diagnóstico de la enfermedad se basó en el aislamiento e identificación de oomicetos y hongos obtenidos directamente de raíces infectadas, o del suelo, mediante el uso de cebos biológicos (Sánchez *et al.*, 2003).

### **III.2. AISLAMIENTO A PARTIR DE RAÍCES DE *QUERCUS ILEX* L.**

En un primer lugar, cada muestra se tamizó con un cedazo de 12 mm de luz para recuperar las raíces de encina y la tierra fina, desechando piedras, restos de hojarasca, etc. Las raíces se lavaron bajo el chorro de agua y se dejaron 24 h sumergidas en agua, cambiándola varias veces para conseguir que el medio fuera aerobio en todo momento y así potenciar el desarrollo de los oomicetos. Después, las raíces se secaron con papel de celulosa y se observaron los síntomas presentes (pequeños chancros, necrosis, pérdida o ausencia de las raicillas absorbentes) (Figura 3):



**Figura 3. Raíces de *Quercus ilex* L. con síntomas de chancros (A, B, C) y pérdida de raicillas absorbentes (D, E), (Alcublas, Valencia).**

El material vegetal se desinfectó superficialmente pulverizando las raíces con una solución de etanol al 70%, dejando secar al aire. De las raíces de cada muestra, los aislamientos se realizaron cogiendo fragmentos de 5 mm de longitud del borde de posibles lesiones. En aquellas raíces donde se observaron chancros, se analizó si la lesión era o no interna, y en el caso de que lo fuera se tomaron pequeños fragmentos de tejido para el aislamiento.

Para el aislamiento de oomicetos, de cada muestra se puso de 15 a 20 fragmentos de raíces por placa Petri y en total 6 placas: 3 de ellas contenían medio de cultivo semi-selectivo para oomicetos (PARBPH) y otras 3 placas el mismo medio sin himexazol (PARBP). El medio de cultivo PARRBH es una modificación del PARP descrito por Jeffers y Martin (1986), siendo su composición: 17 g de CMA (harina de maíz-agar), 0,4 g de pimaricina, 0,125 g de ampicilina, 0,01 g de rifampicina, 0,02 g de benomilo, 0,101 g de pentacloronitrobenceno, 0,069 g de himexazol y 1 litro de agua destilada.

Para el aislamiento de hongos, las raíces seleccionadas se desinfectaron de nuevo sumergiéndolas en solución de hipoclorito sódico (1,5% de cloro activo) durante 2 min y dos lavados posteriores de 30 s en agua destilada estéril. El aislamiento se realizó en medio de cultivo patata-dextrosa-agar (PDA, 39 g de patata-dextrosa-agar en 1 litro de agua destilada) suplementado con 0,5 g de sulfato de estreptomina (PDAs), depositando de 6 a 8 fragmentos de raíces por placa y un total de 2 placas por muestra.

Las placas se incubaron a 20° C en oscuridad, revisándolas diariamente hasta la aparición de colonias. Para obtener aislados, tanto de oomicetos como fúngicos, las colonias se sembraron de manera aislada en placas conteniendo medio PDA cogiendo puntas de hifas. Las placas se incubaron a 20° C en oscuridad.

Si la colonia de un aislado de oomiceto en medio PDA presentaba posible contaminación bacteriana, para eliminarla se empleó la técnica del “sandwich”: en una placa estéril se puso un bloque de medio de cultivo PARBPH o PARBP (usando el mismo medio en el que se hubiera aislado el oomiceto), encima se depositó un pequeño fragmento de la colonia del oomiceto y sobre él se colocó otro bloque de medio PARBPH o PARBP. Las placas se incubaron a 20° C, revisándose diariamente hasta que se observaba el crecimiento de micelio libre de contaminación bacteriana en la superficie; en ese caso, se repicaba de nuevo en medio de cultivo PDA.

### III.3. AISLAMIENTO A PARTIR DE SUELO MEDIANTE EL USO DE TRAMPAS VEGETALES

Para realizar aislamientos de oomicetos a partir de muestras de suelo, se utilizó distinto material vegetal como cebo o trampa: manzanas de la variedad Granny Smith, hojas jóvenes de *Quercus robur* y *Viburnum tinus*, y pétalos inmaduros de *Dianthus* spp. (Erwin y Ribeiro, 1996), con el fin de inducir la infección de este material vegetal a partir de inóculo de oomicetos presente en el suelo.

Para cada muestra de suelo se utilizó una manzana Granny Smith desinfectada superficialmente con alcohol. El material utilizado es el siguiente: sacabocados de 1 cm de diámetro, espátula, vaso de precipitado con agua destilada, pipeta de plástico y papel de filtro. En cada manzana se hizo 4 agujeros de 1,5 cm de profundidad, perpendiculares entre sí. Los agujeros se rellenaron con tierra fina de la muestra de suelo. Después, con la pipeta de plástico se añadió agua, asegurándose que el sustrato quedase saturado. Por último, cada agujero rellenado se tapó con dos trozos de celo, colocándolos perpendiculares entre sí, con la finalidad de estancar el agua. Las manzanas se dejaron a temperatura ambiente hasta la manifestación de síntomas (lesiones de podredumbre). El aislamiento de oomicetos se realizó cortando el fruto y tomando pequeños fragmentos del borde de las lesiones, que se depositaron en 2 placas, una con medio semi-selectivo PARBPH y otra con medio PARBP. Las placas se incubaron a 20° C en oscuridad.

En segundo lugar, aproximadamente 500 g de cada muestra de suelo se puso en un recipiente rectangular de plástico, se saturó con agua destilada y se dejó pasar 24 h. Al día siguiente, la muestra se inundó con agua destilada hasta 3-4 cm por encima de la tierra y se dejó transcurrir 24 h más. Se retiraron las raíces de encima que flotaron en el agua, usándolas para realizar aislamientos en medios semi-selectivos PARBPH/PARBP siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Seguidamente, una vez extraídas las raíces, con la ayuda de una malla y papel de filtro se quitó toda la materia orgánica restante. Se depositó, con cuidado para que flotaran, hojas tiernas de *Q. robur* y *V. tinus*, y los pétalos de clavel. Los recipientes se incubaron en fitotrón con fotoperiodo de 10 h de luz. Diariamente se revisaba este material vegetal para comprobar el desarrollo de lesiones (aparición de manchas negruzcas, decoloraciones, pétalos con aspecto oleaginoso). Pequeños fragmentos de hoja o pétalos se emplearon para realizar los aislamientos de oomicetos en medio de cultivo PARBPH y PARBP, tal como se ha explicado anteriormente.

### III.4. CRECIMIENTO DE OOMICETOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Para obtener una mayor información acerca de los oomicetos obtenidos en los muestreos realizados en encinares de Pina de Montalgrao y el PN Carrascar de la Font Roja, éstos se sembraron en distintos medios de cultivo: extracto de malta-agar (MEA, 15 g extracto de malta y 20 g agar en 1 litro de agua destilada), agar-avena (OA, 20 g de copos de avena, 13 g de agar y 1 litro de agua destilada), medio de ocho vegetales (V8, 200 ml de zumo de vegetales, 2 g CaCO<sub>3</sub>, 15 g agar y 800 ml de agua destilada) y en medio PDA.

Las placas se incubaron en oscuridad durante 7 días a 20° C para observar el crecimiento y morfología de las colonias, comparándolo con las descripciones realizadas por Erwin y Ribeiro (1996) y Jung, 2011, entre otros.

### III.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE OOMICETOS

Inicialmente, los aislados de oomicetos obtenidos se clasificaron según la morfología de su colonia y estructuras de su micelio. En el caso de que la morfología fuese típica de *Phytophthora* o de *Pythium* se procedió a su identificación molecular mediante la secuenciación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosómico. Para ello, se realizó la extracción rápida del ADN de los cultivos según el protocolo descrito por Alaniz *et al.* (2009): se añadió en un tubo eppendorf 20  $\mu$ l de NaOH 25 mM, pH 12, con una pizca de micelio, homogenizando la solución con ayuda de una punta de pipeta estéril y con filtro. La solución se calentó a 100° C durante 15 min y se enfrió a 4° C por 5 min para desnaturalizar la muestra. Se añadió 20  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 40 mM, pH 5, agitando con vortex. La solución de ADN extraído se guardó en una cámara frigorífica a 4° C hasta su uso.

La amplificación de la región ITS del DNA ribosómico se realizó mediante la técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*), empleando los cebadores universales para oomicetos ITS4 e ITS6 (White *et al.*, 1990; Cooke *et al.*, 2000). Para llevar a cabo la reacción PCR se utilizó el kit comercial MBL-Taq DNA Polimerasa (Dominion-MBL, Córdoba, España). Las cantidades y concentraciones de los reactivos se detallan a continuación (Tabla 2):

**Tabla 2. Plantilla de las condiciones de reacción para la amplificación de la región ITS del ADN ribosómico mediante PCR.**

Componente	Concentración stock	Concentración final	Volumen $\mu$ l (1 reacción)
Buffer (x)	10	1	2,5
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	2,5	2,5
dNTPs (mM)	8	0,64	2
ITS4 ( $\mu$ M)	10	0,4	1
ITS6 ( $\mu$ M)	10	0,4	1
H <sub>2</sub> O			14,8
Taq (U/ $\mu$ l)	5	0,04	0,2
Genomic DNA			1
TOTAL ( $\mu$ l)			25

Se añadió 24  $\mu$ l de mezcla de reacción a cada tubo de PCR y 1  $\mu$ l de solución de ADN del aislado de oomiceto a identificar. La amplificación de la región ITS se realizó en un termociclador (mod. PTC 200, MJ Research), con un programa de temperaturas y tiempos indicados en la siguiente tabla (Tabla 3):

**Tabla 3. Condiciones de temperatura y tiempo del programa para la amplificación de la región ITS del ADN ribosómico mediante PCR.**

Etapas	Tª (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	35
Anillamiento	55	30 seg	35
Amplificación	72	45 seg	35
Amplificación final	72	10 min	1

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Se preparó la solución disolviendo 1,5 g de agarosa en 100 mL de tampón TBE 0,5x (0,045 mM de Tris base, 0,045 mM de ácido bórico y 0,001 mM EDTA), calentándola en el microondas durante 2-3 min. Se esperó hasta que estuviese templada para añadirle 4 µl de “REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution”, y antes de que se solidificara se vertió en un molde adecuado. El gel de agarosa se sumergió en una cubeta de electroforesis que contenía tampón TBE 0,5x y en cada pocillo del gel se puso una alícuota del producto de amplificación (5 µl de producto PCR + 1 µl de colorante). En los pocillos de los extremos del gel se añadió 3 µl del marcador de 100 pares de bases “Gene Ruler 100 pb DNA Ladder Plus” para estimar el tamaño de los amplicones.

