

Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Agroforestales



Universidad
de Huelva

**Selección de progenies de encina (*Quercus ilex* L. spp *ballota*) y
alcornoque (*Quercus suber* L) tolerantes al patógeno
Phytophthora cinnamomi Rands**

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

Isabel María León Sánchez

Fecha de lectura: 25 de enero de 2013

Bajo la dirección del doctor:

Raúl Tapias Martín

Huelva, 2013

ISBN: 978-84-15633-76-1

D.L.: H 54-2013

SELECCIÓN DE PROGENIES DE ENCINA
(Quercus ilex L. spp ballota)
Y ALCORNOQUE (*Quercus suber L.*)
TOLERANTES AL PATÓGENO
Phytophthora cinnamomi Rands



Memoria presentada por Isabel María León Sánchez,
Licenciada en Ciencias Ambientales,
para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Huelva.

Doctorando: Isabel María León Sánchez.

Director: Raúl Tapias Martín.

Universidad de Huelva
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Dpto. Ciencia Agroforestales
Programa de doctorado Gestión y Salud Ambiental



Universidad
de Huelva

SELECCIÓN DE PROGENIES DE ENCINA (*Quercus ilex* L. spp *ballota*) Y ALCORNOQUE (*Quercus suber* L.) TOLERANTES AL PATÓGENO *Phytophthora cinnamomi* Rands

Memoria presentada por Isabel María León Sánchez, Licenciada en Ciencias Ambientales, para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Huelva.

Doctorando: Isabel María León Sánchez.

Director: Raúl Tapias Martín.

*¡Encinares castellanos
en laderas y altozanos,
serrijones y colinas
llenos de oscura maleza,
encinas, pardas encinas;
humildad y fortaleza!*

ANTONIO MACHADO (1875-1939).

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Inmaculada Pulido, impulsora de esta aventura su implicación y afán por enseñarme todo lo que sabe y por hacerme ver que no hay nada en la vida que no pueda conseguirse con esfuerzo y constancia.

Darles las gracias también a todos los profesores y profesoras del departamento de Ciencias Agroforestales de la Universidad de Huelva por su amabilidad y cooperación en especial a Manolo y Reyes, por brindarme la oportunidad de aprender de ellos y ayudarme en todo lo que he necesitado. A Don Diego Luis Orihuela, por asesorarme en los aspectos prácticos que día a día se plantean en la investigación, por darme otro punto de vista y por compartir conmigo su sabiduría. Y por supuesto a Raúl por hacerme crecer profesionalmente y por apoyarme en todo este tiempo.

De otro lado, a mis compañeros... Aquellos que día a día han sido participes de mi vida a lo largo de estos años. En primer lugar a Juanjo, compañero de proyecto, de fatigas, de risas, de lagrimas y de la vida durante estos años. Agradecerte tus consejos siempre buenos, tus críticas constructivas y tu apoyo incondicional ¡Gracias por todo compañero!

A Manuel, Andrés, Manoli y Esperanza, por su apoyo en todos los aspectos de mi vida gracias por hacer que los días nublados brillen. Gracias también a mis compis agrícolas Juan Carlos y Pablo por esas charlas interminables en el invernadero... A Eli mi compañera de invernadero, pero sobre todo de fatigas, confidencias y vivencias. Gracias amiga. A Dani por encauzarme en los inicios así como a Manuel Acevedo por ser mi guía. No puedo olvidarme de los PAS... Carmen, Corsi, Isidro y Juan, gracias por ayudarme en todo lo que necesitaba. A Chencho, Seba, Jacinta y Vicky por solucionar todos mis trámites que no han sido pocos... A los vigilantes de seguridad del campus en el que tantas horas he trabajado: Tello, Pepe, Miguel, Cristóbal y Fran por su ayuda y apoyo.

También agradecer a todos aquellos que han compartido conmigo bata y bisturí... en especial a Eva, Paco, Chani, Agustín y Javi. No puedo olvidarme de todos aquellos que formaron parte de esta aventura y ahora se encuentran a kilómetros de distancia... gracias Felipe, Yazmín, Raffaella, Emiliano y Fabio.

Agradecer a los alumnos de 2º del Grado Ingeniería Forestal y del Medio Natural, promoción 2010-1014, su paciencia en mis inicios en la docencia y su afán por aprender. Y como no a aquellos que han hecho que mi estancia en Faro haya sido inolvidable:

Marco, Paula, Professor Cravador y todos los que forman el grupo de investigación de la Universidad del Algarve ¡Muito obrigada!

La amistad es el ingrediente más importante en la receta de la vida. Gracias a Silvia por ayudarme a maquetar este trabajo por tu profesionalidad y por tu amistad. Gracias por formar parte de este ingrediente a “mis gayers” por vuestra confianza en mí y sobre todo a Eli que es la que día a día me ha acompañado en todos los momentos y sus consejos han servido para hacerme mejor persona, sabes que te adoro. Para rematar este ingrediente ya lo sabes mejor amigo del mundo, toda la vida juntos y lo que nos queda, la constancia es lo que ha hecho que este aquí, y de eso tú me has enseñado mucho. Te adoro Javi.

Gracias Kike por hacerme sonreír, por apoyarme en todas mis decisiones, por pensar siempre en lo mejor para mí, por estar en lo bueno y en lo malo, por soportar mis altibajos y sobre todo por confiar en mí.

He dejado el último párrafo de mis agradecimientos para mi FAMILIA y lo escribo en mayúsculas porque es de mayúsculas. En primer lugar agradecer a mis primos y tíos su comprensión y ánimo, gracias por esas reuniones interminables entre risas. A mis padres por educarme desde el optimismo, por inculcarme los valores de la perseverancia y el respeto y sobre todo por ser los mejores padres que un hijo puede desear. Y por último agradecer a mi hermano aquel que vino tras de mí, y que desde pequeño ha sido mi apoyo incondicional. Gracias Sore por estar siempre ahí en cada momento en cada situación por tu dedicación y apoyo... ¡Te quiero enano!

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	21
II. RESUMEN	25
III. ABSTRACT	29
1. INTRODUCCIÓN	33
1.1. El bosque mediterráneo y la dehesa.	35
1.2. La encina [<i>Quercus ilex</i> spp <i>ballota</i> (Desf.) Samp]	36
1.3. El Alcornoque [<i>Quercus suber</i> L.]	38
1.4. El decaimiento del bosque de <i>Quercus</i> . “La Seca”	39
1.4.1. Origen y distribución del decaimiento	39
1.4.2. Sintomatología de la enfermedad	41
1.4.3. Factor causal principal: <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	42
1.4.3.1. Origen y distribución	42
1.4.3.2. Ciclo biológico de la enfermedad	43
1.4.3.3. Proceso infectivo	44
1.4.3.4. Daños ocasionados y control.	45
1.5. Estudios de variabilidad genética.	46
1.5.1. Variabilidad genética en diferentes especies forestales como respuesta al ataque de <i>Phytophthora</i> spp.	48
2. OBJETIVOS	51
3. CAPÍTULO 1. Evaluación de la influencia de la dosis de inóculo, especie hospedadora y procedencia de las semillas en la infección de <i>Phytophthora cinnamomi</i> a <i>Quercus ilex</i> spp <i>ballota</i> y <i>Quercus suber</i>	55
3.1. INTRODUCCIÓN	57
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.2.1. <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	59
3.2.1.1. Origen	59
3.2.1.2. Cultivo de <i>P. cinnamomi</i>	59
3.2.1.3. Preparación del inóculo infectivo.	60
3.2.1.4. Dosis del inóculo infectivo.	61
3.2.1.5. Comprobación de la infección.	62
3.2.2. Material Vegetal	62
3.2.2.1. Especies objeto de estudio	62
3.2.2.2. Procedencia de las semillas	62
3.2.2.3. Recolección de semillas	64
3.2.2.4. Cultivo	64

3.2.2.5. Infección	65
3.2.2.6. Trasplante.	65
3.2.2.7. Evaluación de la regeneración de raíces	66
3.2.2.8. Evaluación de parámetros morfológicos aéreos.	68
3.2.2.9. Potencial hídrico al amanecer (Ψ)	69
3.2.3. Diseño de los experimentos	69
3.2.3.1. Efecto de la dosis sobre el grado de afección de <i>P. cinnamomi</i> en plantas de <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>	69
3.2.3.2. Diferenciación entre especies de <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i> y <i>Q. suber</i>	70
3.2.3.3. Influencia de la procedencia de plantas de <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i> y <i>Q. suber</i> en el desarrollo de la infección por el patógeno <i>P. cinnamomi</i>	70
3.2.4. Análisis estadístico	71
3.3. RESULTADOS	72
3.3.1. Comprobación de la infección	72
3.3.2. Efecto de la dosis de <i>P. cinnamomi</i> en plantas de <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>.	72
3.3.2.1. <i>Quercus ilex</i> spp <i>ballota</i>	72
3.3.2.2. <i>Quercus suber</i>	75
3.3.3. Diferenciación en el efecto de <i>P. cinnamomi</i> en base a la especie hospede- dadora: <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i> y <i>Q. suber</i>.	77
3.3.4. Influencia de la procedencia de plantas de <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i> y <i>Q. suber</i> en el desarrollo de la infección por el patógeno <i>P. cinnamomi</i>	79
3.3.4.1. <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i>	79
3.3.4.2. <i>Q. suber</i>	80
3.4. DISCUSIÓN	82
3.4.1. Sintomatología de la enfermedad	82
3.4.2. Efecto de la dosis	84
3.4.3. Diferencias entre especies.	85
3.4.3. Efectos del tiempo en la sintomatología de la enfermedad.	87
3.4.4. Diferencias entre procedencias	87
4. CAPÍTULO 2. Evaluación de la tolerancia/susceptibilidad de distintas pro- genies de <i>Quercus ilex</i> spp <i>ballota</i> y <i>Quercus suber</i> al patógeno <i>Phytophthora</i> <i>cinnamomi</i>.	89
4.1. INTRODUCCIÓN	91
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS	92
4.2.1.- Material vegetal	92
4.2.1.1.- Selección de progenies	92
4.2.1.2.- Siembra y plantación.	95
4.2.2. Inoculación y trasplante.	96

4.2.3. Evaluación de tolerancia/susceptibilidad de <i>Q. ilex</i>. spp <i>ballota</i> y <i>Q. suber</i>. a <i>P. cinnamomi</i>	97
4.2.3.1.- Comprobación de la infección	97
4.2.3.2. Evaluación de tolerancia/susceptibilidad de <i>Q. ilex</i> . spp <i>ballota</i> y <i>Q. suber</i> . a <i>P. cinnamomi</i> en el total de familias objeto de estudio	97
4.2.3.3. Evaluación de parámetros morfológicos en progenies seleccionadas de <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i>	98
4.2.4. Análisis estadístico	98
4.3. RESULTADOS	100
4.3.1. Comprobación de la infección	100
4.3.2. Variabilidad de la respuesta en progenies de <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i> y <i>Q. suber</i> afectados por el patógeno <i>P. cinnamomi</i>	100
4.3.2.1. <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i>	100
4.3.2.1.1. Efecto del tratamiento y la progenie	100
4.3.2.1.2. Relaciones entre variables de regeneración de raíz	102
4.3.2.1.3. Clasificación de las progenies según su tolerancia a <i>P. cinnamomi</i>	103
4.3.2.2. <i>Q. suber</i>	105
4.3.2.2.1. Efecto del tratamiento y la progenie	105
4.3.2.2.2. Relaciones entre variables de regeneración de raíz	107
4.3.2.2.3. Clasificación de las progenies según su tolerancia a <i>P. cinnamomi</i>	108
4.3.3. Evaluación de parámetros morfológicos en progenies seleccionadas de <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i>	109
4.4. DISCUSIÓN	111
4.4.1. Sintomatología de la enfermedad	111
4.4.2. Relación entre parámetros medidos	112
4.4.3. Diferencias entre progenies	112
4.4.4. Comparación entre progenies tolerantes y susceptibles	114
5. CAPÍTULO 3. Influencia de parámetros hídricos en la evaluación de la tolerancia/ susceptibilidad de plántulas de <i>Quercus ilex</i> spp <i>ballota</i> al patógeno <i>Phytophthora cinnamomi</i>	117
5.1. INTRODUCCIÓN	119
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS	120
5.2.1. Material vegetal e inóculo	120
5.2.2. Diseño experimental	120
5.2.3. Parámetros fisiológicos medidos	121
5.2.3.1. Potencial hídrico (Ψ)	121
5.2.3.2. Tasa de transpiración (E)	122
5.2.3.3. Transpiración cuticular (E_c)	123
5.2.3.4. Conductancia estomática (g_s)	124

5.2.4. Análisis de datos	125
5.3. RESULTADOS	127
5.3.1. Potencial hídrico (Ψ)	127
5.3.2. Ritmo de transpiración (E)	128
5.3.3. Transpiración cuticular (E_c)	133
5.3.4. Conductancia estomática (gs)	133
5.3.5. Relación entre parámetros fisiológicos y morfológicos.	136
5.4 DISCUSIÓN.	138
5.4.1. Sintomatología de la enfermedad	138
5.4.2. Diferencias entre familias seleccionadas	140
6. DISCUSIÓN GENERAL	143
7. CONCLUSIONES	149
8. CONCLUSIONS	153
9. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.	157
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1.1. Dehesa de explotación de ganado porcino situada en el término municipal de Cabezas Rubias (Huelva)	36
Figura 1.2. <i>Quercus ilex</i> spp <i>ballota</i> en el término municipal de la Puebla de Guzmán, comarca del Andévalo, provincia de (Huelva).	36
Figura 1.3. Distribución de <i>Q. ilex</i> spp. <i>ballota</i> en España.	37
Figura 1.4. <i>Quercus suber</i> en el término municipal de San Bartolomé de la Torre, comarca del Andévalo, provincia de (Huelva).	38
Figura 1.5. Distribución de <i>Q. suber</i> en España	39
Figura 1.6. Distribución de los focos de seca sobre masas de <i>Quercus</i> spp. en Andalucía.	41
Figura 1.7. <i>Quercus ilex</i> afectada por <i>P. cinnamomi</i>	42
Figura 1.8. Distribución de <i>P. cinnamomi</i> Rands en Europa.	43
Figura 1.9. Ciclo de vida de <i>P. cinnamomi</i> . Rands. Proceso de infección	44
Figura 3.1. Regiones de procedencias de <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i> objeto de estudio.	63
Figura 3.2. Regiones de procedencias de <i>Q. suber</i> objeto de estudio.	64
Figura 3.3. Germinación de semillas en perlita húmeda.	65
Figura 3.4. Disposición de las plantas en cajones, a la izquierda codo con tubería transparente que indica el volumen de agua en el interior de la caja.	66
Figura 3.5. Representación de fragmento de raíz (F) tomado del exterior del cepellón, puntas activas en crecimiento (P) y ramificaciones (R).	67
Figura 3.6. Distintos componentes morfológicos radiculares y aéreos evaluados en el ensayo.	68
Figura 3.7. Sintomatología mostrada por plantas afectadas por la enfermedad. Clase 4.	69
Figura 3.8. Placas Petri con raíces secundarias creciendo en medio selectivo NARPH. Izquierda: raíces secundarias de plantas control; Derecha: raíces secundarias de plantas infestadas con <i>P. cinnamomi</i>	72
Figura 3.9. Relación de VA (media \pm ET) en cada una de las especies de <i>Quercus</i> objeto de estudio, para plantas control (\square) e Inoculadas (\blacksquare) n= 380.	78
Figura 3.10. Relación de VR (media \pm ET) en cada una de las especies de <i>Quercus</i> objeto de estudio, para plantas control (\square) e Inoculadas (\blacksquare) n= 380.	78
Figura 3.11. Peso de raíces nuevas (media \pm ET) (PRN) (g) entre plantas control (\square) e inoculadas (\blacksquare) en las distintas procedencias estudiadas n=70	81

Figura 3.12. Representación de peso de raíces nuevas (media±ET) (gramos) en plantas Control (□) e Inoculadas (■) de <i>Q. ilex</i> (n= 70).	84
Figura 3.13. Representación de variación de potencial hídrico (Ψ) (media±ET) (-MPa) (n= 40) en los diferentes tratamientos estudiados (C, D1, D3, D5) para plantas de <i>Q. ilex</i> y <i>Q. suber</i>	85
Figura 3.14. Producción de raíces nuevas en la mitad inferior del cepellón en plantas control, y por encima de la zona sumergida del cepellón en plantas inoculadas.	86
Figura 4.1. Distribución de masas forestales incluidas en el estudio de <i>Q. ilex</i> spp <i>ballota</i> (verde) y <i>Q. suber</i> (rojo) en el suroeste de la Península Ibérica.	93
Figura 4.2. Dehesa afectada por la enfermedad en el término municipal de Cabezas Rubias, comarca del Andévalo (Huelva).	94
Figura 4.3. Germinación de semillas de <i>Q. suber</i> con sustrato turba-vermiculita.	95
Figura 4.4. Arriba: Disposición plantas en invernadero. Abajo: Riego por aspersión en bloques aleatorizados	96
Figura 4.5. Diagrama de dispersión de valoración visual de raíces (VR) vs índice normalizado de tolerancia (IR) de plantas inoculadas (n=4) del total de las 80 progenies de <i>Q. ilex</i>	105
Figura 4.6. Diagrama de dispersión de valoración visual de raíces (VR) vs índice normalizado de tolerancia (IR) de plantas inoculadas (n=4) del total de las 64 progenies de <i>Q. suber</i>	109
Figura 5.1. a) Hoja de <i>Q. ilex</i> seccionada. b) Mediciones de potencial hídrico xilemático (Ψ) a través de la cámara de presión (Modelo 1000, PMS Instruments, Corvallis, OR, USA).	122
Figura 5.2. Medida de transpiración cuticular con balanza de precisión (± 1.0 mg).	124
Figura 5.3. Medidas de la Conductancia estomática con Decagon Devices' Leaf Porometer.	125
Figura 5.4. Valores medios de $-\Psi$ (MPa) para cada una de las familias objeto de estudio distinguiéndose plantas inoculadas (I=■) y plantas testigo (C=□). (n=120)	127
Figura 5.5. Representación de E_f (media±ET) ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) del total de progenies objeto de estudio (n=120).	128
Figura 5.6. Valores medios (\pm ET) de las medidas de E diarias en plantas inoculadas y testigo. (n=120).	129
Figura 5.7. Relación de valores medios de SFT (\pm ET) (m^2) de cada una de las progenies evaluadas. (n=120).	129

Figura 5.8. Transpiración media diaria E (E_1, E_2, E_3, E_4, E_5) (media±ET) (mmol- $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$) para cada subconjunto de plantas evaluadas en intervalos de tiempo (días). Factores fijos: Tolerancia (HS, HT) e Infección (C, I) (n=120).	131
Figura 5.9. Representación de SFT (media±ET) (cm^2) para los subconjuntos clasificados como HS y HT en plantas inoculadas (I=■) y testigo (C=□) (n=120).	131
Figura 5.10. Regresión lineal de Radiación solar vs E_{co} en plantas control para n=5.	132
Figura 5.11. Regresión lineal de Temperatura media vs E_i en plantas inoculadas para n=5.	132
Figura 5.12. Representación de la pérdida de conductancia estomática (gs) a lo largo del tiempo (minutos) en diferentes familias de <i>Q. ilex</i> . (n=96)	134
Figura 5.13. Variaciones entre progenies de la conductancia estomática (media±ET) (mmol $H_2O\ m^{-2}s^{-1}$) en el instante t=0 (n=96)	134
Figura 5.14. Variaciones entre progenies de la conductancia estomática (media±ET) (mmol $H_2O\ m^{-2}s^{-1}$) en los instante t=135,240 y 360 minutos (gs_2, gs_3, gs_4) (n=96)	135
Figura 5.15. Valores medios de gs_4 (media±ET) (mmol $H_2O\ m^{-2}s^{-1}$) después de 360 minutos medidos desde el punto de saturación hídrica en plantas testigo (C=□) e inoculadas (I=■) (n=96).	135
Figura 5.16. Regresión exponencial negativa entre el total de valores de E_f (mmol $H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$) y SFT (m^{-2}) (n= 120).	136

TABLAS.

Tabla 1.1. Estrategias hídricas en la a respuesta de las plantas ante situaciones de estrés. Equivalencias de los términos y clasificaciones más empleados.	47
Tabla 3.1. Composición química de dos soluciones salinas empleadas para la producción de esporangios.	60
Tabla 3.2. Concentraciones de las diferentes dosis de inóculo de <i>P. cinnamomi</i>	61
Tabla 3.3. Diferenciación de distintas clases de afección en plantas evaluadas atendiendo a la sintomatología radicular presentada (VR) y a la sintomatología aérea (VA), dependiendo del porcentaje de afección.	67
Tabla 3.4. Valores medios (±ET) de parámetros morfológicos de raíz y nivel de significación para dosis de inóculo infectivo estudiada.	73
Tabla 3.5. Valores medios (±ET) de parámetros morfológicos aéreos y nivel de significación para dosis de inóculo infectivo estudiada.	73
Tabla 3.6. Valores medios (± ET) de Potencial hídrico (MPa) para <i>Q. ilex</i> respecto a la dosis de inóculo infectivo	74
Tabla 3.7. Matriz de correlación de Pearson entre cada uno de los parámetros morfológicos evaluados en <i>Q. ilex</i> (n=60).	74

Tabla 3.8. Valores medios (\pm ET) de parámetros morfológicos de raíz y nivel de significación para dosis de inóculo infectivo en <i>Q. ilex</i> I	75
Tabla 3.9. Valores medios (\pm ET) de parámetros morfológicos de raíz y nivel de significación para dosis de inóculo infectivo en <i>Q. ilex</i> II	75
Tabla 3.10. Valores medios (\pm ET) de parámetros morfológicos de tallo y nivel de significación para dosis en <i>Q. suber</i>	76
Tabla 3.11. Valores medios (\pm ET) de Potencial hídrico (MPa) para <i>Q. suber</i> referente a la dosis.....	76
Tabla 3.12. Matriz de correlación de Pearson entre cada uno de los parámetros morfológicos evaluados en <i>Q. suber</i> (n=60).....	77
Tabla 3.13. Relación de media \pm Error típico de parámetros radiculares de plantas de <i>Q. ilex</i> según procedencia (PROC) y tratamiento (T).....	79
Tabla 3.14. Relación de media \pm Error típico de parámetros aéreos de plantas de <i>Quercus ilex</i> según procedencia (PROC) y tratamiento (T)	80
Tabla 3.15. Relación de media \pm ET de parámetros radiculares en las plantas de <i>Quercus suber</i> según procedencia e infección con <i>P. cinnammomi</i>	81
Tabla 3.16. Relación de media \pm ET de parámetros aéreos en las plantas de <i>Q. suber</i> según procedencia e infección con <i>P. cinnammomi</i>	82
Tabla 4.1. Porcentaje de germinación total (G) (media \pm SD) y proporción de progenies (Pr) que alcanzaron los cuatro niveles de germinación (100%, 50 a 99%, 30 a 50% y <30%) para cada una de las especies	95
Tabla 4.2. Nivel de significación (<i>p</i>) para cada uno de los parámetros de regeneración de raíces en <i>Q. ilex</i> en relación con el factor independiente tratamiento (T), Progenie (Pr) y para la interacción progenie y tratamiento (Pr *T)(n=560) .	100
Tabla 4.3. Valores medios (\pm ET) de parámetros morfológicos en plantas de <i>Q. ilex</i> sometidas a la infección de <i>P. cinnammomi</i> (I)n=380, frente a plantas control (C) (n=560).....	101
Tabla 4.4. Valores máximos y mínimos y percentiles 25 y 75 de los parámetros de regeneración de raíz en plantas inoculadas (I) y control (C) de 80 progenies de <i>Q. ilex</i>	102
Tabla 4.5. Matriz de correlación de Pearson entre cada una de las variables radiculares evaluadas en <i>Q. ilex</i> (n=560)	103
Tabla 4.6. Clasificación general de las familias de <i>Q. ilex</i> con valores normalizados de IR y su grado de tolerancia (GT).....	104
Tabla 4.7. Nivel de significación (<i>p</i>) para cada uno de los parámetros de regeneración de raíces en <i>Q. suber</i> en relación con el factor tratamiento (T), Progenie (Pr) y para la interacción progenie y tratamiento (Pr *T).....	105

Tabla 4.8. Valores medios (\pm ET) de parámetros morfológicos en plantas de <i>Q. suber</i> sometidas a la infección de <i>P. cinnamomi</i> (I) frente a plantas Control (C).	106
Tabla 4.9. Valores medios, máximos y mínimos y percentiles 25 y 75 de los parámetros de regeneración de raíz en plantas inoculadas (I) y control (C) de 80 progenies de <i>Q. suber</i> .	107
Tabla 4.10. Matriz de correlación de Pearson entre cada uno de los factores radiculares evaluados en <i>Q. suber</i> .	107
Tabla 4.11. Clasificación general de las familias de <i>Q. suber</i> con valores normalizados de IR y su grado de tolerancia (GT).	108
Tabla 4.12. Nivel de significación (p) en cada uno de los variables para los factores fijos familia (Pr), tratamiento (T) y su interacción (Pr*T) (n=160).	109
Tabla 4.13. Valores medios \pm ET de cada uno de las variables radiculares evaluados (n= 160) y nivel de significación del tratamiento (T) y de la clasificación de la familia por el grado de tolerancia (To)	110
Tabla 4.14. Valores medios \pm ET de cada uno de las variables aéreas evaluadas (n= 160).	111
Tabla 4.15. Matriz de correlación de Pearson entre cada uno de los parámetros morfológicos evaluados en <i>Q. ilex</i> (n=160).	111
Tabla 5.1. Valores de factores ambientales durante los días del ensayo de transpiración.	123
Tabla 5.2. Valores medios (\pm ET) de Ψ (MPa) entre plantas testigo e inoculadas para los diferentes grados de tolerancia (n=120).	128
Tabla 5.3. Valores de E_f (media \pm ET) ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para cada conjunto de plantas en base a la tolerancia según el tratamiento. HS: plantas susceptibles o no tolerantes, HS = plantas tolerantes (n=120).	130
Tabla 5.4. Valores de E_1 (media \pm ET) ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para cada conjunto de plantas en base a la tolerancia según el tratamiento. HS: plantas susceptibles o no tolerantes, HS = plantas tolerantes (n=120).	130
Tabla 5.5. Valores medios (media \pm ET) para los parámetros relacionados con la transpiración cuticular: E_c = transpiración cuticular ($\text{mmol H}_2\text{O kg}^{-1}\text{s}^{-1}$); AFE= área foliar específica ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$).	133
Tabla 5.6. Matriz de correlación lineal para algunos de los parámetros de la selección de plantas (n=100)	136
Tabla 5.7. Regresión exponencial negativa entre el total de valores de E_f y el total de valores de SFT (n=120)	137

I - ABREVIATURAS

Ψ	Potencial hídrico (medido al amanecer) (MPa)
$\Psi\pi_0$	Potencial osmótico a turgencia cero (MPa)
$\Psi\pi_{100}$	Potencial osmótico a máxima turgencia (MPa)
AA	Alto Alentejo (Portugal)
AFE	Área foliar específica ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$)
ALG	Algarve (Portugal)
BA	Bajo Alentejo (Portugal)
C	Plantas control
CHR_0	Contenido hídrico relativo en el punto de pérdida de la turgencia (%)
CHR_{100}	Contenido hídrico relativo en el punto de máxima turgencia (%)
CHR_a	Contenido hídrico relativo en el apoplasto (%)
CHR_{pce}	Contenido hídrico relativo en el punto de cierre estomático (%)
CO	Cortes de la Frontera (Málaga)
CP	Campofrío (Huelva)
CR	Castaño del Robledo (Huelva)
DIRP	Diámetro de la raíz (mm)
E	Ritmo de transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_1	Ritmo de transpiración en el día 1 ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_2	Ritmo de transpiración en el día 2 ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_3	Ritmo de transpiración en el día 3 ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_4	Ritmo de transpiración en el día 4 ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_5	Ritmo de transpiración en el día 5 ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_c	Transpiración cuticular ($\mu\text{mol H}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
E_{co}	Ritmo de transpiración en plantas control ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_i	Ritmo de transpiración en plantas inoculadas ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_f	Ritmo de transpiración final ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

E_x	Total de valores de ritmo de transpiración ($E_{1'}$, $E_{2'}$, $E_{3'}$, $E_{4'}$, $E_{5'}$) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
F	Fragmento de raíces secundarias nuevas
G	Germinación
GLM	Modelo lineal general
gs	Conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
HE	Las Herrerías (Huelva)
HR	Villanueva de los Castillejos (Huelva)
Hr	Humedad relativa (%)
Hr_{\max}	Humedad relativa máxima (%)
Hr_{\min}	Humedad relativa mínima (%)
HS	Progenies muy susceptibles
HT	Progenies muy tolerantes
I	Plantas inoculadas
IR	Índice ranking
LRN	Longitud de raíces secundarias nuevas (cm)
LTP	Longitud del tallo principal (cm)
MT	Progenies moderadamente tolerantes
NHJ	Número de hojas del tallo principal
P	Puntas de raíz secundaria nuevas activas en crecimiento
P/L	Cociente entre peso de raíces nuevas y longitud de raíces nuevas (g cm^{-1})
PASR	Parque de los Alcornocales Sierra de Ronda (región de procedencia alcornoque)
PAY	Paymogo (Huelva)
PF	Peso fresco (g)
PF_{sat}	Peso fresco en el punto de saturación (g)
PFR	Potencial de formación de raíces
PG	Puebla de Guzmán (Huelva)
Pp	Precipitación (mm)
Pr	Progenies
PRN	Peso fresco de raíces secundarias nuevas (g)

Selección de progenies de encina (*Quercus ilex* L. spp *ballota*) y alcornoque (*Quercus suber* L.) tolerantes al patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands

PROC	Procedencia
PRP	Peso fresco de raíz principal (g)
PRS	Peso fresco de raíces secundarias (g)
PS	Peso seco (g)
R	Ramificaciones de raíces secundarias nuevas
Ra	Radiación solar (MJ/m ² dia)
RE	Región Extremadurensis (región de procedencia de encina)
S	Progenies susceptibles
SBRPII	Región de procedencia Portugal alcornoques 2
SCR	Sierra de Cádiz y Ronda (región de procedencia de encina)
SFT	Superficie foliar total (m ²)
T	Tratamiento (control/inoculado)
T ^a	Temperatura (°C)
T _μ	Temperatura media (°C)
TI	Progenies tolerantes
T _{max}	Temperatura máxima (°C)
T _{min}	Temperatura mínima (°C)
To	Tolerancia
VA	Valoración aérea
VR	Valoración de raíz
ZR	Zalamea la Real (Huelva)

II. RESUMEN

Desde al menos el último tercio del siglo XX los bosques de *Quercus* están sufriendo un decaimiento que conlleva a un descenso de las masas forestales establecidas a lo largo del mediterráneo occidental. En la actualidad se observa como este fenómeno afecta a los bosques de *Q. ilex* spp *ballota* y *Q. suber* de la Península Ibérica. El principal agente causal al que se atribuye este decaimiento es el patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands que actúa favorecido por factores abióticos. Para paliar la acción del patógeno actualmente se están llevando a cabo actuaciones de control de la enfermedad con el fin de reducir la agresividad del patógeno o bien acabar con él. Sin embargo estas técnicas no han sido eficientes. Por tanto, es preciso evaluar la posibilidad de que la severidad de síntomas mostrada por diferentes arboles de encinas y alcornoques impliquen un componente genético y que por tanto la heredabilidad de la tolerancia al patógeno podría generar fluctuaciones en la sintomatología de la enfermedad en diferentes progenies.

En el capítulo 1, se ha evaluado el efecto de la dosis de inóculo en los sistemas radicales de las dos especies en plantas que se inoculaban con una suspensión de micelio y eran trasplantadas a contenedores con perlita para observar el crecimiento de su sistema radical (peso y longitud de raíces nuevas, número de puntas en crecimiento, ramificaciones) además de la valoración visual de síntomas tanto en la raíz como en la parte aérea. Se observó un incremento de la severidad en la sintomatología de las plantas a medida que se incrementa la dosis. Además se corrobora la mayor severidad de síntomas en *Q. ilex* que en *Q. suber*. Otro aspecto evaluado en este capítulo es el efecto de la procedencia de las semillas resultando significativas las diferencias entre procedencias para encinas no siendo así para alcornoque.

En el capítulo 2 se observan las variaciones de tolerancia a *P. cinnamomi* entre 80 progenies de *Q. ilex* y 64 progenies de *Q. suber* seleccionadas de diferentes zonas del suroeste peninsular. Las diferencias de síntomas en el sistema radical son significativas para ambas especies estableciéndose un índice a partir de parámetros de regeneración de raíz evaluados en la plántula. Este índice permitirá distinguir grados de tolerancia y susceptibilidad al patógeno. La tolerancia de una selección de familias de *Q. ilex* con resultados extremo en el ranking anterior se corrobora a partir de una nueva evaluación con mayor número de plantas.

Finalmente en el capítulo 3 se realizaron ensayos en los parámetros fisiológicos de ritmo de transpiración, potencial hídrico, transpiración cuticular y conductancia

estomática, para determinar si los distintos grados de tolerancia exhibidos por los sistemas radicales de las familias estaban relacionados con el comportamiento hídrico de la planta en la selección de familias de *Q. ilex* del ranking elaborado en el capítulo anterior. Los resultados de parámetros como ritmo de transpiración total y diario, superficie foliar total, potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia y conductancia estomática, sí mostraron diferencias entre familias, así como para la categoría de la familia (tolerante/susceptible). Las diferencias entre tratamientos, se observaron en el potencial hídrico al amanecer, el ritmo de transpiración en el primer día de ensayo, el área foliar específica y la superficie foliar total, así como en la conductancia estomática en $t= 360$ minutos. Los resultados sugieren un moderado control genético y una escasa relación entre parámetros de regeneración de raíces y fisiológicos.

III. ABSTRACT

Since the last third of the twentieth century *Quercus* forests were being suffered a decline that leads to a decrease of forest stands established along the western Mediterranean. Actually in Iberian Peninsula are being observed, that this phenomenon affects forests of *Q.suber* and *Q. ilex* spp ballota. *Phytophthora cinnamomi* Rands is the main causal agent to the decline. The pathogen is favored by abiotic factors.

In order to reduce the strong activities of the *P. cinnamomi* is therefore necessary to assess the possibility that the severity of symptoms shown by different oaks trees, involving a genetic component and therefore the heritability of tolerance to the pathogen could cause fluctuations in the symptomatology of the disease in different progenies.

In Chapter 1, we have evaluated the effect to the dose of inoculum in the root systems in plants inoculated with a suspension of mycelium in both species. Then were transplanted into containers with perlite to observe the growth of the root system (weight and new root length, number of growing tips, branches) in addition to the visual assessment of symptoms in both the root and in the shoot. An increase in the severity of symptoms in plants with increasing dose. It also supports the more severe symptoms that in *Q.ilex* plants. Another aspect evaluated in this chapter is the effect of the provenance of the seed, resulting significant differences between provenances for oaks and for cork.

In chapter 2 shows the variations of tolerance to *P. cinnamomi* between 80 progenies of *Quercus ilex* and 64 progenies *Quercus suber*, selected from different areas of the southwest Iberian Peninsula. Differences in symptoms in the root system are significant for both species, establishing an index from regeneration parameters evaluated in the seedling root, to distinguish degrees of tolerance and susceptibility to pathogen tolerance of selected families of *Q. ilex* with end results in the previous ranking. It is confirmed from a reassessment with more plants.

Finally, in Chapter 3 trials were conducted in physiological parameters transpiration rate, water potential, pressure-volume curves, cuticular transpiration and stomatal conductance to determine whether different degrees of tolerance exhibited by the root systems of the families were related the plant water behavior in selecting families *Q.ilex* the ranking prepared in the previous chapter. The results of parameters such as rate of total daily transpiration, leaf area, water potential at turgor loss point and stomatal conductance, did show differences between families, and for the family ca-

tegory (tolerant / susceptible). Differences between treatments were observed in the water potential at dawn, the rate of transpiration on the first day of trial, specific leaf area, total leaf area and stomatal conductance at $t = 360$ minutes. The results suggest a genetic control moderate and low relationship between parameters and physiological root regeneration.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- EL BOSQUE MEDITERRÁNEO Y LA DEHESA.

Se denomina bosque mediterráneo a aquellas formaciones vegetales de origen esclerófilo que se extienden por zonas de clima mediterráneo teniendo a la encina como símbolo más significativo (Marañón *et al.*, 1988). El clima mediterráneo es uno de los factores más influyentes caracterizado por precipitaciones irregulares a lo largo de los años, veranos secos y calurosos, así como inviernos húmedos y fríos (Costa *et al.*, 1998). La vegetación en este clima se encuentra adaptada a la acusada sequía estival que lo caracteriza a través de rasgos anatómicos de las hojas con el fin de evitar pérdidas excesivas de agua.

La intervención del hombre en la transformación del bosque mediterráneo en los últimos tres siglos, queda patente en la sustitución del bosque mediterráneo por pastizales arbolados de escasa cobertura arbustiva, La Dehesa (Martín Bellido 1996). El Plan Forestal Andaluz (Junta de Andalucía 1989) denomina monte adehesado, monte claro o dehesa, a cualquier extensión grande de terreno (mayor de 100 ha), cubierta principalmente de un bosque aclarado de encinas y alcornoques, con una densidad media comprendida entre unos 50-60 pies/ha. (Fernández Rebollo *et al.*, 2008). En este caso las dehesas se caracterizarían por el tipo de vegetación que presentan, principalmente en cuanto a la composición y estructura. Así se componen de un estrato arbóreo claro formado generalmente por *Quercus* mediterráneos (*Q. ilex*, *Q. suber*), con un crecimiento y una velocidad de reciclaje relativamente lentos y con una función estabilizadora y diversificadora muy importante; y otro herbáceo, de crecimiento y velocidad de reciclaje más rápidos (San Miguel *et al.*, 1994). Las dehesas se acotan en función de la densidad del arbolado, independientemente del uso y aprovechamiento al que se vean sometidas.



Figura 1.1. Dehesa de explotación de ganado porcino situada en el término municipal de Cabezas Rubias, Huelva.

1.2.- LA ENCINA [*Quercus ilex* spp *ballota* (DESF.) SAMP].

La carrasca o encina de hoja ancha pertenece al reino *Plantae*, subreino *Tracheobionta*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Hammamelidae*, orden *Fagales*, familia *Fagaceae*, género *Quercus*, Subgénero *Sclepophyllodrys* (Rivas *et al.*, 1991). Es el porte arbóreo, con el que puede llegar a alcanzar los 25 m de altura (Alejano *et al.*, 2011). Puede tomar un aspecto exterior muy variable, arbustivo o arbóreo, en función de la estación que ocupe y del tratamiento al que se vea sometida.



Figura 1.2. *Quercus ilex* spp *ballota* en el término municipal de la Puebla de Guzmán, comarca del Andévalo, provincia de Huelva.

El fuste cuando maduro es recio, recto y cilíndrico con corteza profundamente agrietada gris-negrucza dividida en teselas pequeñas. Cuando joven el tronco es más

flexuoso y de corteza lisa y grisácea. La copa es amplia y densa evolucionando con la edad de esferoidal a lobulada, excepto cuando es sometida a podas periódicas que adquiere un porte más abierto y aparasolado. De raíz principal potente y penetrante (David *et al.*, 2007), posee abundante ramificaciones secundarias en superficie además produce brotes de cepa y de raíz.