La electroforesis se realizó a 120 voltios durante 25-45 min y, posteriormente, las bandas (amplicones) se visualizaron iluminando el gel con luz ultravioleta en un transiluminador. Los amplicones con tamaños entre 700-1000 pb se secuenciaron enviándose a una empresa especializada (Macrogen Inc., Amsterdam, Holanda). Para su envío, se homogenizó 5 µl del producto PCR y 5 µl del cebador ITS6. Los resultados de la secuenciación se reciben mediante correo electrónico y las secuencias de la región ITS se comparan mediante “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) con la base de datos GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) o con la base de datos específica para el género *Phytophthora* ([www.phytophthoradb.org](http://www.phytophthoradb.org)).

### III.6. CONSERVACIÓN DE AISLADOS DE *PHYTOPHTHORA* Y *PYTHIUM*

Se guardó una colección de aislados representativos de las especies identificadas en este trabajo, para su conservación. Para ello, a partir de puntas de hifas de colonias crecidas en medio PDA se repicó a medio V8 (en el caso de querer conservar aislados de *Pythium*) y en medio OA para conservar aislados de *Phytophthora*. De las colonias de *Pythium*, crecidas en V8, se cortaron 20 discos con un sacabocados de 5 mm de diámetro, conservándolos en viales conteniendo solución de extracto de suelo autoclavado (en matraz Erlenmeyer se añadió 900 mL de agua destilada a 100 g de suelo agrícola, se agitó y se dejó reposar 24 h; 50 mL del sobrenadante se añadieron a 950 mL de agua destilada y se esterilizó en autoclave). En el caso de *Phytophthora* se colocó un disco de micelio en tubo inclinado conteniendo medio OA. Estos aislados de oomicetos se conservan a 15° C en la oscuridad.

### **III.7. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS**

La identificación de los hongos aislados se basó en el aspecto y color de la colonia en medio de cultivo PDA y observando con ayuda del microscopio sus estructuras vegetativas y reproductivas. Para ello, en un portaobjetos se depositó una pequeña cantidad de micelio de la zona esporulada de la colonia fúngica, con una gota de solución de Shear's como montante (10 g de acetato potásico, 500 ml de agua, 200 ml de glicerol, 300 ml de etanol 95%). La preparación se protegió con un cubreobjetos y se observó al microscopio (4, 10 y 40 x aumentos). La identificación se llevó a cabo usando el manual ilustrado de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1998).

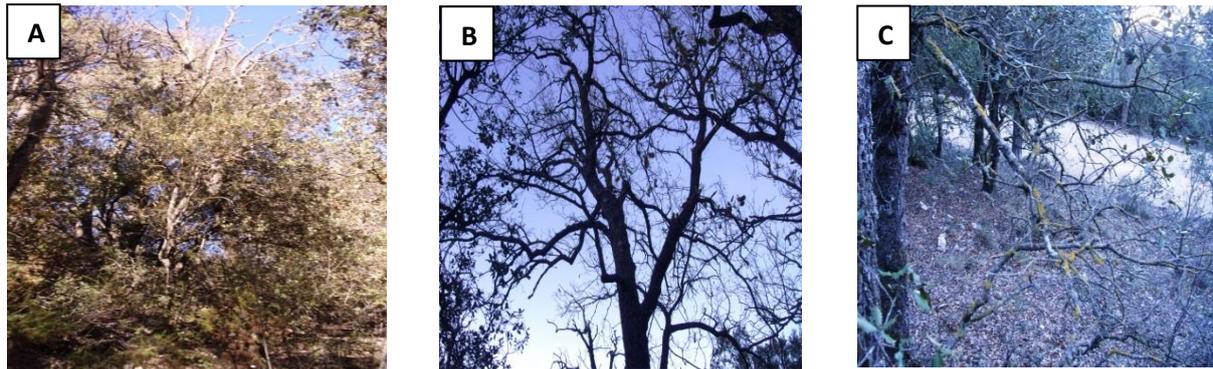
## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **IV. I. RESULTADOS**

#### **IV.I.1. PROSPECCIÓN DE ENCINARES**

Se ha analizado el estado fitosanitario de un total de 12 encinas que presentaban síntomas de decaimiento, y que forman parte de encinares situados en los términos municipales de Alcoi (4 encinas), Alcublas (3 encinas) y Pina de Montalgrao (5 encinas). Los síntomas aéreos observados *in situ* en el PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi) y en Sierra Espina (Pina de Montalgrao) consistían en ramillas secas, muerte de ramas, defoliación y marchitez, característicos de un decaimiento progresivo (Figura 4). Los síntomas subterráneos más frecuentes fueron principalmente pérdida de raicillas absorbentes, necrosis y chancros en raíces leñosas. Las muestras de carrasca procedentes del entorno de Los Molinos (Alcublas) se analizaron porque presentaron un repentino decaimiento, sin manifestación apreciable de defoliación, sino que el follaje se marchitó en poco tiempo y, presumiblemente, estos árboles se colapsaron. En este último caso, las muestras de raíces y suelo fueron recogidas por personal técnico del Ayuntamiento de Alcublas.



**Figura 4. Prospecciones realizadas en el PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi). Encinas con síntomas de decaimiento. A: clareo en la copa. B: completa defoliación. C: muerte de ramas y ramillas secas.**

#### **IV.I.2. AISLAMIENTO DE OOMICETOS A PARTIR DE RAÍCES DE *Q. ILEX* L. Y DE MUESTRAS DE SUELO**

Se obtuvo un total de 19 aislados de oomicetos en el aislamiento directo de estos microorganismos a partir de fragmentos de raíces de encina, empleando los medios semi-selectivos PARBPH y PARBP. Once de estos aislados proceden del sistema radical de las encinas muestreadas en Sierra Espina (Pina de Montalgrao), seis tienen su origen en encinas decaídas del PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi), y únicamente dos se obtuvieron de las raíces de carrascas de Los Molinos (Alcublas).

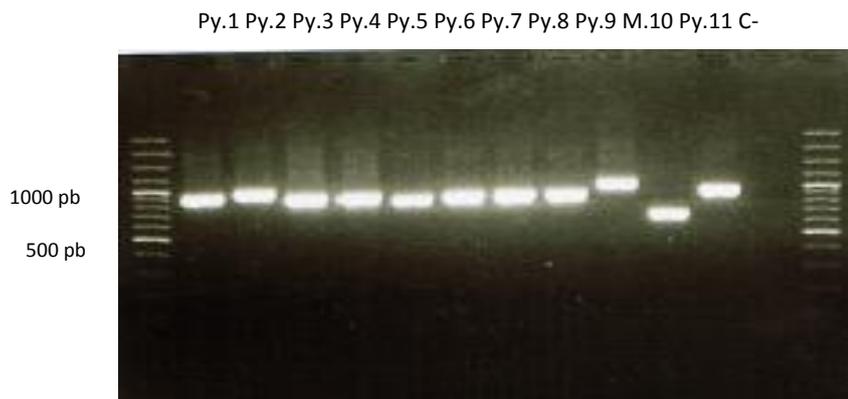
El aislamiento indirecto de oomicetos a partir de muestras de suelo recogidas en el entorno de la rizosfera de encinas sintomáticas, se llevó a cabo usando distintos materiales vegetales como “trampa” (manzanas, *Q. robur* y *V. tinus* y pétalos de clavel). Se obtuvo un total de 65 oomicetos aplicando este método de aislamiento. El origen geográfico de estos oomicetos se distribuye así: 19 aislados proceden de suelo forestal de Sierra Espina (Pina de Montalgrao), 22 oomicetos son

originales de suelo del carrascal de la Font Roja y los 24 aislados restantes proceden de muestras de tierra recogidas bajo encinas del bosque Los Molinos (Alcublas).

#### IV.1.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS OOMICETOS AISLADOS

El ADN genómico de los 84 oomicetos aislados se extrajo aplicando un protocolo de extracción rápida, que permite ahorrar tiempo y reactivos y que ofrece suficiente calidad para amplificar la región ITS del ADN ribosómico mediante la técnica PCR. La síntesis de la región ITS se llevó a cabo usando como cebadores los oligonucleótidos ITS4 e ITS6 diseñados por White *et al.* (1990) y Cooke *et al.* (2000), dando como producto de amplificación una única banda de tamaño superior a 750 pb. Estos resultados concuerdan con lo indicado por Cooke *et al.* (2000), que estudian la filogenia molecular de *Phytophthora* y oomicetos relacionados basándose en el análisis de la secuencia de la región ITS de estos microorganismos. Estos autores indican que la longitud de la región ITS, amplificada con los cebadores utilizados en el presente trabajo, varía entre especies, desde 752 pb (*Phytophthora capsici*) a 915 pb (*Halophytophthora batemanensis*), estando incluido en este rango las diversas especies de los géneros *Phytophthora* y *Pythium*.

Los resultados de la amplificación de la región ITS se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%, como se muestra en la siguiente figura:



**Figura 5. Electroforesis del producto de amplificación de la región ITS de aislados obtenidos de suelo y raíces de encina con síntomas de decaimiento. Marcador molecular: escalera de fragmentos de ADN de 100 pb (pocillos extremos). Control negativo sin ADN (C-).**

La secuenciación de la región ITS del ADN ribosómico de 84 aislados confirmó que son oomicetos, es decir, microorganismos pertenecientes al reino *Straminipila*. La comparación de estas secuencias, mediante BLAST, con secuencias de *Phytophthora* y *Pythium* depositadas en las bases de datos GenBank y *Phytophthora*-database permitió su identificación.

En conjunto, las especies de oomicetos que se han aislado con mayor frecuencia en los encinares prospectados fueron *Pythium heterothallicum* / *Pythium glomeratum*: 52% (44 aislados).

Sin embargo, las especies de oomicetos con mayor incidencia difieren entre los distintos encinares estudiados, asumiendo que la incidencia está directamente relacionada con la frecuencia de aislamiento:

**En Sierra Espina (Pina de Montalgrao):** *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum* son los oomicetos que se han aislado con mayor frecuencia directamente de raíces de encinas con síntomas de decaimiento (45%, correspondiente a 5 aislados). Cuando el aislamiento de oomicetos se realizó a partir de muestras de suelo, se obtuvo 19 aislados pertenecientes a diversidad de especies. La mayor incidencia correspondió a *Pythium cederbergense* / *Pythium* sp. (26%, 5 aislados), seguido de *Pythium rostratum* / *Pythium rostratifingens* (16%, 3 aislados) y *Pythium rhizosaccharum* / *Pythium takayamanum* (16%, 3 aislados).

En este encinar, teniendo en cuenta los datos en conjunto procedentes de aislamiento de oomicetos de raíces y de suelo, los resultados establecen tres grupos de especies más frecuentes: *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum*; *Py. rostratum* / *Py. rostratifingens*; *Py. cederbergense* / *Pythium* sp., siendo su porcentaje de incidencia 23, 23 y 20% respectivamente.

**En el bosque de Los Molinos (Alcublas):** del aislamiento directo de raíces de encinas con síntomas de decaimiento súbito únicamente se obtuvo dos oomicetos pertenecientes ambos a la especie *Pythium vanterpoolii* (100%, 2 aislados). La cantidad de aislados se incrementó al aplicar trampas vegetales (hojas y pétalos de clavel) para inducir infección de estos tejidos a partir del inóculo de oomicetos presente en muestras del suelo donde se enclavan las encinas decaídas. Se obtuvo un total de 24 oomicetos, siendo las especies más frecuentes *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum* (71%, 17 aislados). También se aisló *Pythium vanterpoolii* de las muestras de suelo analizadas (13%, 3 aislados).

**En el PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi):** se obtuvo 6 aislados de oomicetos de raíces de encinas con síntomas de decaimiento, todos pertenecientes al género *Pythium*, siendo la mayoría de ellos *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum* (83%, 5 aislados). El método indirecto de aislamiento, a partir de muestras de suelo del entorno de la rizosfera de las encinas decaídas que se han analizado en este trabajo, permitió aislar *Phytophthora psychrophila* (18%, correspondiente a 4 aislados). La presencia de este oomiceto infectando raíces de *Q. ilex* y *Q. faginea* en el Carrascar de la Font Roja ya se detectó en 2012 (Pérez-Sierra *et al.*, 2013), quedando demostrada su patogenicidad en ambas especies vegetales. Del resto de aislados obtenidos en las muestras de suelo analizadas, las especies más frecuentes fueron *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum* (68%, 15 aislados). Hubo un aislado en el que la secuenciación del amplicón de la región ITS no generó una secuencia con suficiente calidad para permitir su identificación molecular.

Interesa analizar los resultados según el método de aislamiento aplicado, i) directo a partir de raíces de encinas con síntomas de decaimiento, ii) indirecto a partir de muestras de suelo del entorno de la rizosfera de esos árboles y usando cebos vegetales, para valorar también qué tipo de cebo proporciona un mayor número de aislados y qué especies de oomicetos se aíslan con mayor frecuencia dependiendo del cebo utilizado.

De la colección de 84 oomicetos, 19 aislados se han obtenido mediante el método directo de aislamiento a partir de raíces de árboles sintomáticos; aunque la cantidad sea relativamente baja (23% de la colección), su interés fitopatológico es mayor ya que proceden de tejidos radiculares infectados. Más de la mitad de estos aislados se identifican molecularmente como *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum* (53%). También se encuentran en el interior de las raíces *Py. rostratum* / *Py. rostratifingens* (21%) y *Py. cederbergense* / *Pythium* sp. (5%).

El aislamiento indirecto de oomicetos, partiendo de muestras de suelo y usando materiales vegetales como cebo, proporcionó un número mayor de oomicetos (65 aislados, 77% de la colección). De ellos, *a priori*, no se puede deducir si su estrategia de vida es parásita, saprófita o ambas, ni tampoco si son capaces de infectar raíces de *Q. ilex*, pero al menos han sido capaces de desarrollar lesiones necróticas o podredumbres en los materiales vegetales empleados como trampa. Ordenando de mayor a menor la efectividad de los cebos vegetales, se tiene: los pétalos de *Dianthus* sp. (48%); las hojas de *Q. robur* (21%); las hojas de *V. tinus*. (17%); y por último, las manzanas Granny Smith (14%). Concretamente, *P. psychrophila* únicamente se aisló a partir de manzana; *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum* se aisló de todos los cebos vegetales; *Py. rostratum* / *Py. rostratiformis* se aislaron de lesiones formadas en hojas de *V. tinus* y pétalos de clavel; *Py. cederbergense* / *Pythium* sp. colonizaron tejidos foliares de *Q. robur* y pétalos de clavel y *Py. vanterpoolii* solamente se aisló de pétalos de clavel.

#### IV.I.4. CRECIMIENTO DE OOMICETOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Diversos aislados representativos de las especies de oomicetos obtenidos en las muestras analizadas de encinas decaídas, pertenecientes al PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi) y al encinar prospectado en Pina de Montalgrao, se cultivaron en diferentes medios de cultivo para conocer su patrón de crecimiento y morfología de colonia. Prácticamente todos estos oomicetos, a excepción de *P. psychrophila*, pertenecen al género *Pythium*. La información disponible acerca de las especies de este género es muy variable, siendo muy abundante en aquellas especies de *Pythium* que son patógenas de cultivos, por ejemplo *Py. ultimum* que es agente causal de *damping off* en semilleros, pero muy escasa en especies de *Pythium* que habitan en suelos forestales.

A continuación se describen algunas características observadas en los cultivos de las especies de oomicetos que se han aislado con mayor frecuencia en este trabajo (Anejo I):

##### ***Pythium heterothallicum*** W.A. Campbell & F.F. Hendrix:

Las colonias pueden formar micelios aéreos o un patrón de crecimiento tipo “roseta”. Las hifas principales son de hasta 7 µm de ancho. No produce esporangios ni zoosporas en los medios en que se ha cultivado. Como su nombre indica, se trata de un oomiceto autoestéril, siendo necesaria la presencia de dos individuos para que tenga lugar la reproducción sexual y producción de oosporas.

De acuerdo con la filogenia molecular publicada por Lévesque y De Cock (2004), esta especie pertenece al clado I, relacionada con las especies fitopatógenas *Pythium splendens* y *Py. ultimum*, pero se conoce muy poco acerca de la patogenicidad de *Py. heterothallicum*.

##### ***Pythium glomeratum*** B. Paul:

El micelio está ramificado y sus hifas miden hasta 5 µm de diámetro. Las colonias muestran un patrón de crecimiento tipo “crisantemo”. Este oomiceto no produce esporangios ni zoosporas en los medios de crecimiento empleados en este trabajo (PDA, V8, OA y MEA). Las hifas pueden presentar hinchamientos globosos o elongados; a veces estas estructuras son mucho más gruesas que el micelio vegetativo.

*Py. glomeratum* es una especie que se aisló por primera vez de muestras de suelo de uso agrícola del norte de Francia en 1992 y se identificó erróneamente como *Py. heterothallicum*. Son dos especies filogenéticamente muy relacionadas, con pocas diferencias en la secuencia de la región ITS según Paul (2003).

***Pythium rostratum*** E.J. Butler:

Las colonias muestran un patrón de crecimiento tipo “crisantemo” y su micelio crece más despacio de lo habitual en *Pythium* (aunque no se han realizado mediciones del diámetro de la colonia). Las hifas tienen un tamaño medio de 6 µm de ancho. Los esporangios son globosos, ovoides, liminiformes o elipsoidales, no-proliferantes, terminales o intercalares. Sí se forman zoosporas.

***Pythium rostratiformis*** De Cock & Lévesque:

Las colonias tienen un patrón de crecimiento tipo “crisantemo”. Las hifas principales son de hasta 7 µm de ancho. Los esporangios son intercalados, ocasionalmente terminales y globosos, de vez en cuando ovales. Muchos esporangios no desarrollan zoosporas pero pueden germinar directamente por una o más hifas.

***Pythium cederbergense*** Bahramisharif, Botha & Lamprecht:

Colonia con gran parte de su micelio sumergido en el agar, sin patrón de crecimiento definido. No se han observado esporangios, ni estructuras sexuales de reproducción.

Esta especie se ha descrito recientemente (Bahramisharif *et al.*, 2013), asociada a las raíces de una planta nativa sudafricana. Su identificación molecular la sitúa filogenéticamente en el clado G. Se tiene muy poca información acerca de esta especie, tanto morfológica como ecológicamente.