Este árbol domina potencialmente la Península Ibérica, siendo el más extenso, se dispersa a la casi totalidad de las provincias y regiones peninsulares (Costa *et al.*, 1998) salvo en las zonas húmedas de Galicia y la Cornisa Cantábrica, así como en los enclaves más áridos del sureste (Alejano *et al.*, 2011). Este extenso dominio territorial se debe a su extraordinaria amplitud ecológica, pues no solo puede colonizar suelos desarrollados de cualquier naturaleza, sino que es un árbol extraordinariamente resistente a la sequía y a las temperaturas extremas (Fernández *et al.* 2008). Puede adaptarse a precipitaciones muy escasas, del orden de los 350 mm anuales, y acepta también precipitaciones elevadas si los suelos no se encharcan. Resiste bien las altas temperaturas (más de 40 °C), pero también son resistentes al frío invernal, hasta el punto de que en sus hojas no aparecen lesiones si no se alcanzan temperaturas más bajas de -15°C. Esto la convierte en una especie especialmente adaptada a los climas secos y térmicamente contrastados del interior peninsular (Rodà *et al.*, 1999) y a las tierras meridionales que han de soportar una prolongada sequía estival, subsistiendo con modestas precipitaciones de otoño y primavera.

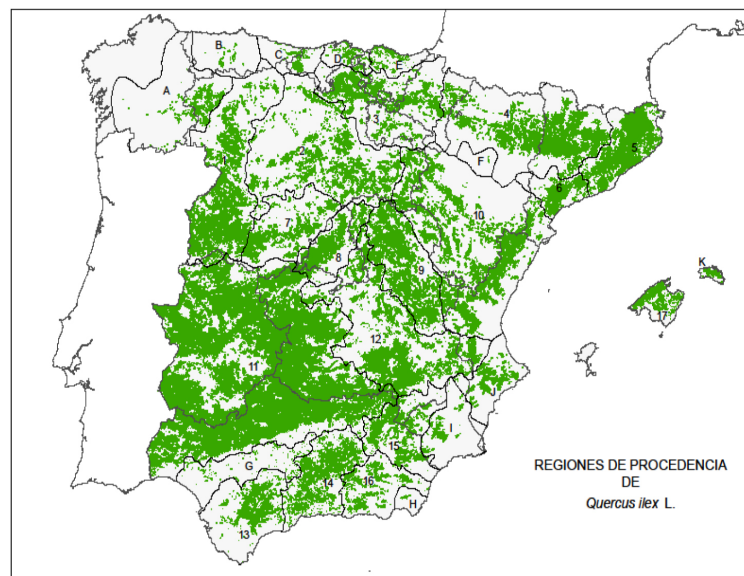


Figura 1.3. Distribución de *Q. ilex* spp. *ballota* en España.

1.3.- EL ALCORNOQUE [*Q. suber* L.]

El alcornoque pertenece al reino *Plantae*, subreino *Tracheobionta*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Hammamelidae*, orden *Fagales*, familia *Fagaceae*, género *Quercus*, Subgénero *Cerris* (Rivas *et al.*, 1991). Es un árbol inerme, robusto y fuerte; de mediana talla que por lo común mide alrededor de 20 metros. Este árbol es muy parecido a la encina por su aspecto y porte, pero es muy fácil de diferenciar por su corteza, que le hace inconfundible. El sistema radical es potente, consta de una raíz central más o menos penetrante según la naturaleza de los suelos (Nadezhdina *et al.*, 2008). Es interesante destacar que estas raíces dan brotes, sobre todo si se rozan. Tiene hojas simples y alternas y son subpersistentes. Posee un limbo coriáceo, delgado y oblongo-lanceolado con medidas comprendidas entre 3 y 8 cm de largo por 1,5 a 3 cm de ancho. Sus bordes son enteros o festoneados y espaciadamente denticulado-espinosos. El haz es verde oscuro, lampiño y algo lustroso.



Figura 1.4. *Q. suber* en el término municipal de San Bartolomé de la Torre, comarca del Andévalo, provincia de Huelva.

La floración es difusa, casi continua en climas benignos. El período de floración comienza en abril y se prolonga durante toda la primavera y en ocasiones puede extenderse hasta verano pudiendo haber incluso flores de otoño que dan frutos maduros en el siguiente verano (Pérez-Latorre *et al.*, 2006). La maduración del fruto es anual y el período de diseminación se extiende desde septiembre hasta enero, cayendo la mayoría entre octubre y noviembre. La bellota del alcornoque es menos apreciada como comestible que la de la encina, por ser más áspera y amarga. Es lampiña, de endocarpo lampiño o glabrescente y cúpula con escamas laxas, alargadas y algo revueltas las últimas (Alejano *et al.*, 2011).

Su área de distribución coincide en buena parte con la encina de las que le separa una amplitud ecológica menor. Esta especie es propia del ámbito mediterráneo occidental requiriendo mayor grado de humedad edáfica y ambiental que la encina. En España predomina en el cuadrante suroccidental pero está presente en otras provincias y abunda en Cataluña (Figura 1.5).

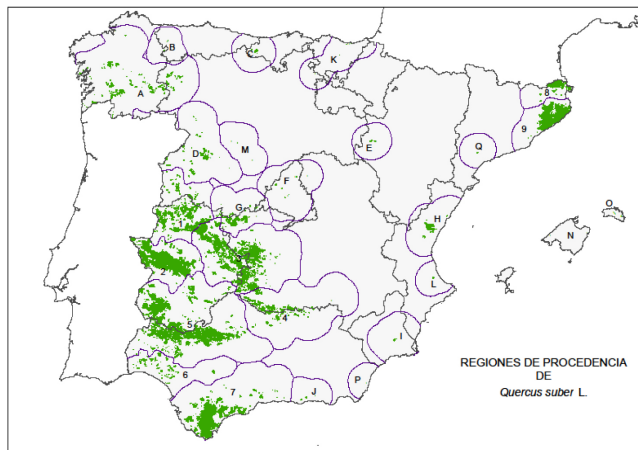


Figura 1.5. Distribución de *Q. suber* en España.

1.4.- EL DECAIMIENTO DEL BOSQUE DE QUERCUS. “LA SECA”.

Desde principio del siglo XX y a lo largo de todo el mundo, las especies de *Quercus* han mostrado diversos episodios de estrés que en ocasiones han dado lugar al decaimiento y muerte del arbolado (Brasier, 1996; Jordan *et al.*, 1996; Mircetich *et al.*, 1977; Robin *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 2000b; Franceschini *et al.*, 2010).

1.4.1. Origen y distribución del decaimiento.

Se ha reportado la aparición del decaimiento de especies del género *Quercus* en muchos países europeos, detallados a continuación de este a oeste: Rusia, Rumania, Yugoslavia, Polonia, Eslovaquia, Republica Checa, Hungría, Austria, Alemania, Países Bajos, Suecia, Inglaterra, Bélgica, Francia, Italia, España y Portugal (Oleksyn and Przybyl 1987; Hartmann *et al.*, 1998; Siwecki and Liese 1991; André and Laudelout 1992; Bayerische Akademie der Wissenschaften 1993; Luisi *et al.*, 1993; Redfern *et al.*, 1993; Rösel and Reuther 1995; Gibbs and Greig 1997; Szepesi 1997; Barklund and Wahlstroem 1998; Sonesson 1999).

De manera general, en la región mediterránea se han visto afectada gran cantidad de *Q. ilex* y en particular, en la Península Ibérica se han observado bastantes bosques

de *Q. suber* (Sousa Santos and Moura Martins 1993). De este modo, el decaimiento de los *Quercus* se ha extendido a lo largo de Europa.

Desde los años 80 se viene observando un decaimiento severo de *Quercus* en la cuenca mediterránea, aunque ya desde principios del siglo XX hay registros sobre una enfermedad de causa desconocida que afectaba a *Q. suber* en Portugal (Brito de Carvalho, 1993). Los primeros estudios sobre las causas de esta enfermedad, además de identificar varios factores predisponentes (sobreexplotación y sequía, fundamentalmente) citan a un patógeno asociado que fue identificado como una «estirpe» extremadamente virulenta de *Phytophthora cambivora*, agente de la tinta del castaño (Lopes Pimentel 1946). En 1953, se rectificó la nomenclatura de esta «estirpe» y se identificó como *Phytophthora cinnamomi* Rands (Viera Natividade, 1950; Brito De Carvalho, 1993).

En la Península Ibérica las especies más afectadas de decaimiento son *Q. suber* y *Q. ilex* (Perez *et al.*, 1993), y en menor proporción *Q. faginea* y *Q. pyrenaica* (Montoya, J.M., 1992). También se ha detectado el decaimiento de *Q. suber* y *Q. ilex* en Túnez y Marruecos (Brasier 1996). Al igual que en Centroeuropa, se han localizado toda una serie de factores implicados en el decaimiento de los *Quercus* mediterráneos, incluyendo sequías severas y recurrente, encharcamientos, contaminación atmosférica, cambios en el uso tradicional de las dehesas, ataques de insectos barrenadores de tronco, y de hongos de chancro, como *Hypoxylon mediterraneum* y *Diplodia mutila* (Montoya 1981; Torres 1985; Ragazzi *et al.*, 1998; Vannini *et al.*, 1996). Más recientemente se ha descubierto la presencia de la bacteria *Brenneria quercina* asociada al decaimiento de *Quercus* en España (Soria *et al.*, 1997).

En 1991 se investigó la posible introducción en España de *Ceratocystis fagacearum*, agente de la marchitez vascular de *Quercus* en Norteamérica. No se encontró evidencia alguna de la implicación de este patógeno en el decaimiento de *Quercus*, pero se sugirió la posibilidad de que en el sudoeste de España las encinas y alcornoques estuvieran sufriendo una enfermedad radical causada por el oomiceto *P. cinnamomi* (Brasier 1993a; Tuset *et al.*, 1996). Esta hipótesis venía apoyada por la sintomatología observada: marchitez y muerte súbita de toda la copa a principios de verano o en otoño, aparición de chancros sangrantes en el tronco de algunos pies afectados y producción de brotes adventicios, todo ello indicativo de algún tipo de estrés radical (Brasier 1996), y finalmente el decaimiento crónico que lleva a la muerte del árbol afectado al cabo de una o dos estaciones (Ragazzi *et al.*, 1989). Los árboles infectados se colapsan repentinamente (síndrome de la muerte súbita o apoplejía), aunque en otros casos sobreviven durante varios años (síndrome de la muerte lenta) (Sánchez *et al.*, 2000).

La combinación del patógeno con largos periodos de elevadas temperaturas y sequía severa favorece la potencialidad en el daño causado a las especies de *Quercus*. La

intensificación en los daños causados por el oomiceto en el sudoeste de la Península Ibérica hace que Andalucía sea la región de nuestro país con mayor extensión de la enfermedad denominada comúnmente Seca, ya que se han inventariado un número total de 465 focos de la enfermedad en la Comunidad Autónoma que se distribuían en las provincias de Cádiz, Córdoba, Granada, Huelva, Jaén, Málaga y Sevilla. Las provincias con mayor número de focos inventariados fueron Cádiz y Huelva con 158 y 110 respectivamente (Navarro *et al* 2000a). A partir del análisis de los factores bióticos que contribuyen a la enfermedad, se estableció una biogeografía de la Seca en Andalucía (Navarro *et al.*, 2001c), diferenciando las distintas zonas afectadas por la enfermedad como se observa en la Figura 1.6.

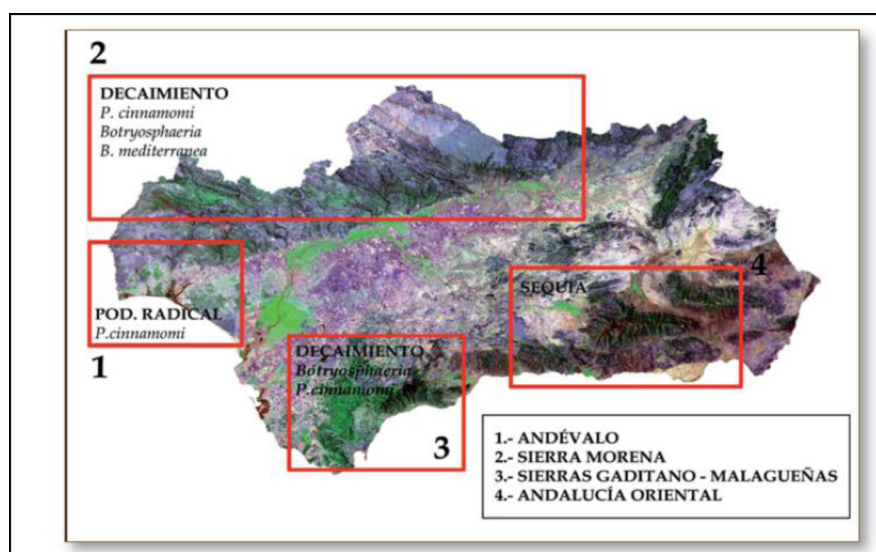


Figura 1.6. Distribución de los focos de seca sobre masas de *Quercus* spp. en Andalucía (Navarro *et al.* 2001). 1. Sector Occidental (Huelva-Andévalo); 2. Sector de Sierra Morena (Huelva – Sierra Norte de Sevilla y Norte de Córdoba); 3. Sector de las Sierras gaditano-malagueñas; 4. Sector oriental de Andalucía (Sur de Córdoba, Granada, Málaga y Almería).
Inventario Junta de Andalucía, 1999.

En estas circunstancias puede hablarse con cierta seguridad de que, en el sector occidental Andalucía, el factor principal que contribuye a la enfermedad es *P. cinnamomi* y está identificado y contrastado a través de muestreos realizados en la comarca (Romero *et al.*, 2007) así como contrastándolo con trabajos realizados en la zona del Algarve Portugués (Ferraz *et al.*, 2003).

1.4.2. Sintomatología de la enfermedad.

Los síntomas en el decaimiento de los *Quercus* se reflejan a partir de una serie de lesiones en diferentes partes de la planta: la copa disminuye debido al incremento anormal de brotes adventicios y muerte regresiva de brotes y ramas en el dosel superior; las

hojas restantes se disponen en ramas acabando en brotes; en muchos casos se observa la decoloración y amarilleamiento de hojas; reducción del tamaño de las hojas; brotes epicórmicos; flujo de savia por el tronco; necrosis progresiva de la corteza y cambium y reducción en el diámetro de crecimiento (Hardham *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 1992; Schlag 1994; Hartmann *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 2002). La distribución de las masas afectadas se determina por la aparición de árboles muertos o moribundos en grandes grupos o focos (la asociación del decaimiento con valles o depresiones topográficas, o con zonas estacionalmente encharcadizas, así como con zonas alteradas, como márgenes de caminos, cortafuegos o áreas que soportan altas cargas ganaderas). Además el decaimiento progresa en las laderas con mayor rapidez en dirección descendente y muestra mayor severidad en exposiciones al sur o suroeste (Brasier 1996; Moreira *et al.* 1997).



Figura 1.7. *Quercus ilex* afectada por *P. cinnamomi*.

1.4.3. Factor causal principal: *Phytophthora cinnamomi* Rands

1.4.3.1. Origen y distribución

P. cinnamomi Rands pertenece al reino Protista, subreino Chromista, phylum Oomycota, clase Oomycetes, orden Pythiales, familia Pythiaceae y género *Phytophthora*. Es un patógeno de tierra que causa la necrosis y putrefacción de raíces absorbentes en el cultivo de muchas especies forestales, ornamentales y hortícolas (Rossman *et al.*, 2006). El origen geográfico no se ha establecido con exactitud. En 1922, se localizó en Sumatra y se describió por primera vez en *Cinnamomun burmannii* (Lauraceae), pero actualmente tiene una distribución mundial a través de Europa (Cabi 1991).



Figura 1.8. Distribución de *P. cinnamomi* Rands en Europa (Desprez-Loustau, 2008).

El patógeno se encuentra en zonas tropicales y subtropicales así como en la región mediterránea y algunas regiones de climas suaves donde ha sido introducido (Cabi 1991).

P. cinnamomi es la especie de *Phytophthora* de distribución más extendida, con alrededor de 1000 especies huéspedes (Zentmyer 1980). La cosecha alimentaria más afectada por este oomiceto, que produce la muerte de las raíces es el aguacate pero el patógeno también ataca a *Ananas comosus*, *Castanea dentata* y *C. sativa*, *Cinchona* spp., *Chamaecyparis lawsoniana*, *Cinnamomum* spp., coníferas, *Ericaceae* (incluyendo *Rhododendron* spp.), *Eucalyptus* spp., especialmente *E. marginata*, *Fagus* spp., *Juglans* spp., *Pinus* spp., *Prunus* spp., *Quercus* spp., y otras muchas plantas ornamentales, incluyendo *Vaccinium macrocarpon*. Este patógeno ha causado un extenso daño a los bosques de *Eucalyptus* en el oeste de Australia así como en los bosques de *Quercus* presentes en la Península Ibérica. En las regiones pertenecientes a la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (EPPO), los huéspedes más significativos son las plantas ornamentales de vivero y aguacates en las áreas limitadas donde se desarrollan. Se ha reportado que es el principal agente causal de la “tinta del castaño” enfermedad que afecta en el sur de Francia a *C. sativa* (Abelleira *et al.*, 1996) y se ha indicado como principal agente causal del decaimiento de los *Quercus* en la Península Ibérica (Brasier 1996) diezmando las poblaciones de Galicia, Asturias, Cantabria y Extremadura.

1.4.3.2. Ciclo biológico de la enfermedad.

P. cinnamomi no es visible a simple vista. En estado vegetativo y a través de un microscopio se observa el cuerpo principal: el micelio. Este se identifica visualmente como una asociación de hilos finos blancos que se entrelazan entre ellos. Las estruc-

turas asexuales producidas por el micelio son los esporangios (Weste *et al.*, 1987). Los esporangios se producen a partir del micelio y en condiciones aeróbicas a una temperatura de entre 22 y 28 °C. En cada esporangio (0.05 a 0.07 mm) se desarrollan alrededor de 30 a 40 zoosporas (<10 µm de diámetro) que se mueven por medio de un flagelo y permiten infectar raíces sanas que se encuentran en una película de agua (Caetano *et al.*, 2007). Estas zoosporas sobreviven durante 4 días (Hardham 2001). Cuando las condiciones del sustrato llegan a ser desfavorables (generalmente en suelos secos) el micelio desarrolla otro tipo de esporas: las clamidosporas (41 µm de diámetro) que son estructuras de resistencia que pueden llegar a permanecer en el tejido de las plantas huéspedes varios años esperando el desarrollo de condiciones favorables para volver a actuar (Hardham 2005). Existe otro tipo de espора: la oospora que se produce de forma sexual por la interconexión de órganos de reproducción sexual: Oogonio (femenino) y Anteridio (masculino). La reproducción sexual de *P. cinnamomi* no es frecuente en campo.

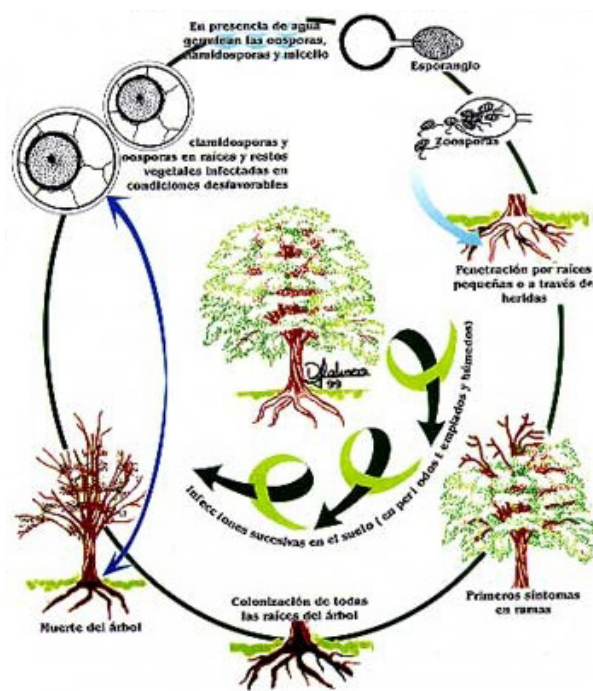


Figura 1.9. Ciclo de vida de *P. cinnamomi*. Rands.
Proceso de infección (Abelleira y cols 1996).

1.4.3.3. Proceso infectivo.

El proceso infectivo se desarrolla a través de la toma de contacto del patógeno con las plantas, adhiriéndose a la cutícula de las raíces y creciendo de forma directa el tubo germinativo en la superficie de la planta. Posteriormente, en el lugar de penetración,

se forma el apresorio, que ejerce una marcada presión sobre la superficie del huésped (Abelleira y cols 1996). Más tarde, crece la hifa de penetración que secreta una variedad de enzimas que degradan la pared y maceran los tejidos de la planta. Una vez que se ha producido la invasión del tejido por la hifa de penetración, se establece una relación parasitaria continuada patógeno-huésped que le proporciona al oomiceto los nutrientes necesarios para su crecimiento en la planta (Mendgen *et al.*, 1996). Cuando se encuentra en condiciones óptimas para el desarrollo de zoosporas, penetran a través de raíces absorbentes, provocando la pudrición de éstas, llevando a un decaimiento progresivo del árbol en el que se observa como síntomas generales: hojas más pequeñas de lo normal, color verde pálido o amarillentas y marchitas. Además las ramas mueren regresivamente producto del avance de la enfermedad y los frutos son de corteza brillante (Erwin *et al.*, 1996).

1.4.3.4. Daños ocasionados y control.

Como consecuencia de esta enfermedad el árbol muestra un aspecto general de marchitez y la copa se va desfoliando, llegando a secarse completamente en estados avanzados de la enfermedad. Como resultado la fructificación va decayendo aunque a veces puede producir una fructificación excesiva con frutos pequeños que no llegan a engordar. Producto del ataque del patógeno, las raíces absorbentes mueren, observándose ennegrecidas y quebradizas, siendo posible no encontrarlas en estados avanzados de la infección, sin embargo la infección raramente se extiende hacia las raíces principales (Caetano *et al* 2007). Esta enfermedad puede producirse bajo un amplio rango de temperaturas del suelo que van desde 21 hasta 30°C. Se presenta mayormente en los suelos con un drenaje deficiente, siendo la presencia del oomiceto y el exceso de humedad los dos factores que potencian el rápido desarrollo de la enfermedad (Gallo *et al.*, 1990). Actualmente en España se llevan a cabo estudios de tratamientos integrales que ayuden a paliar la acción del oomiceto tratando distintas situaciones y asociaciones que producen la enfermedad, aunque aún sin haber llegado a reducir el efecto del decaimiento (Navarro *et al.*, 2001d; Navarro *et al.*, 2001f).

No es fácil establecer un método de control, debido a la amplia gama de huéspedes a los que afecta el patógeno, así como por la longevidad de las estructuras de resistencia (a menudo varios años); como por su facilidad de propagación (la mayoría de esporangios y zoosporas enquistadas) en suelos no estériles y en detritos de raíces en profundidad, que disminuyen la capacidad en la efectividad de la fumigación del suelo (Munnecke 1984). Además existe un periodo que a veces es largo, entre el establecimiento de la infección y la manifestación de síntomas foliares.

Los métodos de control químico, como la aplicación de fungicidas (García *et al.*, 1993), deben ser respetuosos con el medio ambiente, estar debidamente autorizados y ser compatibles con cualquier otra práctica cultural y/o biológica. Existen en el mercado diversos fungicidas sistémicos eficaces en el control de *Phytophthora* spp., aunque la información sobre su eficacia en el patosistema *P. cinnamomi-Quercus* es aún escasa (Fernández-Escobar *et al.*, 1999; Fernández-Escobar 2002; Sánchez *et al.*, 2006). Se han realizado estudios sobre la mejora de la enfermedad a través de aplicación de fertilizaciones de fósforo, pero no se ha observado una mejora relevante en especies de *Quercus* (Navarro *et al.*, 2004).

1.5. ESTUDIOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA.

Ante el ataque de patógenos, las plantas actúan mediante mecanismos diferentes. Si el patógeno supera las barreras físicas de la pared celular de la cubierta vegetal, penetrando a través de heridas en la raíz, cicatrices, u otro medio de acceso superficial, las plantas deberán desarrollar mecanismos de resistencia, siendo importante la influencia que ejercen factores epidemiológicos y la predisposición de las plantas en la determinación de la infección. En el caso de que el agente patógeno sea *P. cinnamomi*, la planta se encuentra sometida a estrés hídrico por asfixia radical. Esto hace que desarrolle las anteriores respuestas adaptativas ante el problema del déficit hídrico.

En primer lugar, respuestas que tienden a evitar o prevenir el estrés (mecanismos evitadores) y mecanismos o adaptaciones que permiten soportar o resistir el estrés (mecanismos tolerantes). En las plantas, las respuestas o mecanismos para afrontar esta situación, han sido denominados estrategias, y son características de cada especie (Larcher 1995). Existe diversidad de clasificaciones a través de diversos autores, en las cuales se definen las principales estrategias de las especies que pueden denominarse en general mecanismos de resistencia. Estas clasificaciones, aunque utilizan diferentes nomenclaturas, se refieren a mecanismos similares (Tabla 1.1).

	Levitt (1980)	Turner (1986)	Kozlowski <i>et al.</i> , (1991)	Jones (1992)	Larcher (1995)
Denominación del mecanismo o estrategia	Resistencia a la sequía	Resistencia a la sequía	Tolerancia a la sequía	Tolerancia a la sequía	Resistencia a la sequía
Especies que completan el ciclo vital antes del periodo de estrés	Evasión	Evasión	Evitación	Evitación	Elusiva de sequía (árido-pasiva)
Especies que evitan la deshidratación celular	Evitación	Tolerancia con alto potencial hídrico Ψ	Aplazamiento de deshidratación	Evitación	Evitadora de desecación (árido-activa)
Especies que toleran la deshidratación celular	Tolerancia	Tolerancia con bajo potencial hídrico Ψ	Tolerancia de deshidratación	Tolerancia	Tolerante de desecación (árido-tolerante)

Tabla 1.1. Estrategias hídricas en la a respuesta de las plantas ante situaciones de estrés. Equivalencias de los términos y clasificaciones más empleados.

En 1980, Jacob Levitt describió extensamente los dos tipos de estrategias de resistencia a situaciones de estrés: la estrategia evitadora de la sequía y la tolerante de la sequía y cómo los mecanismos ecofisiológicos de resistencia se articulaban entorno a cada una de las estrategias. Las especies evitadoras del estrés serían reguladoras en el sentido de Hickman (1970), ya que regulando la transpiración evitarían tensiones excesivas en el xilema, mientras que las especies tolerantes serían conformistas según este mismo autor. Las especies con estrategia tolerante serían para Levitt las plantas que toleran que el estrés llegue a afectar en sus tejidos. Los mecanismos de tolerancia son muy específicos de la deformación que se produzca, desencadenándose diferentes modos de resistencia e incluso llegando a ser toleradas las deformaciones plásticas. Un aspecto importante de esta estrategia son los mecanismos reparadores de ese estrés, que la planta tiene que poner en funcionamiento cuando éste ha dejado de actuar (Levitt 1980).

En la estrategia evitadora del estrés las plantas previenen o minimizan la penetración del estrés en sus tejidos, ya que éstos son muy sensibles a la deshidratación. Las especies que siguen esta estrategia o bien maximizan la absorción de agua a través de sistemas radicales profundos o bien minimizan las pérdidas de agua, por lo que dentro de esta estrategia encontraríamos dos mecanismos evitadores: uno por derroche de

agua, el cual permite mantener hidratados los tejidos en plena sequía siempre que el acceso al agua del suelo y su distribución interna por el xilema no sea limitante, y otro por ahorro de agua. Ambos mecanismos mantienen a las plantas dentro del estado de turgor, con potenciales hídricos relativamente altos. Cuando las condiciones de déficit hídrico se acentúan, los derrochadores no pueden mantener las elevadas tasas de transpiración, y o bien se vuelven ahorradores o bien el individuo muere (Levitt 1980, Kozlowski *et al.*, 1991).

Una vez que una planta determinada está ya sometida a estrés debe ser capaz de resistirlo, bien por mecanismos tolerantes o bien por mecanismos evitadores. Diversos trabajos muestran que ambas estrategias son exitosas, ya que co-existen en especies adaptadas a ambientes deficitarios hídricamente, como los hábitats mediterráneos (Davis y Mooney 1986a, Lo Gullo y Salleo 1988, Rambal 1994, Abril y Hanano 1998, Nardini *et al.*, 1999). Sin embargo, como señala Levitt (1980), las plantas han evolucionado hacia el desarrollo de mecanismos que evitan el déficit hídrico, mientras que los mecanismos tolerantes serían un factor que complementaría a los mecanismos anteriores. De esta forma el desarrollo de mecanismos evitadores eficientes permitiría no solo sobrevivir al estrés sino continuar creciendo y desarrollándose en condiciones limitantes. Los mecanismos de evitar el estrés serían más exitosos que los tolerantes en climas áridos ya que evitarían cualquier tipo de deformación y los costes energéticos asociados. Sin embargo, dado que una planta no es perfectamente impermeable a las pérdidas de agua, necesita mecanismos que le permitan tolerar un cierto déficit hídrico en sus tejidos. No obstante y aunque las plantas deben desarrollar ambas estrategias, cada especie vegetal tiende a desarrollar principalmente una de las dos estrategias.

1.5.1. Variabilidad genética en diferentes especies forestales como respuesta al ataque de *Phytophthora* spp.

A lo largo de los años y después de diferentes estudios sobre la variabilidad genética, se han reportado estudios sobre la tolerancia por parte de diferentes poblaciones de especies forestales a *Phytophthora* spp. Estos estudios se comenzaron a llevar a cabo en plantas de aguacate donde se observó la diferencia en el comportamiento ante la infección de tres progenies de la planta (Kellam *et al.*, 1984). Se ha encontrado, en especies forestales exóticas como *P. cinnamomi* en *Eucalyptus marginata* (Stukely & Crane, 1994) y *Cronartium ribicola* en *Pinus lambertiana* (Kinloch 1992), que la frecuencia del gen principal de resistencia es relativamente fuerte en las poblaciones de unas regiones con respecto a otras estando mas adaptadas a episodios xerofíticos. Por tanto la diferencia en las lesiones de las plantas que se han estudiado es consecuencia de las adaptaciones xerofíticas al estrés. La reducida susceptibilidad es genéticamente

heredada en proporciones significantes por el descendiente. Estos pies podrían usarse para producir plantas en stocks para programas de reforestación. Se ha reportado una variación considerable en la respuesta a la inoculación con *P. ramorum* en individuos y poblaciones de *Q. agrifolia*, siendo un patrón consistente con la estructura genética en esta especie (Dodd *et al.*, 2004). Por último cabe destacar los estudios llevados a cabo en poblaciones de cacao para determinar la resistencia a *Phytophthora megakarya* por parte de determinados clones de la especie que actúa como hospedador (Paulin *et al.*, 2005). Se reportó que existen evidencias significativas en la resistencia y susceptibilidad al patógeno por parte de distintos clones.

Los primeros estudios de resistencia realizados en base a la interacción de las especies forestales con el patógeno *P. cinnamomi* se llevaron a cabo en eucalipto. A lo largo de los años, este patógeno ha causado daños irreversibles en las comunidades forestales de Australia (Weste & Mark 1987). Los estudios realizados sugieren que existe resistencia en líneas clonales a *P. cinnamomi* en diferentes parámetros medidos en árboles como la inducción a la lignificación, generación de compuestos fenólicos y actividad PAL entre otros (Cahill 1993). Además se reportan trabajos de medidas de supervivencia, en los que se han evaluado distintas familias seleccionadas de zonas afectadas y se observó que existe una respuesta diferente a la infección dependiendo de la familia a la que pertenezca cada planta (Stukely *et al.*, 1994). Continuando estas líneas de investigación, y tomando clones que se obtuvieron como resistentes, se observaron diferencias en las lesiones de las raíces de unos clones con otros (Hüberli *et al.*, 1997). Actualmente la enfermedad se ha estudiado en una gran variedad de especies forestales a las que afecta. Estudios recientes aseguran que el oomiceto afecta de forma diferente a distintas especies del género *Juglans*, identificándolos a través de la longitud de necrosis en raíces (Belisario *et al.*, 2009).

Finalmente se han reportado estudios en los que se observa la diferencia en la susceptibilidad a *P. cinnamomi* de distintas especies de *Quercus*. Así se examinaron una serie de árboles adultos de *Q. rubra*, y se vio la capacidad de resistir al ataque de *P. cinnamomi* de sus raíces, en comparación con otras especies de fagáceas como *Castanea sativa* (Marçais *et al.*, 1996). También mostraron diferencias en la susceptibilidad al patógeno las especies de *Q. engelmannii* y *Q. agrifolia* siendo la primera más susceptible (Garbelotto *et al.*, 2006).

Al igual que otras especies del género *Quercus*, *Q. ilex* y *Q. suber* se han visto afectadas por la patogenicidad causada por *P. cinnamomi*, hasta el punto de verse amenazada su población en lugares donde la enfermedad adquiere una mayor severidad. Dicha severidad incrementa debido a que las condiciones ambientales del medio, favorecen el crecimiento del patógeno influyendo la temperatura, humedad y tipo de suelo de

manera determinante en el desarrollo de *P. cinnamomi*. Para combatir la enfermedad actualmente se llevan a cabo estudios que demuestran la capacidad de determinadas progenies de dichas especies a desarrollar en menor grado la enfermedad (Tapias *et al.*, 2004).

Existen estudios acerca de la capacidad de resistencia de determinadas progenies, que usualmente se controla por genes individuales de resistencia en el hospedador. En esta línea se han reportado estudios que relacionan la capacidad enzimática intrínseca de *Q. suber*, a través de la cinnamyl alcohol dehydrogenase, para desactivar las toxinas producidas por el fitopatógeno (Coelho *et al.*, 2006) y de esta forma se trataría de reducir la activación que produce la infección del oomiceto.

En la actualidad se están llevando a cabo estudios en los que se evidencian las diferencias genéticas de poblaciones de *Q. ilex*, en la variación de la susceptibilidad hacia el patógeno *P. cinnamomi* (Navarro *et al.*, 2004, Moralejo *et al.*, 2009) La capacidad de individuos a sobrevivir en áreas bajo influencias severas de condiciones de estrés asociadas con la seca, y los resultados de test de invernadero, sugieren que *Q. ilex* y *Q. suber* exhiben una variabilidad genética considerable cuando se someten a condiciones de infección por *P. cinnamomi* (Tapias *et al.*, 2005a). Se han realizado estudios preliminares acerca de progenies que presentan supervivencia a niveles medios o moderados de sustrato infectado. De esta forma la tolerancia de individuos de *Q. ilex* y *Q. suber* al patógeno *P. cinnamomi* podría estar relacionado con la resistencia de determinadas progenies a la infección y así establecer una selección de individuos potencialmente resistentes a *P. cinnamomi*.

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo han sido definidos por los protocolos de investigación del proyecto financiado por la Junta de Andalucía y desarrollado por la E.T.S.I, desde el área de Tecnologías del medio ambiente. El proyecto tuvo su inicio en 2008 y se tituló "Selección y propagación de encinas (*Quercus ilex* L.) y alcornoques (*Quercus suber* L.) con alto grado de tolerancia al patógeno *Phytophthora cinnamomi* (RNM-03108)".

El objetivo principal de la presente tesis es seleccionar progenies de *Quercus ilex* spp *ballota* (Desf) Samp. y *Quercus suber* con alto grado de tolerancia al patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Para alcanzar el objetivo principal, se han tenido en cuenta una serie de objetivos parciales:

1. Estudiar el efecto de diferentes dosis de *P. cinnamomi*, en ambas especies de *Quercus*, en parámetros morfo-fisiológicos de plantas producidas en vivero.
2. Estudiar las diferencias entre especies, procedencias y progenies en la formación de raíces y síntomas aéreos.
3. Finalmente evaluar diferencias en parámetros fisiológicos relacionados con la tolerancia a la sequía en plantas de *Q.ilex*, sobre progenies con distintos niveles de tolerancia al patógeno, así como su relación con el potencial de formación de raíces.

**3. CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN
DE LA INFLUENCIA DE LA
DOSIS DE INÓCULO, ESPECIE
HOSPEDADORA Y PROCEDENCIA
DE LAS SEMILLAS EN LA
INFECCIÓN DE *Phytophthora
cinnamomi* a *Quercus ilex*
spp *ballota* Y *Quercus suber*.**

3.1. INTRODUCCIÓN

Frente a la práctica unanimidad en señalar a *P. cinnamomi* como el principal responsable de la mortalidad de los *Quercus* en el suroeste de la Península Ibérica, los factores que hacen que su efecto sea más o menos severo son muy variados, y la importancia de su contribución varía de unas zonas a otras (Tapias *et al.*, 2006). De este modo los parámetros referentes a raíces secundarias, permiten detectar la infección generada por el patógeno (Robin *et al.*, 2001). La existencia de una densidad suficiente de inóculo es una condición necesaria pero no suficiente, ya que también depende de una serie de factores ambientales de la región, además de la mayor o menor susceptibilidad de la especie huésped a *Phytophthora* spp, que como se ha reportado, genera una elevada variabilidad en la afección al sistema radicular dependiendo de la especie hospedante (Moralejo *et al.*, 2009). Los mecanismos de respuesta a *P. cinnamomi* pueden ser similares a los seleccionados como mecanismos de tolerancia/resistencia típicos en cada localidad (Levitt *et al.*, 1980), aún cuando la presencia del patógeno no haya acompañado la evolución de la población hospedante.

Se ha estudiado la concentración de inóculo infeccioso adecuada para que se produzca una infección de manera que se observen los síntomas de la enfermedad a corto plazo en plantas de corta edad (1 ó 2 años). Sin embargo para que se produzca una generación de raíces nuevas ante la presencia de la infección, el tiempo necesario sería más elevado. Por ello se plantea la hipótesis de que exista una mayor afección a través de la aplicación de dosis más elevadas de inóculo.

El decaimiento de especies del género *Quercus* ha sido estudiado en diferentes escenarios y situaciones (Gallego *et al.* 1999; Sánchez *et al.* 2004; Thomas *et al.*, 2002; Caetano *et al.*, 2007) asociado al patógeno *P. cinnamomi*, observándose una variabilidad interespecífica en la agresividad de las afecciones generadas por el patógeno así como en la sintomatología mostrada por el huésped. Se han reportado estudios en Francia sobre la diferencia en la severidad de la acción del patógeno en diferentes especies, observándose cómo para *Q. ilex*, los síntomas son más evidentes que para otras especies como *Q. rubra* y *Q. suber* (Marçais *et al.*, 1996). De esta forma se pretende contrastar la hipótesis de que en el suroeste de la Península Ibérica también se observa la diferenciación en la severidad de la enfermedad en albas especies de *Quercus*.

La amplia distribución de bosques de encina y alcornoque unida a la heterogeneidad de los ambientes que coloniza, implica una alta plasticidad fenotípica a varios niveles (Gratani 1995) lo que indica una gran capacidad de adaptabilidad a diversos factores tanto bióticos como abióticos (Valladares *et al.*, 2000). Las diferentes respuestas morfológicas de distintas poblaciones a los factores de estrés a los que la planta es sometida (generalmente sequía o acción de patógenos) tendrían un empleo práctico en la elección del material para repoblación. Además el tipo de suelo, la topografía y otros factores del lugar, podrían contribuir al incremento de la probabilidad del desarrollo de la enfermedad (Moreira *et al.*, 1997). Así se plantea la hipótesis de que existan variaciones en la afección del patógeno dependiendo de la zona en la que se encuentren distribuidos los ejemplares evaluados.