***Pythium vanterpoolii*** V. Kouyeas & H. Kouyeas:

Las colonias tienden a formar micelio aéreo o un patrón de crecimiento radial. Las hifas principales tienen hasta 5 µm de ancho. Los esporangios se disponen con frecuencia en cadena y son subglobosos o irregularmente elipsoidales, situados intercalados en las hifas o con posición terminal. Sí se forman zoosporas.

Un aislado de esta especie de *Pythium*, junto a otras del mismo género, se ha aislado de raíces de chirivía (*Pastinaca sativa*) cultivada en Australia (Petkowski *et al.*, 2013), causando graves pérdidas en el cultivo. Según los investigadores australianos, *Py. vanterpoolii* se aísla con frecuencia de gramíneas silvestres.

Según Kageyama (2014), se han descrito más de 140 especies de *Pythium*, pero la mayoría de ellas son difíciles de identificar basándose en características morfológicas, ya que abundan aislados que se diferencian notablemente del aislado tipo, hay especies que no forman esporangios ni zoosporas en medios axénicos de cultivo a no ser que se suplemente con algún material vegetal (por ejemplo semillas de cáñamo, hojas de *Lolium*), aislados autoestériles, variación en el tamaño y forma de las estructuras morfológicas dentro de una misma especie, y la semejanza de morfologías entre diferentes grupos de especies. Por este motivo, hoy día los aislados de *Pythium* se identifican

molecularmente basándose predominantemente en la secuencia de la región ITS del DNA ribosómico, siendo la filogenia propuesta por Lévesque y De Cock (2004) la más aceptada, que está subdividida en once clados (A-K).

***Phytophthora psychrophila*** T. Jung & E. M. Hansen:

Las colonias son más algodonosas en los medios V8, MEA y OA que en PDA y no presentan un patrón de crecimiento determinado. Es una especie de crecimiento lento y requiere bajas temperaturas de incubación. Es muy raro que sus hifas presenten hinchamientos hifales. Sus esporangios tienen semipapila y su tamaño y forma varía mucho aunque predomina la forma obpiriforme.

Esta especie fue descrita por Jung *et al.*, (2002) junto a *Phytophthora europaea* y *Phytophthora uliginosa* como especies nuevas asociadas a numerosos casos de decaimiento de *Quercus* en bosques europeos. La patogenicidad de *P. psychrophila* se demostró en bioensayos realizados con plantas de dos savias de *Q. robur* (Jung *et al.*, 2002) y de *Q. ilex* y *Q. faginea* (Pérez-Sierra *et al.*, 2013).

#### IV.1.5. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

Además del aislamiento de oomicetos, a partir de las muestras de raíces procedentes de encinas con síntomas de decaimiento también se realizó aislamiento de hongos con un medio de cultivo apropiado para ello (PDAs), ya que la sintomatología manifestada por los árboles es tan inespecífica que entre las posibles causas fitosanitarias debe incluirse la infección de sus raíces por algún hongo fitopatógeno.

Los aislados fúngicos se sembraron de manera independiente en placas de PDA; cuando las colonias alcanzaron un diámetro superior a los 6 cm se fotografiaron, y se realizaron preparaciones para su observación al microscopio. Los resultados fueron los siguientes (Anexo II):

- En las raíces de las encinas muestreadas en el PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi) únicamente se aislaron hongos pertenecientes al género *Fusarium*.
- En las raíces de las encinas analizadas procedentes de Alcublas se identificaron aislados del género *Fusarium*, siendo algunos de ellos de la especie *Fusarium solani*.
- En las raíces de encinas decaídas recogidas en Pina de Montalgrao se obtuvo mayor diversidad fúngica, identificándose aislados pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Gliocladium*, *Colletotricum*, *Fusarium* y otros que al no haber formado esporas, únicamente son considerados ascomicetos.

Hay que indicar que para el aislamiento de oomicetos se empleó medios semi-selectivos, que contienen antibióticos y fungicidas que inhiben el crecimiento de la mayoría de hongos y bacterias. Sin embargo, especialmente cuando los aislamientos proceden de suelos forestales como sucede en el presente trabajo, el uso de estos medios de cultivo (PARBPH y PARBP) no logran inhibir el crecimiento de algunos hongos. Por ello, el producto de la amplificación de su región ITS se envió a secuenciar para confirmar si se trataba de oomicetos o de hongos verdaderos (pertenecientes al reino *Fungi*). Este fue el caso de 20 aislados, que tras la secuenciación se confirmó que la mayoría (80%) pertenecen al género *Mortierella* (hongos del orden *Mortierellales* que viven como saprófitos en suelos, hojarasca y otros materiales orgánicos), y el resto se identificó como hongos

pertenecientes al orden *Mucorales* (hongos muy comunes, capaces de vivir como saprófitos sobre sustratos muy diversos).

## **IV.II. DISCUSIÓN**

Actualmente, el decaimiento progresivo es el problema más grave al que la encina se enfrenta. En nuestro país se ha citado una serie de factores abióticos implicados en el mismo: sequías severas y periódicas, encharcamientos estacionales, contaminación atmosférica, y otros factores de carácter biótico como la podredumbre radical debido a la infección de las raíces por oomicetos fitopatógenos. El decaimiento se entiende, por tanto, como una enfermedad de etiología compleja, sobre masas con un importante déficit selvícola, donde las sequías prolongadas son el principal factor incitante y la presencia de al menos un agente biológico virulento contribuye a causar el deterioro y la muerte del arbolado.

En encinares situados en los términos municipales de Alcoi, Pina de Montalgrao y Alcublas se han detectado árboles con síntomas de decaimiento que consisten principalmente en una pérdida del vigor de la copa del árbol, de forma lenta o más repentina, que concuerda con lo descrito por Tuset *et al.* (1996). La manifestación de los síntomas es muy inespecífica por lo que el diagnóstico preliminar en campo es muy complicado. Sin embargo, la distribución espacial y la evolución temporal proporcionan información válida para el diagnóstico, siendo heterogénea y por focos cuando los daños son causados por agentes bióticos, o incluso encontrándose árboles aislados con síntomas cuando se trata de las primeras etapas de manifestación de la enfermedad. En estos encinares, los pies afectados se distribuyen de manera aislada en Los Molinos (Alcublas) y Sierra Espina (Pina de Montalgrao), mientras que en el PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi) hay varios focos de *Quercus* afectados.

Este trabajo ha consistido en el análisis fitopatológico del sistema radical de encinas con síntomas de decaimiento, para determinar si sus raíces están infectadas por oomicetos fitopatógenos. Para ello, se realizaron aislamientos de muestras de raíces y suelo del entorno de la rizosfera de estos árboles para confirmar la presencia de oomicetos como factor contribuyente al decaimiento. Debido a la dificultad existente de aislar *Phytophthora* a partir de raíces, se emplearon también diferentes materiales vegetales como trampa (manzana, hojas de distintas especies y pétalos de clavel). De hecho, este último método de aislamiento aplicado ha proporcionado el 77% de los oomicetos obtenidos.

Según Jung (2011), las raíces que están infectadas por *Phytophthora* son invadidas posteriormente por otros patógenos oportunistas. En el suelo donde se encuentran estas raíces afectadas quedan estructuras de supervivencia de estos oomicetos fitopatógenos y, por este motivo, también se realizan aislamientos con muestras de suelo usando trampas vegetales. Estos cebos inducen la germinación de las estructuras de supervivencia de *Phytophthora* y *Pythium* y la colonización de estos tejidos, permitiendo así incrementar el éxito de aislamiento de estos microorganismos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los de otros autores: se logra mayor frecuencia de aislamiento de oomicetos cuando se utilizan muestras de suelo respecto a las muestras de raíces, aunque éstas también deben ser siempre analizadas (Jung, 2011). Concretamente, el cebo

vegetal que ha ofrecido mejores resultados de aislamiento son los pétalos inmaduros de clavel, proporcionando el 48% de los oomicetos.

La mayoría de oomicetos aislados son del género *Pythium*, a excepción de cuatro aislados de *P. psychrophila*. *Pythium* es un género cuyos aislados son fáciles de identificar a ese nivel, pero que ofrece gran dificultad a nivel de especie. Actualmente, la taxonomía de este género está en revisión y diversas especies se han descrito o revisado su posición taxonómica en los últimos años. Por ello, los datos que se obtienen en la base de datos del GenBank pueden presentar discrepancias con la información publicada acerca de las especies, dificultando la identificación exacta de los aislados.

Las especies de *Pythium* que se conoce que causan daños en la encina, mediante la infección de sus raíces, son *Py. spiculum* y *Py. sterilum* (Romero *et al.*, 2007). Según estos autores, *Py. spiculum* es un patógeno agresivo de raíces que produce severos síntomas. Este nuevo patógeno podría jugar un papel importante como factor del decaimiento de encinares en el suroeste de la Península Ibérica. *Py. sterilum*, también es un patógeno de las raíces del género *Quercus* en el centro de España. Estas especies, más que un factor activo del decaimiento, podrían ser consideradas como un peligro potencial para los bosques del género *Quercus* (Romero *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguna de estas dos especies ha sido aislada en el presente trabajo. Por ello, se realizó una búsqueda bibliográfica de las especies de *Pythium* que se han identificado en este caso de diagnóstico.