Así pues en primer lugar se plantea como objetivo la necesidad de determinar el grado de afección causada por distintas concentraciones de micelio de *P. cinnamomi* aportadas a plantas de encina y alcornoque, comprobando la hipótesis nula de que las plantas actuaran de forma similar en las diferentes dosis en base a medidas de parámetros morfológicos radiculares y aéreos. Por tanto se realizará un ensayo de la dosis adecuada necesaria para evaluar las afecciones producidas por el patógeno a medio-largo plazo, que permitan identificar diferencias entre cada una de las progenies estudiadas (Trujillo *et al.*, 2005). Además se pretende observar la diferencia en la sintomatología al variar de forma exponencial la concentración de inóculo y demostrar que existe relación entre la concentración de micelio inoculado a la planta y la agresividad en los síntomas mostrados por los huéspedes o la tardanza en la aparición de síntomas como se estudió para *Capsium annuum* afectadas por *Phytophthora capsici* (Trujillo *et al.*, 2005).

En segundo lugar se pretende observar la diferencia entre las distintas especies evaluadas valorando la sintomatología presente en las plantas objeto de estudio. Por ello se pretende evaluar si esta diferenciación se denota entre las especies de *Q. ilex* y *Q. suber* objeto del presente estudio localizadas en el suroeste de la Península Ibérica.

Finalmente se evaluarán las procedencias para encina y para alcornoque, con el objetivo de determinar si existen diferencias en el comportamiento de las plantas según la región de procedencia de la que provengan. Existe la necesidad de abarcar diversos análisis que conlleven respuestas diferenciales de plantas de distintas procedencias en virtud de su gran variabilidad interpoblacional. La influencia de *P. cinnamomi*, podría estar afectada por factores edáficos y fisiográficos de la región de la que procedan las plantas, como se estudió en bosques de eucaliptos australianos (Weste and Marks. 1987; Marks and Smith. 1991).

El presente capítulo servirá para establecer las dosis adecuadas de inóculo necesarias para evaluar en el siguiente capítulo las diferencias entre familias respecto al de-

sarrollo de la enfermedad, así como para conocer las diferencias en la sintomatología generada en las dos especies de *Quercus* evaluadas, y la influencia de las procedencias respecto a la tolerancia al patógeno.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.2.1. *Phytophthora cinnamomi* Rands.

3.2.1.1. Origen.

Para el estudio de la enfermedad provocada por *P. cinnamomi*, se dispuso de tres cepas diferentes: las dos primeras, aisladas de terrenos muy afectados por la enfermedad en la zona comarca del Andévalo Onubense, en el término municipal de San Bartolomé de la Torre, Huelva (P45 y P37), facilitadas por la Unidade de Ciências y Tecnologías Agrarias de la Universidade do Algarve (Faro) y la tercera (P203) facilitada por la Excma. Diputación Provincial de Pontevedra, Servicio Agrario, estación fitopatológica “Do Areeiro” (Pontevedra), aislados de terrenos afectados en la provincia de Pontevedra. La patogenicidad de las cepas utilizadas en el estudio fue testada en publicaciones anteriores (Sánchez *et al*, 2000; Mansilla *et al*, 1993).

3.2.1.2. Cultivo de *P. cinnamomi*.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento del micelio fue zumo de V8-agar clarificado (Miller 1955). Para la elaboración del medio de cultivo, se añadirán 4,8 g de CaCO₃ a 354 ml de zumo V8 (Juice Vegetable V8) y se agitará con un rotor magnético durante 30 minutos. Posteriormente este preparado se centrifuga a 3.500 rpm durante 15 minutos a 25 °C de temperatura. Una vez centrifugado se toman 100 ml de la solución resultante, se filtra (con papel de filtro) y se enrasa con agua destilada hasta 1 litro (1/10). Para el medio sólido basta con añadir finalmente 15 g de agar puro. A continuación se esteriliza en autoclave (20 min, 121 °C).

Para llevar a cabo la producción de esporangios, se utilizó el método de Zentmyer y Chen (1969). Así se partió de cultivos de *P.cinnamomi* de 2-3 días en medio V8 sólido sin antibióticos incubados a 25°C. Se tomaron pequeños fragmentos de micelio de alrededor de 5mm de diámetro y se transfirieron a placas con medio V8 clarificado (25 fragmentos de micelio por placa). Las placas se incubaron a 25⁰ C durante 24 horas. Posteriormente, los fragmentos de micelio se lavaron a intervalos de 30 minutos con 15- 20 ml de solución salina autoclavada (durante 3 horas aproximadamente). La composición de esta solución salina se detalla en la siguiente tabla:

Solución salina 1	Solución salina 2
13,05g de EDTA	13,05g de EDTA
1,64 g Ca (NO ₃) ₂ (0.01M)	7,5g de KOH
0,05g de KNO ₃ (0.05M)	24,9g de FeSO ₄ (0.16M)
0,48g de MgSO ₄ (0.004M)	
Se enrasa con agua destilada hasta 1 litro	Se enrasa con agua destilada hasta 1 litro

Tabla 3.1. Composición química de dos soluciones salinas empleadas para la producción de esporangios.

Los cultivos se incuban a 25°C en dicha disolución en diferentes placas Petri bajo lámparas de luz fluorescente. La esporulación alcanza su máximo en 24-36 horas, tras las que se añade finalmente agua destilada. Después de 24 horas se observan las placas a microscopio y se seleccionan aquellos fragmentos de micelio que contengan esporangios, que serán los que se utilicen con posterioridad para inocular las plantas. La esporulación se produce a causa de dos situaciones de estrés a la que se somete al patógeno: de un lado, la reducción de nutrientes en el cultivo, y de otro, el efecto que ejercen los cationes liberados por la solución salina (Zentmyer y Chen 1969).

La morfología del micelio era similar en las cepas P45 y P37. Se trata de una estructura blanquecina algodonada de aspecto uniforme con abundante micelio aéreo algodonoso a la semana de crecimiento. En la cepa P203 se observó la estructura del micelio algo más translúcida. Los esporangios se observaron a microscopio óptico a 40x 10 aumentos y se caracteriza por ser no papilados, persistentes, de forma y tamaño bastante variables dependiendo de las condiciones nutricionales. La morfología se detectó ovoides-elipsoides, con un tamaño comprendido entre 25-100 x 18-43 μ con abundante proliferación interna. El micelio en la mayoría de los casos no tabicado, ramificado y las hifas suelen ser coraloides con hinchamientos hifales esféricos (hiphal swellings). Además se observa la presencia de clamidosporas o estructuras de resistencia caracterizándose por su pared gruesa opaca (Mansilla *et al.*, 1993). La presencia de abundantes clamidosporas se comprobó mediante la preparación de montajes microscópicos de pequeñas cantidades de inóculo teñidas con fucsina ácida en lactofenol al 0,005%, y su posterior observación a microscopio óptico (Navarro *et al.*, 2004).

3.2.1.3. Preparación del inóculo infectivo.

Antes de la preparación del inóculo el micelio debe madurar en medio líquido para así favorecer la generación de zoosporas a partir de esporangios y para evitar el efecto contaminante que puede ejercer el agar que contiene el medio V8 sólido, en las plantas. Para preparar el medio V8 líquido se procede, al igual que en el subapartado

1.2 del presente capítulo. Este medio líquido se depositará en placas de Petri a razón de 20ml por placa.

De esta forma se tomaron las 3 cepas, al igual que se reportó por Robin *et al.* (2001), habiendo madurado durante una semana (en medio V8 sólido), y se cortaron fragmentos de 5 mm de diámetro que se depositaron en las placas que contenían el medio líquido. El micelio producido durante un mes a 20°C y en condiciones de oscuridad tras ser separado del medio nutritivo y lavado con agua destilada se utilizará para la preparación del inóculo líquido.

El inóculo líquido se preparó según la metodología descrita por Sánchez *et al.*, 2000, batiendo en agua estéril el micelio activo lavado de cada una de las 3 cepas objeto de estudio.

3.2.1.4. Dosis del inóculo infectivo.

Para determinar de la dosis apropiada para las observaciones de síntomas en la planta a medio-largo plazo y habiendo evaluado a priori (apartado 3.2.1.2) las condiciones óptimas para el desarrollo de esporangios y clamidosporas en cultivos de V8 líquido, se elaboraron diferentes disoluciones atendiendo a la concentración de micelio activo de *P. cinnamomi* en disolución. De esta forma se establecieron 5 dosis diferentes tal y como se observa en la Tabla 3.2. La Dosis 1 (D1) corresponde a la disolución de ½ placa de Petri de cada una de las cepas (1 placa y ½ en total), de *P. cinnamomi* en 300ml de agua destilada. Así se fue incrementando exponencialmente la dosis, multiplicando por 2 la dosis anterior, de manera que para la Dosis 5, se elaboró una disolución de micelio del contenido de 24 placas de Petri con 300 ml agua destilada.

Dosis	Composición del inóculo infectivo
D1	Contenido de micelio de 1,5 placa Petri (½ de cada cepa) de <i>P. cinnamomi</i> + 300 ml agua destilada.
D2	Contenido de micelio de 3 placas Petri (1 de cada cepa) de <i>P. cinnamomi</i> + 300 ml agua destilada.
D3	Contenido de micelio de 6 placas Petri (2 de cada cepa) de <i>P. cinnamomi</i> + 300 ml agua destilada
D4	Contenido de micelio de 12 placas Petri (4 de cada cepa) de <i>P. cinnamomi</i> + 300 ml agua destilada.
D5	Contenido de micelio de 24 placas Petri (8 de cada cepa) de <i>P. cinnamomi</i> + 300 ml agua destilada.

Tabla 3.2. Concentraciones de las diferentes dosis de inóculo de *P. cinnamomi*.

Tras mezclar el agua con las diferentes concentraciones de micelio, se batirán y se tomará de cada una de estas dosis 10 ml de disolución de inóculo infectivo para cada plantas a inocular aportando la cantidad de micelio indicada al cepellón de la planta, a través de una inyección del preparado en tres puntos diferentes del mismo, para así asegurar el reparto uniforme de la mezcla (Tello *et al.*, 1991).

3.2.1.5. Comprobación de la infección.

Para comprobar que el desarrollo de la infección se ha generado en las plantas que se inocularon con *P. cinnamomi*, se tomaron fragmentos de 2cm de longitud de raíces necrosadas y fueron lavadas durante 4 horas en agua corriente. Estas raíces necróticas se cortan en segmentos de 3-4mm con un bisturí estéril y se colocaron en placas Petri que contenían 20 ml de medio selectivo NARPH. Este medio se prepara añadiendo a 1 litro de extracto de V8 clarificado 0,03 g de Nistatina, 0,250 g de Ampicilina sódica, 0,01 g de Rifampicina, 0,1 g de Pentacloronitrobenzeno y por último se añade Hymexaxol 71mg/l, (Romero *et al.*, 2007). Se cultivaron 10 placas con 6 fragmentos cada una de raíces control e igual para inoculadas y se incubaron durante 4 días a 25°C en oscuridad.

3.2.2. Material Vegetal.

3.2.2.1. Especies objeto de estudio.

En el presente capítulo se estudiarán las especies de *Quercus* más representativas del suroeste de la Península Ibérica, *Q. ilex* ssp *ballota* y *Q. suber*, que actualmente se encuentran afectadas por la enfermedad de la seca.

3.2.2.2. Procedencia de las semillas.

Las semillas de *Q. ilex* spp *ballota* se recogieron durante los meses de octubre-noviembre de 2008 en 3 zonas pertenecientes a dos regiones de procedencia diferentes. La primera zona de estudio es la Comarca del Andévalo (Huelva), de donde se recolectaron semillas de 3 términos municipales diferentes: Puebla de Guzmán, Paymogo y Villanueva de los Castillejos. La segunda zona de estudio se localiza en la comarca de la Sierra de Aracena, habiendo recogido bellotas de dos términos municipales diferentes: Castaño del Robledo y Campofrío. Ambas comarcas se sitúan en la región de procedencia denominada Región Extremadura (RE) que se dispone en la zona suroccidental de la Península Ibérica con una superficie de 54.800km² y una altitud que varía entre 200 y 800 m. La temperatura media en esta región gira en torno a 13,9°C con unas precipitaciones que oscilan entre 75 y 100 mm en episodios lluviosos. Según Allué (1990) esta región pertenece al subtipo fitoclimático Mediterráneo arbóreo genuino (*esclerófilo*) y subnemoral (*esclerófilo exclusivo subnemoral continental*). El tipo de suelo es silíceo Cambisol dístico y eútrico con un pH que oscila entre 6,0 y 6,7.

La tercera y última zona de estudio se encuentra situada en el término municipal de Cortes de la Frontera (Málaga) en la región de procedencia de Sierra de Cádiz y Ronda (SCR) con una superficie de 1.900km² y un intervalo de altitud de 600m. El tipo

fitoclimático es Mediterráneo arbóreo genuino (*esclerófilo exclusivo menos seco*) con un tipo de suelo calizo con pH básico (7,0-8,5) regosol calcárico y cambisol calcárico. La temperatura media oscila alrededor de 18 y 14,5°C, con las mayores precipitaciones anuales de la Península Ibérica llegando a 500 mm en periodos de lluvias.

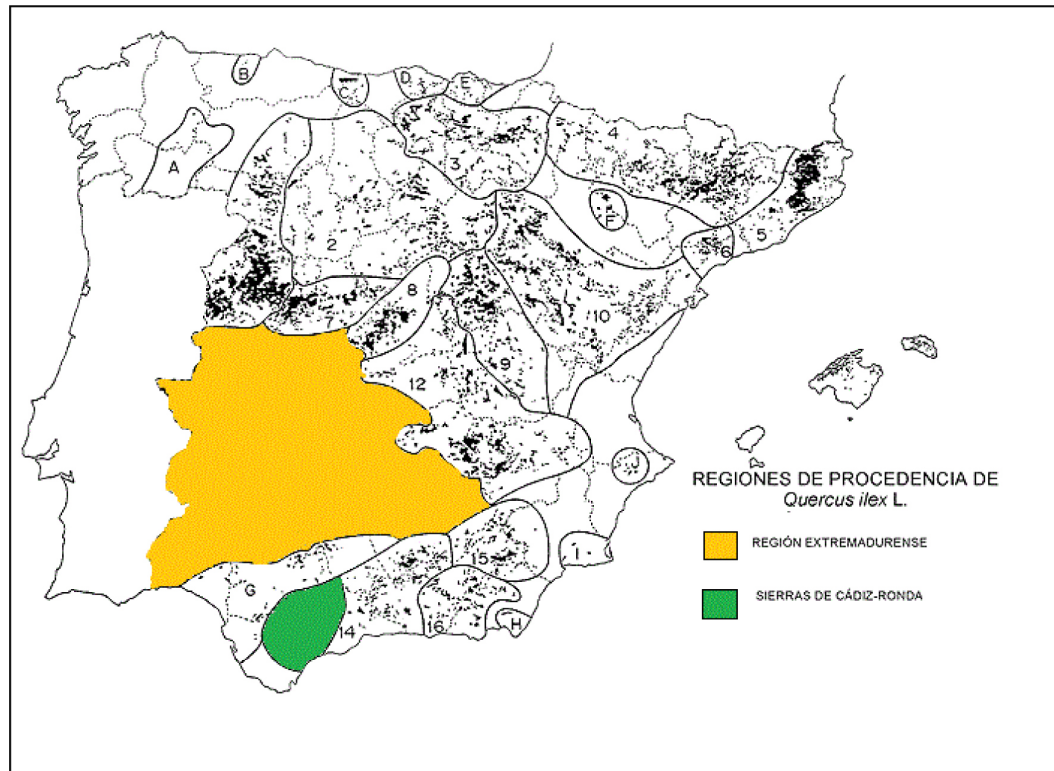


Figura 3.1. Regiones de procedencias de *Q. ilex* spp *ballota* objeto de estudio.

Las bellotas de alcornoque se recogieron durante el otoño-invierno de 2008 en cuatro localidades situadas en dos regiones de procedencia diferentes con condiciones climáticas variables entre las distintas regiones. Las dos primera localidades se sitúan en los términos municipales de Los Barrios (Cádiz) y Cortes de la Frontera (Málaga) perteneciendo ambas a la región de procedencia Parque de los Alcornocales- Serranía de Ronda (PASR). Esta región dispone de una superficie aproximada de 22.900 km², localizándose a una altitud de entre 100 y 800 m. Corresponde al subtipo fitoclimático mediterráneo arbóreo genuino (*subtropical* y *esclerófilo exclusivo menos seco*) según subtipos descritos por Allué (1990). La temperatura media anual es de 16,5°C, con precipitaciones que alcanzan los 100mm en los meses lluviosos. El tipo de suelo en el que se disponen estos bosques es cambisol eútrico de textura silíceo con un pH que se encuentra en torno a 4,7 (Clasificación FAO 1990).

Las 2 localidades restantes, Almodôvar y Ponte de Sor se localizan en la región de Alentejo en Portugal, perteneciendo a la región de procedencia SBRP II, situándose conforme se observa en la Figura 3.2:

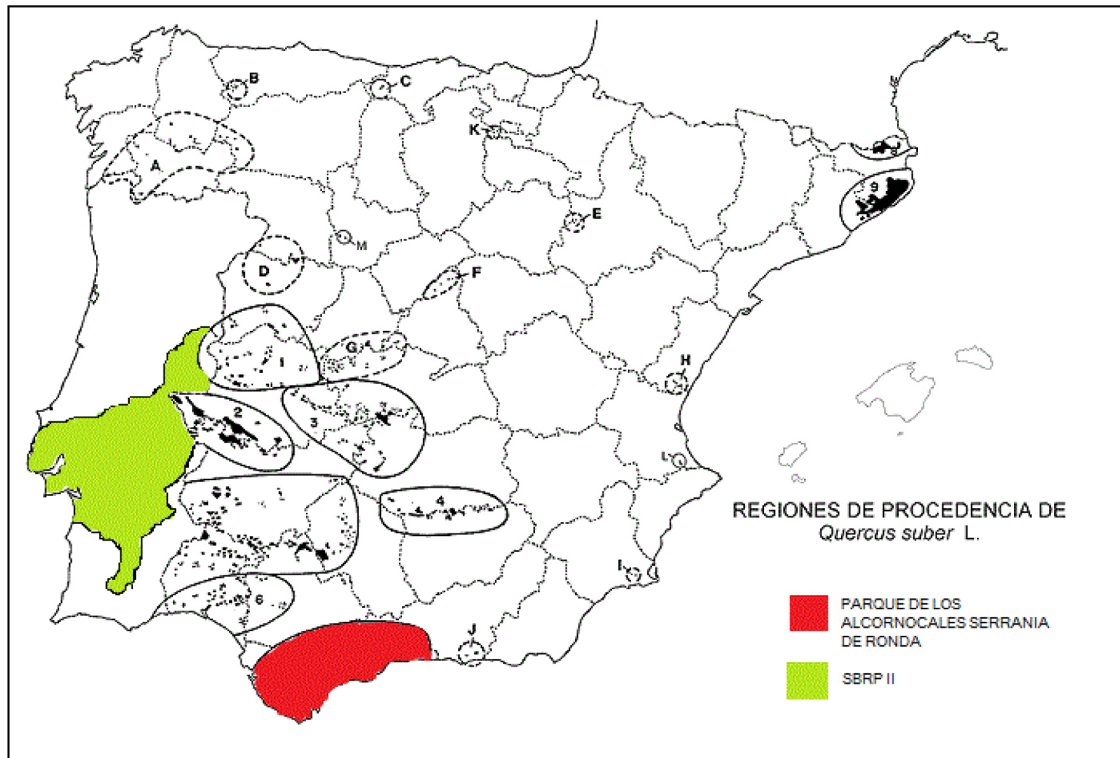


Figura 3.2. Regiones de procedencias de *Q. suber* objeto de estudio.

Esta región se caracteriza por poseer una superficie de 29.750 km² con una altitud media de 200 m pudiendo llegar hasta los 900 m de máxima. La precipitación media anual gira en torno a 700-800 mm y la temperatura varía desde los 7,5^oC de media en invierno hasta 17,5^oC de media en verano. El tipo de suelo es arenosol calcárico con texturas areno-arcillosas (Clasificación FAO 1989).

3.2.2.3. Recolección de semillas.

Las bellotas de ambas especies se recogieron durante los meses de Noviembre-Diciembre de 2008. De cada región de procedencia, se seleccionaron 10 árboles separados entre ellos por más de 100 metros para así evitar posibles parentescos. Se recolectó una media de 200 semillas por árbol. Las semillas fueron limpiadas y desinfectadas con NaClO (0.1% v/v), desechando aquellas que se encontraban en mal estado y dejándolas secar durante 3 días a temperatura ambiente. Posteriormente se conservaron en una cámara frigorífica a 4^oC en oscuridad.

3.2.2.4. Cultivo.

En Febrero de 2009 se tomaron 1.500 semillas por procedencia de cada una de las especies objeto de estudio, y se pusieron a pregerminar en el laboratorio en bandejas con perlita húmeda a una temperatura constante de 25^oC (Carevic *et al.*, 2010).

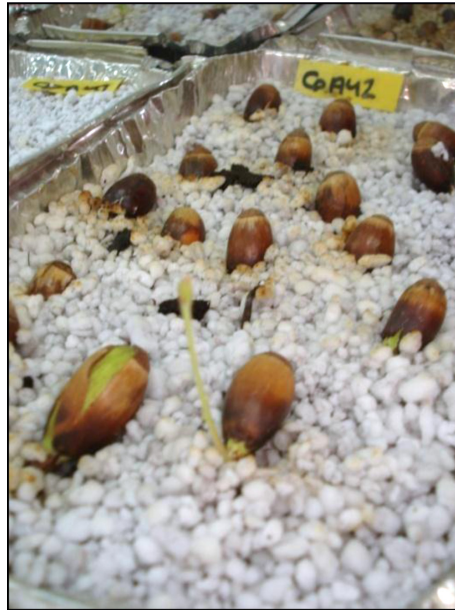


Figura 3.3. Germinación de semillas en perlita húmeda.

En la primera semana de marzo de entre las plantas pregerminadas de forma satisfactoria se sembraron un total de 1.000 semillas germinadas de cada procedencia. Para llevar a cabo la siembra de las semillas, se elaboró un sustrato resultado de la mezcla de 3/1 turba negra y vermiculita (Navarro *et al*, 2004), disponiéndose en alveolos de 330 ml Superleach® Bardi. Las familias fueron distribuidas aleatoriamente en 115 bandejas de 35 alveolos, identificando las diferentes procedencias y familias a través de etiquetas. Las plantas crecieron en vivero bajo una malla que reducía la radiación un 50%. El riego fue continuo según necesidad y las bandejas se movieron periódicamente durante el ciclo de crecimiento para así evitar efectos debidos al posicionamiento.

3.2.2.5. *Infección.*

Para proceder a la inoculación de las plantas se tomaron 10 ml de inóculo infectivo y se inyectará en distintos puntos del cepellón de la planta para favorecer la completa absorción del inóculo a través del sustrato.

3.2.2.6. *Trasplante.*

Tras la inoculación, y para favorecer las condiciones de infección y generación de zoosporas, las plantas se dispondrán en cajas de poliestireno expandido de 45 litros (40 x 49 cm) a razón de 25 plantas por caja conteniendo perlita húmeda. Las condiciones de humedad y temperatura están en todo momento controladas (HR>70%; T^a 20-35°C) durante el periodo requerido para cada uno de los ensayos que se van a realizar. Las cajas son totalmente opacas e impermeables por lo que presencia del agua en el inte-

rior se estimaba de acuerdo a la Ley Hidrostática de los Vasos Comunicantes (VC). Se trata de un sistema tubería conectado a la caja donde se disponen las plantas por lo que el líquido se halla en equilibrio en los dos vasos a la misma altura (Figura 3.4). Las cajas con las plantas incluidas se someterán a ciclos de encharcamiento-sequía durante la duración del ensayo para favorecer el desarrollo de la infección, de manera que se mantendrán 2 días con la mitad del cepellón encharcado y posteriormente se eliminará el agua de las cajas manteniéndose 5 días en condiciones de sequía.

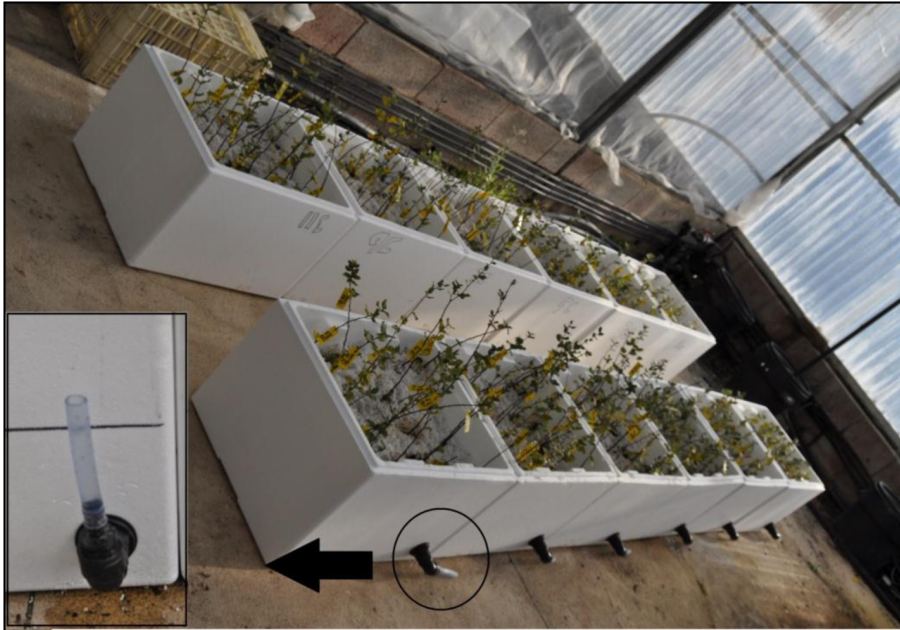


Figura 3.4. Disposición de las plantas en cajones, a la izquierda codo con tubería transparente que indica el volumen de agua en el interior de la caja.

3.2.2.7. Evaluación de la regeneración de raíces.

En la figura 3.6 se representan los parámetros que participan en el potencial de formación de raíces (PFR). En primer lugar, el peso fresco de raíces secundarias nuevas (PRN) generadas en el exterior del cepellón que crecieron en la perlita, con balanza digital ($e = \pm 0,001g$), además de la longitud de raíces secundarias nuevas (LRN) con cinta métrica flexible $e = \pm 0,1cm$ (Villar *et al.*, 1997). Posteriormente se desmontó el cepellón de turba que contenía la planta, con cuidado de no dañarla, y se lavó hasta conseguir obtener la totalidad de raíces que se formaron en el interior del cepellón. Se denomina a este parámetro peso fresco de raíces secundarias (PRS) y una vez desprendidas las raíces secundarias, se tomará el peso fresco de raíz principal (PRP) contenidas en el cepellón de turba formadas antes de la infección con balanza digital ($e = \pm 0,001g$), así como la longitud de raíz principal con cinta métrica flexible $e = \pm 0,1cm$. Además se contabilizó la cantidad de fragmentos de raíces secundarias nueva generados en el exte-

rior del cepellón (F), así como las puntas activas en crecimiento (P) y las ramificaciones del total de los fragmentos evaluados (R). Se comprobó que el porcentaje de humedad de las raíces no difiere entre especies y tratamientos, siendo el peso seco un 30% menos que el peso de raíces saturadas en agua.

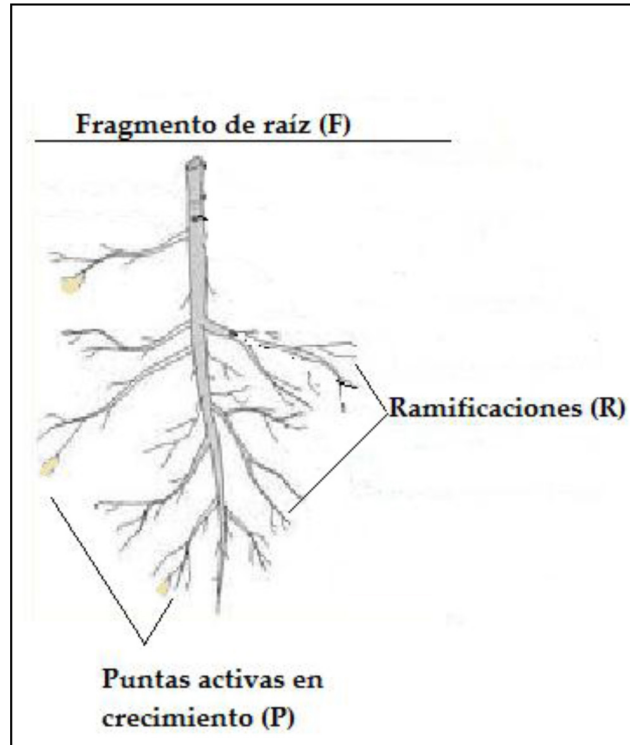


Figura 3.5. Representación de fragmento de raíz (F) tomado del exterior del cepellón, puntas activas en crecimiento (P) y ramificaciones (R).

Por último se determinó el estado óptimo de la planta a través de la evaluación visual de raíces VR (Sánchez *et al.*, 2000), por el que se establece una escala diferenciando a través de clases el grado de necrosis en las raíces evaluadas (Tabla 3.3). Las raíces necrosadas se detectaban visualmente al fraccionar, con ayuda de la uña, la raíz y observar el desprendimiento del xilema y el floema de manera desigual.

Clase	Porcentaje de afección	de Sintomatología radicular	Sintomatología aérea
0	0-10%		
1	10-25%		
2	26-75%	Necrosis radicular	Defoliación y/o marchitez foliar
3	76-90%		
4	91-100%		

Tabla 3.3. Diferenciación de distintas clases de afección en plantas evaluadas atendiendo a la sintomatología radicular presentada (VR) y a la sintomatología aérea (VA), dependiendo del porcentaje de afección.

3.2.2.8. Evaluación de parámetros morfológicos aéreos.

Dentro de los atributos aéreos se tomaron mediciones del tallo principal, peso fresco (PTP) en gramos, longitud del tallo principal (LTP) en cm y el número de hojas de cada planta (NHJ).

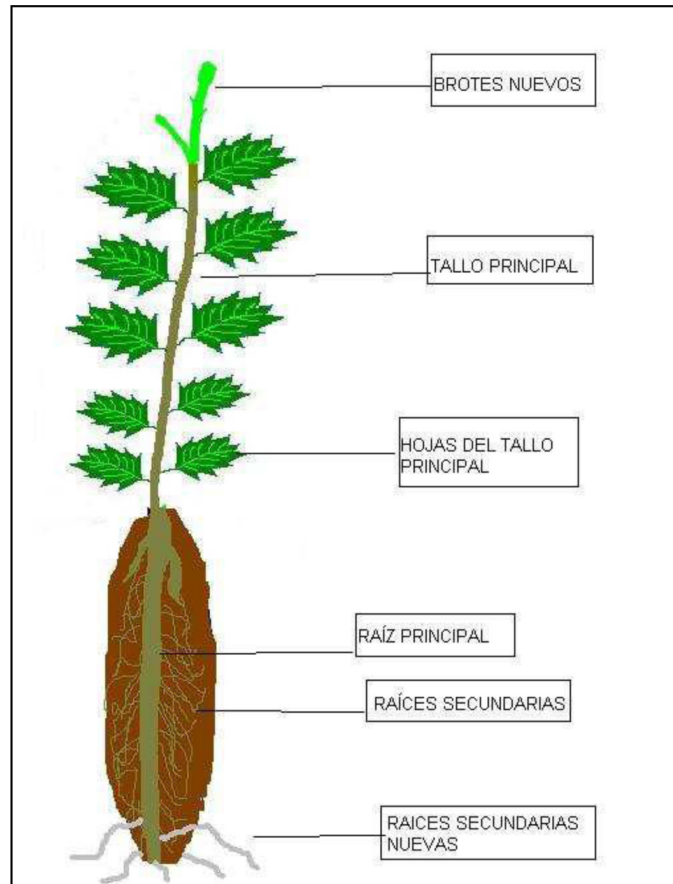


Figura 3.6. Distintos componentes morfológicos radiculares y aéreos evaluados en el ensayo.

Además se evaluó visualmente el grado de defoliación y/o marchitez foliar (VA) de cada una de las plantas según la escala utilizada por Sánchez *et al.*, (2000) presentada en la tabla 3.3.



Figura 3.7. Sintomatología mostrada por plantas afectadas por la enfermedad. Clase 4.

3.2.2.9. *Potencial hídrico al amanecer (Ψ).*

La medida del potencial hídrico xilemático de las plantas (Ψ) que se efectuó utilizando una cámara de presión (Modelo 1000, PMS Instruments, Corvallis, OR, USA). Se seleccionaron dos hojas de cada planta que en el momento del muestreo aún no recibían luz solar directa. Fueron conservadas refrigeradas y en oscuridad hasta su traslado al laboratorio, en un plazo máximo de 30 minutos, dentro de bolsas de plástico (Carevic *et al.*, 2010) efectuando la medida del Ψ en dicho instante.

3.2.3. *Diseño de los experimentos.*

3.2.3.1. *Efecto de la dosis sobre el grado de afección de *P. cinnamomi* en plantas de *Q. ilex* y *Q. suber*.*

Para el presente ensayo se tomaron 150 plantas de cada especie. En diciembre de 2009 se procederá a la inoculación con las distintas dosis. Se dispone de 25 plantas por un total de 5 dosis además de 25 plantas testigo, para *Q. ilex* y *Q. suber*. De cada especie, cada una de las dosis, se dispondrán en una caja independiente de las otras. Así se tienen 6 cajas para encinas y 6 para alcornoques (el control se sitúa también en un cajón

independiente). Las plantas se someten a ciclos de encharcamiento (2 días) y sequía (5 días) en cada semana del ensayo. La combinación de saturación hídrica y periodos de estrés (sequía) del suelo favorece la infección radicular y acelera la expresión de síntomas de la enfermedad (Shearer y Tippet 1989). En este escenario se mantienen durante un mes. Pasado un mes (principios de febrero de 2010), se extrae el cepellón del cajón con perlita y se valoran cada una de las plantas. Las plantas evaluadas en el ensayo fueron 15 plantas de cada uno de los tratamientos Control, D1, D3 y D5. Los factores evaluados en las plantas del presente ensayo fueron los siguientes: Ψ , PRN, LRN, PRS, PRP, VR, PTP, LTP, NHJ y VA.

3.2.3.2. Diferenciación entre especies de *Q. ilex* spp *ballota* y *Q. suber*.

Se tomaron un total de 380 plantas de cada especie germinadas en vivero de 1 savia de 4 regiones de procedencia distribuidas a través del suroeste de la Península Ibérica (para así asegurar la variabilidad en las semillas de cada especie). En marzo de 2010 se procedió a la inoculación con la concentración de micelio de la dosis 3 valorada en el ensayo anterior para así poder llevar a cabo un ensayo de valoración de severidad de síntomas aéreos (VA) y radiculares (VR), siguiendo la metodología de Sánchez *et al.*, (2000) de cada planta (Tabla 3.3). Del total de plantas de cada especie 250 fueron inoculadas y 130 se tomaron de testigo. Las plantas se sometieron a ciclos de encharcamiento-sequia, tal y como se desarrolló en el apartado anterior. El ensayo discurrió en los meses de abril y julio de 2010, durante 16 semanas, tomándose medidas de severidad de síntomas (Tabla 3.3) a la finalización del estudio.

3.2.3.3. Influencia de la procedencia de plantas de *Q. ilex* spp *ballota* y *Q. suber* en el desarrollo de la infección por el patógeno *P. cinnamomi*.

A principios de enero de 2011 cuando las plantas alcanzaron cerca de 2 años de edad, se tomaron 35 plantas por procedencia de cada especie y se inocularon utilizando la dosis D2 trasplantándolas inmediatamente después (como en los ensayos anteriores) a cajones que se someterán a ciclos de encharcamiento-sequia (2-5 días) durante 20 semanas y se tomaran 35 plantas por procedencia de testigo. Un total de 70 plantas por cada una de las dos procedencias de cada especie. La toma de datos se llevó a cabo en mayo de 2011. Para determinar la diferenciación entre las procedencias de las semillas de las que se dispone, se procederá a evaluar los diferentes parámetros de raíz: PRN, LRN, F, P, R; así como síntomas aéreos: LTP, SF, NHJ, VA.

3.2.4. Análisis estadístico.

El efecto de la dosis de inóculo infectivo en el desarrollo de las variables dependientes que forman el potencial de formación de raíces y el potencial hídrico de las plantas de *Q. ilex* fue evaluado a través de un ANOVA siguiendo un modelo lineal general (GLM). La normalidad de los datos fue evaluada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico de Levene. Las variables PRN, LRN, PRS, VR y VA, fueron transformadas ($\ln(x)$), para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. En datos de plantas de *Q. suber* no fue necesario realizar ninguna transformación de las variables. Las diferencias significativas entre los distintos parámetros medidos fueron evaluadas mediante el test de Tukey-b, con $p=0,05$.

El efecto de la inoculación y la procedencia en la morfología de parámetros morfológicos radiculares y aéreos fue evaluado usando el siguiente modelo lineal general (GLM):

$$y_{ijk} = \mu + T_i + PR_j + T*PR_{ij} + \hat{\epsilon}_{ijk}$$

(1)

donde y_{ijk} es el valor de la variable dependiente en la planta k inoculada con el tratamiento i de N ($i = 1, 2$), perteneciente a la procedencia j ($j = 1, 2$); μ es la media general; T y PR son los efectos fijos de la inoculación y la procedencia; el término doble representa la interacción entre los mismos; y $\hat{\epsilon}$ es el término de error bajo la hipótesis $\hat{\epsilon}_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_{\epsilon})$. Una serie de variables fueron transformadas ($\ln(x)$), para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Estas variables fueron para *Q. ilex*: PRN, LRN, R y LTP; mientras que para *Q. suber* fueron: PRN, LRN, F, P, R, LTP y NHJ. Las diferencias significativas entre los distintos efectos fueron evaluadas mediante el test de Tukey-b, con $p = 0,05$.

Para evaluar el efecto de la especie en el desarrollo de la infección se realizó un ANOVA, previa transformación (Va^3) para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, siguiendo el presente modelo:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + SP_j + T*SP_{ij} + \hat{\epsilon}_{ijk}$$

(2)

donde y_{ijk} es el valor de las variables dependientes (VA, VR) en la planta k inoculada con el tratamiento i de N ($i = 1, 2$), perteneciente a la especie j ($j = 1, 2$); μ es la media general; T y SP son los efectos fijos de la inoculación y la especie; el término doble re-

presenta la interacción entre los mismos; y ϵ es el termino de error bajo la hipótesis $\epsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$. Todos los análisis estadísticos realizados se realizaron con el software SPSS® (versión 19.0, Chicago, USA).

Las correlaciones entre diferentes variables se analizaron a través de una correlación lineal de Pearson.

3.3. RESULTADOS.

3.3.1. Comprobación de la infección.

En todas las placas infestadas se obtuvieron colonias no sucedió en las testigo. Finalmente se traspasaron a medio V8 sólido y después de una semana se identificó como *P. cinnamomi* bajo microscopio por observación directa de características morfológicas del micelio.

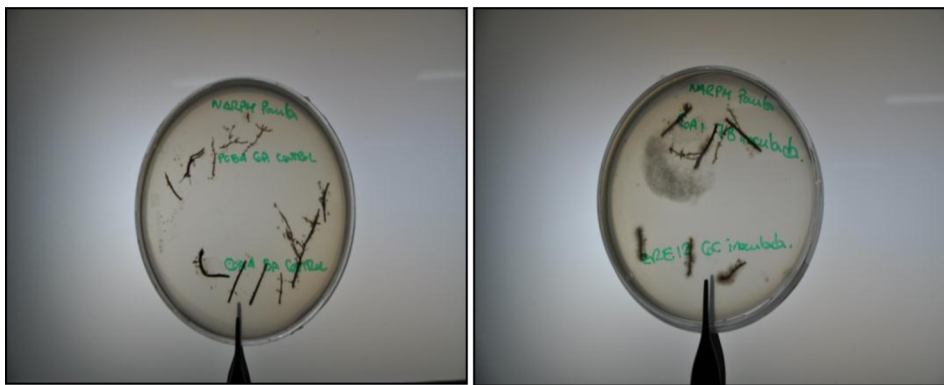


Figura 3.8. Placas Petri con raíces secundarias creciendo en medio selectivo NARPH. Izquierda: raíces secundarias de plantas control; Derecha: raíces secundarias de plantas infestadas con *P. cinnamomi*.

3.3.2. Efecto de la dosis de *P. cinnamomi* en plantas de *Q. ilex* y *Q. suber*.

3.3.2.1. *Quercus ilex* spp *ballota*.

La dosis de patógeno originó diferencias significativas en la producción de raíces nuevas tras 45 días de inoculación. En la tabla 3.4 se representa la tendencia seguida por los datos en los parámetros peso de raíces nuevas (PRN), longitud de raíces nuevas (LRN) y peso de raíces secundarias (PRS) entre las dosis. El análisis univariante a través de un modelo lineal general, desveló diferencias significativas entre tratamientos en las variables peso de raíces nuevas (PRN) y longitud de raíces nuevas (LRN) con valores de $p=0,019$ y $0,007$ respectivamente. Se observó la proliferación de raíces nue-

vas en la totalidad del cepellón en todas las plantas testigo mientras que en plantas inoculadas las raíces secundarias nuevas se desarrollaron a partir en la mitad superior del cepellón coincidiendo con la fracción “no encharcada” de éste.

En relación a las raíces formadas antes de la inoculación (principal y secundarias dentro del cepellón) no se encontraron diferencias significativas para las variable Peso de las raíces secundarias en el cepellón (PRS) ni valoración visual del grado de daños de las raíces secundarias (VR).

	PRN	LRN	PRS	PRP	LRP	VR
C	0,098±0,024	18,847±3,722	0,925±0,074	3,003±0,342	11,173±0,288	2,333±0,187
D1	0,055±0,018	13,067±3,756	0,912±0,163	3,844±0,320	12,900±0,620	2,400±0,131
D3	0,028±0,010	8,167±1,996	0,665±0,088	3,310±0,402	12,500±0,272	2,667±0,126
D5	0,021±0,006	5,387±1,186	1,120±0,163	3,285±0,418	11,100±0,522	2,400±0,190
TOTAL	0,050±0,004	11,367±0,763	0,905±0,024	3,361±0,045	11,918±0,118	2,450±0,019
p	0,019	0,007	0,65	0,82	0,008	0,45

Tabla 3.4. Valores medios (±ET) de parámetros morfológicos de raíz y nivel de significación para dosis de inóculo infectivo estudiada. C: control, D1 a D5 dosis crecientes de micelio de *P. cinnamomi* (n_d=15) en plantas de 1 año de *Q. ilex*. PRN: peso de las raíces nuevas, LRN: longitud de las raíces nuevas; PRS: peso de las raíces secundarias, PRP y LRP: peso y longitud de la raíz principal, VR: valoración visual de las raíces.

El análisis estadístico de parámetros morfológicos aéreos mostró diferencias significativas entre tratamientos, según se observa en la tabla 3.5. No se encontraron diferencias significativas en el número de hojas (NHJ) ni en la valoración visual de la parte aérea (VA). Las diferencias significativas en el peso (PTP) y longitud del tallo principal (LTP) son debidas a que las plantas empleadas en las dosis altas eran ligeramente más grandes que las plantas testigo, pues su crecimiento se originó antes de la inoculación.

	PTP	LTP	NHJ	VA
C	1,786±0,139	10,553±0,749	13,000±0,617	1,600±0,214
D1	1,571±0,168	9,267±0,977	11,867±1,183	1,667±0,159
D3	1,279±0,157	7,100±0,802	11,133±0,956	1,667±0,159
D5	2,311±0,258	11,787±0,707	12,200±0,835	1,867±0,215
TOTAL	1,737±0,056	9,677±0,258	12,050±0,100	1,700±0,015
p	<0,001	<0,001	0,405	0,773

Tabla 3.5. Valores medios (±ET) de parámetros morfológicos aéreos y nivel de significación para dosis de inóculo infectivo estudiada. C: control, D1 a D5 dosis crecientes de micelio de *P. cinnamomi* (n_d=15) en plantas de 1 año de *Q. ilex*. PTP: peso del tallo principal, LTP: longitud del tallo principal, NHJ: número de hojas, VA: valoración visual de la parte aérea.

El ANOVA sobre potencial hídrico (Ψ) muestra diferencias significativas entre los potenciales hídricos de las plantas sometidas a distintas dosis de patógeno ($p=0,002$; $n=60$). En la Tabla 3.6 se contempla la tendencia de las plantas a reducir el potencial

hídrico a medida que se aumenta la dosis de inóculo. El Ψ en plantas control es significativamente mayor que en inoculadas.

C	D1	D3	D5	TOTAL
-1,25MPa±0,015a	-1,78MPa±0,016ab	-2,09MPa±0,016b	-2,11MPa±0,016b	-1,80MPa±0,016

Tabla 3.6. Valores medios (\pm ET) de potencial hídrico (MPa) para *Q. ilex* respecto a la dosis de inóculo infectivo. C: control, D1 a D5 dosis crecientes de micelio de *P. cinnamomi*. (a y b desvelan subconjuntos homogéneos significativamente diferentes a través de un test Tukey).

Al analizar la relación entre cada uno de los parámetros medidos se observa como LRN y PRN se encuentran íntimamente correlacionados ($r=0,791$, $p<0,001$, $n=60$). Además se muestra una correlación bilateral positiva al nivel $p=0,005$ entre los parámetros nombrados y PRS. Este último parámetro se encuentra relacionado con todos los parámetros de raíz exceptuando LRP. Como cabe esperar, todos los parámetros relacionados con las medidas realizadas en el tallo principal, manifiestan correlaciones positivas entre ellos, evaluado a través de una correlación de Pearson, donde el coeficiente de correlación fue positivo y con $p<0,005$.

	PRN	LRN	PRS	PRP	LRP	PTP	LTP	NHJ	VR
LRN	0,785**	1							
PRS	0,191	0,234	1						
PRP	0,139	0,223	0,367**	1					
LRP	0,025	0,183	-0,174	0,314*	1				
PTP	0,054	0,109	0,430**	0,620**	-0,088	1			
LTP	0,088	0,116	0,424**	0,438**	-0,144	0,816**	1		
NHJ	0,146	0,171	0,228	0,249	-0,031	0,464**	0,551**	1	
VR	-0,129	-0,260*	-0,426**	-0,338**	-0,042	-0,396**	-0,323*	-0,087	1
VA	0,118	0,101	-0,15	-0,206	0,065	-0,042	0,05	-0,034	0,042

Tabla 3.7. Matriz de correlación de Pearson entre cada uno de los parámetros morfológicos evaluados en *Q. ilex* ($n=60$). PRN= peso de raíces nuevas; LRN= longitud de raíces nuevas; PRS= peso de raíces secundarias; PRP= peso de raíz principal; LRP= longitud de raíz principal; PTP= peso del tallo principal; LTP: longitud del tallo principal; NHJ= número de hojas; VR= valoración de raíz; VA= valoración aérea. **=La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral), *=La correlación es significante al nivel 0.05 (bilateral).

3.3.2.2. *Quercus suber*.

El análisis estadístico (tablas 3.8 y 3.9) mostró diferencias significativas en algunos de los parámetros morfológicos estudiados en las raíces de las plantas de *Q. suber*. Se

observó la proliferación de raíces nuevas en la totalidad del cepellón en todas las plantas testigo e inoculadas.

	PRN	LRN	P/L	PRS	PRP	LRP
C	0,513±0,145	29,77±4,59	0,015±0,002	1,849±0,201	7,603±0,891	11,63±0,32
D1	0,382±0,076	50,50±7,11	0,007±0,001	1,342±0,138	7,644±0,617	12,23±0,39
D3	0,359±0,069	46,67±5,73	0,008±0,001	1,205±0,129	7,757±0,751	11,78±0,28
D5	0,356±0,074	42,33±7,86	0,008±0,001	1,863±0,186	8,382±0,920	11,92±0,48
Total	0,403±0,047	42,32±3,30	0,010±0,001	1,555±0,089	7,828±0,390	11,89±0,18
p	0,618	0,132	0,013	0,005	0,668	0,562

Tabla 3.8. Valores medios (±ET) de parámetros morfológicos de raíz y nivel de significación para Dosis de inóculo infectivo. C: control, D1 a D5 dosis crecientes de micelio de *P. cinnamomi* ($N_d=15$) en plantas de 1 año de *Q. suber*. PRN: peso de las raíces nuevas, LRN: longitud de las raíces nuevas; PRS: peso de las raíces secundarias, PRP y LRP: peso y longitud de la raíz principal.

	VR	F	P	R
C	1,53±0,26	11,13±1,48	3,80±0,87	36,20±4,87
D1	2,20±0,20	14,73±2,11	2,47±0,59	17,73±3,25
D3	2,47±0,17	15,60±2,99	3,00±0,64	18,13±2,55
D5	2,15±0,19	14,85±2,11	3,54±0,78	20,62±4,11
Total	2,09±0,11	14,05±1,12	3,19±0,36	23,26±2,11
p	0,016	0,345	0,528	0,001

Tabla 3.9. Valores medios (±ET) de parámetros morfológicos de raíz y nivel de significación para dosis de inóculo infectivo. C: control, D1 a D5 dosis crecientes de micelio de *P. cinnamomi* ($n_d=15$) en plantas de 1 año de *Q. suber*. VR: valoración visual de las raíces; F: número de fragmentos de raíz, P: número de puntas blancas, R: número de ramificaciones.

Aunque no se observaron diferencias significativas respecto al peso de raíces nuevas (PRN) si se observa una tendencia descendente a medida que se aumentó la dosis del inóculo infectivo. Sin embargo LRN incrementó de C a D1, descendiendo en las siguientes dosis. El peso de las raíces secundarias (PRS), la valoración de las raíces (VR) y el número de ramificaciones (R) muestran diferencias significativas según la dosis de inóculo. Las plantas inoculadas presentan mayores síntomas de daños en las raíces (VR > 2,1 frente a 1,5 de los control) y menor número de ramificaciones (entre 17 y 29 frente a las 36 de los controles). Aunque el peso y la longitud de las raíces nuevas no mostró diferencias significativas se observa que la infección provoca una mayor elongación de las raíces (40 a 50 mm frente a 30 mm del control) pero de menores diámetros pues los pesos de las raíces de las plantas infectadas son menores. El cociente peso/longitud (P/L) de raíz nueva que representa el grosor de la raíz es significativamente superior en las control (15 mg/mm) que en las inoculadas (7-8 mg/mm).

El análisis estadístico (Tabla 3.10) de parámetros morfológicos estudiados en la fracción aérea de las plantas de *Q. suber*, desveló diferencias en el parámetro LTP. Los restantes no revelaron diferencias significativas.

	PTP	LTP	NHJ	VA
C	3,946±0,382	23,07±2,02	21,47±1,89	2,00±0,17
D1	7,464±3,280	30,16±1,70	16,60±2,07	2,27±0,18
D3	4,077±0,410	26,30±1,55	19,60±2,01	2,33±0,16
D5	4,631±0,403	28,30±1,95	17,31±1,69	2,15±0,15
Total	5,043±0,865	26,91±0,95	18,79±0,98	2,19±0,08
<i>p</i>	0,379	0,016	0,231	0,424

Tabla 3.10. Valores medios (±ET) de parámetros morfológicos de tallo y nivel de significación para dosis en *Q. suber*. PTP: peso del tallo principal, LTP: longitud del tallo principal, NHJ: número de hojas, VA: valoración visual de la parte aérea.

El análisis de un modelo lineal general univariante, y reveló diferencias significativas en el potencial hídrico de las plantas sometidas a distintas dosis de inóculo ($p=0,022$), tal y como se expone en la tabla 3.11:

C	D1	D3	D5
-0,191±0,014a	-0,187±0,007a	-0,197±0,010ab	-0,248±0,020b

Tabla 3.11. Valores medios (±ET) de Potencial hídrico (MPa) para *Q. suber* referente a la dosis (a y b desvelan subconjuntos homogéneos significativamente diferentes a través de un test Tukey).

La correlación de Pearson mostró las relaciones entre cada uno de los parámetros evaluados. Así, las medidas de longitud y peso efectuadas en cada una de las distintas fracciones de la plantas generaron una significación $p<0,001$ Las relaciones establecidas entre cada uno de los parámetros denotan una fuerte linealidad entre parámetros radiculares. Los parámetros aéreos asociados al tallo establecieron relaciones con LRN y F. Como cabía esperar, el factor PRS mostró relación con -VR.

	PRN	LRN	PRS	PRP	LRP	VR	F	P	R	PTP	LTP	NHJ
LRN	0,675*	1										
PRS	0,552	0,040	1									
PRP	0,661*	0,776**	0,397	1								
LRP	0,398	0,608*	0,089	0,661*	1							
VR	-0,054	0,516	-0,612*	0,210	0,195	1						
F	0,798**	0,915**	0,319	0,795**	0,635	0,408	1					
P	0,894**	0,538	0,727*	0,706*	0,548	-0,123	0,785**	1				
R	0,665*	-0,071	0,765**	0,217	-0,051	-0,595	0,180	0,674*	1			
PTP	0,649*	0,692*	0,364	0,478	0,531	0,096	0,778**	0,604*	0,239	1		
LTP	0,424	0,802**	0,218	0,826**	0,800**	0,222	0,739**	0,481	-0,146	0,647*	1	
NHJ	0,372	0,309	0,037	0,642*	0,196	0,169	0,240	0,295	0,281	-0,169	0,204	1
VA	-0,100	-0,096	-0,114	-0,572	-0,148	-0,128	-0,094	-0,165	-0,214	0,172	-0,198	-0,866**

Tabla 3.12. Matriz de correlación de Pearson entre cada uno de los parámetros morfológicos evaluados en *Q. suber* (n=60). PRN= peso de raíces nuevas; LRN= longitud de raíces nuevas; PRS= peso de raíces secundarias; PRP= peso de raíz principal; LRP= longitud de raíz principal; PTP= peso del tallo principal; LTP: longitud del tallo principal; NHJ= número de hojas; VR= valoración de raíz; VA= valoración aérea. **=La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral), *=La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

3.3.3. Diferenciación en el efecto de *P. cinnamomi* en base a la especie hospedadora: *Q. ilex* spp *ballota* y *Q. suber*.

Las diferencias entre especies de *Quercus*, afectadas por la enfermedad generada por *P. cinnamomi* en el ensayo, resultaron significativas para VA ($p= 0,048$) y VR ($p<0,001$).

Además, se observó la influencia del patógeno en la fracción aérea en ambas especies. En encina, los valores de VA variaron desde $0,1\pm 0,02$ en plantas control, hasta valores que casi alcanzan el valor 3 en inoculadas ($VA= 2,99\pm 0,11$).

En alcornoque la variación entre plantas sanas e infectadas es menor. Aún así se observan diferencias significativas entre ambos tratamientos, observándose unos valores de defoliación foliar y amarilleamiento en plantas control de alrededor del 20% ($1,51\pm 0,09$) mientras que en plantas inoculadas los valores alcanzan los $1,86\pm 0,06$, rondando alrededor del 33% de marchitez foliar. Las evidencias significativas entre tratamientos se analizaron obteniéndose un coeficiente de significación $p< 0,001$.

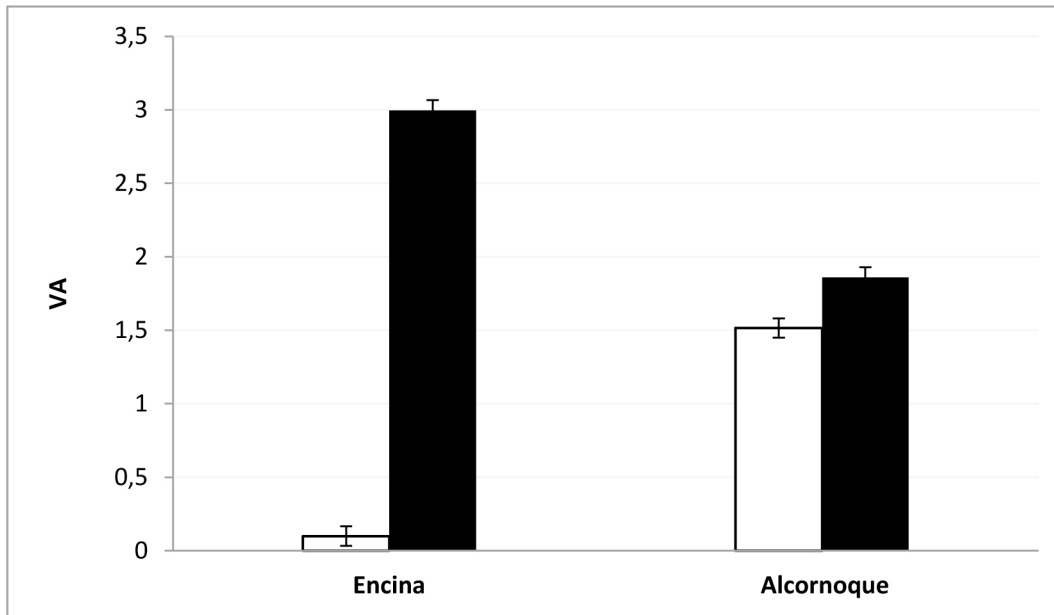


Figura 3.9. Relación de VA (media \pm ET) en cada una de las especies de *Quercus* objeto de estudio, para plantas control (□) e Inoculadas (■) n= 380.

La influencia del patógeno resultó significativa en ambas especies para el parámetro VR ($p < 0,001$). Así en plantas de encina, los valores medios de plantas control e inoculadas variaron desde $0,578 \pm 0,044$ a $2,348 \pm 0,057$ respectivamente.

Para plantas de alcornoque, las variaciones fueron menores pero seguían siendo significativas, con valores medios que oscilan entre $0,703 \pm 0,057$ en plantas control y $1,608 \pm 0,053$ en plantas inoculadas.

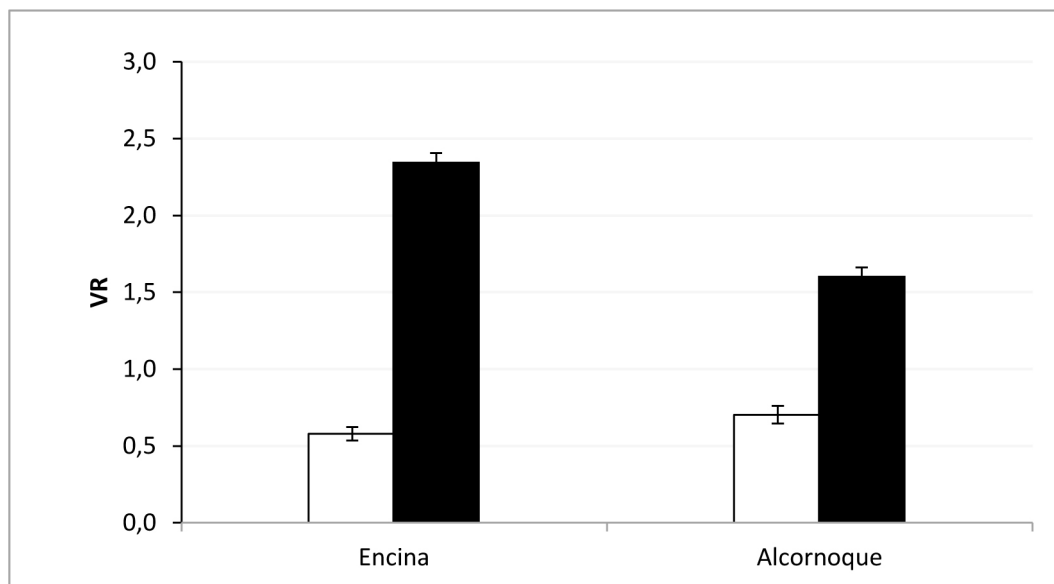


Figura 3.10. Relación de VR (media \pm ET) en cada una de las especies de *Quercus* objeto de estudio, para plantas control (□) e inoculadas (■) n= 380.

Por último se valoró la interacción entre especie y tratamiento, resultando significativa para VA y VR, al igual que los anteriores análisis ($p < 0,001$).

La relación establecida entre ambos parámetros cualitativos se analizó a través de una correlación de Pearson para el total de las 760 plantas obteniéndose una significación de $p < 0,001$ y $r = 0,693$.

3.3.4. Influencia de la procedencia de plantas de *Q. ilex* spp *ballota* y *Q. suber* en el desarrollo de la infección por el patógeno *P. cinnamomi*.

3.3.4.1. *Q. ilex* spp *ballota*.

La inoculación con *P. cinnamomi* para la especie *Q. ilex*, al igual que la procedencia, tuvieron un efecto significativo en todos los parámetros radiculares evaluados exceptuando el número de puntas blancas (P). La interacción de ambos factores fijos no generó diferencias significativas en ninguno de los parámetros radiculares evaluados (Tabla 3.13).

Procedencia	Tratamiento	PRN	LRN	R	P	F
SCR	C	0,566±0,055	126,494±12,287	88,520±10,491	3,340±0,565	31,942±4,006
	I	0,287±0,051	46,375±7,068	40,333±6,778	2,970±0,502	7,944±0,752
RE	C	0,322±0,045	79,630±7,290	50,722±6,804	2,610±0,435	17,777±2,109
	I	0,226±0,045	40,959±5,977	35,750±5,106	2,580±0,430	8,555±0,908
p	T	<0,001	<0,001	<0,001	0,762	<0,001
	PROC	0,002	0,002	0,005	0,395	0,004
	T*PROC	0,168	0,320	0,181	0,794	0,336

Tabla 3.13. Relación de media ± Error típico de parámetros radiculares de plantas de *Q. ilex* según procedencia (PROC) y tratamiento (T). Para cada parámetro también se muestra el nivel de significación del tratamiento de infección, procedencias y la interacción entre ambos. SCR: procedencia de Serranía de Cádiz Ronda Y RE: región extremadurensis; PRN: peso de las raíces nuevas, LRN: longitud de las raíces nuevas; PRS: peso de las raíces secundarias; PRP y LRP: peso y longitud de la raíz principal; F: número de Fragmentos de raíz; P: número de puntas blancas; R: número de ramificaciones. (n=140).

En los parámetros morfológicos aéreos examinados, se detectaron diferencias en todos los parámetros excepto LTP cuando se produjo la infección. Sin embargo respecto a la procedencia de las semillas, y la interacción de ambos factores, se observó una significación en LTP y NHJ, siendo no significativas las relaciones entre procedencias en los factores SF y VA. El factor procedencia (PRO) resultó significativo para las variables relacionadas con el tamaño de la planta (LTP, NHJ), mientras que el factor tratamiento (T) fue significativo para aquellas variables que manifiestan síntomas de la enfermedad (NHJ, SF, VA).

Procedencia	Tratamiento	LTP	NHJ	SF	VA
SCR	C	19,895±1,131	30,285±2,451	4,370±0,411	1,49±0,17
	I	17,027±1,160	11,000±1,485	2,395±0,296	2,50±0,23
RE	C	13,661±0,717	18,152±1,303	3,463±0,323	1,53±0,66
	I	13,042±1,051	12,500±1,504	2,264±0,229	1,97±0,24
	T	0,385	<0,001	<0,001	0,001
p	PROC	<0,001	0,002	0,105	0,244
	T*PR	0,050	<0,001	0,224	0,172

Tabla 3.14. Relación de media ± Error típico de parámetros aéreos de plantas de *Quercus ilex* según procedencia (PROC) y tratamiento (T). Para cada parámetro también se muestra el nivel de significación del tratamiento de infección, procedencias y la interacción entre ambos. LTP: longitud del tallo principal; NHJ: número de hojas nuevas; SF: superficie foliar; VA: valoración visual de la parte aérea. (n=140).

Se observó la tendencia general de mayor longitud del tallo (LTP) en plantas de la región de procedencia Serranía de Cádiz y Ronda, frente a la Región Extremadurenses. También se percibe un mayor número de hojas en esta procedencia (SCR). Ambos parámetros se encuentran íntimamente asociados con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,577. Como consecuencia de la influencia de la procedencia de las semillas, se obtendrán mayores valores en los parámetros radiculares evaluados, siendo casi dos veces superior la media en el peso de raíces nuevas sanas en SCR que en RE, alcanzándose un valor máximo de PRN para SCR de 1,360 g. Lo mismo ocurre para LRN, ya que se contempla un elevado valor en la procedencia SCR en plantas control, mientras que en inoculadas el valor baja hasta 3 veces.

Para el parámetro R se obtuvieron también valores mayores para la procedencia SCR y para plantas control, llegándose a alcanzar hasta un total de 226 ramificaciones en las raíces de una sola planta de la procedencia SCR. Por último el factor F también mostró diferencias significativas. Los parámetros radiculares mostraron que ambas procedencias tienen tendencias diferentes, siendo los valores más bajos los de las plantas de la región extremadurenses.

3.3.4.2. *Q. suber*.

Los parámetros morfológicos radiculares medidos en plantas de *Q. suber*, mostraron diferencias significativas entre plantas infestadas y testigo en los parámetros PRN, R y P. Para los parámetros restantes no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Se observa una mayor longitud de raíces nuevas en plantas inoculadas aun no siendo significativo este parámetro. Los valores de F son ligeramente inferiores para plantas inoculadas.

		PRN	LRN	R	P	F
PASR	C	0,700±0,086	122,480±11,514	196,444±32,831	2,140±0,641	30,194±3,746
	I	0,483±0,055	149,411±19,059	216,472±35,338	6,310±1,534	28,555±5,075
SBRPII	C	1,068±0,176	122,697±12,634	134,277±20,842	1,310±0,295	26,138±3,033
	I	0,639±0,076	133,491±15,037	165,694±22,522	4,940±0,882	25,972±2,655
	T	0,003	0,593	0,047	<0,001	0,37
<i>p</i>	PROC	0,016	0,2	0,363	0,253	0,807
	T*PROC	0,326	0,582	0,84	0,783	0,842

Tabla 3.15. Relación de media ± ET de parámetros radiculares en las plantas de *Quercus suber* según procedencia e infección con *P. cinnammomi*. Para cada parámetro también se muestra el nivel de significación del tratamiento de infección (T), procedencias (PROC) y la interacción entre ambos (T*PROC). N=144. PASR: Parque de los Alcornocales Serranía de Ronda; SBRPII: zona suroeste de Portugal; PRN: peso de las raíces nuevas, LRN: longitud de las raíces nuevas; F: número de fragmentos de raíz, P: número de puntas blancas, R: número de ramificaciones. (n=140).

Los parámetros morfológicos aéreos medidos en plantas de *Q. suber* desvelaron diferencias significativas entre tratamientos en LTP Y VA. Para los parámetros restantes no se encontraron diferencias entre tratamientos. Ninguno de los parámetros aéreos medidos mostró diferencias entre familias ni en la interacción T*PROC.

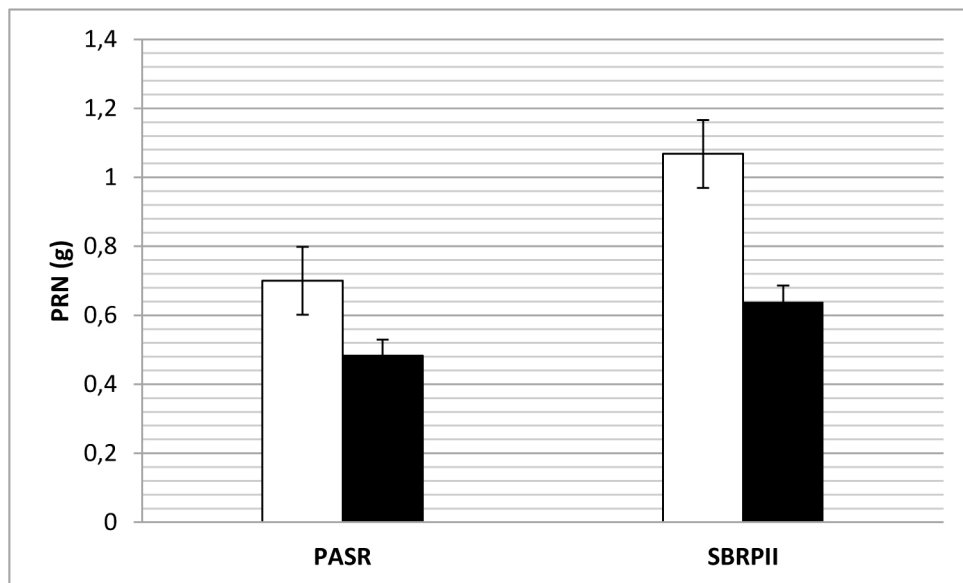


Figura 3.11. Peso de raíces nuevas (media ±ET) (PRN) (g) entre plantas control (□) e inoculadas (■) en las distintas procedencias estudiadas. (n=70).

Los parámetros morfológicos aéreos medidos en plantas de *Q. suber*, desvelaron diferencias significativas entre tratamientos en LTP Y Va. Para los parámetros restantes no se encontraron diferencias entre tratamientos. Ninguno de los parámetros aéreos medidos mostró diferencias entre familias ni en la interacción T*PROC.

		LTP	NHJ	SF	VA
PASR	C	47,016±3,129	37,166±3,599	2,546±0,243	1,527±0,171
	I	42,025±2,980	36,861±3,653	3,252±0,729	1,986±0,172
SBRPII	C	47,564±4,203	34,055±3,191	3,074±0,351	1,333±0,178
	I	39,397±2,875	32,222±4,304	2,524±0,371	1,622±0,177
	T	0,048	0,77	0,865	0,034
p	PROC	0,753	0,291	0,827	0,112
	T*PROC	0,63	0,835	0,17	0,628

Tabla 3.16. Relación de media ± ET de parámetros aéreos en las plantas de *Q. suber* según procedencia e infección con *P. cinnamomi*. Para cada parámetro también se muestra el nivel de significación del tratamiento de infección (T), procedencias (PROC) y la interacción entre ambos (T*PROC). n=140. LTP: longitud del tallo principal, NHJ: número de hojas nuevas, Sf: superficie foliar; VA: valoración visual de la parte aérea; PASR: Parque de los Alcornocales Serranía de Ronda; SBRPII: zona suroeste de Portugal.

3.4. DISCUSIÓN.

3.4.1. Sintomatología de la enfermedad.

Los resultados correspondientes a este capítulo corroboran bajo las condiciones de este experimento la capacidad infecciosa de *P. cinnamomi* en plantas de *Q. ilex* y *Q. suber*, puestas de manifiesto a través de numerosos estudios (Brasier *et al.*, 1993b; Brasier *et al.*, 1996; Erwin *et al.*, 1996; Marçais *et al.*, 1996; Moreira *et al.*, 1997; Robin *et al.*, 1998b).

La sintomatología se manifiesta a través de diferentes mecanismos. En primer lugar, existe una menor producción de raíces nuevas provocada por dos motivos: de un lado, los daños en el sistema radical, desarrollado antes del ensayo, demostrado por el aumento de la proporción de raíces necrosadas, que se ve reflejado porque el parámetro Vr ha resultado mayor en plantas inoculadas que en control, hecho que también ha sido demostrado en otros casos para *Q. ilex* y *Q. suber* (Sánchez *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006; Caetano *et al.*, 2007). Y de otro lado, a infección ha provocado en la planta, una situación de deficiencia manifestada a través de la pérdida de capacidad de producción de raíces nuevas, descenso del potencial hídrico y defoliación y marchitez foliar. Estos síntomas podrían estar relacionados con estrés hídrico ya que, estos mismos han sido reportados por otros autores en diferentes especies sometidas a estrés por efecto de sequía (Villar *et al.*, 1997; Tinus 1996; Villar-Salvador *et al.*, 1999). Tanto en un caso como en otro, los síntomas observados podrían estar estrechamente relacionados puesto que

en otros trabajos se ha asociado la necrosis radicular a un peor estado hídrico y a un aumento de la marchitez y defoliación (Sánchez *et al.*, 2004; Maurel *et al.*, 2001b).

En segundo lugar, las raíces de plantas infectadas, muestran una menor producción de raíces ramificadas y metabólicamente activas, generando una simplificación de los mecanismos de desarrollo de sistemas radiculares, y dando lugar a raíces sencillas y necróticas, como se ha reportado por Caetano *et al.*, (2007). Las plantas afectadas no solo formaran menos raíces sino que las raíces formadas son menos ramificadas lo cual es un aspecto novedoso en esta especie ya que no se han encontrado reportes que hayan medido este parámetro.

También se puede añadir que los síntomas observados no son atribuibles a la sucesión de encharcamientos pues estos se han aplicado también a las plantas control. Esta metodología de secuencias de encharcamientos y drenaje ha sido empleada por numerosos autores (Sánchez *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2006; Caetano *et al.*, 2007) para propiciar la infección por *P. cinnamomi* (Juzwik *et al.*, 1998; Pettitt *et al.*, 1998). Esto se traduce como una elevada susceptibilidad de ambas especies de *Quercus* a estos patógenos, en condiciones de saturación hídrica, ya que estas condiciones, favorecen la infección de raíces (Peñuelas y Ocaña 1996). El empleo de un sustrato muy poroso como la perlita y el drenaje practicado en el fondo de las cajas, asegura una correcta difusión de los gases en el sustrato, como pone de manifiesto el desarrollo normal del sistema radical de las plantas control. Sin embargo el transplante realizado antes de la infección, podría haber desencadenado posibles consecuencias en las plantas como inducción de resistencia, posibles daños radiculares o variaciones en los parámetros fisiológicos.

La utilización de la mezcla de cepas ha sido reportada por Robin *et al.* (2001). Sin embargo esta mezcla puede haber ocasionado posibles interacciones entre cepas que palien el efecto de la cepa de mayor virulencia. Por tanto para futuros ensayos se comprobará la virulencia de cada una de las cepas por separado, comprobando que la mezcla actua de la misma forma.

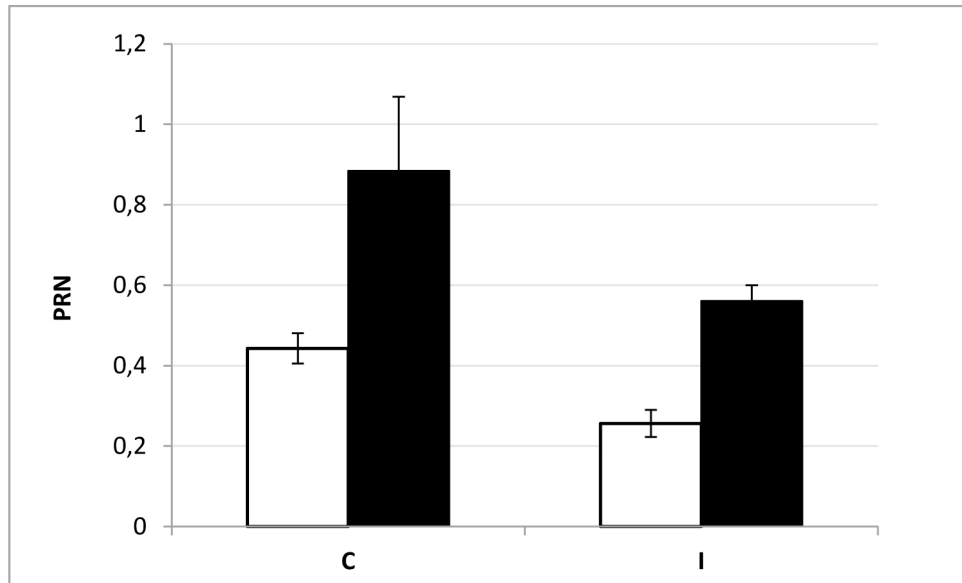


Figura 3.12. Representación de peso de raíces nuevas (media±ET) (gramos) en plantas control (C) e inoculadas (I) en plantas de *Q. ilex* (□) y *Q. suber* (■) (n= 70).

3.4.2. Diferencias entre especies.

El efecto de la dosis de inóculo tras un mes de infección, ha sido significativo en los parámetros de formación de raíces nuevas (PRN, LRN, R, P, F) pero no en los aéreos. Esto ha sido estudiado por Mitchell (1978), resultando una mayor severidad, a niveles elevados de inóculo presentes en el complejo planta-sustrato. Así a medida que se incrementa la dosis de inóculo, se produce una reducción de la biomasa radicular, que conlleva una reducción del aporte hídrico a la planta como consecuencia del descenso de Ψ (Maurel *et al.*, 2001b). Sin embargo, no se observan síntomas aparentes en la fracción aérea de plántulas evaluadas, sospechando que el tiempo del ensayo no ha sido suficiente para apreciar dicha sintomatología como reportó Villar *et al.*, (1997) para plantas de *Pinus halepensis* Mill. sometidas a diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico. Por tanto la dosis óptima indicativa de la presencia de *P. cinnamomi* a través de la reducción de la formación de raíces será la dosis 2.

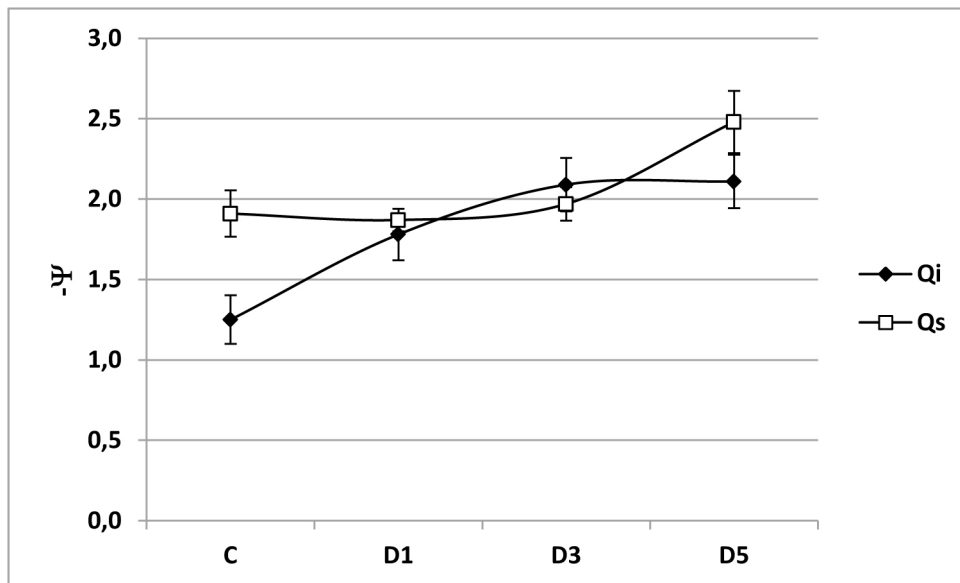


Figura 3.13. Representación de variación de potencial hídrico (Ψ) (media \pm ET) (-MPa) (n= 40) en los diferentes tratamientos estudiados (C, D1, D3, D5) para plantas de *Q. ilex* y *Q. suber*.