Según la clasificación basada en análisis filogenéticos, el género *Pythium* se clasifica en once clados (Lévesque y De Cock, 2004). Entre las especies que se han aislado en nuestro estudio, se encuentran: *Py. heterothallicum* que pertenece al Clado I y está muy relacionado con *Py. glomeratum*, aunque son especies diferentes. Este último fue aislado a partir de muestras de suelo tomadas en el norte de Francia de 1992 y se identificó erróneamente por el autor (Paul, 2003) como *Py. heterothallicum* durante mucho tiempo. Ambas especies mostraron respuestas patogénicas diferentes en la germinación de semillas y en las plántulas de *Pinus halepensis*; *Py. rostratiformis* se ha aislado principalmente de suelo, de hojarasca y también de raíces de *Triticum* y *Medicago sativa*. Recalcar que esta especie se aisló de hojarasca de *Quercus* en Canadá por Lévesque y De Cock (2004). Sin embargo, no se ha encontrado información relativa a su patogenicidad. Todos los aislamientos de *Py. rostratiformis* se identificaron inicialmente como *Py. rostratum* al ser filogenéticamente y morfológicamente similares; *Py. cederbergense* del Clado G, sólo se conoce su asociación con una planta, rooibos (*Aspalathus linearis*) y aunque se hicieron ensayos de patogenicidad en esta misma especie vegetal, dio negativo en el ensayo (Bahramisharif *et al.*, 2013); *Py. vanterpoolii* se incluye en el Clado B1e, donde la mayoría son aislados obtenidos de gramíneas, predominantemente trigo y avena.

De las especies de *Pythium* que se han aislado en este trabajo, o bien se desconoce su patogenicidad o lo son de otras especies vegetales no forestales. La mayor parte de la información que se ha encontrado ha sido sobre la morfología de los aislados (aspecto del micelio, morfología de las estructuras de reproducción asexual y sexual), pero muy poca información en relación a su patogenicidad y nada relativo a la interacción con *Q. ilex*. De hecho, existen escasos estudios realizados en ecosistemas forestales sobre la influencia patogénica del género *Pythium*, lo que genera una mayor dificultad para identificar correctamente las especies.

Económicamente, en cultivos de interés agrícola, las especies de *Pythium* no son especialmente importantes como patógenos de plantas ya desarrolladas. Generalmente, en las plantas cultivadas los daños más graves ocurren en las fases de pre- y post-emergencia de las semillas y primeras etapas de crecimiento, infectando tejidos juveniles que provocan la podredumbre de raíces y cuello de la planta (Hendrix y Campbell, 1973). Sin embargo, estos mismos autores ya sugirieron que muchas especies de *Pythium* son potenciales patógenos de plantas, por lo que se debería prestar más atención para detectar enfermedades de plantas asociadas a *Pythium*.

Cabe decir que la relación de *Pythium* y *Phytophthora* con el medio natural está establecida desde hace mucho tiempo, existiendo una coevolución entre las especies de estos oomicetos y las especies vegetales en sus hábitats naturales. Sin embargo, según Stenlid *et al.* (2011), las estrategias de especies foráneas de oomicetos, introducidas en nuevos hábitats, pueden ser diferentes a las de aquellas asociadas a la vegetación autóctona. Las especies introducidas son más agresivas en la colonización de plantas susceptibles y más eficientes en la competencia por los recursos, alterando el equilibrio del ecosistema forestal.

Por otro lado, algunas especies de *Pythium* pueden ofrecer beneficios potenciales como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos que habitan en el suelo (Gerbore *et al.*, 2014) y de mosquitos (Su, 2006), así como una fuente de productos químicos útiles en la medicina y en la industria (Stredansky *et al.*, 2000).

Puesto que se desconoce si las especies de *Pythium* aisladas en este trabajo causan enfermedad en encina, habría que realizar bioensayos/tests de patogenicidad en plantas de *Q. ilex*, bajo condiciones controladas, y confirmar los postulados de Koch para tener evidencias de su carácter fitopatógeno en esta frondosa. Aunque, en caso de confirmarse su patogenicidad, hay que tener en cuenta que los resultados de la interacción oomiceto/planta pueden ser distintos según la edad de la planta inoculada. Muchas especies vegetales son susceptibles a la infección por *Pythium* spp. sólo en las primeras etapas de su vida. Además, los efectos de esta interacción biológica puede que no sean inmediatos, sino que determinadas clases de tamaño puedan ser en el futuro más vulnerables al estrés ambiental.

Por otra parte, podría ser que los oomicetos patógenos estén presentes pero no estén actuando, que no se manifiesten debilitando a la encina, debido a que las condiciones climáticas no hayan sido las adecuadas como, por ejemplo, lluvias torrenciales en época estival que estimulan el desarrollo de los oomicetos al proporcionarles las condiciones de temperatura y agua adecuadas. También podría ser que la cantidad de inóculo no haya sido suficiente para potenciar el desarrollo de dichos patógenos o que su presencia haya sido enmascarada por otras especies oportunistas.

En relación a *Phytophthora*, las especies fitopatógenas que causan daños en especies esclerófilas del género *Quercus* son: *Phytophthora cinnamomi*, el patógeno más agresivo de encina y alcornoque, causando la podredumbre de la raíz (Sánchez *et al.*, 2002b); *Phytophthora cryptogea* (Sánchez *et al.*, 2005); *Phytophthora drechsleri* (Sánchez *et al.*, 2005); *Phytophthora gonapodyides* (Corcobado *et al.*, 2010); *Phytophthora megasperma* (Pérez-Sierra *et al.*, 2013); *P. quercina* (Pérez-Sierra *et al.*, 2013); *P. psychrophila* (Pérez-Sierra *et al.*, 2013).

En este trabajo, únicamente se ha detectado *Phytophthora* en el PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi). Se han obtenido cuatro aislados de *P. psychrophila*, corroborando estudios previos realizados en este mismo encinar (Pérez-Sierra *et al.*, 2013). Estos autores aislaron varias especies de *Phytophthora* de raíces de encina y quejigo, demostrándose su patogenicidad mediante inoculación de plantas jóvenes de *Q. ilex* y *Q. faginea*. Según Jung *et al.* (2012), este patógeno también es capaz de producir lesiones necróticas en la corteza de raíces primarias suberizadas de plantas jóvenes de *Q. robur*.

En dicho Parque Natural no existe, hoy en día, regeneración evidente de *Q. ilex*. Por tanto, las especies de *Phytophthora* detectadas, entre ellas *P. psychrophila*, podrían estar ejerciendo un efecto negativo sobre la regeneración natural del encinar, reduciendo el establecimiento de nuevas plantas, ya que son capaces de infectar desde el momento de la germinación de las bellotas si se dan las condiciones ambientales adecuadas. Por tanto, en el PN Carrascar de la Font Roja sí hay evidencias de la presencia de un agente biológico que actúa como factor contribuyente al decaimiento y muerte de las encinas.

Como ya se ha indicado en la Introducción (apartado I.3.7), se reconocen tres tipos de factores involucrados en el decaimiento o “Seca” de la encina y alcornoque: i) factores que predisponen de tipo selvícola; ii) factores incitantes relacionados con variaciones climáticas, en particular periodos prolongados de sequía y aumento de la temperatura; iii) factores contribuyentes de tipo biótico, enfermedades y plagas de insectos, que intervienen en las últimas fases del decaimiento provocando la muerte de los árboles.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, y teniendo en cuenta los datos de precipitación de los últimos 10-15 años, se considera que la sequía pudiera ser la causa principal del debilitamiento de las encinas analizadas de Alcublas y Pina de Montalgrao, así como un factor incitante en el decaimiento de las encinas muestreadas en el PN Carrascar de la Font Roja.

Los tres municipios están influenciados por el clima mediterráneo: periodos de sequía prolongada que conlleva estrés hídrico y debilitamiento de la planta, y eventos de lluvias torrenciales, que ofrecen las condiciones ambientales adecuadas para que rápidamente se produzca la infección masiva de raíces si en el suelo están presentes estructuras de supervivencia de *Phytophthora* spp. y/o *Pythium* spp. fitopatógenas. El cambio climático actúa como agente primario en la muerte del arbolado asociado principalmente a severas sequías. Concretamente, en la región mediterránea se ha detectado un aumento de las temperaturas y de la evotranspiración, así como una ligera disminución de las precipitaciones (Piervitali *et al.*, 1997). Este aumento de las temperaturas y la alteración de los periodos de lluvia podrían estar proporcionando las condiciones adecuadas para un aumento de la incidencia de enfermedades asociadas a agentes biológicos (Garbelotto y Pautasso, 2011).

Los modelos climáticos señalan la tendencia a un aumento de la aridez, así como de la frecuencia e incidencia de severas sequías (Osborne *et al.*, 2000; IPCC, 2001). En la Península Ibérica, las sequías de finales del S. XX, situadas en un período climáticamente muy variable, afectaron negativamente a muchas especies leñosas en lo que vino a llamarse la “seca”. De hecho, desde entonces el número de encinas y alcornoques dañados va en aumento (Manrique y Fernández - Cancio, 2000).

Aparte del estrés hídrico, el sustrato también puede ser un factor de predisposición en el decaimiento forestal. El tipo de suelo, que sea calizo o silíceo, influye en la instalación del agente

patógeno más virulento de la encina, *P. cinnamomi*. Este patógeno no tolera sustratos calizos por lo que de las tres zonas muestreadas, únicamente podría encontrarse en el encinar de Sierra Espina (Pina de Montalgrao) cuyo suelo en algunas zonas es de naturaleza silíceo. Sin embargo, otras especies de *Phytophthora* poseen rangos de tolerancia mucho más amplios en cuanto al tipo de sustrato. Otro aspecto a considerar es la profundidad del sustrato. En ciertas zonas, las encinas presentan menor profundidad de raíces, sufriendo más los efectos de sequías prolongadas.

Así pues, las precipitaciones límites que han tenido lugar en estos tres municipios (Alcoi, Alcuablas y Pina de Montalgrao) en el período analizado, podrían haber provocado ciertos daños en el sistema radical de encinas, manifestándose los síntomas en la copa de los árboles. Estos síntomas de decaimiento pueden ocurrir en la planta, según la interacción de múltiples factores, de manera progresiva y lenta o de manera súbita, colapsándose el árbol.