3.4.3. Diferencias entre especies

La variación en la susceptibilidad entre *Q.ilex* y *Q.suber* ha sido demostrada en este trabajo, a vista del diferente comportamiento que han presentado ambas especies frente a la inoculación con *P. cinnamomi*. Esta variabilidad ha sido reportada también por otros autores en plantas del género *Quercus* (Marçais *et al.*, 1996; Moreira *et al.*, 1997) susceptibles al patógeno *P. cinnamomi*.

En este estudio, la encina manifestó reducción en el potencial de formación de raíces, amarilleamiento, defoliación y marchitez foliar, notables síntomas visuales en la zona aérea y raíz (VA y VR), así como descenso del potencial hídrico (Ψ), con dosis más bajas que el alcornoque. Para este último parámetro, la encina mostró valores descendentes hasta un umbral a partir del cual se estabiliza, mientras que, el comportamiento del alcornoque es diferente, observándose como dosis bajas no repercuten al Ψ , y a partir de la D3 se produce un descenso progresivo del mismo.

Los parámetros radiculares en encina denotaron una afección inmediata ante la aplicación de la primera dosis de inóculo (D1) (Maurel *et al.*, 2001), aumentando los síntomas (menor RRN, LRN y VR) a medida que se incrementa la dosis de inóculo, llegando a un punto (D3) en el que la sintomatología no sufre cambios significativos. No obstante, dentro de las dosis ensayadas en este estudio el alcornoque compensa la disminución del peso de raíces nuevas con un incremento de la longitud, dando como resultado, raíces más delgadas y más ramificadas en el primer mes de la infección. El potencial hídrico muestra que el estrés de la planta sigue empeorando hasta D5.

Además los síntomas se manifiestan de forma diferente, de manera que, en encina se reduce la producción de raíces (tanto en peso como en longitud) a medida que incrementa la infección (Caetano *et al.*, 2007), mientras que en alcornoque se estimula la producción de raíces de mayor longitud (LRN) y ramificaciones (R) y menor peso (PRN), teniéndose valores de la fracción P/L (peso de raíces nuevas/ longitud de raíces nuevas) de $0,015 \pm 0,001 \text{ g cm}^{-1}$ para plantas control y $0,008 \pm 0,001 \text{ g cm}^{-1}$ en plantas inoculadas.

Esto puede deberse a que los mecanismos de defensa ante la infección, actúen de forma diferente en cada una de las especies evaluadas (Levitt 1980). Las plantas de *Q. suber*, aun reduciendo su biomasa radicular, toleran el ataque del patógeno desarrollando raíces nuevas y más delgadas (Turner 1986).

Por otro lado, se observó que el efecto del encharcamiento en plantas inoculadas, afecta de forma diferente a encina y alcornoque. Así como en las plantas de alcornoque, las raíces nuevas se desarrollan a lo largo del cepellón independientemente de la zona encharcada y de la infección, en encina, las plantas inoculadas solo generaron raíces nuevas en la parte no sumergida del cepellón. Por su parte, las plantas control de encina, generaron raíces a lo largo de todo el cepellón independientemente de la zona sumergida. De este modo se demuestra la mayor susceptibilidad de la encina frente a alcornoque ante la presencia de *P. cinnamomi* ante condiciones de encharcamiento (Sánchez *et al.*, 2000).



Figura 3.14. Producción de raíces nuevas en la mitad inferior del cepellón en plantas control, y por encima de la zona sumergida del cepellón en plantas inoculadas.

A través de los experimentos llevados a cabo se verifica que la encina es más susceptible a *P. cinnamomi* que el alcornoque, como se ha reportado por otros autores (Marçais *et al.*, 1996; Moreira *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2006; Tapias *et al.*, 2006).

3.4.4. Efectos del tiempo en la sintomatología de la enfermedad.

En el presente ensayo se tomaron los valores promedios de plantas control e inoculadas (dosis 2) en ambas especies para cada uno de los parámetros y se compararon los resultados obtenidos en el ensayo de dosis (1 mes de infección) y el ensayo de procedencia (5 meses de infección).

Después de un mes de infección, en las condiciones de ciclo de sequía-encharcamiento descritas, los parámetros aéreos evaluados no mostraron evidencias significativas, mientras que tras 5 meses, mostraron diferencias entre plantas sanas e infestadas, observándose síntomas de defoliación y marchitez foliar.

En cambio los parámetros radiculares aumentaban progresivamente con el período de infección, de manera que tras 5 meses de infección manifestaron valores 5 veces superiores a la infección de un mes, por lo que las raíces crecían de manera proporcional conforme pasaba el tiempo.

3.4.5. Diferencias entre procedencias.

En el presente ensayo se han observado variaciones en las características morfológicas estudiadas, de acuerdo con la región de procedencia de donde se recolectaron las semillas. Sin embargo la interacción de la infección causada por *P. cinnamomi* con la región de procedencia no resultó significativa, lo que quiere decir que la infección del patógeno muestra un patrón de sintomatología similar en diferentes localizaciones.

La región de procedencia en plantas de encina, tuvo su influencia en los parámetros morfológicos: PRN, LRN, R y F, observándose valores mayores para la procedencia Sierra de Cádiz Ronda (SCR), lo cual puede estar relacionado con la existencia de una mayor disponibilidad de agua en dicha región (Allué 1990), como se ha descrito en el apartado 3.2.2.2 de Material y Métodos. Además se encontraron diferencias significativas en la longitud del tallo, siendo mayores las plantas de esta procedencia. Algunos estudios han mostrado que en plantas de *Q. ilex*, los parámetros morfológicos como el tamaño de la planta, estarían relacionados con las condiciones climáticas de la región de procedencia (Gratani *et al.*, 2003) de manera que en aquellas zonas más secas, como es el caso de la región extremeña (RE) (Alejano *et al.*, 2011), las plantas serán más pequeñas. Estas fluctuaciones también se han relacionado con el tamaño de la bellota (Gimeno *et al.*, 2009). Sin embargo, las plantas de la procedencia SCR se encontraron

más afectadas por la infección de *P. cinnamomi*, ya que se observa una reducción de su potencial de formación de raíces en mayor grado que las de la procedencia región extremeñadureñse (RE).

En *Q. suber* las evidencias entre procedencias no fueron tan claras. Las plantas pertenecientes a la región de procedencia SBRPII (Portugal) desarrollaron raíces más gruesas y pesadas, mientras que las plantas de Parque de los Alcornocales Sierra de Ronda (PASR) desarrollaron raíces más largas y ramificadas, lo que probablemente está relacionado, con las diferencias entre poblaciones (Moreira *et al.*, 1997). Estas variaciones entre poblaciones han sido comprobadas en otras especies: las variaciones regionales de resistencia a *P. cinnamomi*, fueron reportadas para *E.marginata* (Stukely *et al.*, 1994) y para *Cronartium ribicola* en *Pinus lambertiana* (Kinlonch 1992) en las cuales la mayor parte de los genes resistentes se detectaron en poblaciones del sur de California. Esto puede dar una idea de la variabilidad genética que existe dependiendo de la zona de distribución de la población que se estudie.

4. CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN
DE LA TOLERANCIA/SUSCEPTIBILI-
DAD DE DISTINTAS PROGENIES DE
Quercus ilex spp *ballota* Y
Quercus suber AL PATÓGENO
Phytophthora cinnamomi Rands.

4.1. INTRODUCCIÓN

El presente capítulo servirá de base para la tesis doctoral presentada, puesto que los datos de tolerancia/susceptibilidad obtenidos en el mismo se utilizarán en el capítulo siguiente para analizar la influencia de factores fisiológicos sobre la diferencia en la tolerancia a la enfermedad de la seca en individuos de *Q. ilex* en condiciones de invernadero.

El decaimiento de los bosques de *Quercus* en el suroeste de la Península Ibérica, se está reportando desde finales del siglo XX, atribuyéndose principalmente al oomiceto *P. cinnamomi* (Brasier 1992; Cobos *et al.*, 1993). Este patógeno actúa con gran severidad a través de bosques de una gran variedad de especies a lo largo del mundo: *Pinus* spp; *Eucaliptus* spp; *Quercus* spp (Podger *et al.*, 1972; Bryan *et al.*, 1973; Batini *et al.*, 1974; Malajczuk *et al.*, 1977; Cahill *et al.*, 1993). Pocas especies son resistentes a *P. cinnamomi* y tampoco se conocen especies que sean capaces de prevenir la entrada inicial del patógeno. Por tanto se descartan los mecanismos de evitación de la enfermedad por parte de los huéspedes. Sin embargo, los mecanismos de resistencia a la afección causada por *P. cinnamomi* han sido descritos. En árboles de *E. marginata*, Cahill *et al.*, (1993) reportó que la resistencia se produce bajo control poligenético. Además los cambios anatómicos como resultado de barreras a la invasión dentro del tejido de las raíces no ocurren generalmente aunque se ha reportado que podrían estar asociado con la resistencia del aguacate (Phillips *et al.*, 1987) así como en la maduración de tejidos secundarios de *E. marginata* bajo ciertas condiciones (Tippett & Hill 1984).

Las observaciones iniciales de supervivencia y vigor de árboles de encina y alcornoque en bosques afectados por *P. cinnamomi* indican posibles sucesos de resistencia en el genoma de ambas especies, como se reportó para planta de cacao (Ducamps *et al.*, 2004) y *E. marginata* (Podger, 1972; McComb *et al.*, 1987; McComb *et al.*, 1991; Cahill *et al.*, 1992). Stuckely *et al.* (1994) demostraron para *E. marginata*, la diferenciación entre distintos grados de resistencia a *P. cinnamomi* en 16 familias de eucalipto. Además también se ha reportado, en especies consideradas susceptibles al patógeno (*Pinus echinata* Mill., *Pinus radiata* D. Don, and *Persea americana* Miller), la resistencia de plantas individuales (Bryan *et al.*, 1973; Butcher *et al.*, 1984; Zentmyer 1980).

Sin embargo los estudios llevados a cabo en especies de *Quercus* hablan de mecanismos de tolerancia a la enfermedad. En *Quercus agrifolia*, afectada en este caso por *Phytophthora ramorum* (Dodd *et al.*, 2005), se demostró que existen árboles con escasa susceptibilidad al patógeno, asumiendo que transmitirán la tolerancia en proporciones significativas a las semillas, heredando esta capacidad. También se ha estudiado la habilidad de individuos a sobrevivir en áreas bajo influencias severas de condiciones de estrés asociadas con la seca, y los resultados de test de invernadero, sugieren que distintas poblaciones de *Q. ilex* y *Q. suber* exhiben una variabilidad genética considerable cuando se someten a condiciones de infección por *P. cinnamomi* (Tapias *et al.*, 2005a y b). Estos mecanismos diferenciarían progenies tolerantes, en las que el árbol, aun conviviendo con el patógeno en el sustrato, se desarrolla normalmente, o bien con una sintomatología breve o media, que permita seguir con el desarrollo de la planta, como se reportó para el olmo campestre en su afección por grafiosis (Solla 2000). Por todo esto la hipótesis de partida que se plantea en este estudio es la de encontrar progenies de *Q. ilex* y *Q. suber* que de alguna forma resistan o toleren a la enfermedad de la seca.

El objetivo del presente capítulo es analizar si existen diferencias en la tolerancia a la infección por parte de *P. cinnamomi*, entre distintas progenies de *Q. ilex* y *Q. suber*, y si es así, tratará de establecerse un ranking que permita clasificar las progenies para así, poder llevar a cabo la propagación a partir de semillas de la misma familia, conociendo los árboles adultos de los que proceden las progenies seleccionadas, insertándolas en programas de rehabilitación de bosques afectados por la seca.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.2.1.- Material vegetal.

4.2.1.1. Selección de progenies.

El material vegetal utilizado en los ensayos realizados se recogió a lo largo de la temporada otoñal 2009/2010. Para la obtención de las plantas que posteriormente serán evaluadas, se procedió a la recolección de semillas de *Q. ilex* spp *ballota* L. y *Q. suber* L. de distintas zonas del suroeste peninsular. Para la localización de zonas afectadas por la seca se tomó como referencia el inventario de focos de áreas afectadas por la enfermedad en Andalucía (Navarro *et al.*, 2001a).

Así durante los meses de noviembre y diciembre de 2009 y enero de 2010 se llevó a cabo la recolección de muestras de tres de las cuatro grandes áreas (Figura 1.6) que corresponden a situaciones de decaimiento por dicha enfermedad en Andalucía (Na-

varro *et al.*, 2001a). Dentro de cada una de las zonas de estudio se tomaron semillas de árboles elegidos al azar, asegurando una distancia mínima entre unos pies y otros de al menos 100 metros, para evitar posibles parentescos (Tapias *et al.*, 2004). Las dehesas seleccionadas para el estudio se distribuyen por la zona suroeste peninsular desde El Alentejo en Portugal y así hasta la provincia de Málaga (Figura 4.1).

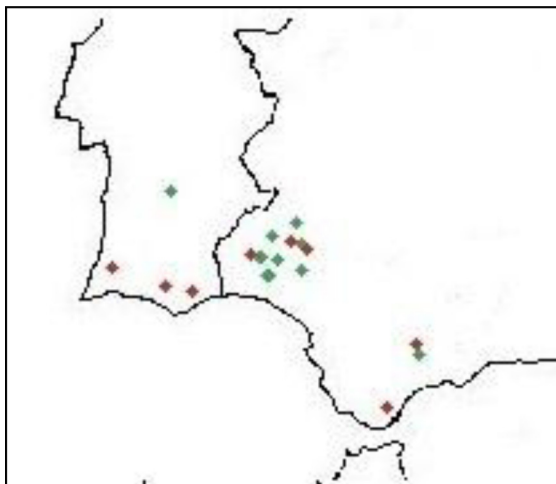


Figura 4.1. Distribución de masas forestales incluidas en el estudio de *Q. ilex* spp *ballota* (verde) y *Q. suber* (rojo) en el suroeste de la Península Ibérica.

Un total de 200 semillas fueron seleccionadas de 98 árboles madre diferentes. Las semillas de *Q. ilex* spp *ballota* que se recogieron en la provincia de Huelva, corresponden a fincas que se localizan en los siguientes términos municipales: Villanueva de los Castillejos (HR), Puebla de Guzmán (PG), Las Herrerías (HE), Paymogo (PAY); pertenecientes al Andévalo onubense, cuya problemática actual gira en torno al decaimiento de las dehesas que conforman el terreno forestal de la zona (Moreira *et al.*, 1997). En la misma provincia se recolectaron semillas en los términos municipales de Castaño del Robledo (CR), Zalamea la Real (ZR) y Campofrío (CP); disponiéndose estas últimas en las comarcas históricas de la Cuenca Minera y la Sierra. Las semillas que se recolectaron fuera de la provincia pertenecen al término municipal de Cortes de la Frontera (CO) en la provincia de Málaga y en Portugal en la comarca de Bajo Alentejo (BA).

De otro lado las semillas de *Q. suber* se recogieron total de 200 semillas siendo seleccionadas de 69 árboles madre diferente durante el mismo periodo que las bellotas de encina, en distintas zonas del sureste peninsular que se describen a continuación: Los Barrios (BA) en la provincia de Cádiz, Cortes de la Frontera (CO) en Málaga y en Portugal zonas del Algarve portugués (ALG), Bajo Alentejo (BA) y Alto Alentejo (AA).



Figura 4.2. Dehesa afectada por la enfermedad en el término municipal de Cabezas Rubias, comarca del Andévalo. Huelva.

Para la selección de las semillas de los árboles elegidos fue necesaria la evaluación de éstas en el lugar de recogida (Torres *et al.*, 1985). Se tomaron semillas en buen estado que aparentemente se encontraban sanas desechando todas aquellas que tenían indicios claros de afección por patógenos (blanqueamiento en la zona terminal de la semilla), perforaciones por insectos perforadores, y otros aspectos que suponen el deterioro de la planta (Hachemi *et al.*, 2001). Además se desecharon todas aquellas semillas que pudieran estar afectadas por larvas de diferentes insectos.

Una vez obtenidas las semillas, se dispusieron en una bolsa de red y se llevaron al laboratorio, sometiéndose a un primer lavado con agua en abundancia para eliminar los posibles residuos superficiales; y posteriormente se procedió a un segundo lavado con una solución de fungicida diluido para la desinfección total por patógenos (Captan 1,5 g/l) (Tapias *et al.*, 2005a). A continuación se sometieron a una serie de lavados con agua, para evitar el precipitado de fungicida en la superficie de la bellota, y se dejaron secar en condiciones de humedad y temperatura ambiente (Caetano *et al.*, 2007). Una vez las semillas han perdido la humedad superficial, éstas se almacenan en una cámara frigorífica a 4°C, para posterior siembra (Almeida *et al.*, 2001).

4.2.1.2.- Siembra y plantación.

Durante el mes de marzo de 2010 se llevó a cabo la siembra de semillas de ambas especies. Previamente un total de 105 semillas por progenie fueron seleccionadas para su pregerminación. Para ello, en el mes de febrero, las semillas se dispusieron en bandejas sobre perlita húmeda y se introdujeron en una cámara de cultivo a 20°C con el fin de inducir la germinación. Con ello se pretendía acortar el tiempo de germinación y conseguir que fuese más uniforme entre las bellotas (Andivia et al., 2011). En la última semana de febrero, el porcentaje de germinación (G) de semillas fue el siguiente:

	G TOTAL(%)	G =100%	99,9% ≥G >50%	50% ≥G >30%	G ≤30%
<i>Q.ilex</i>	53,9 ± 27,7	13,3%	39,7%	28,6%	18,4%
<i>Q.suber</i>	80,2 ± 27,6	53,6%	23,2%	11,6%	5,8%

Tabla 4.1. Porcentaje de germinación total (G) (media±SD) y proporción de progenies (Pr) que alcanzaron los cuatro niveles de germinación (100%, 50 a 99%, 30 a 50% y <30%) para cada una de las especies.

Al cabo de dos semanas, de la selección de familias que superaban el 30% de germinación, se traspasaron, las semillas a contenedores de tipo Superleach contenedor individual de 300 cc (Villar *et al.*, 1997), siendo el sustrato empleado una mezcla de turba y vermiculita (3/1) (Sánchez *et al.*, 2000), para cada una de las especies objeto de estudio. Se sembraron 30 semillas germinadas por cada familia de un total de 80 familias de *Q. ilex* spp. *ballota* y 64 familias de *Q. suber*.



Figura 4.3. Germinación de semillas de *Q.suber* con sustrato turba-vermiculita.

Para la diferenciación e identificación de familias se utilizó un sistema de códigos de letras y números (Carevic *et al.*, 2010) donde se diferencian zonas, especies y número de árbol del lugar de recogida del material vegetal. Los envases se colocaron en bandejas de 35 alvéolos siguiendo un diseño de bloques aleatorizados disponiéndose en hileras de 3 módulos, para así favorecer el riego por aspersión de forma homogénea (Figura 4.4). Estos envases se dispusieron en el invernadero que se encuentra localizado en las instalaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Campus de la Rábida (Huelva).



Figura 4.4. Disposición plantas en invernadero.

4.2.2. Inoculación y trasplante.

La inoculación de las plantas se realizó en marzo de 2011 siguiendo la metodología de inoculación del Capítulo 1. Éstas, se sometieron a la infección del patógeno con la dosis D2 estudiada en el apartado anterior. Se tomaron 640 plantas de *Q. ilex* y 520 plantas de *Q. suber*. De éstas, el 60% se inocularon dejando el 40% restante como testigo. Un total de 5 plantas inoculadas y 3 controles por progenie. Posteriormente, un mes después, estas plantas sufrieron un trasplante (Villar *et al.*, 2012) disponiéndose aleatoriamente en recipientes de 50 litros de poliestireno expandido (al igual que en el apartado 2.6. del material y métodos del Capítulo anterior) con un sustrato perlita (20 plantas por caja), con las testigo se hizo lo mismo, disponiéndolas en módulos diferentes del invernadero para así evitar posible infección. Las plantas de una savia son extraídas del recipiente de 330 cm en el que se encontraban y se colocaron en cada

una de las cajas con perlita. Las plantas permanecerán en estas condiciones durante 12 semanas (Mayo a Julio de 2011) hasta su evaluación sometiéndose a ciclos continuos de encharcamiento- sequía como se expone en el material y métodos del Capítulo 1.

4.2.3. Evaluación de tolerancia/susceptibilidad de *Q. ilex. spp ballota* y *Q. suber . a P. cinnamomi*.

4.2.3.1. Comprobación de la infección.

Para comprobar que el desarrollo de la infección se ha generado en las plantas que se inocularon con *P. cinnamomi*, se tomaron 3 fragmentos de raíces secundarias nuevas (F) de 2 cm de longitud al extraer las plantas a los 3 meses, de un total de 4 plantas por familia (2 inoculadas y 2 controles), de una selección de 40 familias, de ambas especies objeto de estudio. Éstas fueron lavadas durante 4 horas en agua corriente. Posteriormente los fragmentos se fraccionan en segmentos de 3-4mm con un bisturí estéril y se colocan en placas Petri que contenían 20 ml de medio selectivo NARPH (apartado 3.2.1.5. Capítulo 1). (Romero *et al.*, 2007). Se cultivaron 10 placas con 3 segmentos de cada planta (8 plantas por placa), para plantas control y otras 10 para inoculadas. Se repitió el mismo proceso para ambas especies. Posteriormente se incubaron durante 4 días a 25°C en oscuridad, hasta su posterior evaluación.

4.2.3.2. Evaluación de tolerancia/susceptibilidad de *Q. ilex. spp ballota* y *Q. suber . a P. cinnamomi* en el total de familias objeto de estudio.

A la hora de evaluar las afecciones causadas por *P. cinnamomi*, se considera conveniente valorar diferentes aspectos fisiológicos de la planta (Capítulo 1) en los que se produzcan variaciones por la infección del patógeno (Belisario *et al.*, 2009). La evaluación de síntomas de las plantas se realizará durante el mes de julio de 2011. Para ello se extrajeron previamente las plantas de los contenedores con perlita, con la precaución de no dañar durante la extracción las raíces absorbentes generadas a lo largo del sustrato. Los atributos morfológicos radiculares evaluados fueron, además de peso y longitud de las raíces nuevas (PRN, LRN) y valoración visual de las raíces (VR) (evaluados en el capítulo anterior): Diámetro de la raíz principal (DIRP) entendido como el punto de intersección de la planta con el sustrato, se midió con un calibre digital en mm (Mitutoyo, e= ± 0,01mm); además de proceder a cuantificar una serie de parámetros observables en raíces de plantas que son determinantes del buen estado de las raíces (Sánchez *et al.*, 2000). Se trata del número de raíces activas en crecimiento (P), número de fragmentos de raíz (F) y conteo de ramificaciones absorbentes del total de F (R).

El Potencial de formación de raíces (PFR) (Villar *et al*, 2004a) será menor, cuanto mayor sea la afección de *P. cinnamomi* sobre la progenie estudiada, ya que la escasez de raicillas absorbentes generadas a lo largo de la duración del ensayo, después de la infección, se traduce como una afección grave por parte del patógeno a las especies de *Quercus* en estudio (Brito de Carvalho 1993; Brasier 1996; Sánchez *et al*, 2000). Así se determina la diferenciación en el PFR de las progenies que permitirá establecer un ranking de tolerancia/ vulnerabilidad intraespecífico.

4.2.3.3. Evaluación de parámetros morfológicos en progenies seleccionadas de *Q. ilex* spp *ballota*.

Tras la prospección inicial de la tolerancia de 80 progenies de *Q. ilex* a la enfermedad, se realizó un nuevo ensayo, para verificar la tolerancia de las progenies sobresalientes y poder realizar estudios fisiológicos que se expondrán en el siguiente capítulo. El presente experimento se llevó a cabo durante los meses de febrero a julio de 2012. Se seleccionaron un total de 20 plantas (de dos años de edad) de 8 familias de entre las extremas del ranking de tolerancia generado en el apartado anterior (PGE6, ZRE8, COE23, HRE8, HRE10, PAYE1, PAYE3, ABA110), sometiéndose a la infección en febrero de 2012 por parte de *P. cinnamomi* a 10 plantas por familia dejando 10 plantas de testigo. La inoculación se realizó a través de la inyección a lo largo del cepellón de la mezcla turba-vermiculita del inoculo, elaborado tal y como se describe en el capítulo 1 apartado 1, con el patógeno *P. cinnamomi* con la dosis D2, anteriormente descrita. Las plantas se trasplantaron (inmediatamente después a la infección) a cajas de poliestireno de 50 L con perlita para favorecer la generación de raíces, como se describió anteriormente.

La evaluación de parámetros radicales y aéreos se llevó a cabo en julio de 2012 siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. En este caso, los parámetros valorados fueron: PRN, LRN, DIRP, P y R. Además se evaluaron los siguientes parámetros aéreos: longitud del tallo principal (LTP) (cm) entendido como la medida desde el punto de intersección de la planta con el sustrato hasta el ápice de la planta; número de hojas (NHJ) y valoración visual aérea (VA) descrita en el capítulo 1 (Tabla 3.3).

4.2.4. Análisis estadístico.

La normalidad de los datos fue evaluada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico de Levene. Las diferencias significativas entre los distintos parámetros medidos fueron evaluadas mediante el test de Tukey-b, con $p = 0,05$.

El efecto de la inoculación y la familia en la morfología de parámetros radiculares fue evaluado usando el siguiente modelo lineal general (GLM):

$$y_{ijk} = \mu + T_i + F_j + T^*F_{ij} + \hat{\epsilon}_{ijk}$$

(1)

donde y_{ij} es el valor de la variable dependiente en la planta k inoculada con el tratamiento i de N ($i = 1, 2$), perteneciente a la familia j ($j = 1, 2, \dots, 80$) en el caso de *Q. ilex* y j ($= 1, 2, \dots, 65$) para *Q. suber*; μ es la media general; T y F son los efectos fijos de la inoculación y la familia; el término doble representa la interacción entre los mismos; y $\hat{\epsilon}$ es el termino de error bajo la hipótesis $\hat{\epsilon}_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_e)$. Posibles vínculos entre los diferentes parámetros medidos fueron estimados mediante análisis de correlación de Pearson.

Para generar el índice que permite la elaboración del ranking de tolerancia, se calculará el residuo estandarizado tipificado de cada variable dependiente, para el conjunto de plantas inoculadas de cada una de las especies. Todos los análisis estadísticos realizados se realizaron con el software SPSS® (versión 19.0, Chicago, USA).

Para llevar a cabo el análisis estadístico del apartado 3.1 se seguirá el mismo modelo anterior, examinando a priori, que se cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

$$y_{ijk} = \mu + T_i + F_j + T^*F_{ij} + \hat{\epsilon}_{ijk}$$

(2)

donde y_{ij} es el valor de la variable dependiente en la planta k inoculada con el tratamiento i de N ($i = 1, 2$), perteneciente a la familia de *Q. ilex* j ($j = 1, 2, \dots, 8$) μ es la media general; T y F son los efectos fijos de la inoculación y la familia; el término doble representa la interacción entre los mismos; y $\hat{\epsilon}$ es el termino de error bajo la hipótesis $\hat{\epsilon}_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_e)$. Posibles vínculos entre los diferentes parámetros medidos fueron estimados mediante análisis de correlación de Pearson.

Además se añadió un factor fijo para observar las diferencias en la clasificación del grado de tolerancia a la enfermedad:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + To_j + T^*To_{ij} + \hat{\epsilon}_{ijk}$$

(3)

donde y_{ij} es el valor de la variable dependiente en la planta k inoculada con el tratamiento i de N ($i = 1, 2$), perteneciente al grado de tolerancia j ($j = 1, 2$), μ es la media general; T y To son los efectos fijos de la inoculación y la clasificación de la progenie como

tolerante o susceptible; el término doble representa la interacción entre los mismos; y $\hat{\epsilon}$ es el termino de error bajo la hipótesis $\hat{\epsilon}_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_{\epsilon})$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Comprobación de la infección.

En la evaluación de la infección generada por *P. cinnamomi* en las raíces de encina se observó micelio en el 95% de las placas infestadas mientras que en las plantas testigo se obtuvieron aislamientos menores al 2%. La evaluación en alcornoque generó resultados similares, con porcentajes de un 90% en placas con raíces infectadas y tan solo se detectó un fragmento de raíz infectado en una de las 10 placas donde se sembraron las raíces de plantas testigo. Cuando se traspasaron a medio V8 sólido y después de una semana se identificó como *P. cinnamomi* bajo microscopio por observación directa de características morfológicas del micelio, verificándose la infección de las raíces con las cepas utilizadas, y la escasa incidencia de afección en plantas testigo.

4.3.2. Variabilidad de la respuesta en progenies de *Q. ilex* spp *ballota* y *Q. suber* afectados por el patógeno *P. cinnamomi*.

4.3.2.1. *Q. ilex* spp *ballota*.

4.3.2.1.1. Efecto del tratamiento y la progenie.

El análisis de varianza de dos factores muestra un efecto significativo de los factores tratamiento de infección (T) y progenie (Pr) así como su interacción para todos los parámetros de regeneración radicular salvo el diámetro de la raíz principal y valoración de la raíz (Tabla 4.2).

	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	VR
<i>p</i> T	<0,001	<0,001	0,935	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>p</i> Pr	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,653
<i>p</i> Pr*T	<0,001	<0,001	0,868	0,002	<0,001	<0,001	1

Tabla 4.2. Nivel de significación (*p*) para cada uno de los parámetros de regeneración de raíces en relación con el factor independiente tratamiento (T), progenie (Pr) y para la interacción progenie y tratamiento (Pr *T). n= 7. PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz, VR= valoración de raíz.

El peso de las raíces nuevas (PRN) en plantas control es 4 veces superior que en plantas inoculadas ($p < 0,001$) (tabla 4.3). El valor máximo de PRN encontrado en plantas inoculadas no supera los 0,359 g mientras que en el control alcanza 1,077 g de raíz. El 30% de las plantas inoculadas no emitieron raíces nuevas mientras que en las plantas control este valor se reduce al 2%. De igual modo la longitud de las raíces nuevas (LRN) es hasta 3 veces menor en plantas inoculadas que en las plantas testigo ($p < 0,001$) llegando a alcanzarse valores máximos de 170 cm de raíz en plantas testigo, sin llegar a superar los 60cm en el caso de las inoculadas. Para los valores de diámetros de la raíz principal (DIRP) no se encontraron diferencias significativas entre plantas infestadas y testigo, observándose valores similares en ambos subconjuntos de plantas, como se aprecia en la tabla 4.3. Con respecto al número de raíces nuevas en crecimiento (P) se apreció una disminución (tres veces menos) en las plantas inoculadas respecto a las plantas testigo, que alcanzaron valores máximos de 30. Asimismo, los parámetros ramificaciones (R) y fragmentos de raíz (F) mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre plantas infestadas y testigo. El modelo lineal general propuesto explica entre el 53 y el 60 % de la varianza total para las variables que resultaron significativas, observándose en ambos un descenso en los valores de las plantas inoculadas de casi 3 veces el valor de las plantas control (tabla 4.3).

	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	VR
C	0,185±0,014	37,542±2,179	4,078±0,091	5,013±0,325	32,320±2,182	10,807±0,523	1,022±0,044
I	0,047±0,003	11,078±0,600	4,061±0,055	1,661±0,097	10,352±0,760	3,254±0,164	2,247±0,050

Tabla 4.3. Valores medios (\pm ET) de parámetros morfológicos en plantas de *Q. ilex* sometidas a la infección de *P. cinnamomi* (I) n=400, frente a plantas control (C) n=240. PRN= peso de raíces nuevas(gr), LRN= longitud de raíces nuevas(cm), DIRP= diámetro de raíz principal(mm), P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz, VR= valoración radicular.

Se observó, en el 70% de casos de plantas inoculadas, la inexistencia de ramificaciones en las raíces, mientras que se obtuvieron valores máximos en plantas control de 95 ramificaciones. Finalmente para el valor de valoración visual de la raíz (VR) fue significativo el tratamiento ($p < 0,001$); se mantuvo alrededor de 1 para plantas Control, que se traduce como un porcentaje de raíces afectadas por necrosis menor al 30%, teniendo un elevado número de raíces sanas, mientras que para plantas inoculadas ronda entre un 70-80% de raíces perjudicadas.

En relación al factor progenie, en el único parámetro cualitativo radicular evaluado, VR, no resultó significativa la diferencia entre progenies, como tampoco la interacción Pr *T (tabla 4.4). Los parámetros cuantitativos mostraron en su totalidad, diferencias significativas entre progenies. Así, el peso y la longitud de las raíces nuevas (PRN

y LRN) mostró grandes diferencias entre las distintas progenies, siendo el valor medio de las 80 progenies ($0,086 \pm 0,004$ g y $18.61 \pm 0,96$ cm) respectivamente. El promedio del PRN y LRN de las 10 progenies con valores más alto es de $0,171 \pm 0,011$ g y 34.55 ± 2.86 cm, mientras que las 10 más bajas muestran valores de $0,029 \pm 0,003$ g y $7.81 \pm 0,58$ cm, respectivamente.

	T	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	VR
Max	C	1,077	170	7,76	30	150	40	3
	I	0,359	60	9,11	12	101	20	4
Min	C	0,004	3	1,31	0	2	1	0
	I	0	0	0,59	0	0	0	0,25
Perc25	C	0,252	19,25	3,22	2,25	15	7	0,5
	I	0	0	3,34	0	0	1	1,5
Perc75	C	0,317	51	4,84	7	40,75	14	1,5
	I	0,068	18,5	4,73	3	14	5	3

Tabla 4.4. Valores máximos y mínimos y percentiles 25 y 75 de los parámetros de regeneración de raíz en plantas inoculadas (I) y control (C) de 80 progenies de *Q. ilex*. PRN= peso de raíces nuevas (g), LRN= longitud de raíces nuevas (cm), DIRP= diámetro de raíz principal (mm), P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz, VR= valoración radicular. (n=640).

El diámetro de la raíz principal mostró diferencias significativas entre familias. Se observa como los valores en el percentil 25 rondan en torno a 3 mm, mientras que en el percentil 75 superan los 4mm. El número de puntas activas en crecimiento (P), obtuvo valores medios de $2.63 \pm 0,14$; mientras que los valores de las 10 progenies sobresalientes en este parámetro, alcanzaron valores de $4,92 \pm 0,51$; observándose notables diferencias con la media para los valores de las 10 familias que generaron menor cantidad de puntas activas en crecimiento, $1,04 \pm 0,08$. El valor medio de ramificaciones (R) generadas en el total de las 80 progenies fue $16,73 \pm 0,85$, siendo la media para las 10 progenies que presentaron valores mayores de $30,92 \pm 1,50$, mientras que las 10 de menor valor se movieron alrededor de la media $6,85 \pm 0,54$. Los fragmentos de raíz (F) se mueven entre valores de 7 y 1, en el percentil 25, y 14 y 5, en el percentil 75 (tabla 4.4).

4.3.2.1.2. Relaciones entre variables de regeneración de raíz.

Para determinar el grado de relación entre cada uno de los variables radiculares medidos, y de esta forma poder simplificar el modelo, se analizó a través de una matriz de correlación de Pearson, la significación de las correlaciones se muestran en la tabla 4.5.

	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	-VR
PRN	1						
LRN	0,893**	1					
DIRP	0,130**	0,106*	1				
P	0,71**	0,828**	0,116**	1			
R	0,573**	0,681**	0,03n.s.	0,533**	1		
F	0,750**	0,897**	0,105*	0,849**	0,624**	1	
-VR	0,368**	0,428**	0,118**	0,399**	0,352**	0,451**	1

Tabla 4.5. Matriz de correlación de Pearson entre cada una de las variables radicales evaluadas en *Q. ilex* (n=560). PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones, F=fragmentos de raíz.

**=La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral),

*=La correlación es significante al nivel 0.05 (bilateral), n.s.= no significativo. (n=640).

Se observa una correlación positiva con significación al nivel 0,01 entre la mayoría de los parámetros estudiados, siendo PRN, LRN, N, F y VR significativos entre ellos y con el resto de los 7 parámetros evaluados. Sin embargo no se observa significación entre los parámetros DIRP y R. Esta es la única correlación no significativa de toda la matriz. Cabe destacar la cercanía al valor 1 en la correlación entre los parámetros LRN, P y F. Esto se traduce como una relación directamente proporcional entre estos parámetros, aumentan de igual forma entre ellos.

4.3.2.1.3. Clasificación de las progenies según su tolerancia a *P. cinnamomi*.

Para establecer una diferenciación que permita clasificar las distintas familias de *Q. ilex*, se tendrán en cuenta todos aquellos parámetros que contribuyan al aumento del potencial de regeneración de raíces (PRG) bajo la presencia del patógeno.

Para ello y observando los parámetros que resultaron significativos en base a las familias, se elaborará un índice (Paulin *et al.*, 2008) a partir de la suma de los residuos estandarizados de cada uno de los parámetros, planteándose como se observa a continuación:

$$IR= PRN + LRN + P + R + F$$

Así se establece un ranking en el que se diferenciaron cada una de las familias. Para determinar el grado de tolerancia/susceptibilidad, se utilizó la escala de puntuación elaborada por Nyassé *et al* 1995, en la que se determina el grado de resistencia a partir de la siguiente escala: progenies con mayor grado de tolerancia (HT) ($IR \geq 2$), tolerantes

(TI) ($1 \leq IR < 2$) moderadamente tolerantes (MT) ($0 \leq IR < 1$), susceptibles (S) ($-2 \leq IR < 0$), elevadamente susceptibles (HS) ($-2 \geq IR$).

FAMILIA	IR	GT	FAMILIA	IR	GT	FAMILIA	IR	GT	FAMILIA	IR	GT
CPE10	7,336	HT	HEE10	1,121	TI	HEE3	-0,269	S	HRE2	-1,441	S
PGE6	5,302	HT	CPE4	1,079	TI	ZRE6	-0,290	S	ZRE7	-1,469	S
PAYE7	4,798	HT	ZRE9	0,907	MT	HRE13	-0,327	S	HRE4	-1,588	S
ZRE8	3,564	HT	HEE8	0,893	MT	COE8	-0,357	S	COE14	-1,608	S
PGE15	3,551	HT	HEE5	0,725	MT	ZRE11	-0,365	S	HRE11	-1,700	S
COE22	3,397	HT	COE7	0,691	MT	ZRE12	-0,499	S	HEE7	-1,766	S
PAYE10	2,998	HT	CPE3	0,564	MT	COE24	-0,501	S	PAYE8	-1,842	S
PGE4	2,626	HT	PGE13	0,559	MT	HEE9	-0,711	S	PGE11	-1,954	S
COE31	2,621	HT	COE1	0,529	MT	CPE5	-0,730	S	ZRE4	-2,117	HS
CPE8	2,376	HT	CR3	0,472	MT	HEE12	-0,771	S	PAYE2	-2,583	HS
COE23	2,231	HT	COE6	0,463	MT	COE9	-0,848	S	HRE3	-2,626	HS
CPE1	1,994	TI	HEE14	0,434	MT	PAYE4	-0,883	S	HRE9	-2,639	HS
COE15	1,937	TI	PAYE9	0,383	MT	COE25	-0,969	S	PAYE5	-2,680	HS
CR2	1,650	TI	CPE7	0,324	MT	PGE7	-1,035	S	ABA110	-2,692	HS
CPE6	1,626	TI	HRE16	0,214	MT	HRE14	-1,043	S	COE26	-2,954	HS
PAYE11	1,565	TI	CPE2	0,191	MT	HEE15	-1,162	S	HRE7	-3,013	HS
PGE10	1,520	TI	HEE11	-0,069	S	HEE4	-1,178	S	PAYE3	-3,231	HS
COE30	1,435	TI	COE29	-0,074	S	PGE9	-1,211	S	PAYE1	-3,321	HS
ZRE1	1,294	TI	HEE1	-0,213	S	HEE2	-1,264	S	HRE10	-3,652	HS
HRE15	1,143	TI	PGE8	-0,251	S	CPE9	-1,299	S	HRE8	-3,926	HS

Tabla 4.6. Clasificación general de las familias de *Q. ilex* con valores normalizados de IR y su grado de tolerancia (GT). Alto grado de tolerancia (HT) ($IR \geq 2$), tolerantes (TI) ($1 \leq IR < 2$) moderadamente tolerantes (MT) ($0 \leq IR < 1$), susceptibles (S) ($-2 \leq IR < 0$), elevadamente susceptibles (HS) ($-2 \geq IR$).

11 progenies se clasificaron como de alto grado de tolerancia (HT) y 12 con alto grado de susceptibilidad (HS). El 13,75% de las familias se clasificaron como tolerantes, mientras que el 40% como susceptibles. 14 familias se clasificaron como moderadamente tolerantes. En el grupo HT el 30% de las progenies son de la procedencia SCR mientras que el 70% pertenecen a la procedencia RE. La única progenie procedente de Portugal (ABA110) mostró una susceptibilidad elevada. Las plantas clasificadas como HS pertenecieron, exceptuando COE26, a la región extremadurese. Se observa cómo, progenies localizadas en la misma zona (ZR, PAY, COE) se posicionan en ambos conjuntos extremos del ranking. Las familias evaluadas situadas en el término municipal de Villanueva de los Castillejos, Huelva (HR), presentaron en general valores elevados de susceptibilidad al patógeno. Las progenies seleccionadas de la zona de la Sierra Onubense (CR, CP) mostraron en general valores de tolerancia al patógeno en el ranking elaborado. Por último las progenies seleccionadas en el término municipal de Puebla de Guzmán (PG, HE) situadas en el Andévalo Onubense, se distribuyeron a lo largo del ranking aunque se denotó una mayor susceptibilidad en general de las progenies pertenecientes a esta localización.

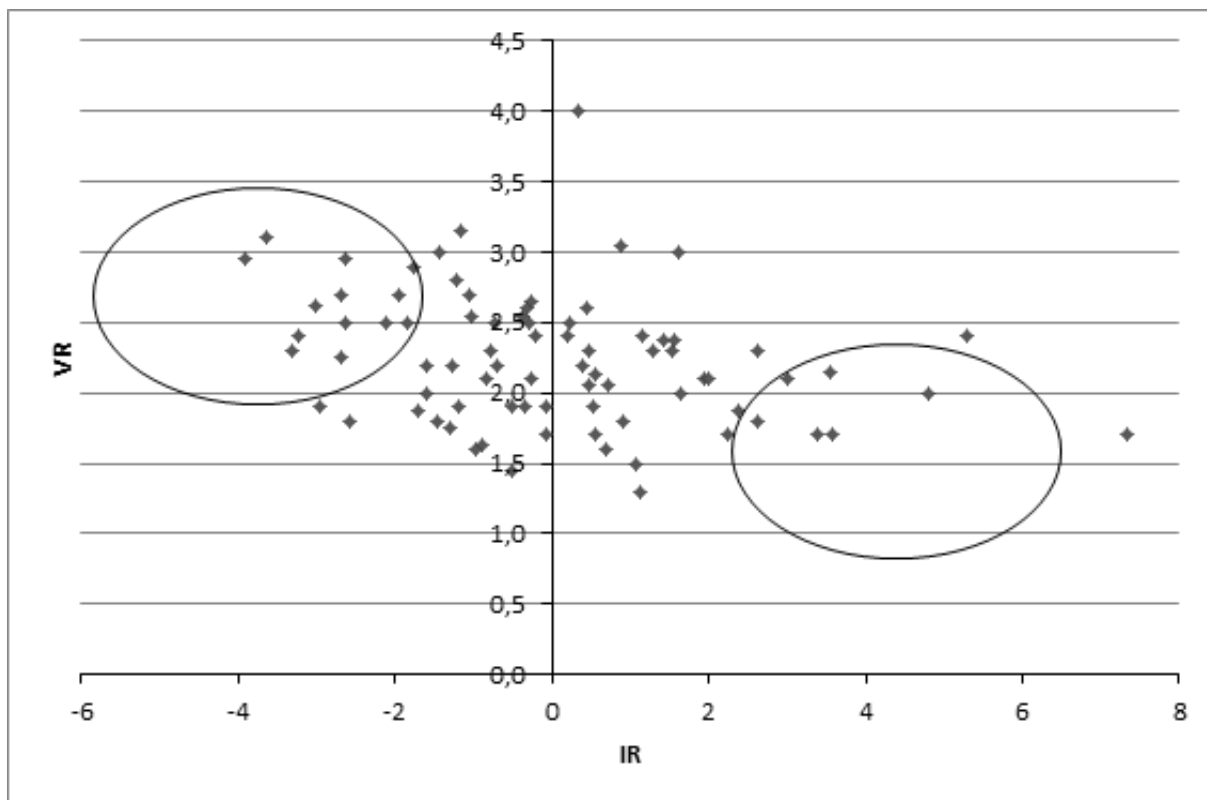


Figura 4.5. Diagrama de dispersión de valoración visual de raíces (VR) vs índice normalizado de tolerancia (IR) de plantas inoculadas (n=4) del total de las 80 progenies de *Q. ilex*.

4.3.2.2. *Q. suber*.

4.3.2.2.1. Efecto del tratamiento y la progenie.

El análisis de varianza de los factores muestra un efecto significativo de los factores tratamiento de infección (T) para todos los parámetros, exceptuando DIRP, al igual que ocurrió en *Q. ilex*. En el factor fijo progenie (Pr), los factores PRN, LRN, P y R mostraron evidencias significativas. Para la interacción entre ambos factores (Pr*T) la significación se observó en PRN, LRN y R (Tabla 4.7).

	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	VR
<i>p</i> T	<0,001	<0,001	0,583	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>p</i> Pr	<0,001	<0,001	1	0,009	<0,001	0,20	0,960
<i>p</i> Pr*T	<0,001	0,001	1	0,065	<0,001	0,608	0,948

Tabla 4.7. Nivel de significación (*p*) para cada uno de los parámetros de regeneración de raíces en *Q. suber* en relación con el factor Tratamiento (T), Progenie (Pr) y para la interacción progenie y tratamiento (Pr *T). n=384. PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz, VR= valoración de la raíz.

El peso de las raíces nuevas (PRN) en plantas control es 7 veces superior a las plantas inoculadas, donde los valores no superan los 0,51 gramos. El valor máximo para plantas Control es de 3,04 gramos de raíz (tabla 4.9). De igual modo, la longitud de las raíces nuevas (LRN) es hasta 5 veces menor en plantas inoculadas que en las plantas testigo, con valores máximos de 245 cm. Para los valores de diámetros de la raíz principal (DIRP), se observan valores similares en ambos subconjuntos de plantas. Con respecto al número de raíces nuevas en crecimiento (P) se apreció una disminución (tres veces menos) en las plantas inoculadas respecto a las plantas testigo en las que se alcanzó el máximo de 17 puntas blancas. Asimismo, los parámetros ramificaciones (R) y fragmentos de raíz (F) mostraron en ambos un descenso en los valores de inoculadas de casi 3 veces el valor de las control (tabla 4.8).

	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	VR
C	1,021±0,070	111,357±5,404	4,613±0,086	6,492±0,438	165,175±10,153	16,365±0,605	0,750±0,038
I	0,151±0,012	21,137±1,259	6,349±2,063	2,602±0,159	22,152±1,442	6,020±0,296	1,870±0,051

Tabla 4.8. Valores medios (\pm ET) de parámetros morfológicos en plantas de *Q. suber* sometidas a la infección de *P. cinnamomi* (I). PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz, VR= valoración radicular. (n=384).

La media de PRN de plantas control fue hasta 10 veces mayor que en inoculadas encontrándose valores extremos de 4 g en plantas control; igual ocurrió para LRN, donde los valores máximos para plantas inoculadas y control variaron entre 108 y 350 cm, respectivamente. Las puntas activas en crecimiento alcanzaron su máximo en plantas testigo con 25, mientras que estos valores se reducían a la mitad en el caso de los valores máximos para plantas inoculadas. Las ramificaciones (R) alcanzaron valores máximos de 557 en plantas control, no pasando los 160 en inoculadas. Los valores de VR se establecieron por debajo de 1 para Control y entre 1 y 2 para Inoculadas, siendo estas variaciones estadísticamente significativas. En los parámetros relacionados con el número de fragmentos de raíz (F) y la valoración de raíz (VR) no se observaron diferencias significativas entre familias, ni en la interacción entre familia y tratamiento.

Los valores medios del total de las 64 progenies para ambos factores fueron 0,442±0,03 g y 51,29±2,71 cm. En el caso del factor DIRP, éste no generó diferencias significativas para ninguna de las dos variantes. El parámetro radicular P, que representa el número de puntas de raíz metabólicamente activas con media 3,90±0,19; mostró diferencias significativas entre las distintas familias. Sin embargo, para la interacción entre familia y tratamiento (Pr*T) no resultó significativa. En el parámetro R ocurre lo mismo que en aquellos que se relacionan directamente con el peso y longitud de raíces. El análisis de la varianza resultó significativo $p < 0,05$ ($R^2 = 0,732$). Posteriormente

se realizó un test *Tukey* de comparación múltiple de las medias para un nivel de significación $p \leq 0,05$ que generó una diferenciación entre dos subconjuntos homogéneos de progenies evaluadas. Los valores máximos y mínimos, así como los percentiles 25 y 75, para cada factor se exponen en la tabla 4.9:

Pr	T	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	VR
Max	C	4	350	7,26	25	557	36	2
	I	1,317	108	5,22	12	160	24	4
Min	C	0,039	12	1,83	0	9	1	0
	I	0	0	1,72	0	0	0	0,5
Perc25	C	1,348	66,5	3,90	3	73,5	11,75	0,5
	I	0,290	7	3,66	1	4	2	1
Perc75	C	0,457	150,5	5,2	9	29,25	20	1
	I	0,187	31	4,85	4	32	9	2,5

Tabla 4.9. Valores medios, máximos y mínimos y percentiles 25 y 75 de los parámetros de regeneración de raíz en plantas inoculadas (I) y control (C) de 80 progenies de *Q. ilex* (n= 5 para inoculadas y n= 3 para control). PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz.

4.3.2.2.2. Relaciones entre variables de regeneración de raíz.

Se encontró una correlación positiva significativa entre todos los elementos evaluados, exceptuando el DIRP que no se relaciona significativamente con ninguno de los factores restantes, como se percibe en la siguiente matriz de correlación de Pearson (tabla 4.10):

	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	-VR
PRN	1						
LRN	0,900**	1					
DIRP	-0,15n.s.	-0,19n.s.	1				
P	0,557**	0,654**	0,034n.s.	1			
R	0,741**	0,849**	-0,027n.s.	0,585**	1		
F	0,696**	0,841**	0,013n.s.	0,752**	0,743**	1	
-VR	0,498**	0,561**	0,021n.s.	0,435**	0,491**	0,577**	1

Tabla 4.10. Matriz de correlación de Pearson entre cada uno de los factores radiculares evaluados en *Q. suber* (n=384). PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz; VR: valoración visual de raíz. **=La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral), *=La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral), n.s.= no significativo.

El factor VR es inversamente proporcional al resto de los factores, debido a que el incremento en este valor implica el descenso de vigor de la planta, mientras que en los factores cuantitativos evaluados, un aumento se traduce como un mayor valor de

Potencial de regeneración de raíces, y por consiguiente, un mejor desarrollo de la estructura radicular de la planta.

4.3.2.2.3. Clasificación de las progenies según su tolerancia a *P. cinnamomi*.

Para clasificar las distintas familias de *Q. suber* se tendrán en cuenta todos aquellos parámetros que se utilizaron para determinar el índice en *Q. ilex*. Para ello a partir de los datos obtenidos en plantas infectadas, en los que se observan diferencias significativas entre familias de manera evidente, se compondrá un índice a partir de la suma de los valores normalizados de los parámetros que generaron diferencias significativas:

$$IR = PRN + LRN + P + R + F$$

La escala de puntuación elaborada por Nyassé *et al* 1995, se utilizó para clasificar las progenies a partir del índice, al igual que en *Q. ilex*. (Tabla 4.11).

FAMILIA	IR	GT	FAMILIA	IR	GT	FAMILIA	IR	GT	FAMILIA	IR	GT
HEE6	5,244	HT	SAA361	0,791	MT	COA47	-0,495	S	BAA27	-1,151	S
SALG297	5,050	HT	COA2	0,781	MT	COA6	-0,527	S	COA7	-1,204	S
SBA326	3,734	HT	COA10	0,735	MT	BAA22	-0,579	S	BAA29	-1,220	S
BAA6	3,483	HT	COA3	0,709	MT	BAA4	-0,607	S	COA48	-1,273	S
SAA359	3,463	HT	SALG82	0,625	MT	BAA7	-0,661	S	COA45	-1,470	S
BAA26	2,621	HT	BAA10	0,421	MT	SALG307	-0,662	S	BAA15	-1,481	S
COA4	2,459	HT	BAA3	0,392	MT	BAA8	-0,672	S	SALG296	-1,489	S
BAA9	2,189	HT	COA5	0,315	MT	BAA12	-0,726	S	SALG299	-1,559	S
SAA355	1,947	TI	BAA24	0,082	MT	ZRA5	-0,735	S	COA43	-2,063	HS
SAA370	1,837	TI	BAA18	0,002	MT	COA1	-0,746	S	SAA356	-2,096	HS
BAA1	1,691	TI	SABA330	-0,047	S	BAA25	-0,818	S	COA46	-2,181	HS
BAA5	1,629	TI	SALG295	-0,113	S	COA41	-0,867	S	COA44	-2,309	HS
COA9	1,416	TI	BAA17	-0,118	S	BAA20	-0,868	S	CRA1	-2,384	HS
BAA11	1,304	TI	BAA28	-0,128	S	COA42	-0,986	S	BAA14	-2,528	HS
BAA16	1,135	TI	COA8	-0,206	S	BAA30	-1,034	S	SAA360	-2,885	HS
COA40	1,055	TI	BAA23	-0,369	S	BAA13	-1,099	S	COA49	-3,747	HS

Tabla 4.11. Clasificación general de las familias de *Q. suber* con valores normalizados de IR y su grado de tolerancia (GT). Alto grado de tolerancia (HT) ($IR \geq 2$), tolerantes (TI) ($1 \leq IR < 2$) moderadamente tolerantes (MT) ($0 \leq IR < 1$), susceptibles (S) ($-2 \leq IR < 0$), elevadamente susceptibles (HS) ($-2 \geq IR$).

8 progenies se clasificaron como de alto grado de tolerancia (HT) y 8 con alto grado de susceptibilidad (HS). El 46,8% de las familias se clasificaron como susceptibles y el 28,2% restante se clasificaron como MT y TI. La influencia de la procedencia no se percibió para alcornoque, ya que existe una homogeneidad en la distribución de procedencias a lo largo del ranking. En la figura 4.6 se representan el total de las 64 familias de *Q. suber*. Aquellas que dispongan de valores de IR mayor junto con valoraciones radicales más bajas serán aquellas que presenten valores mayores de tolerancia. Sin embargo los valores más bajos en el ranking junto con valores de VR mayores representan aquellas familias susceptibles a la enfermedad.

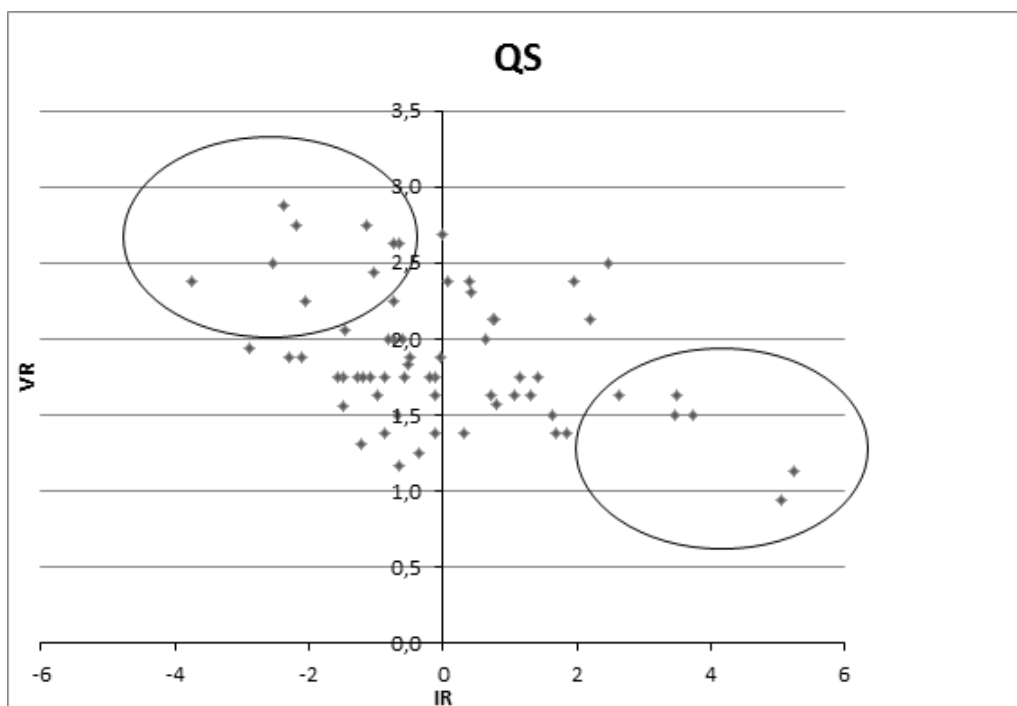


Figura 4.6. Diagrama de dispersión de valoración visual de raíces (VR) vs índice normalizado de tolerancia (IR) de plantas inoculadas (n=4) del total de las 64 progenies de *Q. suber*.

4.3.3. Evaluación de parámetros morfológicos en progenies seleccionadas de *Q. ilex* spp *ballota*.

El análisis de varianza realizado el año siguiente (plantas de 2 años de edad, tras 6 meses de inoculación y 6 meses en la caja de perlita) sobre la selección de 8 progenies con comportamiento extremo, mostró un efecto significativo del tratamiento (T) y de las familias (Pr) (tabla 4.12). Los parámetros morfológicos evaluados PRN, LRN, R, F, NHJ y VA, mostraron diferencias significativas entre tratamiento de inoculación y control con $p < 0,001$ en todos los casos. Respecto a las 8 familias seleccionadas se observaron diferencias significativas en los parámetros PRN, DIRP, LTP y NHJ. La interacción entre ambos factores fue significativa para PRN y R.

	PRN	LRN	DIRP	R	P	F	LTP	NHJ	VA
Pr	0,001	0,102	0,007	0,093	0,110	0,368	0,050	0,050	0,085
T	<0,001	<0,001	0,118	<0,001	0,989	<0,001	0,085	<0,001	<0,001
Pr*T	0,015	0,333	0,677	0,008	0,359	0,248	0,834	0,317	0,169
R ²	0,346	0,319	0,193	0,281	0,148	0,333	0,153	0,352	0,272

Tabla 4.12. Nivel de significación (p) en cada uno de los variables para los factores fijos Familia (Pr, n=8), tratamiento (T, n=2) y su interacción (Pr*T, n=16). Además se exhiben los valores de R² para cada modelo (n=320). PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz, LTP: longitud del tallo principal, NHJ: número de hojas, VA: valoración visual de la parte aérea.

Las diferencias entre el conjunto de familias tolerantes (HT) y susceptibles (HS), se analizaron mediante una ANOVA de dos factores: el factor fijo clase de Tolerancia (To) y el factor fijo tratamiento (T) y la interacción. Se encontró un efecto significativo de la clasificación de tolerancia en todos los parámetros radiculares excepto DIRP. Las plantas de las familias pertenecientes al conjunto HT poseen valores significativamente superiores en los parámetros evaluados. Se observó una diferencia significativa entre plantas inoculadas y testigo, viéndose cómo todos los factores disminuyen tras la infección, exceptuando el parámetro P en plantas HT, que aumentó tras la infección. Exceptuando este parámetro, se observa una variación mayor entre plantas inoculadas y testigo, en aquellas plantas clasificadas como HS. Los valores de peso y longitud de las raíces nuevas en las plantas inoculadas alcanzan un 41% respecto al control para el grupo de familias HS mientras que para el grupos HT representan el 68 y 51% del peso y longitud de las plantas control respectivamente superando incluso el valor de las control del grupo HS. Proporciones similares se encuentran para la variable número de ramificaciones (42 y 74% en las plantas HS y HT respectivamente).

To	T	PRN	LRN	DIRP	R	P	F
HS	c	0,293±0,035	71,98±4,61	0,537±0,029	61,46±6,81	2,40±0,51	17,85±0,12
	i	0,124±0,019	30,09±3,97	0,477±0,024	26,48±4,18	1,52±0,34	6,74±0,13
HT	c	0,451±0,076	99,36±14,75	0,545±0,029	75,18±13,79	2,27±0,46	20,23±0,10
	i	0,316±0,045	52,61±8,65	0,538±0,022	56,03±10,57	3,90±0,81	9,40±0,26
Total	c	0,354±0,037	82,55±6,53	0,540±0,021	66,75±6,75	2,35±0,36	18,80±0,08
	i	0,197±0,023	38,54±4,23	0,500±0,017	37,56±4,98	2,41±0,39	7,74±0,14
<i>p</i> (To)		<0,001	0,001	0,224	0,010	0,042	0,149
<i>p</i> (T)		<0,001	<0,001	0,236	0,001	0,498	<0,001
<i>p</i> (To*T)		0,683	0,743	0,343	0,338	0,024	0,936

Tabla 4.13. Valores medios ± Et de cada uno de las variables radiculares evaluados (n= 136) y nivel de significación del tratamiento (T) y de la clasificación de la familia por el grado de tolerancia (To). PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=ramificaciones radiculares, F=fragmentos de raíz.

Los parámetros morfológicos aéreos NHJ y VA también mostraron diferencias significativas en los distintos grados de tolerancia. Las plantas HT poseen mayor número de hojas que las HS, y éstas se reducen a la mitad en ambos casos, con el desarrollo de la infección. El grado de afección en la valoración visual de la parte aérea fue mayor en el grupo de familias susceptibles, obteniéndose afecciones de alrededor del 50% de la planta, mientras que las HT se mantuvieron alrededor del 35% de afección.

To	T	LTP	NHJ	VA
HS	C	14,57±0,66	18,94±1,68	1,60±0,17
	I	16,40±0,90	9,04±1,18	2,60±0,19
HT	C	15,17±1,26	24,04±2,02	1,32±0,16
	I	16,29±0,98	12,83±1,89	2,13±0,26
Total	C	14,80±0,63	20,91±1,32	1,49±0,12
	I	16,36±0,66	10,46±1,04	2,43±0,16

Tabla 4.14. Valores medios ± ET de cada uno de las variables aéreas evaluadas (n= 136). LTP: longitud del tallo principal, NHJ: número de hojas jóvenes, VA: valoración visual de la parte aérea.

Finalmente, y al igual que en anteriores ensayos, se valoró la relación entre los distintos parámetros medidos en las plantas, observándose como el único factor que no se encuentra relacionado con la mayoría de los parámetros radiculares evaluados es longitud del tallo principal (LTP).

	PRN	LRN	DIRP	R	P	F	LTP	NHJ	VA
PRN									
LRN	0,741**								
DIRP	0,202*	0,258**							
R	0,692**	0,719**	0,206*						
P	0,202*	0,281**	0,086n.s.	0,298**					
F	0,511**	0,812**	0,226**	0,589**	0,319**				
LTP	0,036n.s.	0,111n.s.	0,241**	0,063n.s.	0,002**	0,108n.s.			
NHJ	0,536**	0,573**	0,218*	0,515**	0,223**	0,508**	0,306**		
VA	-0,398**	-0,545**	-0,098n.s.	-0,408**	-0,236**	-0,468**	-0,153n.s.	-0,675**	

Tabla 4.15. Matriz de correlación de Pearson entre cada uno de los parámetros morfológicos evaluados en *Q. ilex* (n=320). PRN= peso de raíces nuevas, LRN= longitud de raíces nuevas, DIRP= diámetro de raíz principal, P= puntas activas en crecimiento, R=pelos radiculares, F=fragmentos de raíz; LTP: longitud del tallo principal; NHJ= número de hojas; VA= valoración aérea. **=La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral), *=La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral), n.s.= no significativo.

4.4. DISCUSIÓN.

4.4.1. Sintomatología de la enfermedad.

La presencia de *P. cinnamomi* en las raíces de plantas infectadas se ha verificado a través del cultivo de raíces afectadas en medio selectivo, evidenciando con ello que la infección ha sido efectiva en ambas especies (Sánchez *et al.*, 2002).

La sintomatología de la enfermedad en ambas especies se manifiesta a través de la reducción en la regeneración de raíces nuevas tanto en peso como en longitud, como se comprobó en el capítulo 1, así como la reducción de ramificaciones y puntas activas en crecimiento en las raíces de plantas infectadas por la enfermedad. Se observa por tanto que en las condiciones de estrés impuestas por el patógeno las plantas reducen su capacidad de generación de raíces (Tinus 1996; Villar-Salvador *et al.*, 1999).

4.4.2. Relación entre parámetros medidos.

Las relaciones que se establecen entre cada uno de los parámetros radiculares evaluados para evidenciar el efecto de la infección por *P. cinnamomi* (como fue visto en el Capítulo 1), han sido analizadas a través de una matriz de correlación de Pearson. Según esta matriz, se observa una clara relación entre todos los parámetros (Caetano *et al.*, 2007), exceptuando DIRP, que no se pudo relacionar con la generación de raicillas absorbentes, resaltando que este parámetro no sería un buen indicador para infecciones en las mismas condiciones en las que se ha desarrollado este estudio. Independientemente de DIRP, los resultados obtenidos en los restantes parámetros medidos en el ensayo desvelan como para ambas especies objeto de estudio, la generación de raíces tras la infección y el trasplante a sustrato poroso derivó en un descenso significativo a la hora de desarrollar el sistema radical, reflejado por la caída de los valores de los parámetros evaluados. Como consecuencia de los resultados de esta matriz, se puede determinar que, cualquiera de los parámetros medidos (a excepción de DIRP) podría ser un buen indicador del efecto de la infección por parte de *P. cinnamomi* en plantas de *Q. ilex* y *Q. suber*.

4.4.3. Diferencias entre progenies.

Los resultados obtenidos en el ensayo desvelan una clara variabilidad tanto en el total de familias de *Q. ilex* como en *Q. suber* (Tapias *et al.*, 2005a; Tapias *et al.* 2004), coincidiendo con estudios efectuados para la especie *E. marginata*, donde se observaron familias de eucaliptos resistentes a *P. cinnamomi* (Stukely *et al.*, 1994) y se desvela que la tolerancia se encuentra influenciada por un moderado componente genético. Sin embargo no se ha apreciado una mortalidad elevada en las plantas seleccionadas para el estudio que hubiera apoyado la selección de progenies tolerantes.

Cuando se procede a la evaluación de las diferencias entre progenies, en cada uno de los parámetros evaluados, se observaron las siguientes reacciones ante la infección: en primer lugar, existen familias que en condiciones normales (control) desarrollaran un sistema radicular sano y poseen un elevado PFR en relación con otras, como es el caso de la familia COE26 (HS), en la que a priori, se observan valores medios de

peso de raíces nuevas (PRN) de $0,254 \pm 0,096$ g, pero que, ante la acción del patógeno, frenaran su crecimiento radicular, disminuyendo drásticamente su PFR, hasta valores de $0,012 \pm 0,006$ g, observándose valores medios de ramificaciones (R) de hasta un 90% mayores para plantas testigo e inoculadas de $21,5 \pm 1,49$ y $2 \pm 1,26$ respectivamente.

En segundo lugar, se presentan progenies con valores bajos en factores radiculares para testigo (PRN= $0,073 \pm 0,029$ g) y tras la inoculación, estos valores descienden hasta casi no generar raíces ($0,053 \pm 0,031$ g) como es el caso de HEE2 (S).

Por último, existe un grupo de progenies, como es el caso de COE22 (HT) en el que se aprecia la existencia de un sistema radicular sano y potente en plantas testigo (PRN= $0,213 \pm 0,095$ g), y que en plantas infestadas sus valores de PFR destacan por encima del resto de las familias (PRN= $0,100 \pm 0,031$ g). Se observa la incidencia de la infección por parte de *P.cinnamomi* pero aún así, la planta sigue generando raíces funcionales que permiten el desarrollo del individuo, detectándose parámetros de salubridad de la planta (Caetano *et al.*, 2007) a través de la generación de ramificaciones (R) con valores de $32,5 \pm 7,5$ en plantas testigo y $22,2 \pm 8,7$ en plantas infectadas.

Las familias más adecuadas para seleccionarlas como más tolerantes al patógeno, serían las última, ya que independientemente del desarrollo normal de su sistema radicular, estas familias generarán un PFR que permita seguir con el desarrollo de la planta pese a la presencia del patógeno, mientras que aquellas cuyo sistema radicular desciende drásticamente ante la infección, se considerarán vulnerables a la acción de *P.cinnamomi*. Resultados similares han sido reportados por Tapias *et al.* (2005) que estudió la variabilidad de progenies de encina y de alcornoque (Tapias *et al.* 2004) para sustratos infectados de forma natural y artificialmente.

También se han llevado a cabo estudios de variabilidad entre familias en otras especies. Así, Paulin *et al.*, 2008, estableció un índice en el que clasificó clones de poblaciones de cacao resistentes a *P. megakarya* (Nyassé *et al.*, 1995). Además la clasificación de árboles tolerantes a *P.cinnamomi*, también se desarrollo para *E. marginata* (Stukely *et al.*, 1994; Hürbeli *et al.*, 2002), a partir de la medida de lesiones de raíces secundarias ya formadas. Así se establece un ranking a partir de los valores de los parámetros radiculares que conforman el PFR en plantas inoculadas, observándose la variabilidad intraespecífica así como interespecífica, como se reportó para arboles de alcornoques por Moreira *et al.*, (1997).

El ranking elaborado a partir de los parámetros ha permitido clasificar las progenies en función de su tolerancia o susceptibilidad a *P.cinnamomi*. De este modo, las progenies con valores más altos en esta clasificación corresponderían a las familias más tolerantes, mientras que los más bajos corresponderían a las familias consideradas más susceptibles. Dado que los límites de tolerancia o susceptibilidad del ranking

elaborado, dependerían de las condiciones de estudio para analizar la tolerancia o susceptibilidad de las progenies, conviene comparar las progenies pertenecientes a los conjuntos más extremos del ranking.

4.4.4. Comparación entre tolerantes y susceptibles.

El análisis de progenies pertenecientes a los conjuntos más extremos del ranking, denota una clara significación entre las familias clasificadas como tolerantes y susceptibles.

En progenies de *Q.ilex*, se clasificaron 11 progenies como muy tolerantes, procedentes de distintas localizaciones de las dos regiones de procedencia estudiadas en el capítulo anterior. En el extremo opuesto del índice, donde se encuentran las plantas muy susceptibles (HS) se posicionan un 15% de las familias, que no toleraron la infección y como consecuencia obtuvieron valores más negativos en el IR. Las progenies pertenecientes a este subconjunto, mostraron diferencias bastante notables en cada uno de los parámetros evaluados entre plantas infestadas y testigo.

Si se hace un análisis general de la medias de los grupos clasificados como muy tolerantes (HT) y muy susceptibles (HS) se obtienen valores 8 veces más altos en plantas HT que en HS para el parámetro PRN: $0,083\pm 0,030$ g y $0,011\pm 0,039$ g respectivamente. Para otros parámetros determinantes de la salud de la planta como número de puntas blancas (P) se obtuvieron valores 6 veces mayores, $3,181\pm 0,324$ (HT) y $0,583\pm 0,039$ (HS).

Estas notables diferencias en la tolerancia a la enfermedad, se corroboraron a través de un ensayo posterior en el que se utilizaron un mayor número de plantas de las progenies clasificadas como tolerantes y susceptibles (Apartado 4.3.2.2.3 de resultados), verificando por tanto, que las progenies seleccionadas se mantuvieron dentro de los supuestos de tolerancia del ranking elaborado.

En las progenies estudiadas de *Q.suber*, al igual que en encina, se observan diferencias que evidencian la disparidad en la adaptación a la infección del patógeno por parte de las progenies. No se observó una relación entre los diferentes rangos del ranking en base a la localidad de procedencia, verificando el estudio de procedencias del Capítulo 1, al contrario que ocurrió en estudios llevados a cabo por Moreira *et al.*, (1997) donde se localizaron diferencias entre localizaciones de árboles de alcornoque, sospechando que esta diferenciación, podría estar influenciada por factores edáficos y fisiográficos.

El parámetro PRN ha variado significativamente, siendo hasta 8 veces mayor, en plantas infestadas de HT que en HS, registrándose valores de $0,358\pm 0,022$ g y $0,041\pm 0,008$ g respectivamente. Los valores de P en plantas HT fueron hasta 4 veces ma-

yores que en HS, llegando a ser hasta 6 veces mayores para el parámetro R. El número de fragmentos de raíz en HT mostró valores medios de $9,42 \pm 0,84$ que enfrentados con los valores de $2,03 \pm 1,23$ en plantas muy susceptibles, dan una idea de las grandes variaciones en el PFR entre progenies de ambos grupos extremos.

Los resultados de los ensayos llevados a cabo en este capítulo, han permitido una selección de familias de encinas y alcornoques, tolerantes al patógeno, y del mismo modo, dentro de estas progenies, seleccionar individuos que muestren los mayores niveles de tolerancia ya que también existe una elevada variabilidad en la tolerancia al patógeno entre los individuos pertenecientes a una misma progenie. Estas mismas observaciones fueron reportadas por diferentes autores, como por ejemplo, para el caso de *E. marginata* (Kellam *et al.*, 1985; Hüberli *et al.*, 2002) y plantas de cacao afectadas por *P. megakarya* (Paulin *et al.*, 2008).

5. CAPÍTULO 3. INFLUENCIA DE
PARÁMETROS HÍDRICOS EN LA
EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA/
SUSCEPTIBILIDAD AL PATÓGENO
Phytophthora cinnamomi DE
PLANTAS DE VIVERO DE
Quercus ilex spp *ballota*.

5.1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, se han llevado a cabo medidas de parámetros fisiológicos en las plantas (Kramer *et al.*, 1983; Pearcy *et al.*, 1989), con la finalidad de determinar los daños que producen distintas situaciones de estrés en especies forestales. Estas situaciones de estrés se ocasionan tanto por factores bióticos hongos, protistas, etc. (Batini *et al.*, 1974; Maurel *et al.*, 2001; Robin *et al.*, 1998a) como por factores abióticos: sequía, heladas, fluctuaciones de temperatura, etc. (Ferreeres *et al.*, 1978; Levitt *et al.*, 1980; Arnott *et al.*, 1993; Abril *et al.*, 1998).

Las adaptaciones fisiológicas entre procedencias han sido estudiadas para otras especies: *Pinus taeda* (Bongarten y Teskey, 1986), *Picea abies* (Oleksyn *et al.*, 1998), *Pinus sylvestris* (Palmroth *et al.*, 1999), *Fagus sylvatica* (Peuke *et al.*, 2002) pero para especies de frondosas esclerófilas mediterráneas no existe una literatura que especifique claramente las diferencias entre procedencias (Pesoli *et al.*, 2003). Algunos estudios en *Quercus ilex* (Gratani *et al.*, 2003; Serrano and Peñuelas 2005; Ogaya y Peñuelas 2006; Sánchez-Vilas y Retuerto, 2007) y en *Quercus suber* (Ramírez-Valiente *et al.*, 2009) han encontrado una adaptación de plantas de procedencia xéricas a la sequia.

Se han realizado estudios de respuesta a condiciones de estrés que evalúan las diferencias en los parámetros fisiológicos en plantas afectadas, como se reportó por Fernández (2008). En el caso particular de *P.cinnamomi* se han llevado a cabo diversos estudios en diferentes especies afectadas por el oomiceto.

Así los primeros experimentos llevados a cabo para este patógeno, que estudiaron las diferencias entre parámetros hídricos, fueron en plantas de aguacate (Kellam *et al.*, 1985). En el caso de especies forestales se reportó para *Eucalyptus marginata* (Fernández *et al.*, 2003) la diferenciación en los parámetros hídricos entre plantas afectadas por *Phoracantha semipunctata* (Fab). Posteriormente se evaluó la influencia de *P.cinnamomi* en los parámetros hídricos en plantas de *Castanea sativa* (Maurel *et al.*, 2001). Actualmente se están llevando a cabo estudios en los que se valoran las diferencias en parámetros fisiológicos en plantas de *Q.ilex* infectadas con *P.cinnamomi* (Maurel *et al.*, 2001; Robin *et al.*, 2001), pero no se reportan estudios en los que se valoren parámetros fisiológicos en relación con la enfermedad causada por *P.cinnamomi* entre familias de resistencia contrastada.

De esta forma surge la necesidad de evaluar la diferencia en el comportamiento hídrico de familias afectadas por la enfermedad, partiendo de la hipótesis de partida en la que la infección afecta a la fisiología de la planta, en mayor o menor grado, dependiendo de la tolerancia de la progenie a la que pertenece. Por tanto, se plantea como objetivo de este capítulo estudiar el efecto de la infección de raíces causada por el patógeno *P. cinnamomi* en diferentes parámetros hídricos. Para ello se seleccionaron progenies que una vez inoculadas, habían respondido a la infección, bien con una afección leve y con escasos o nulos síntomas aparentes, bien con una afección drástica (Capítulo 2).

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.2.1. Material vegetal e inóculo.

Para el desarrollo del presente capítulo se tomaron las plantas de las familias que, previamente, se clasificaron como más tolerantes y más susceptibles en el ranking generado en el capítulo anterior. Al igual que en los anteriores capítulos, las plantas se sometieron a la infección por parte de las tres cepas de *P. cinnamomi* de las que se disponía.