Por tanto, el diagnóstico de las encinas analizadas en este trabajo concluye que los daños observados en las muestras de Alcuablas y Pina de Montalgrao se asocian básicamente a efectos de la sequía. En cambio, en las muestras del PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi), la podredumbre radical debida a *P. psychrophila* es un factor contribuyente, y muy posiblemente causa primaria, del decaimiento de las encinas muestreadas. Por otro lado, no se ha detectado ninguna enfermedad fúngica que afecte a las raíces de encina adultas. El género *Cylindrocarpon* es el único que infecta a las raíces de encina en vivero, pero no se ha aislado en este trabajo.

En definitiva, según Camarero *et al.* (2004), el único consenso alcanzado sobre el decaimiento del bosque y la salud de los árboles es que ambos tipos de factores causantes, climáticos o patógenos, participan de forma decisiva según el tipo de monte y su medio (localidad, clima, suelo, historia de uso).

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES**

---

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- Los síntomas aéreos observados en encinas del PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi) y Sierra Espina (Pina de Montalgrao) consistían en ramillas secas, muerte de ramas, defoliación y marchitez, característicos de un decaimiento progresivo. Los síntomas subterráneos observados fueron pérdida de raicillas absorbentes, necrosis y pequeños chancros en raíces leñosas. Por el contrario, las encinas analizadas procedentes de Alcublas sufrieron una marchitez repentina, sin defoliación aparente.
- De muestras de raíces de doce encinas con síntomas y muestras de suelo del entorno de la rizosfera de estos árboles se aislaron 84 oomicetos, la mayoría del género *Pythium*, excepto cuatro aislados de *Phytophthora psychrophila*.
- La identificación molecular de los oomicetos, basada en la secuencia de la región ITS del ADN ribosómico, indicó que *Pythium heterothallicum* / *Pythium glomeratum* fueron los más frecuentes. En Sierra Espina y en el PN Carrascar de la Font Roja los oomicetos con mayor incidencia en raíces han sido *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum*, siendo en el bosque de Los Molinos *Pythium vanterpoolii*. De las muestras de suelo procedentes del PN Carrascar de la Font Roja y del bosque de Los Molinos los oomicetos más frecuentes fueron *Py. heterothallicum* / *Py. glomeratum* y en Sierra Espina han sido *Py. cederbergense* / *Pythium* sp.
- El 23% de la colección de oomicetos se ha obtenido mediante el método directo de aislamiento a partir de raíces de árboles sintomáticos.
- De los cebos vegetales empleados, el más eficaz para el aislamiento de oomicetos han sido los pétalos de *Dianthus* sp., proporcionando el 48% de los aislados, seguido de las hojas de *Quercus robur* (21%), hojas de *Viburnum tinus* (17%) y manzanas (14%).
- Los daños observados en las encinas de Alcublas y Pina de Montalgrao, analizadas en este trabajo, se asocian básicamente a efectos de la sequía. En cambio, en las muestras del PN Carrascar de la Font Roja (Alcoi), la podredumbre radical debida a *Phytophthora psychrophila* es un factor contribuyente, y muy probablemente causa primaria, del decaimiento de las encinas muestreadas.
- No se ha aislado ningún hongo fitopatógeno de las raíces de las encinas que pudiera ser considerado causa primaria del decaimiento observado.

## **CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA**

**CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA**

AGRIOS G.N. 1997. Plant Pathology. Academic Press, London. 635 pp.

ALANIZ S., ARMENGOL J., GARCÍA-JIMÉNEZ J., ABAD-CAMPOS P., LEÓN M. 2009. A multiplex PCR system for the specific detection of *Cylindrocarpon lirodendri*, *C. macrodidymum*, and *C. pauciseptatum* from grapevine. Plant Dis. 93(8): 821-825.

ÁLVAREZ L.A., GRAMAJE D., ABAD-CAMPOS P., GARCÍA-JIMÉNEZ J. 2008. Role of the *Helix aspersa* snail as a vector of *Phytophthora citrophthora* causing branch cankers on Clementine trees in Spain. Plant Pathol. 58: 956-963.

BAHRAMISHARIF A., LAMPRECHT S.C., SPIES C.F.J., BOTHA W.J., MCLEOD A. 2013. *Pythium cederbergense* sp. nov. and related taxa from *Pythium* clade G associated with the South African indigenous plant *Aspalathus linearis* (rooibos). Mycologia 109 (5): 1174-1189.

BARNETT H.L., HUNTER B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. 218p.

BARTNICKI-GARCIA S., WANG M.C. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. Pp 121-137. En *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D.C Erwin, S. Bartnicki-García and P.H.Tsao, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

BELBAHRI L., CALMIN G., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ E., OSZAKO T., LEFORT F. 2006. *Pythium sterilum* sp. nov. isolated from Poland, Spain and France, its morphology and molecular phylogenetic position. FEMS Microbiol. Lett. 255: 209-14.

BIOSCA E.G., GONZÁLEZ R., LÓPEZ-LÓPEZ M.J., SORIA S., MONTON C., PÉREZ-LAORGA E., LÓPEZ M.M. 2003. Isolation and characterization of *Brenneria quercina*, causal agent for bark canker and drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. Phytopathology 35: 485-492.

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. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. Plant Pathol. 57 (5): 792-808.

BRASIER C.M. 2009. *Phytophthora* biodiversity: how many *Phytophthora* species are there? En: *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*, Proceedings of the Fourth Meeting of the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). Goheen EM, Frankel SJ (eds). USDA Forest Service, Albany, pp 101-115.

BRASIER C.M., SCOTT J.K. 1994. European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. EPPO Bulletin 24: 221-232.

BRASIER C.M., ROBREDO F., FERRAZ J.F.P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. Plant Pathol. 42: 140-145.

- CAMARERO J.J., LLORET F., CORCUERA L., PEÑUELAS J., GIL-PELEGRÍN E. 2004. Cambio global y decaimiento del bosque. En: *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. F. Valladares (ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid. Pp. 397-423.
- CARRASCO A., FERNÁNDEZ A., TRAPERO A., LÓPEZ G., SÁNCHEZ I., RUIZ J.M., JIMÉNEZ J.J., DOMÍNGUEZ L., ROMERO M.A., CARBONERO M.D., SÁNCHEZ M.E., CAETANO P., GIL P., FERNÁNDEZ P., NAVARRO R.M., SÁNCHEZ R., RAPOSO R., RODRÍGUEZ S., 2009. Procesos de decaimiento forestal (la seca). Situación del conocimiento. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Córdoba, 110 pp.
- CAVALIER-SMITH T. 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14 (3-4): 461-81.
- COBOS J.M., MONTOYA R., TUSET J.J. 1993. New damage to the *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the posible implicaton of *Phytophthora cinnamomi*. Proc. Int. Congress "Recent Advances in Studies on Oak Decline".
- COOKE D.E.L., DRENTH A., DUNCAN J.M., WAGELS G., BRASIER C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Gen. Biol.* 30: 17-32.
- CORCOBADO T., CUBERA E., PÉREZ-SIERRA A., JUNG T., SOLLA A. 2010. First report of *Phytophthora gonapodyides* involved in the decline of *Quercus ilex* in xeric conditions in Spain. *New Dis. Report* 22: 33.
- DICK M.W. 1995. Sexual Reproduction in the Peronosporomycetes (Chromistan fungi). *Canadian Journal of Botany* 73. Suppl. 1: 5712-5724.
- EL-HAMALAWI Z.A., MENGE, J.A. 1996. The role of snails and ants in transmitting the avocado stem canker pathogen, *Phytophthora citricola*. Department of Plan Pathology, University of California, Riverside. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 973–977.
- ERWIN D.C, RIBEIRO O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society Press. St Paul, Minnesota. USA. 562 pp.
- FERNÁNDEZ REBOLLO P., CARBONERO M.D., BLÁZQUEZ A., 2008. La dehesa en el Norte de Córdoba. Perspectivas futuras para su conservación. Servicios de Publicaciones Universidad de Córdoba. Pp 443.
- FORTEZA J., RUBIO J.L., GIMENO E. (coords.) 1995. Catálogo de suelos de la Comunidad Valenciana. Valencia: Generalitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació.
- GARBELOTTO M., PAUTASSO M. 2012. Impacts of exotic forest pathogens on Mediterranean ecosystems: four case studies. *Eur. J. Pl. Pathol.* 133: 101-116.
- GERBORE J., BENHAMOU N., VALLANCE J., LE FLOCH G., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C., REY P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (7): 4847-4860.
- GOHEEN E.M., KUBISIA T.L., ZHAO W.X. 2006: The search for the origin of *Phytophthora ramorum*: a first look in Yunnan Province, People's Republic of China. Proceedings of the Sudden oak Death

- Second Science Symposium: The State of our Knowledge. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-196. Ed. By Frankel, S. J.; Shea, P. J.; Haverty, M. I., tech. coords. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, pp. 113-115.
- GOODWIN S.B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87 (4): 462-473.
- HENDRIX F.F.Jr., CAMPBELL W.A. 1969. Heterothallism in *Pythium catenulatum*. *Mycologia* 61: 639-641.
- HENDRIX F.F.Jr., CAMPBELL W.A. 1973. Pythiums as plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 11: 77-98.
- HUNTER J.E., BUDDENHAGEN I.W. 1969. Field Biology and control of *Phytophthora parasitica* on papaya (*Carica papaya*) in Hawaii. *Ann. Appl. Biol.* 63: 53-60.
- IPCC. 2001. Climate change 2001: the scientific basis. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- JEFFERS S.N., MARTIN S.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70: 1038-1043.
- JUNG T. 2011. Recognition of disease symptoms, isolation and identification of *Phytophthora* species. Training course, University of Algarve.
- JUNG T., BLASCHKE M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathol.* 53: 197-208.
- JUNG T., HANSEN E.M, WINTON L., OSWALD W., DELATOUR C. 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycol. Res.* 106 (4): 397-411.
- JUNG T., ORLIKOWSKI L., HENRICOT B., ABAD-CAMPOS P., ADAY A.G., AGUÍN CASAL O., BAKONYI J., CACCIOLA S.O., CECH T., CORCOBADO T., CRAVADOR A., DENTON G., DIAMANDIS S. *et al.*, 2012. Ubiquitous *Phytophthora* infestations of forest, horticultural and ornamental nurseries and plantings demonstrate major failure of plant biosecurity in Europe. 6<sup>th</sup> IUFRO Working Party 7.02.09 “*Phytophthora* in Forests and Natural Ecosystems” 9<sup>th</sup> – 14<sup>th</sup> Septiembre 2012. Córdoba, Spain.
- KAGEYAMA K. 2014. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 314-326.
- KONAM J.K., GUEST D. I. 2004. Role of flying beetles (Coleoptera: Scolytidae and Nitidulidae) in the spread of *Phytophthora* pod rot of cocoa in Papua New Guinea. *Aust. Plant Pathol.* 33: 55-59.
- LANGE L., OLSON L. 1983. The biological significance of the fungal zoospore. En: Buczacki, S. T. 1983. Zoosporic plant pathogens, a modern perspective. Ed. Academic Press. E.U.A. 28-42.
- LÉVESQUE C.A., DE COCK A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycol. Res.* 108 (12): 1363-1383.

- LUQUE J, PARLADÉ J., PERA J. 2002. Seasonal changes in susceptibility of *Quercus suber* to *Botryosphaeria stevensii* and *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathol. 51 (3): 338-345.
- MANION P. 1991. Decline diseases of complex biotic and abiotic origin. En: *Tree Diseases Concepts*, 2nd. Ed. By Manion, P. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, pp. 328-349.
- MANRIQUE E., FERNÁNDEZ-CANCIO A. 2000. Extreme climatic events in dendroclimatic reconstructions from Spain. Climatic Change 44: 123-138.
- MORCILLO M., MORENO B., PULIDO E., SÁNCHEZ M. 2007. Manual de Truficultura Andaluza. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla.
- NAVARRO R.M., ARIZA D., PORRAS C., JORGE I., JORRÍN J. 2009. Evaluación de la resistencia aparente de individuos de encina a *Phytophthora cinnamomi*. Bol. San. Veg. Plagas 35: 89-98.
- NAVARRO 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. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 32 pp.
- NAVARRO 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. Bol. San. Veg. Plagas 32: 685-694.
- OSBORNE C.P., MITCHELL P.L., SHEEHY J.E., WOODWARD F.I. 2000. Modelling the recent historical impacts of atmospheric CO<sub>2</sub> and climate change on Mediterranean vegetation. Global Change Biology 6: 445-458.
- Plan de Acción Territorial Forestal de la Comunitat Valenciana (PATFOR). Las formaciones forestales y su función. 2012. Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana.
- PAUL B. 2003. *Pythium glomeratum*, a new species isolated from agricultural soil taken in north-eastern France, its ITS region and its comparison with related species. FEMS Microbiol. Lett. 225 (1): 47-52.
- PEÑUELAS J.L., OCAÑA L. 1996. Cultivo de plantas forestales en contenedor. MAPA. Mundi-Prensa, Madrid.
- PÉREZ-SIERRA A., LÓPEZ-GARCÍA M.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 Pathol. 43 (4): 331-339.
- PETKOWSKI J., BOER R., NORNG S., THOMSON F., MINCHINTON E. 2013. *Pythium* species associated with root rot complex in winter-grown parsnip and parsley crops in south eastern Australia. Austral. Plant Pathol. 42 (4): 403-411.
- PIERVITALI E., COLACINO M., CONTE M. 1997. Signals of climatic change in the Central-Western Mediterranean Basin. Theor. Appl. Climatol. 58: 211-219.

- RIVAS MARTÍNEZ S. 1987. Memoria del mapa de series de vegetación de España 1: 400.000. 268 pp. ICONA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- RODRÍGUEZ-MOLINA M.C., TORRES-VILA L.M., BLANCO A., PALO E.J., TORRES-ÁLVAREZ E. 2002. Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. Forest Pathol. 32: 365-372.
- ROMERALO C. 2008. La seca: decaimiento y muerte del género *Quercus* en la Comunidad de Castilla La Mancha. Serie técnica: La salud de los bosques 1, 20 pp.
- ROMERO MARTÍN M.A., 2012. Etiología, epidemiología y control del chancro de los *Quercus* causado por *Botryosphaeria* spp. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- ROMERO M.A., SÁNCHEZ J.E., JIMÉNEZ J.J., BELBAHRI L., TRAPERO A., LEFORT F., SÁNCHEZ M.E. 2007. New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in South-West Spain and Portugal. J. Phytopathol. 155: 289-295.
- RUIZ DE LA TORRE J.L. 2001. Árboles y arbustos de la España peninsular. Fundación Conde del Valle de Salazar, Madrid.
- RUIZ DE LA TORRE J.L. 2006. Flora Mayor. Ministerio de Medio Ambiente. Parques Nacionales, Madrid.
- SÁNCHEZ J.E., SÁNCHEZ M.E. y TRAPERO A. 2002a. Enfermedades del castaño en Andalucía. XI Congreso de la Sociedad española de Fitopatología. Almería, pag. 136.
- SÁNCHEZ M.E., ANDICOBERRY S., TRAPERO A. 2005. Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. Forest Pathol. 35: 115-125.
- SÁNCHEZ M.E., CAETANO P., FERRAZ J., TRAPERO, A. 2002b. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. Forest Pathol. 32: 5-1.
- SÁNCHEZ M.E., CAETANO P., ROMERO M.A., NAVARRO R.M., TRAPERO A. 2006. *Phytophthora* root rot as the main factor of oak decline in southern Spain. En: *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees. Forest Research*, Farnham. pp. 149-154
- SÁNCHEZ M.E., SÁNCHEZ J.E., NAVARRO R.M., FERNÁNDEZ P., TRAPERO A. 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. Bol. San. Veg. Plagas 29: 87-108.
- SÁNCHEZ M.E., ROMERO M.A., VARO R., ANDICOBERRY S., LORA F., TRAPERO A., 2010. Principales enfermedades detectadas en viveros forestales de Andalucía. Vida Rural 311: 39-43.
- SANSOME E. 1965. Meiosis in diploid and polyploidy sex organs of *Phytophthora* and *Achlya*. Cytologia 30: 103-117.
- SARDINERO S., FERNÁNDEZ A., PEREIRA I., MANRIQUE E. 2000. Oak decline and vegetation dynamics in southwestern Spain, 6 pp. INIA Report. Proyect No. 1FD97-0911-C3-1, Causas del decaimiento y Seca de las masas de *Quercus* mediterráneas. Técnicas de amortiguamiento. INIA, Madrid.

- SERRANO M.S., DE VITA P., CALLIER P., SÁNCHEZ M. E., TRAPERO A., FERNÁNDEZ-REBOLLO P. 2010. Influencia de la nutrición cálcica y potásica en la susceptibilidad de la encina a *Phytophthora cinnamomi*. XV Congreso Nacional de la SEF. Vitoria.
- SOLLA A., GARCÍA L., PÉREZ A., CORDERO A., CUBERA E., MORENO G. 2009. Evaluating potassium phosphonate injections for the control of *Quercus ilex* decline in SW Spain: implications of low soil contamination by *Phytophthora cinnamomi* and low soil water content on the effectiveness of treatments. *Phytoparasítica* 37: 303-316.
- STENLID J., OLIVA J., BOBERG J.B., HOPKINS A.J. 2011. Emerging diseases in European forest ecosystems and responses in society. *Forests* 2: 486-504.
- STREDANSKY M., CONTI E., SALARIS A. 2000. Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium ultimum* in solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology* 26(2-4): 304-307.
- SU X., 2006. A new species of *Pythium* isolated from mosquito larvae and its ITS region of rDNA. *Mycosystema* 25: 523-528.
- TUSET J.J., HINAREJOS C., MIRA J.L., COBOS J.M. 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la "seca" de encinas y alcornoque. *Bol. San. Veg. Plagas* 22: 491-499.
- VAN DER PLAÄTS-NITERINK A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 21: 1-242.
- VICENTE M., SÁNCHEZ M.E., FERNÁNDEZ P., TRAPERO A. 2009. Evaluation of biofumigant plants and organic amendments for supresiveness of root rot of *Quercus* spp. caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 99: S134-135.
- WESTE G.M., TAYLOR P. 1971. The invasion of native forest by *Phytophthora cinnamomi*. I. Brisbane Ranges, Victoria. *Aust. J. Bot.* 19, 281-294.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. Pp 315-322 En: *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications*. Innis M.A., Gelfan D.H., Sninsky J.J., White T.J. Eds. Academic Prss. San Diego. California. 482 pp.
- WORKNEH F., YANG X.B., TYLKA G.L. 1998. Effect of tillage practices on vertical distribution of *Phytophthora sojae*. *Plant Dis.* 82: 1258-1263.
- ZENTMYER G.A., MITCHELL D.J., 1986. *Phytophthora* Diseases of fruit trees in the Tropics. *Rev. Tropical Plant Pathol.* 2: 287-309.

**Webs consultadas:**

Círculo Industrial de Alcoi: <http://www.circuloindustrial.es/pluviometria.asp>

Consellería de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente (CITMA):  
<http://www.redalquila.gva.es/en/web/medio-natural/seca-de-quercineas>.