5.2.2. Diseño experimental.

Para llevar a cabo este ensayo, se evaluó el total de 80 familias descritas en el capítulo anterior. Los datos de Transpiración y Potencial hídrico mostrados en este apartado serán de las 20 progenies de *Q. ilex* que a priori (Capítulo 2), resultaron tolerantes (CPE10, PGE6, PAYE7, ZRE8, PGE15, COE22, PAYE10, PGE4, COE31, CPE8, COE23 y CPE1) o susceptibles (HRE8, HRE10, PAYE1, PAYE3, HRE7, COE26, ABA110 y PAYE5). Así, previo al ensayo de evaluación de parámetros morfológicos radiculares del Capítulo 2, las plantas, se sometieron a inoculación (apartado 2 material y métodos Capítulo 2) la primera semana de marzo de 2011. Una vez inoculadas la mitad de las plántulas, se dispusieron 3 plantas testigo y 3 inoculadas de cada progenie, en alveolos de 330cc a lo largo de una serie de bandejas, en módulos separados para evitar infección de los controles, de forma aleatoria, rotando periódicamente las bandejas para evitar fluctuaciones de posición. La altura media de las plántulas en este momento es de $12,271 \pm 0,541$ cm. Posteriormente se dispusieron sobre mantas calefactoras para mantener la temperatura media en torno a 25-30°C, con el fin de que se produzca el desarrollo de la acción infectiva de *P. cinnamomi*, cuya capacidad de invadir tejidos vegetales se ve favorecida por temperaturas entre 25°C y 30°C, con óptimos de alrededor de 30°C (Shearer- Tippet, 1989). La humedad ambiental de la sala se consiguió mante-

ner en torno a 70% a través del empleo de microaspersores. Las plantas que se tomaron como testigo, estarán sujetas a las mismas condiciones ambientales que las infectadas. Las plantas estuvieron durante 3 semanas en condiciones favorables de infección. El ensayo de transpiración se llevó a cabo en la última semana de marzo de 2011.

5.2.3. Parámetros fisiológicos medidos.

5.2.3.1. Potencial hídrico (Ψ).

Con la medida del potencial hídrico se pretende correlacionar el estado hídrico de la planta con la acción necrótica que ejerce el hongo sobre las raíces absorbentes, hecho que dificulta la absorción tanto de agua como de minerales y en definitiva modifica el estado de salud del huésped (Caetano *et al.*, 2007).

Del total de las plantas descritas en el apartado de material vegetal se seleccionaron, de forma aleatoria, 4 plantas inoculadas por familia y 2 testigos. Cuando aún no recibían luz solar directa, antes del amanecer (Serrano and Peñuelas 2005) y previamente hidratadas (día anterior), se tomaron 2 hojas de cada planta de la zona intermedia del tallo y se transportaron, en oscuridad y dentro de bolsas de plástico y refrigeradas en una nevera portátil con un bloque de hielo, hasta el laboratorio donde se realizaron las mediciones, que se encontraba a menos de 100 m del invernadero. Previamente se comprobó que no existían diferencias significativas entre las mediciones en el momento del corte de la hoja y tras su transporte a laboratorio, tal y como describió Myers *et al.*, (1988) Los potenciales hídricos xilemáticos (Ψ) se midieron seccionando la hoja con ayuda de un bisturí, tal y como se muestra en la Figura 5.1a, para permitir la entrada en la cámara de presión (Modelo 1000, PMS Instruments, Corvallis, OR, USA) (Scholander *et al.*, 1965) donde se realizaran las medidas de Ψ (Figura 5.1b).

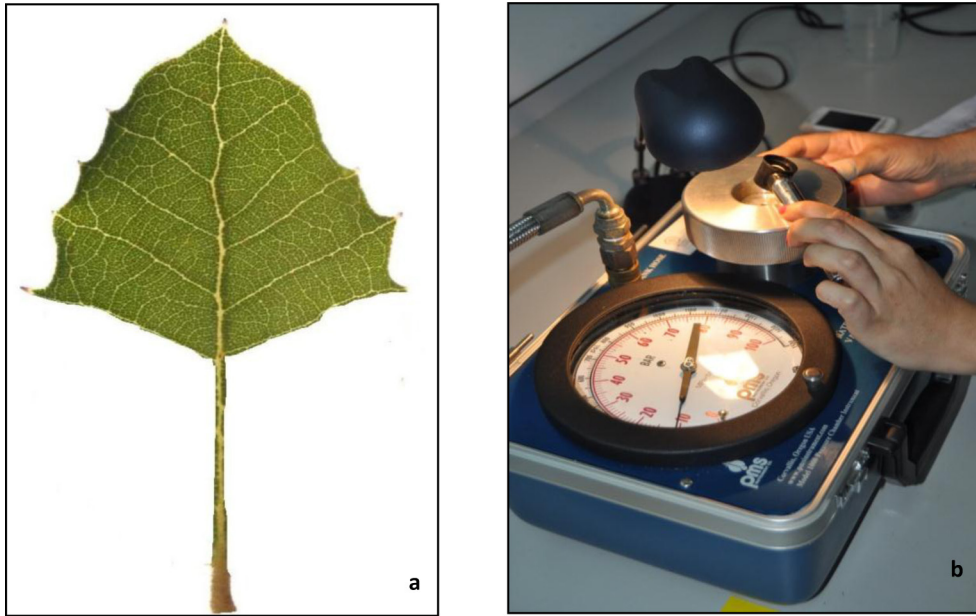


Figura 5.1. a) Hoja de *Q. ilex* seccionada. b) Mediciones de potencial hídrico xilemático (Ψ) a través de la cámara de presión (Modelo 1000, PMS Instruments, Corvallis, OR, USA).

5.2.3.2. Tasa de Transpiración (E).

La pérdida de agua de la planta a lo largo del tiempo se llevó a cabo con 6 plantas (3 inoculadas y 3 testigo) de cada una de las 20 progenies seleccionadas nombradas en el apartado de “material vegetal” del anterior capítulo. Tres semanas después de la inoculación, en los que se mantuvieron tanto las plantas inoculadas como las testigo en las mismas condiciones ambientales, se procedió al desarrollo del experimento. Para ello se dispuso de un total de 480 plantas (240 infectadas y 240 testigo), inmersas en sus correspondientes cepellones saturados de humedad hasta capacidad de campo, en bandejas de 35 alveolos, distribuyéndolas de forma aleatoria, para evitar influencias de factores ambientales. Previamente se habían envuelto en plástico transparente la totalidad del sistema radicular-cepellón, exceptuando la parte aérea (tallo y hojas), para evitar pérdidas de agua a través del sustrato y sistema radical (Baptista *et al.*, 2005).

Durante el transcurso del ensayo las plantas se mantuvieron en el invernadero sin riego, con temperaturas máximas de 31.8°C, condiciones de humedad relativa alrededor de 60% y fotoperíodo de 16 h. Al finalizar el experimento el sustrato de las plantas aún permanecía húmedo.

En el inicio del experimento, las plantas se encontraban en estado de saturación hídrica y en este momento se tomaron las medidas de la superficie foliar total de cada planta (SFT, m²). Seguidamente se recopilaron medidas cada 24 horas (entre las 8:00 y 10:00 a.m.) para determinar la pérdida de agua a través de la fracción aérea de la plan-

ta, en un total de 6 días consecutivos. Finalmente se obtendría la medida de la tasa de transpiración (E) en ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para cada día (E1, E2, E3, E4, E5), además de la transpiración total media de los 6 días de ensayo (Ef).

Los datos evaluados en el presente ensayo corresponden a las progenies extremas en el ranking generado en el anterior capítulo. Los datos correspondientes a factores ambientales se muestran en la tabla siguiente.

Día	Tmax(°C)	Tmin(°C)	T(°C)	Hrmax(%)	Hrmin(%)	Hr(%)	R(MJ/m ² día)
1	20,9	14,2	17,6	97,1	69,2	86,8	22,7
2	22,4	12,0	16,9	97,0	64,5	85,6	18,4
3	24,3	11,9	18,1	96,9	59,1	80,1	19,9
4	29,5	15,4	21,5	95,0	32,2	68,3	25,1
5	30,5	12,9	20,7	95,9	26,4	66,4	26,5
6	31,8	14,1	21,8	90,8	25,2	56,8	26,2

Tabla 5.1. Valores de factores ambientales durante los días del ensayo de transpiración. T_{max}(°C): temperatura máxima; T_{min}(°C): temperatura mínima; T(°C): temperatura media; Hr_{max}(%): humedad relativa máxima; Hr_{min}(%): humedad relativa mínima; Hr(%): humedad relativa media; R(MJ/m²día): radiación solar.

5.2.3.3. Transpiración cuticular (Ec).

La medida de Ec se realizó a principios de julio de 2012. Para la evaluación de transpiración cuticular, se tomaron las hojas de las plantas evaluadas en el ensayo descrito en el apartado 4.3.2. del Material y Métodos del capítulo 2. Así se estudiarían 8 progenies diferenciadas por su grado de tolerancia a *P.cinnamomi*. (5 testigo y 1 inoculada) por las razones descritas en el apartado anterior.

Para el cálculo de la transpiración cuticular se utilizó el método descrito por Quisenberry *et al.*, (1982). Para ello, se cortaron aleatoriamente dos hojas sanas de cada una de las plántulas seleccionadas para cada ensayo. Las muestras se hidrataron hasta su saturación en oscuridad durante 24 h y una hora antes de efectuar las mediciones, se expusieron a la luz con la base del ramillo sumergido en agua, cubierto con una bolsa de polietileno translúcida, favoreciendo la apertura estomática (Carevic *et al.*, 2010). Éstas se dispusieron en el laboratorio apoyadas en su superficie abaxial sobre una rejilla de plástico y se procedió a medir periódicamente el peso fresco con intervalos de 5, 10 y 30 minutos, durante un mínimo de 7 horas (inicialmente los intervalos de tiempo fueron de 5 min y al final de 30 min) siguiendo la metodología descrita por Carevic *et al.*, 2010 (Figura 5.2). Para el peso se utilizó la balanza de precisión ($\pm 1,0\text{mg}$) y un cronómetro para registrar el intervalo de tiempo. En el momento de las mediciones el programador de temperatura del laboratorio se ajustó a 25 °C y la humedad relativa rondaba 60 %.

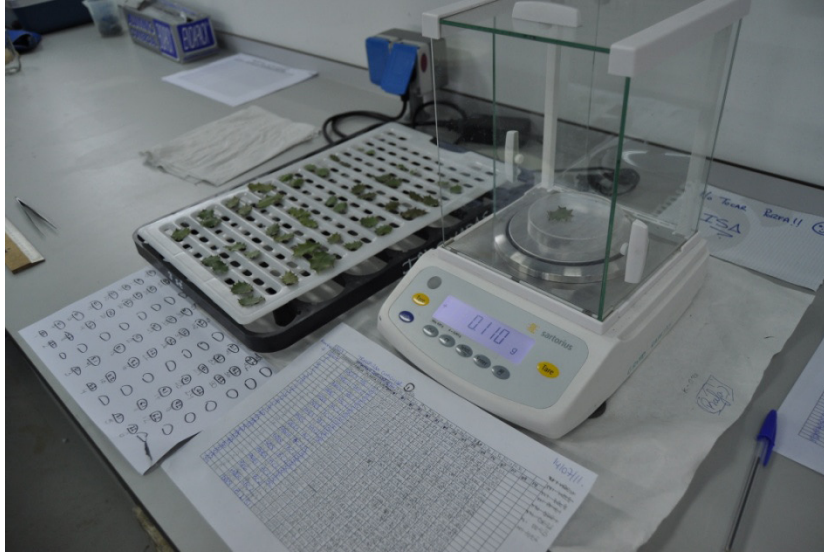


Figura 5.2. Medida de transpiración cuticular con balanza de precisión ($\pm 1.0\text{mg}$).

A través de esta metodología se confeccionaron las curvas de descenso de transpiración, las cuales permiten el cálculo del tiempo transcurrido (t_{pce}) y el contenido hídrico relativo (CHR_{pce}) en el punto de cierre estomático. Los datos obtenidos fueron usados para obtener la transpiración cuticular (E_c) dada por la razón entre la pendiente de la recta de regresión de la parte final rectilínea de la representación PF-PS *vs* tiempo y la superficie foliar de cada hoja ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Además, una vez determinado el PS de la muestra en estufa se determinó el área foliar específica (AFE) por medio de la razón entre superficie foliar y el peso seco foliar ($\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$), lo que nos permitía poder transformar las unidades de E_c a $\mu\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a efectos comparativos con otros autores.

5.2.3.4. Conductancia estomática (g_s).

Las medidas de conductancia estomática ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se realizaron en el mismo momento que las medidas de E_c correspondientes al mes de verano, tomando las mismas plantas, un total de 8 familias con 6 individuos cada una (uno de ellos inoculado). De cada uno de éstos se tomaron dos hojas sanas de la zona superior de la planta (Serrano *et al.*, 2005), se cortaron y se mantuvieron en oscuridad al igual que en el apartado anterior. Se llevaron a cabo 4 medidas en el tiempo, siendo la primero a las 8 de la mañana, con un rango entre medidas de 2 horas, con un porómetro (Decagon Devices' Leaf Porometer 2365NE Hopkins Court Pullman, WA 99163 – USA). Como la conductancia estomática se evaluó en 4 tiempos diferentes, así cada valor asociado a g_s expone un número, siendo g_{s_1} : conductancia estomática ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el instante $t=0$; g_{s_2} : conductancia estomática ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el instante $t=135$; g_{s_3} :

conductancia estomática ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el instante $t=240$; gs_4 : conductancia estomática ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el instante $t=360$. (t = tiempo en minutos).

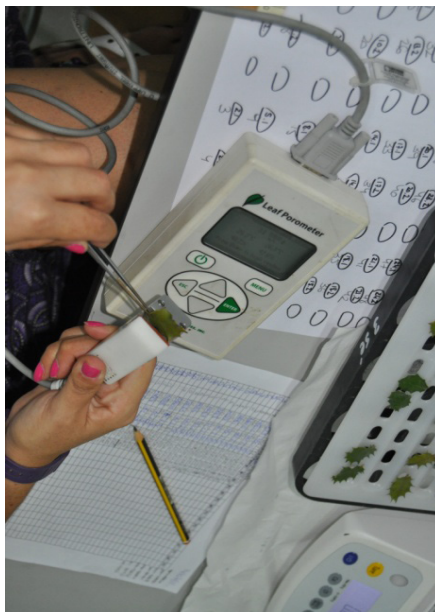


Figura 5.3. Medidas de la Conductancia estomática con Decagon Devices' Leaf Porometer.

5.2.4. Análisis de datos.

Todos los análisis estadísticos realizados se realizaron con el software SPSS® (versión 19.0, Chicago, USA).

Todas las variables resultantes del ensayo de ritmo de transpiración (E1, E2, E3, E4, E5, Ef y SFT) fueron transformadas, usando la transformación $\ln(\text{var})$, para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, evaluadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el estadístico de Levene, respectivamente. Respecto al parámetro Ψ , no necesitó transformación. Las diferencias significativas entre los distintos parámetros medidos fueron evaluadas mediante el test de Tukey-b, con $p=0,05$.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de E y Ψ se seguirá el siguiente modelo:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + F_j + T^*F_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

(1)

donde y_{ijk} es el valor de la variable dependiente en la planta k inoculada con el tratamiento i ($i = 1, 2$), perteneciente a la familia de *Q.ilex* j ($j = 1, 2, \dots, 20$); μ es la media general; T y F son los efectos fijos de la inoculación y la familia; el término doble representa la interacción entre los mismos; y ϵ es el término de error bajo la hipótesis $\epsilon_{ijk} \sim$

$N(0, \sigma_e^2)$. Posibles vínculos entre los diferentes parámetros medidos fueron estimados mediante análisis de correlación de Pearson.

Además se añadió un factor fijo para observar las diferencias en la tolerancia a la enfermedad:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + T_{0j} + T^*T_{0ij} + \hat{\epsilon}_{ijk}$$

(2)

donde y_{ijk} es el valor de la variable dependiente en la planta k inoculada con el tratamiento i ($i = 1, 2$), perteneciente al grado de tolerancia j ($j = 0, 1$); μ es la media general; T y T_0 son los efectos fijos de la inoculación y el grado de tolerancia; el término doble representa la interacción entre los mismos; y $\hat{\epsilon}$ es el termino de error bajo la hipótesis $\hat{\epsilon}_{ijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

A la hora de evaluar los parámetros descritos en los apartados (5.2.3.3 y 5.2.3.4) el presente capítulo, habiendo comprobado a priori que seguían los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se procederá, de un lado, a la elaboración de un modelo simple para evaluar la diferenciación entre las distintas familias para cada uno de los parámetros descritos en dicho apartado:

$$y_{jk} = \mu + F_j + \hat{\epsilon}_{jk}$$

(3)

donde y_{jk} es el valor de la variable dependiente en la planta k inoculada perteneciente a la familia de *Q. ilex* j ($j = 1, 2, \dots, 8$); μ es la media general; F es el efecto fijo de la familia y $\hat{\epsilon}$ es el termino de error bajo la hipótesis $\hat{\epsilon}_{jk} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

De la misma forma se realizará para valorar la diferenciación entre plantas infestadas y testigo:

$$y_{ik} = \mu + T_i + \hat{\epsilon}_{ik}$$

(4)

donde y_{ik} es el valor de la variable dependiente en la planta k inoculada perteneciente al tratamiento i ($i = 1, 2$), μ es la media general; T es el efecto fijo del tratamiento y $\hat{\epsilon}$ es el termino de error bajo la hipótesis $\hat{\epsilon}_{ik} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Por último se analizará la acción del grado de tolerancia (T_0) respecto a los parámetros de los apartados (5.2.3.3; 5.2.3.4; 5.2.3.5):

$$y_{jk} = \mu + T_{0j} + \hat{\epsilon}_{jk}$$

(5)

donde y_{jk} es el valor de la variable dependiente en la planta k perteneciente al grado de tolerancia j ($j = 0, 1$); μ es la media general; y T_0 es el efecto fijo del grado de tolerancia; y ϵ es el termino de error bajo la hipótesis $\epsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$.

Posibles vínculos entre los diferentes parámetros medidos, así como entre los parámetros morfológicos evaluados en el capítulo anterior, fueron estimados mediante análisis de correlación de Pearson.

5.3. RESULTADOS.

5.3.1. Potencial hídrico (Ψ).

Las progenies tuvieron un Ψ diferente según fueran inoculadas o no. El análisis de datos reveló diferencias significativas entre tratamientos para Ψ ($p < 0,001$), no siendo significativas estas diferencias entre familias, ($p = 0,154$) ni la interacción entre ambos factores independientes ($p = 0,232$).

El potencial hídrico xilemático (Ψ), medido al amanecer, para el conjunto de plantas inoculadas osciló entre $-3,5 \pm 0,25$ MPa para HRE8 y $-0,67 \pm 0,21$ MPa para la familia ZRE8. Los valores de las plantas control para el total de las familias evaluadas, fueron mayores de -1 MPa en todos los casos (Figura 5.4).

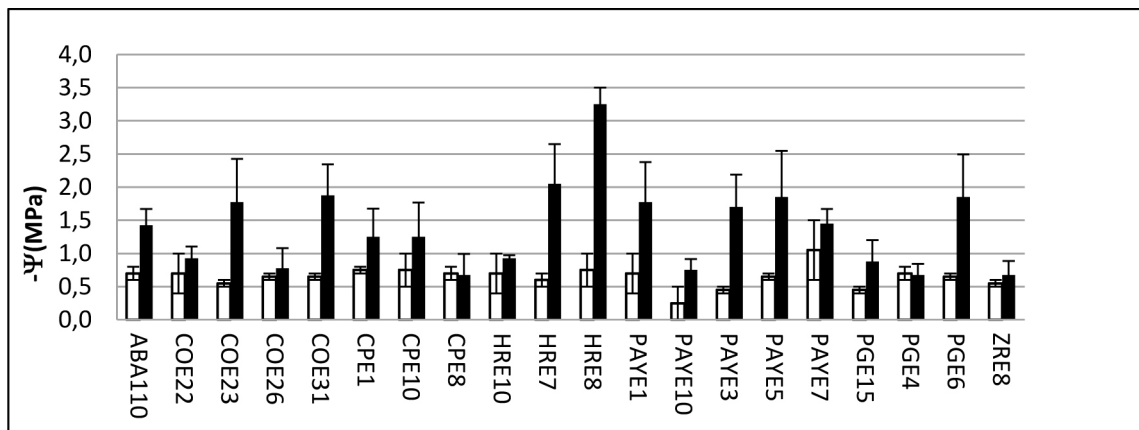


Figura 5.4. Valores medios de $-\Psi$ (MPa) para cada una de las familias objeto de estudio distinguiéndose plantas inoculadas (I=■) y plantas testigo (C=□). (n=120).

A la hora de evaluar la diferencia entre plantas clasificadas según la tolerancia a la enfermedad (tolerantes HT, y susceptibles HS), se evidenciaron diferencias significativas entre las plantas infectadas y testigo ($p < 0,01$). Mientras que respecto al grado de tolerancia, aunque las diferencias no fueron significativas, se observaron variaciones mayores de los valores de Ψ , entre plantas inoculadas y testigo, en las familias correspondientes al conjunto HS (Tabla 5.2).

tolerancia	T	Ψ	n
HS	C	-0,65±0,05	16
	I	-1,83±0,25	20
HT	C	-0,65±0,06	24
	I	-1,24±0,15	29

Tabla 5.2. Valores medios (\pm ET) de Ψ (MPa) entre plantas testigo e inoculadas para los diferentes grados de tolerancia. (n=120).

5.3.2. Ritmo de transpiración (E).

El análisis de Ef generó diferencias significativas entre las diferentes familias evaluadas ($p<0,001$), no siendo significativas las diferencias entre plantas inoculadas y testigo ($p=0,119$) ni la interacción entre ambos factores fijos.

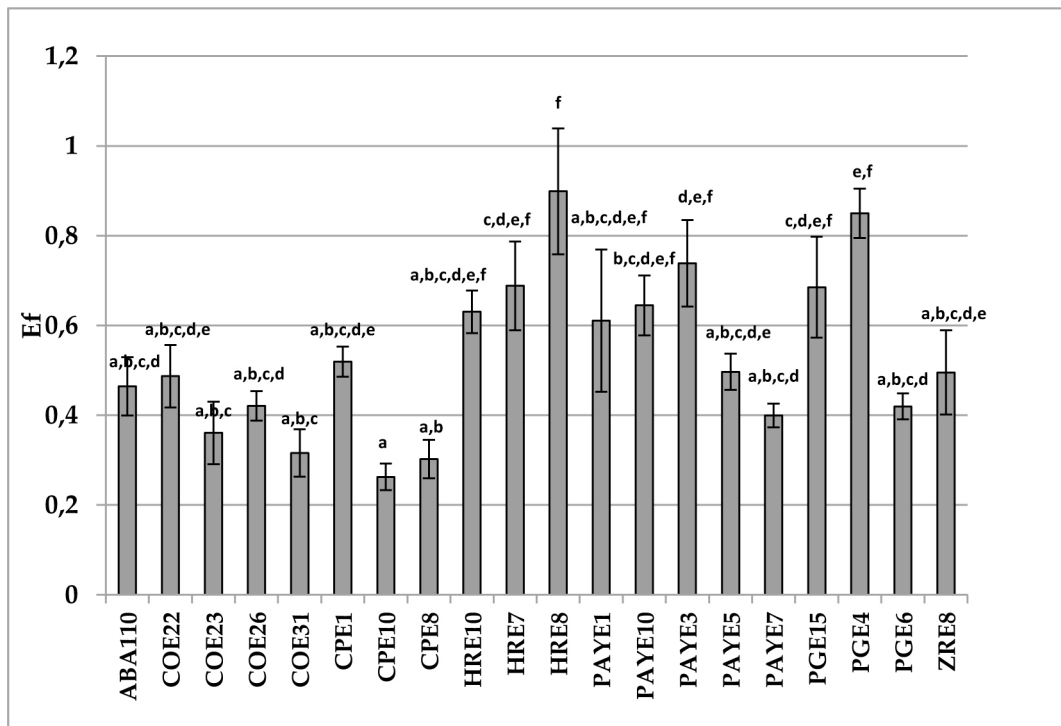


Figura 5.5. Representación de Ef (media \pm ET) (mmolH₂O m⁻² s⁻¹) del total de progenies objeto de estudio (n=120). Letras distintas sobre cada familia denota diferencias significativas (test Tukey, $p<0,005$), considerando el total de plantas de cada progenie (testigo + inoculadas).

El análisis de los valores de transpiración diarios (E_1 , E_2 , E_3 , E_4 , E_5) mostró diferencias significativas entre familias ($p<0,001$) en las medidas de todos los días de ensayo. Sin embargo, aunque la tendencia fue a presentar menores tasas de transpiración de las plantas inoculadas, sólo se localizaron diferencias entre tratamientos en la primera

medición, E_1 ($p=0,001$). La interacción entre ambos factores no generó diferencias significativas en ninguna de las medidas.

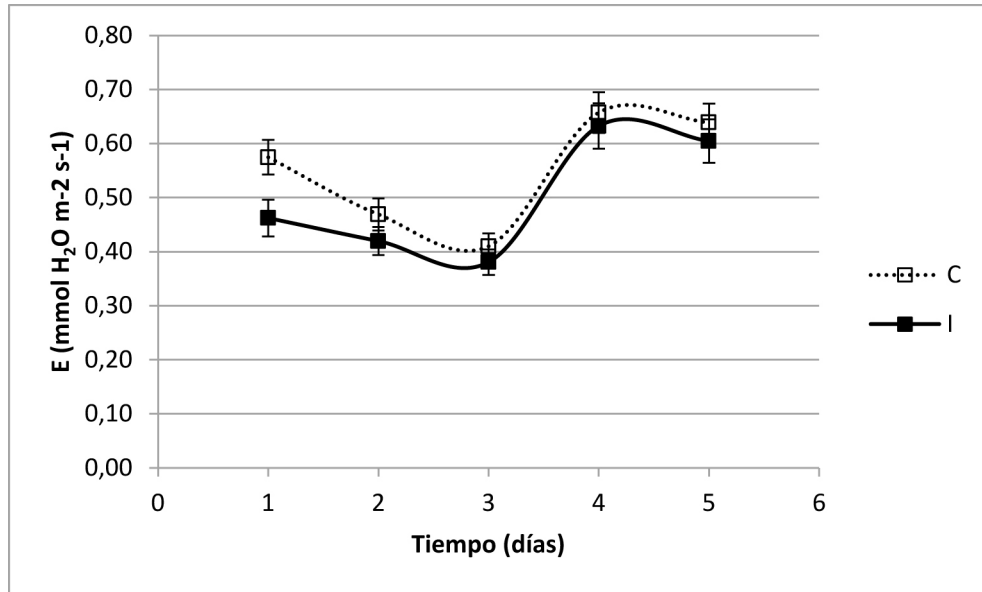


Figura 5.6. Valores medios (\pm ET) de las medidas de E diarias en plantas inoculadas y testigo. (n=120).

El análisis de SFT mostró diferencias significativas ($p<0,001$) entre progenies (Figura 5.7) y entre tratamientos ($p=0,034$) con valores para testigo e inoculadas de 58 ± 4 cm² y 49 ± 4 cm², respectivamente, no observándose diferencias en la interacción entre ambos factores.

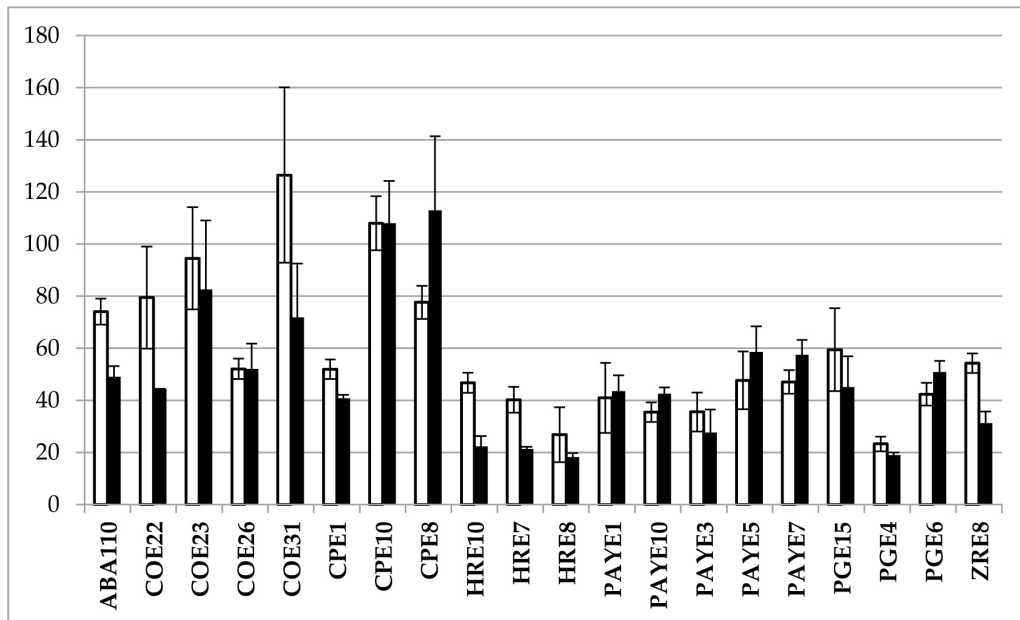


Figura 5.7. Relación de valores medios de SFT (\pm ET) (m²) de cada una de las progenies evaluadas para plantas control (□) e Inoculadas (■). (n=120).

Si se agrupan los datos de plantas clasificadas como tolerantes (HT) y susceptibles (HS) en el capítulo anterior, se detectan diferencias significativas en el total de transpiración (Ef) de ambos subconjuntos de plantas ($p=0,003$). Aunque la tendencia observada fue hacia una menor transpiración en las plantas inoculadas, no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,244$), ni en la interacción entre ambos factores fijos.

TOLERANCIA	Tratamiento	Ef(media±ET)	n
HS	C	0,634±0,054	24
	I	0,602±0,053	24
	Total	0,618±0,037	48
HT	C	0,478±0,037	36
	I	0,477±0,035	36
	Total	0,478±0,026	72
Total	C	0,541±0,032	60
	I	0,527±0,031	60
	Total	0,534±0,022	120

Tabla 5.3. Valores de Ef (media±ET) ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para cada conjunto de plantas en base a la tolerancia según el tratamiento. HS: plantas susceptibles o no tolerantes, HS = plantas tolerantes.

Si se analizan los parámetros de transpiración diarios (E_1, E_2, E_3, E_4, E_5) en base al factor fijo Tolerancia (To), que las divide en HT y HS, se observa que ocurre algo parecido a lo que sucedía con las familias, observándose que la significación entre tratamientos ocurrió sólo en las medidas del primer día E_1 ($p=0,003$).

TOLERANCIA	Tratamiento	E_1 (media±ET)	n
HS	C	0,680±0,047	24
	I	0,579±0,061	24
	Total	0,630±0,039	48
HT	C	0,504±0,039	36
	I	0,384±0,034	36
	Total	0,444±0,027	72
Total	C	0,574±0,032	60
	I	0,462±0,034	60
	Total	0,518±0,024	120

Tabla 5.4. Valores de E_1 (media±ET) ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para cada conjunto de plantas en base a la tolerancia según el tratamiento. HS: plantas susceptibles o no tolerantes HT= plantas tolerantes.

En la medición de E_1 se pudo apreciar que las plantas control de ambos conjuntos evaluados, disponen de valores de transpiración significativamente mayores a las

plantas infectadas. Al igual que ocurrió con E_f se apreció que en plantas HS la transpiración fue significativamente mayor que en plantas HT, en cada valor de E (E_1, E_2, E_3, E_4, E_5), con todos los valores de $p < 0,05$. La interacción entre ambos factores ($To * T$) no ocasionó diferencias significativas entre valores de E.

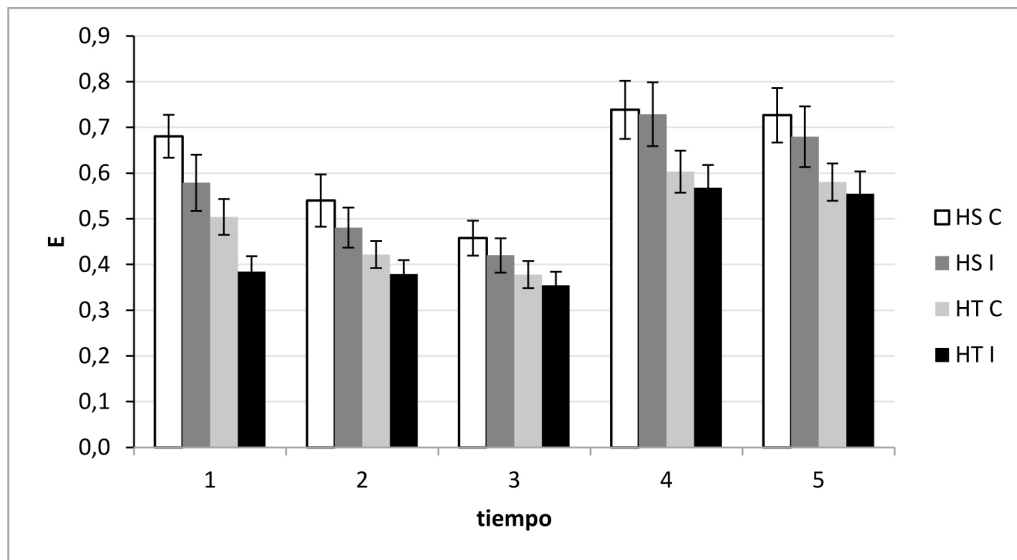


Figura 5.8. Transpiración media diaria E (E_1, E_2, E_3, E_4, E_5) (media \pm ET) (mmolH₂O m⁻² s⁻¹) para cada subconjunto de plantas evaluadas en intervalos de tiempo (días). Factores fijos: Tolerancia (HS, HT) e Infección (C, I). (n=120).

Al analizar los datos referentes a SFT, se obtuvieron diferencias significativas entre los subconjuntos clasificados como HT y HS ($p=0,002$). Además los diferentes tratamientos, también mostraron diferencias significativas ($p=0,011$). No ocurrió lo mismo para la interacción entre ambos factores fijos $To * T$, que no mostró diferencias.

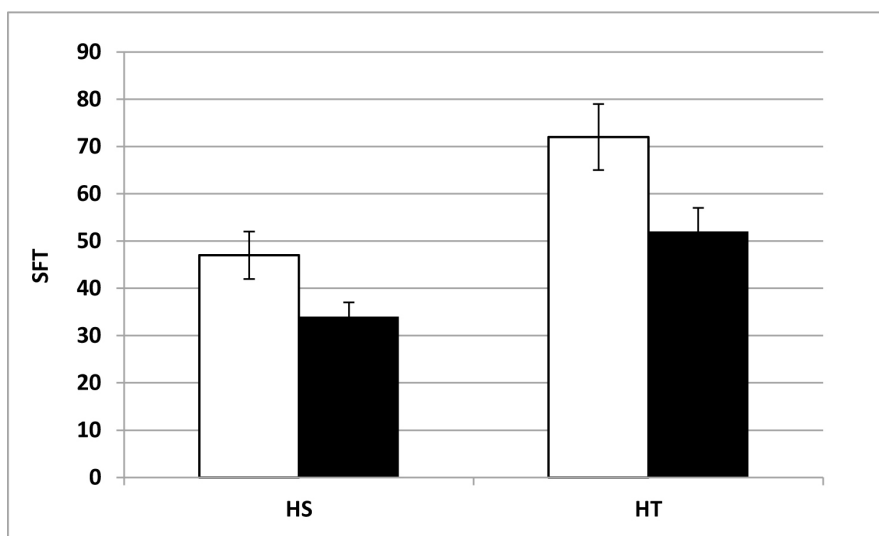


Figura 5.9. Representación de SFT (media \pm ET) (cm²) para los subconjuntos clasificados como HS y HT en plantas inoculadas (I=■) y testigo (C=□) (n=120).

A la hora de examinar los resultados de transpiración, se observa una clara influencia de factores ambientales incidentes en el comportamiento de las plantas (Figuras 5.10 y 5.11). De esta forma se relacionan a través de una regresión lineal, los factores ambientales y las medidas de transpiración resultando significativas las relaciones mostradas entre transpiración y los factores ambientales $T(^{\circ}\text{C})$ y radiación solar ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$), mostrándose el mejor ajuste en las figuras 5.10 y 5.11. Se observó una linealidad positiva entre los parámetros, con valores elevados de R^2 .

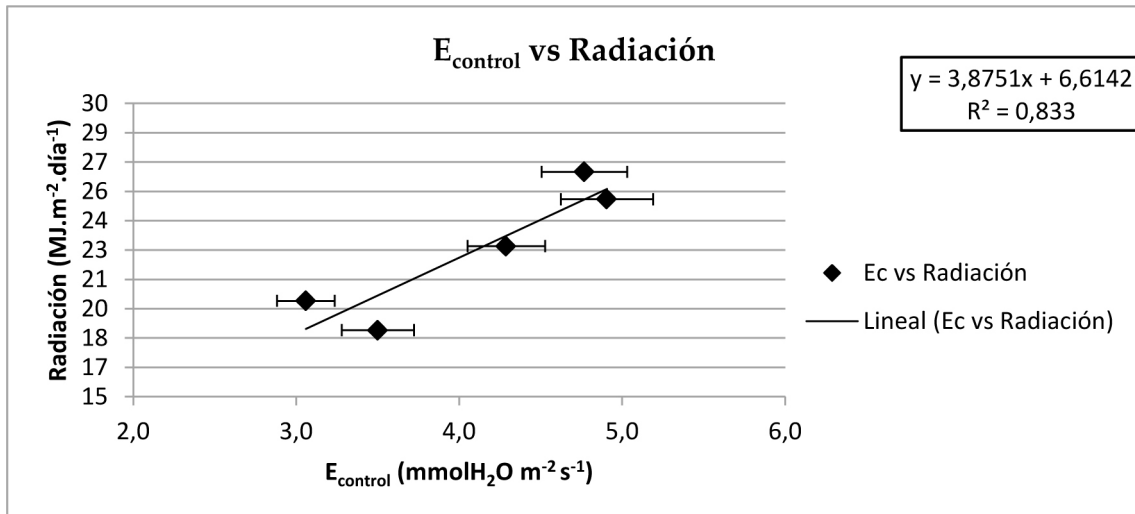


Figura 5.10. Regresión lineal de Radiación solar vs E_{co} en plantas control para $n=5$.

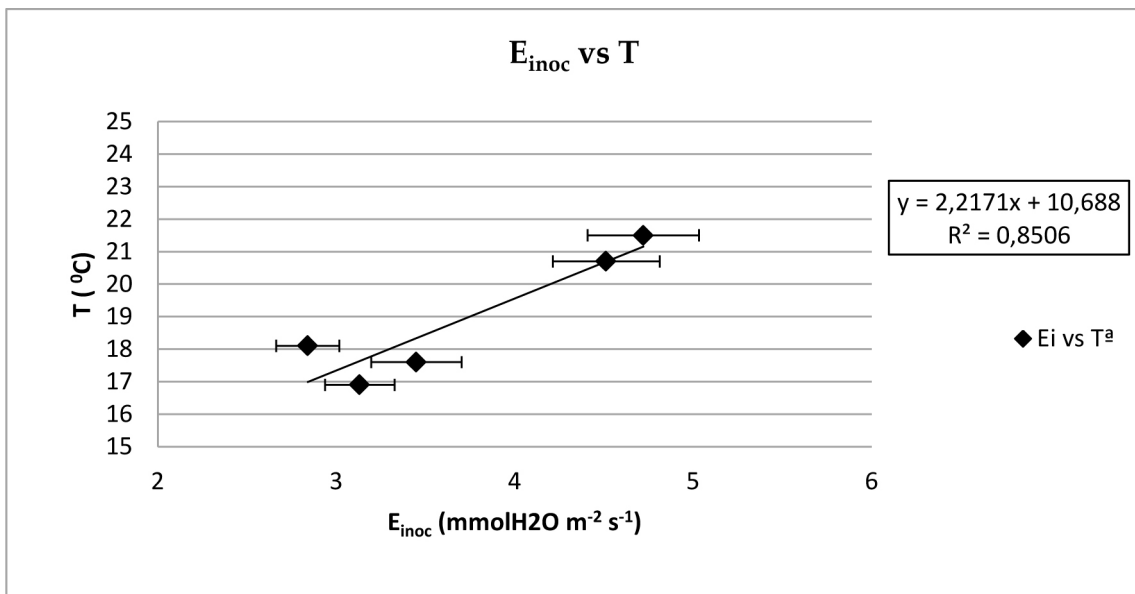


Figura 5.11. Regresión lineal de Temperatura media vs E_i en plantas inoculadas para $n=5$.