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

Phytophthora database.org © 2006-2015 Cyber-infrastructure for Phytophthora Seogchan Kang:  
<http://phytophthoradb.org>

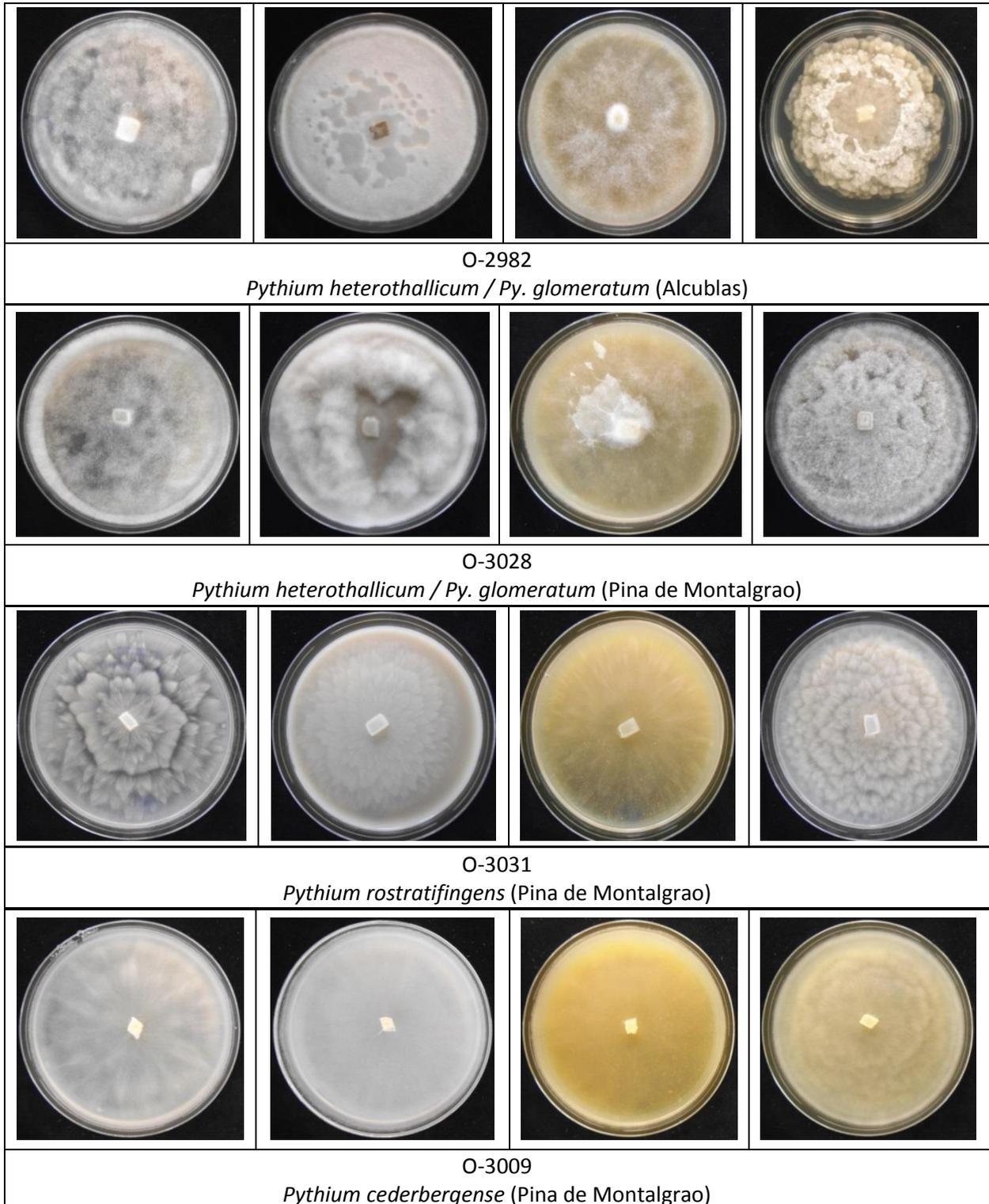
Sistema de Información Agroclimática para el Regadío (SIAR):  
<http://portal.magrama.gob.es/websiar/SeleccionParametrosMap.aspx?dst=1>

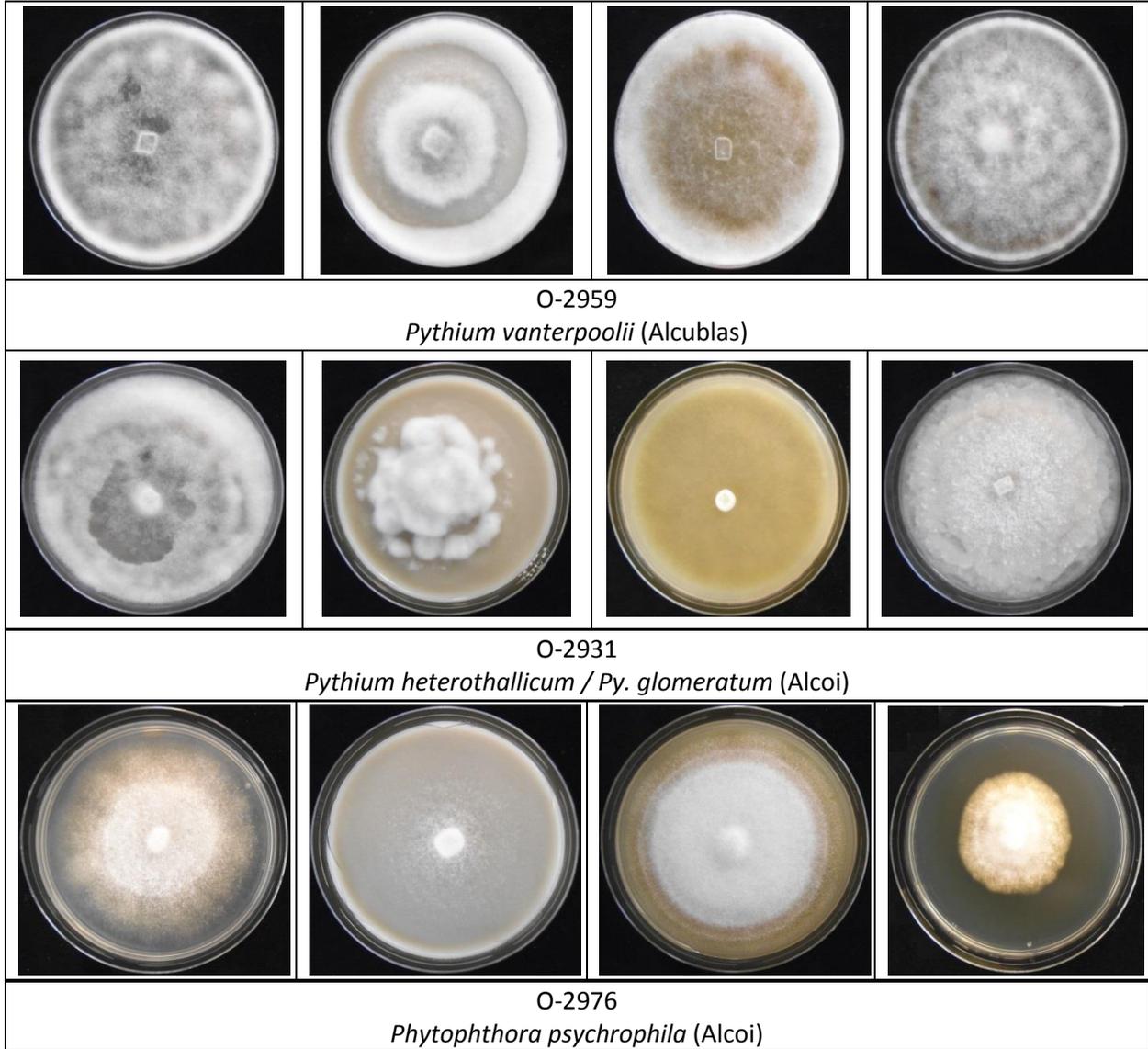
## **CAPÍTULO VII: ANEJOS**

---

**ANEJO I: MORFOLOGÍA DE LA COLONIA DE OOMICETOS  
CRECIDOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.**

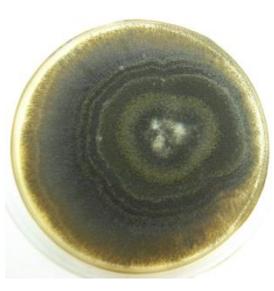
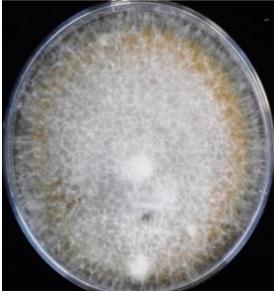
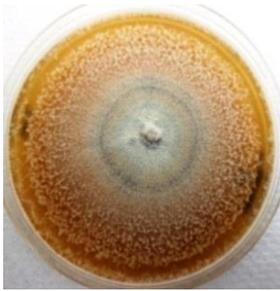
Morfología de la colonia de oomicetos crecidos en diferentes medios de cultivo (De izquierda a derecha MEA, OA, V8 y PDA).





**ANEJO II: MORFOLOGÍA DE LA COLONIA DE  
AISLADOS FÚNGICOS CULTIVADOS EN MEDIO PDA.**

**Morfología de la colonia de aislados fúngicos cultivados en medio PDA.**

			
<i>Alternaria</i> sp. (Pina de Montalgrao)	<i>Gliocladium</i> sp. (Pina de Montalgrao)	<i>Colletotrichum</i> sp. (Pina de Montalgrao)	<i>Fusarium</i> sp. (Pina de Montalgrao)
			
<i>Fusarium</i> sp. (Alcublas)	<i>Fusarium</i> sp. (Alcoi)	<i>Fusarium solani</i> (Alcublas)	