5.3.3. Transpiración cuticular (E_c).

Para llevar a cabo el análisis de las medidas relacionadas con la transpiración cuticular realizadas al final del ensayo (Julio 2012), se tomaron 5 plantas testigo y una planta inoculada por cada una de las familias, por lo que el análisis se realizará entre plantas control, para observar si existen diferencias entre familias y de otro lado se analizarán el total de plantas inoculadas ($n=40$) frente a las control ($n=8$) para evaluar si los parámetros difieren entre plantas infectadas y testigo.

En primer lugar, se analizarán las diferencias obtenidas entre familias. Para ninguno de los parámetros evaluados (E_c , AFE) se observaron diferencias entre familias. Los valores medios de ambos parámetros se exponen en la tabla 5.7 (Tratamiento C).

En segundo lugar se analizaron las diferencias obtenidas entre tratamientos. En este caso sí se observaron diferencias significativas entre tratamientos para E_c ($p=0,019$) y AFE ($p<0,001$).

Tratamiento	E_c	AFE	n
C	650,68±37,89	6,59±0,24	80
I	863,78±161,75	10,18±1,09	16

Tabla 5.5. Valores medios (media±ET) para los parámetros relacionados con la Transpiración cuticular: E_c = transpiración cuticular ($\mu\text{mol H}_2\text{O kg}^{-1}\text{s}^{-1}$); AFE= área foliar específica ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$).

Se clasificaron las familias según el grado de tolerancia, no obteniéndose diferencias significativas, al igual que ocurrió entre progenies.

5.3.4. Conductancia estomática (g_s).

Las variaciones de g_s respecto a las progenies evaluadas mostraron diferencias significativas en todos los valores de g_s , exceptuando en g_{s2} , siguieron una tendencia similar, como se observa en la Figura 5.12:

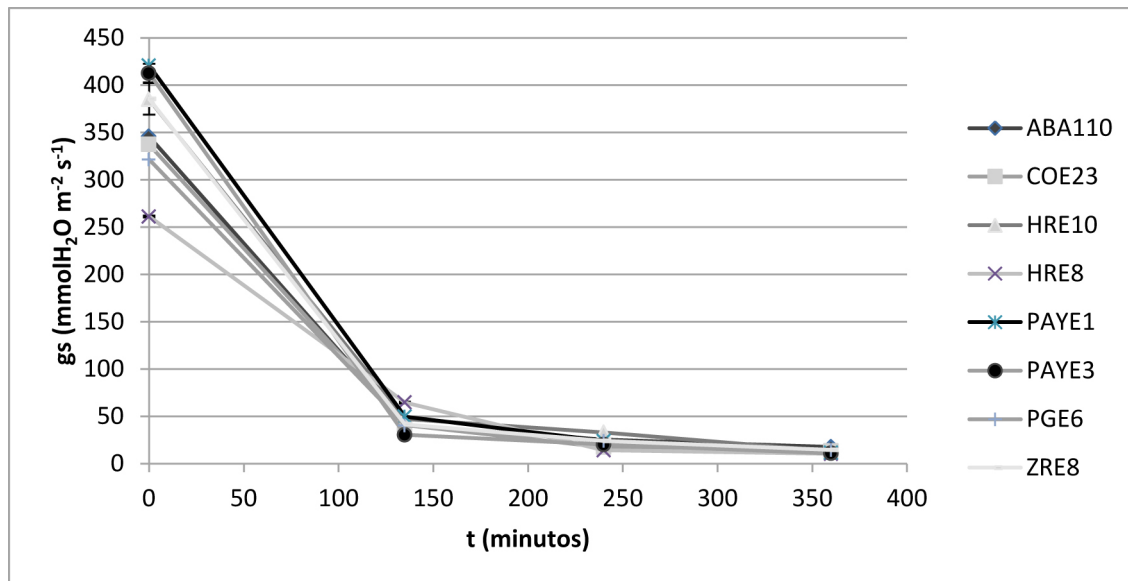


Figura 5.12. Representación de la pérdida de conductancia estomática (g_s) a lo largo del tiempo (minutos) en diferentes familias de *Q. ilex*. (n=96).

En el instante $t=0$, las hojas se encontraban en condiciones de saturación hídrica, y se mostraron datos de g_{s1} , diferentes entre distintas progenies ($p=0,016$) como se observa en la siguiente figura:

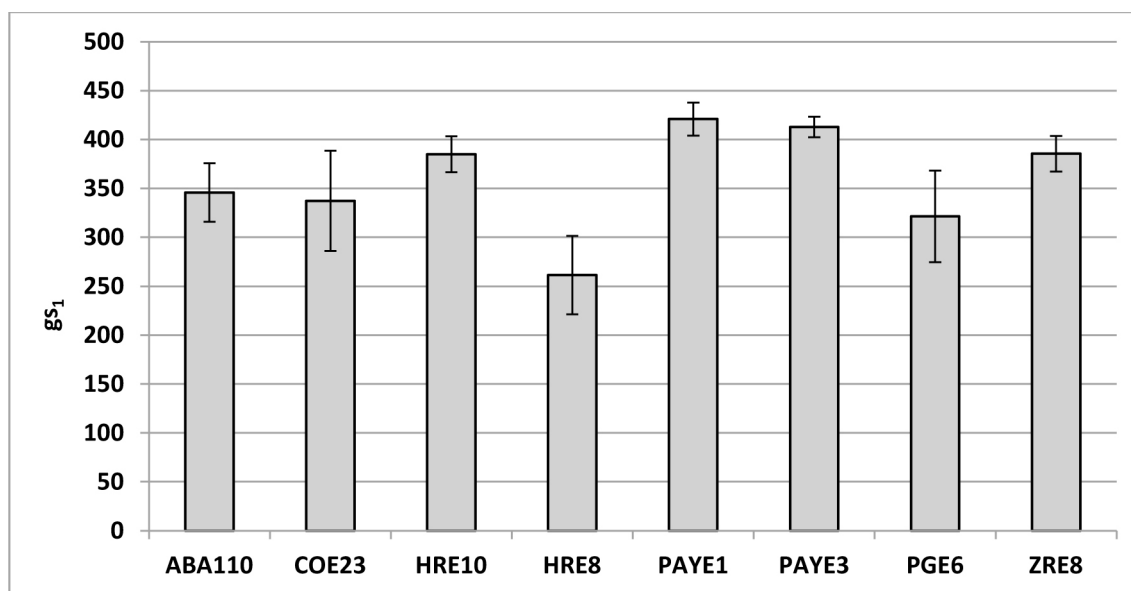


Figura 5.13. Variaciones entre progenies de la conductancia estomática (media±ET) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en el instante $t=0$. (n=96).

Las variaciones entre progenies en los instantes $t=135$, 240 y 360 (g_{s2} , g_{s3} y g_{s4}), también mostraron diferencias entre progenies, siendo significativas para g_{s3} ($p=0,017$) y g_{s4} ($p=0,013$).

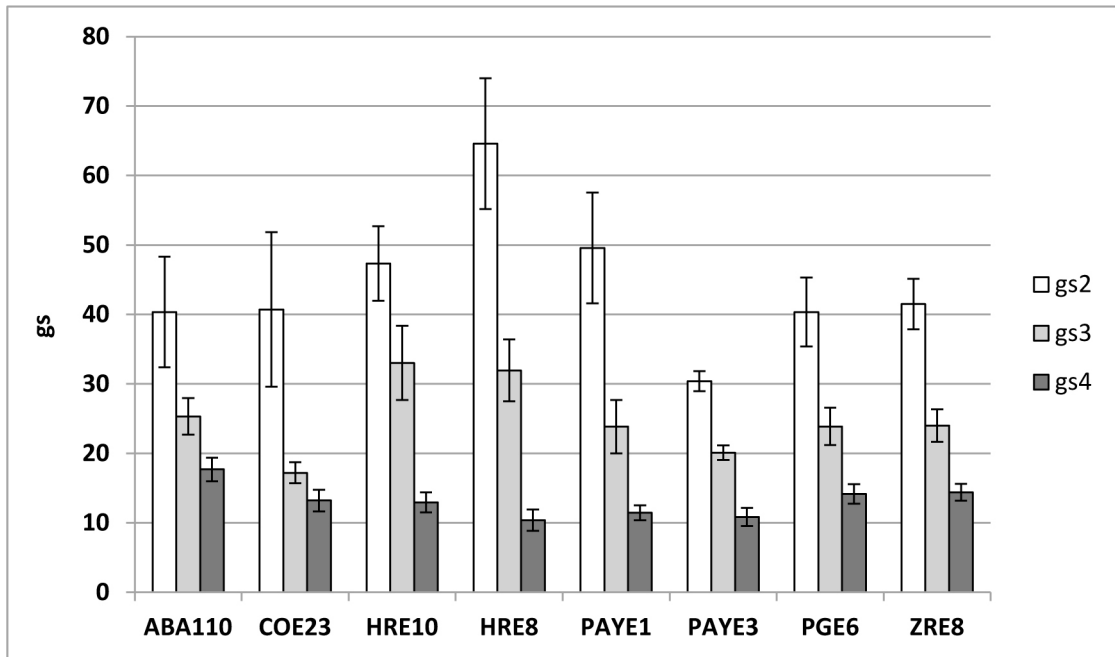


Figura 5.14. Variaciones entre progenies de la conductancia estomática (media±ET) (mmol H₂O m⁻²s⁻¹) en los instante t=135,240 y 360 minutos (gs₂, gs₃, gs₄).

Las diferencias entre tratamientos resultaron significativas sólo para gs₄ ($p=0,028$), diferenciándose entre sí los tratamientos, con los valores medios de gs₄ de 13,13±0,68 mmol m⁻² s⁻¹ en plantas testigo y 9,45±1,17 mmol m⁻² s⁻¹ en inoculadas.

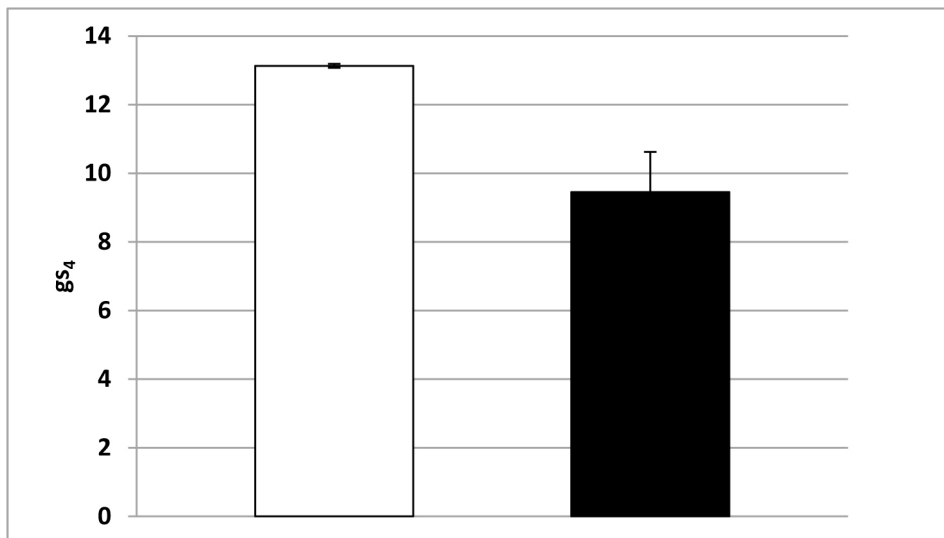


Figura 5.15. Valores medios de gs₄ (media±ET) (mmol H₂O m⁻²s⁻¹) después de 360 minutos medidos desde el punto de saturación hídrica en plantas testigo (C=□) e inoculadas (I=■).(n=96).

El análisis del modelo que incluye como factor fijo el grado de tolerancia, sólo mostró diferencias significativas en el parámetro gs₃, con valores medios de 26,84±1,76 mmol m⁻² s⁻¹ en plantas HS y valores de 21,69±1,37 mmol m⁻² s⁻¹ en plantas HT.

5.3.5. Relación entre parámetros fisiológicos y morfológicos.

La relación entre Ψ y otras variables morfológicas fueron estudiadas. Al analizar la relación con E, no se apreció correlación entre el potencial hídrico y cada una de las medidas de Transpiración (Ef: $r=0,067$; $p=0,469$; $n=120$). Sin embargo se apreció cierta relación significativa con el total de los parámetros radiculares medidos en las plantas estudiadas, exceptuando DIRP, pero con un bajo coeficiente de correlación (Tabla 5.6).

	Ψ	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	VR
Ψ	1							
PRN	0,274*	1						
LRN	0,309**	0,921**	1					
DIRP	0,116 n.s.	0,146 n.s.	0,171 n.s.	1				
P	0,289**	0,816**	0,918**	0,153 n.s.	1			
R	0,332**	0,640**	0,730**	0,171 n.s.	0,644**	1		
F	0,341**	0,823**	0,940**	0,159 n.s.	0,918**	0,694**	1	
VR	-0,595**	-0,461**	-0,496**	-0,310**	-0,429**	-0,425**	-0,508**	1

Tabla 5.6. Matriz de correlación lineal para algunos de los parámetros de la selección de plantas ($n=100$). Ψ = potencial hídrico al amanecer, PRN= peso de raíces nuevas, LRN = longitud de raíces nuevas, DIRP = diámetro de raíz principal, P = número raíces activas en crecimiento, R = número de ramificaciones, F = fragmentos de raíz, VR = valoración radical. n.s = no significativo, * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ ($n=100$).

La relación entre la variable Ef y los parámetros morfológicos tanto aéreos como radiculares, fue también analizada a partir de una matriz de correlación de Pearson, encontrándose relaciones significativas con el número de hojas, NHJ ($r=0,529$; $p<0,001$; $n=100$) y con SFT, donde se observó una correlación lineal negativa ($n=120$; $p<0,001$).

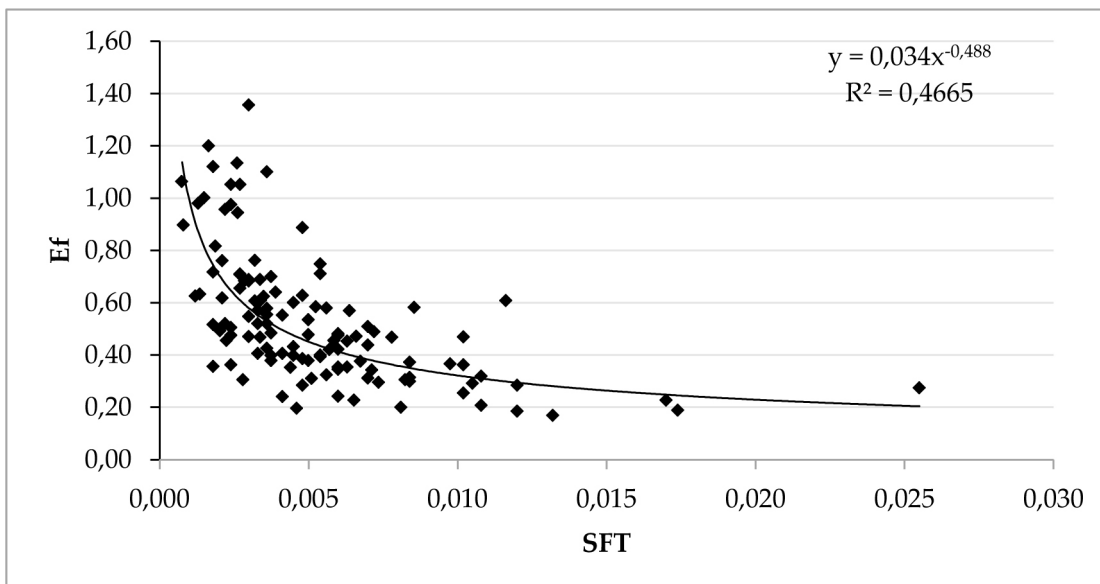


Figura 5.16. Regresión exponencial negativa entre el total de valores de E_f ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y el total de los valores de SFT (m^2) ($n=120$).

Con respecto a las relaciones existentes entre los parámetros fisiológicos de relaciones hídricas medidos con los parámetros morfológicos de la planta, se analizaron a través de una correlación de Pearson y se observó que existían relaciones significativas entre éstos y algunas de las variables morfológicas estudiadas, como se muestra en la siguiente tabla:

	E _c	AFE	PRN	LRN	DIRP	P	R	F	LTP	NHJ	Sf	VA	gs1	gs2	gs3
E _c															
AFE	-0,194														
PRN	0,124	-0,061													
LRN	-0,18	-0,034	0,699**												
DIRP	0,181	-0,111	-0,127	0,029											
P	-0,103	-0,015	0,125	0,425**	0,305*										
R	0,092	-0,089	0,613**	0,610**	0,078	0,273									
F	-0,214	-0,113	0,294*	0,681**	0,235	0,440**	0,378**								
LTP	-0,214	0,139	-0,197	-0,035	-0,087	0,048	-0,035	0,111							
NHJ	-0,105	-0,16	0,256	0,311*	0,006	0,209	0,203	0,237	0,360*						
Sf	0,095	-0,300*	-0,015	-0,149	0,104	-0,007	0,021	-0,024	0,340*	0,146					
VA	0,337*	0,263	-0,12	-0,450**	-0,088	-0,295*	-0,222	-0,473**	-0,081	-0,488**	-0,006				
gs1	0,023	-0,074	-0,105	-0,043	-0,028	0,015	-0,105	0,08	0,032	-0,054	0,059	0,168			
gs2	0,594**	-0,142	0,084	-0,02	0,157	0,021	0,076	-0,024	-0,111	-0,068	0,126	0,158	-0,147		
gs3	-0,18	-0,193	-0,184	0,203	0,494**	0,346*	0,057	0,331*	-0,034	0,044	-0,002	-0,288	0,012	0,300*	
gs4	0	-0,359*	0,039	0,025	0,228	-0,104	-0,017	-0,02	0,117	0,057	0,315*	-0,157	-0,026	-0,082	0,088

Tabla 5.7. Matriz de correlación lineal para los parámetros fisiológicos y morfológicos de la selección de plantas (n=48). E_c= transpiración cuticular; AFE= área foliar específica; PRN= peso de raíces secundarias nuevas; LRN= longitud de raíces nuevas; DIRP= diámetro de raíz principal; F= fragmentos de raíz nuevos; P= puntas activas en crecimiento; R= ramificaciones; LTP= longitud del tallo principal; NHJ= número de hojas; Sf= superficie foliar; VA= valoración aérea; gs₁= conductancia estomática en el instante t=0min; gs₂= conductancia estomática en el instante t=135min; gs₃= conductancia estomática en el instante t=240min; gs₄= conductancia estomática en el instante t=360min Los valores corresponden al coeficiente de correlación de Pearson y la significación entre las relaciones viene dada por: * = p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01.

5.4. DISCUSIÓN.

5.4.1. Sintomatología de la enfermedad.

La medida de parámetros fisiológicos ha resultado ser una herramienta efectiva para la evaluación de síntomas de infección por parte del patógeno *P. cinnamomi* en plantas de *Q. ilex*, como se afirmó en estudios previos por Robin *et al.* (2001), en los que se seleccionaron plantas de *Q. ilex* de 1 año de edad procedentes de España, utilizando también para la inoculación 3 cepas diferentes del oomiceto, comprobando el deterioro del estado hídrico de las plantas sometidas a la infección.

La sintomatología general que se observa en las plantas de *Q. ilex* afectadas por el estrés que ocasiona el patógeno es una modificación en caracteres morfológicos (como se ha comprobado en los capítulos anteriores) y fisiológicos como: la distribución de la biomasa en la hoja, tallo y raíces, la morfología foliar, el control estomático o el componente osmótico del potencial hídrico celular. Estas variaciones han sido encontradas en otras especies sometidas a estrés hídrico como *Eucalyptus globulus* (Snowdon 2000; Pita y Pardos 2001; Fernández 2008).

En general, se ha visto que, las hojas de plantas sometidas a situaciones desfavorables, modifican sus atributos morfológicos como respuesta al agente causal de estrés (Begg *et al.*, 1980). En plantas de *Q. ilex*, se verifica esta teoría debido a que aquellas que padecen una infección, modifican su comportamiento de crecimiento, reduciendo sus atributos morfológicos, observándose por tanto una menor superficie foliar total (SFT), obteniéndose valores de $49 \pm 4 \text{ cm}^2$, siendo significativamente menor que en plantas control ($58 \pm 4 \text{ cm}^2$).

La menor superficie foliar está motivada tanto por la reducción del tamaño de la hoja (Sf) como por una disminución el numero de hojas. La reducción del tamaño de la hoja ha sido comprobado en numerosos estudios en plantas de *Eucalyptus globulus* Labill. sometidas a estrés (Fernández *et al.* 2010a), y la disminución en el número de hojas es característico de la enfermedad generada por *P. cinnamomi* (Sánchez *et al.*, 2000; Caetano *et al.*, 2007). Así, si se toma la superficie foliar de una sola hoja, se obtiene que los valores de superficie foliar (Sf), son significativamente mayores en plantas control que en plantas inoculadas, obteniendo valores medios de $3.66 \pm 0.17 \text{ cm}^2$ y $2.41 \pm 0.27 \text{ cm}^2$ respectivamente. De otro lado, la pérdida de hojas de las plantas afectadas por la enfermedad como consecuencia de la infección del patógeno (Sánchez *et al.*, 2000), disminuirá el valor de la superficie foliar total (SFT) al disponer de un valor menor número de hojas (10.79 ± 0.62 hojas) respecto a las plantas control (22.12 ± 1.09 hojas).

Se sabe que el área foliar específica (AFE) es un rasgo morfológico importante que suele ser muy sensible a las condiciones externas y a la edad de la hoja (Ackerly & Reich, 1999). Así en el presente ensayo se aprecia un descenso en el grosor de la hoja ante la infección, obteniéndose valores mayores de AFE ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$) para plantas inoculadas ($10.18 \pm 1.09 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$) respecto a las control ($6.59 \pm 0.24 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), de manera que se este mecanismo hace que las plantas produzcan hojas más delgadas y/o con menor acumulación de biomasa no estructural en su conjunto (Carevic *et al.*, 2010), ante la presencia de estrés que produce *P. cinnamomi*.

El descenso en la conductancia estomática final (g_{s4}) se relacionó con el descenso de la superficie de la hoja, en plantas inoculadas artificialmente, como se reportó por Maurel *et al.*, (2001a), que estudió la susceptibilidad de plantas de castaño a *P. cinnamomi*, demostrando que en plantas infestadas, se observan valores menores de conductancia estomática que en testigo, sugiriendo por tanto, que el punto de cierre estomático ocurre cuando se alcanza un valor crítico del umbral de pérdida de raíces. Por tanto, para el presente estudio y a partir de los resultados obtenidos, se afirma que un descenso de la conductancia estomática, se debe a la incidencia de un factor de estrés, como se reportó por Serrano *et al.* (2005), en el que se observa la diferenciación en los valores de g_s para plantas de *Q. ilex* en distintas situaciones de estrés hídrico, resultado de mediciones en diferentes estaciones del año. En el presente Capítulo, las fluctuaciones en los valores de g_s , resultan más evidentes por la infección del patógeno propiamente dicha, que por las condiciones de estrés hídrico impuestas de manera artificial (ciclos de encharcamiento-sequía), que como se ha demostrado en el capítulo 1, no produce afección aparente en plantas testigo. Los valores de conductancia estomática (g_{s4}) en el instante final ($t=360 \text{ min}$), una vez se han cerrado los estomas, variaron entre $13,13 \pm 0,68 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para plantas control y $9,45 \pm 1,17 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el caso de plantas infestadas con el patógeno.

El descenso en el potencial hídrico fue un efecto de la enfermedad impuesto por el estrés hídrico al que se somete a la planta (resultado del déficit de absorción de agua) más que la infección en sí misma, como fue reportado por trabajos en *Eucalyptus sieberi* (Dawson & Weste 1984) así como para plantas de *Quercus agrifolia* por Knops *et al.* (2000); provocando un incremento del estrés hídrico en las plantas inoculadas, debido al favorecimiento de las condiciones óptimas del patógeno, que permite la movilización de zoosporas y su consecuente penetración en los tejidos de las plantas (Caetano *et al.*, 2007), obteniéndose valores que descienden de -3MPa mientras que en plantas testigo, los valores de Ψ , serán superiores a -1MPa en todas las plantas, coincidiendo con los datos que reportó Maurel *et al.*, (2001b) que estudió las diferencias entre las interacciones de tratamientos de agua y la infección por

P.cinnamomi, observándose la reducción de los valores de potencial hídrico hasta -3,5MPa en plantas infectadas.

Los dos últimos parámetros que establecieron diferencias entre plantas inoculadas y testigos, son los relacionados con la transpiración. En primer lugar, se estudió el ritmo de transpiración (E). Este parámetro da una idea del comportamiento del conjunto del complejo de la planta (Tognetti *et al.*, 1998), sumando el efecto del estado de la parte aérea con la radicular, así como la capacidad conductora del tallo. Se sabe que el ritmo de transpiración en *Q.ilex* descenderá, ante la presencia de factores que produzcan el estrés de la planta (Infante *et al.*, 2003). De esta forma se observan diferencias entre tratamientos en las medidas del primer día con valores medios de transpiración en plantas testigo e inoculadas de $0,57\pm 0,03$ y $0,46\pm 0,03$ mmol m⁻² s⁻¹, respectivamente. A medida que pasan los días, se observan unas diferencias menos evidentes, aunque se sigue manifestando la mayor transpiración de plantas control respecto a inoculadas, siguiendo una tendencia similar (Figura 5.6) al igual que se demostró para *Q. suber* por Kwak *et al.*, (2011).

En segundo lugar se contempla el efecto de la transpiración cuticular (E_c) (μmol H₂O kg⁻¹ s⁻¹). Este parámetro desveló una clara estrategia de conservación hídrica en plantas de *Q.ilex* (Carevic *et al.* 2010). Si se comparan los datos obtenidos (Testigo= $0,78\pm 0,04$ mg g⁻¹min⁻¹; Inoculadas $1,2\pm 0,34$ mg g⁻¹min⁻¹), con los valores reportados por Pardos *et al.* (2001) para *Pinus canariensis* ($4\pm 0,5$ mg g⁻¹ min⁻¹) se denota claramente, la adaptación al estrés hídrico reduciendo la pérdida de agua lo suficiente como para subsistir en períodos de sequía u otras condiciones desfavorables (Bussotti *et al.*, 2002; Pena-Roja *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, esto quedó patente en las menores tasas de E_c (en base a peso seco de hoja) en las plantas control estudiadas. Así la menos AFE de las plantas control ayudaría a un ahorro de agua por incrementar la resistencia a la difusión del vapor de agua a través de la pared celular externa (Premachandra *et al.*, 1992) que podría ayudar a las plantas a reducir el gasto de agua y mantener mejor estado hídrico bajo condiciones de estrés (Villar *et al.*, 2004b). Se ha reportado que las diferencias en la permeabilidad de la pared podría estar directamente relacionada con la variación en el espesor de la pared cuticular (Riederer and Schreiber 2001). Sin embargo es difícil relacionar la permeabilidad cuticular con el espesor de la cutícula (Burghardt and Riederer 2003).

5.4.2. Diferencias entre familias seleccionadas.

En el presente estudio, las diferencias entre familias se evidencian notablemente en los distintos parámetros fisiológicos medidos. En primer lugar, a la hora de evaluar

el ritmo de transpiración (E), se observa que se encuentra relacionado negativamente a través de una correlación significativa ($p < 0,001$) con SFT (m^2). Esta relación negativa entre ambos parámetros hace que las familias que a priori, presentan valores mayores en el ritmo de transpiración medio (E_i), sean aquellas que tienen menor superficie foliar total, que en el caso del presente estudio, coincide con las plantas clasificadas en el capítulo anterior como muy Susceptibles (HS). Por tanto se asegura que las estrategias de ahorro de agua llevadas a cabo por cada una de las familias evaluadas, dependen de la mayor o menor superficie de la planta expuesta (Kwak *et al.* 2011).

El subconjunto de familias que se clasificó en el capítulo anterior como tolerantes, transpiran significativamente menos ($0,478 \pm 0,026 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), que las progenies clasificadas como susceptibles ($0,618 \pm 0,037 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Esto podría asociarse con la capacidad de absorción de agua, explicándose como, para progenies susceptibles, existirá una mayor capacidad de transpiración, que se traduciría como una mejor absorción del agua del sustrato y como consecuencia una facilidad de penetración del patógeno a través de la raíz. Esto permitirá a *P.cinnamomi* infectar con mayor facilidad, alterando el mecanismo de transpiración una vez invadida la planta, reduciéndose como consecuencia la tasa de transpiración para las plantas infectadas. Sin embargo, en familias consideradas como tolerantes, no existen variaciones en la tasa de transpiración entre plantas infestadas y sanas. Por tanto se sospecha que las familias tolerantes, desarrollan estrategias de evitación de la enfermedad (Jones 1992), que impiden la penetración del patógeno a través de la raíz, y presentan valores menores de transpiración en general, ya que serán plantas que se han adaptado a condiciones de estrés hídrico a través del ahorro de agua (Fernández *et al.*, 2010b). No obstante, todo esto debería estudiarse con mayor profundidad. El análisis de las tasas de absorción de agua en raíces sanas y de la conductancia hidráulica del xilema aportaría una información valiosa que ayudaría a explicar el mecanismo de entrada y la velocidad de propagación en la planta.

En este estudio del complejo planta-sustrato, existe una diferencia en el comportamiento de cada una de las familias examinadas. Así, del total de 20 familias evaluadas, se observa una menor transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y como consecuencia, mayor desarrollo de mecanismos de ahorro de agua de las familias: CPE10, CPE8, COE22, COE23, COE26, PGE6, ZRE8, PAYE7, COE31 y ABA110.

La conductancia estomática medida en distintos intervalos de tiempo, también da una idea de la capacidad de la planta a soportar el estrés hídrico, en distintos períodos (Sala *et al.*, 1994). Así, en el momento de máxima saturación hídrica (g_{s1}) las familias actúan de forma diferente que en el caso opuesto (g_{s4}). Al inicio del ensayo, los valores de g_s varían entre 250 y 425 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, a medida que va aumentando el estrés hídrico, los valores de las plantas descienden drásticamente (Figura 5.13),

diferenciándose dos subconjuntos de familias. Las familias con valores mayores de g_s son: ABA110, PGE6, ZRE8 y COE23. La reducción en los valores de g_s , ante situaciones de estrés, fue reportado por Beadle *et al.* (1985) para plantas de pino, así como por Maurel *et al.*, 2001 y Carevic *et al.* 2010, coincidiendo los datos obtenidos en el presente experimento, con el rango de valores que establecieron los autores para *Q. ilex*.

En todos los parámetros hídricos evaluados, las familias COE23, CPE10, PGE6 y ZRE8, mostraron mecanismos de ahorro de agua, valores altos de potencial hídrico xilemático, así como mayores valores de conductancia estomática, coincidiendo con las plantas que en el ensayo de medida de Potencial de Formación de raíces se clasificaron como tolerantes.

6. DISCUSIÓN GENERAL

La patogenicidad causada por *P.cinnamomi*, se ha demostrado a través de la medida del Potencial de formación de raíces (PFR) en todos los ensayos realizados en la presente Tesis, confirmando estudios anteriores de la enfermedad en plantas de *Q.ilex* y *Q.suber* (Brasier *et al.*, 1992, 1993a, 1993b, 1996; Caetano *et al.*, 1997; Robin *et al.*, 1998b, 2001; Sánchez *et al.*, 2000, 2001, 2004, 2006). La virulencia de las cepas estudiadas, la dosis óptima, así como el tipo de inoculación, también han sido confirmadas. Se observa como el proceso infectivo incrementa con el paso del tiempo aumentando los síntomas en plantas infectadas, como fue reportado por Navarro Cerrillo *et al.*, (2004). En el total de estudios llevados a cabo en la presente Tesis, se han generado diferencias en el PFR entre plantas de la misma edad sometidas a la inoculación durante 2 meses (Ensayo de dosis, Capítulo 1) y plantas sometidas a la inoculación durante 5 meses (Ensayo de familias, Capítulo 2):

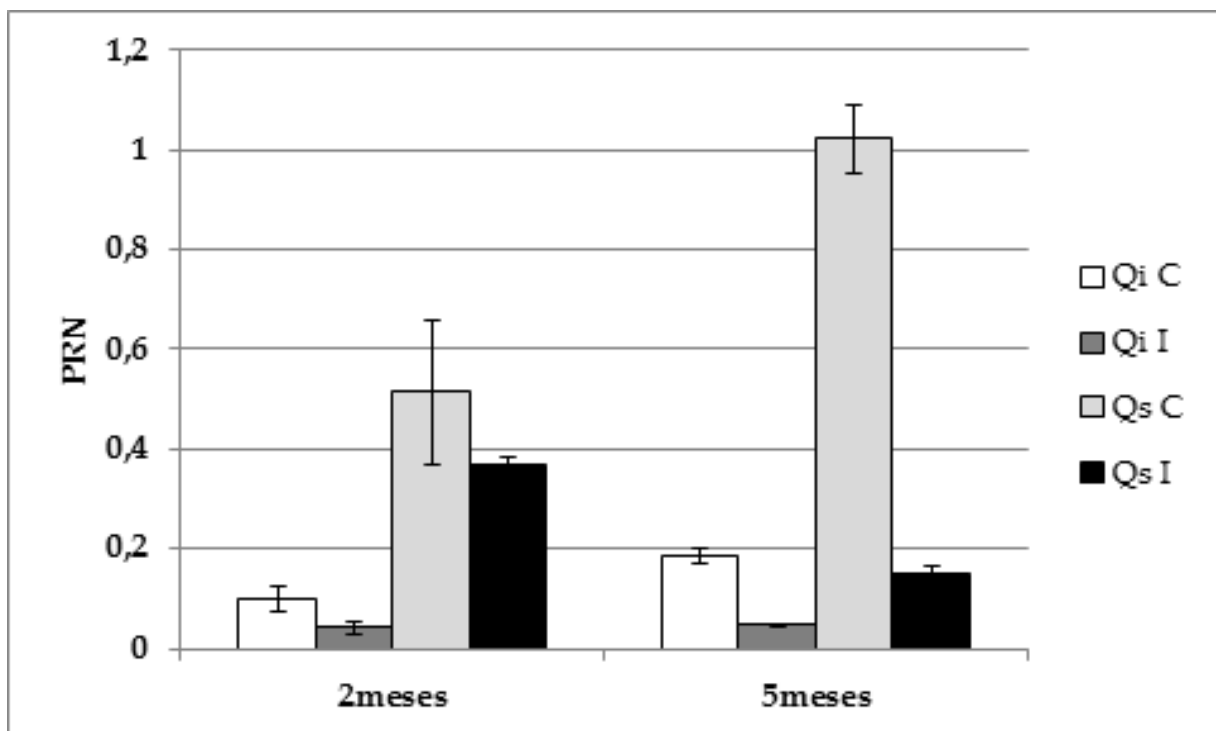


Figura 6.1. Valores de Peso de raíces nuevas (PRN (gr)) (media±ET) en diferentes ensayos. n= 30; 2 meses de inoculación. n= 500; ensayo 5 meses de inoculación.

Así los parámetros que forman el potencial de formación de raíces han resultado adecuados para seleccionar individuos ante la infección de *P. cinnamomi*.

El estudio del potencial hídrico medido al amanecer (Ψ) en plantas de *Quercus ilex*, fue el único parámetro que se relacionó directamente con la generación de raíces secundarias nuevas, como se reportó en estudios previos (Maurel *et al.*, 2001; Robin *et al.*, 2001). En este sentido, se observa como a medida que disminuye el desarrollo del sistema radicular, las plantas estarán sometidas a un mayor estrés hídrico que se traduce con el descenso de los valores de Ψ .

Las plantas sometidas a situaciones de estrés son capaces de responder a estas condiciones combinando estrategias de evitación, tolerancia y resistencia (Levitt *et al.*, 1980; Kozłowski *et al.*, 1991; Jones 1992; Larcher 1995). Así, a través de los experimentos realizados se observan dos tipos de estrategias de respuesta a la enfermedad. En primer lugar, del total de familias evaluadas, se tienen aquellas que, aún conviviendo con el patógeno, mantienen un elevado potencial hídrico y desarrollan su sistema radicular permitiendo el desarrollo de la planta (Turner *et al.*, 1986), actuando de forma similar a como actuaron plantas de *E. marginata* mediante estrategias de evitación de la enfermedad (Stukely *et al.* 1994). De otro lado, se observa un comportamiento parecido al que se reportó por Turner *et al.*, (1986) a través de mecanismos de defensa. Así, las progenies que toleran la deshidratación y aún disponiendo de valores de potencial hídrico bajos, son capaces de desarrollar su sistema radicular secundario, en presencia de la infección.

La selección de progenies de *Q.ilex* de las posiciones extremas del ranking elaborado en el presente estudio, se ha realizado a través de las diferencias obtenidas en los parámetros morfológicos radiculares: PRN, LRN, R y P, coincidiendo con los resultados obtenidos para progenies en el Capítulo 2. Además los parámetros morfológicos aéreos, también mostraron diferencias entre las plantas clasificadas como tolerantes y susceptibles. Los valores de valoración aérea (VA) adquieren valores superiores en plantas HS. Así, se observa el mayor deterioro de la planta (VA) en familias consideradas como susceptibles, como se reportó en el estudio realizado para familias de *E.marginata* sometidas a la acción de *P. cinnamomi* (Stukely *et al.* 1994), en el que fue patente la variabilidad en la mortalidad de las diferentes progenies. Este parámetro se relaciona directamente con el número de hojas (NHJ) ($r=-0,675$; $p=0,001$; $n=136$). Esta reducción de NHJ, relacionada positivamente con el ritmo de transpiración ($r= 0,529$; $p<0,001$; $n=100$) hace que los valores de transpiración (E_r , E_1 , E_2 , E_3 , E_4 , E_5) sean mayores (Baptista *et al.*, 2005), en plantas pertenecientes al nivel de susceptibilidad (HS).

El incremento de VA también se relacionó significativamente con el aumento de la transpiración cuticular de la hoja (E_c), observándose valores mayores en plantas HS. Esta última característica en *Q.ilex* ha dado lugar a que la califiquen de “*especie gastadora de agua*”, justificándolo por su tendencia a conservar el agua en períodos

limitantes (valores de E_c mayores referidos a superficie) (Infante *et al.*, 2003; Pena-Rojas *et al.*, 2005; Baquedano & Castillo, 2006). Por último la conductancia estomática en el instante $t= 240\text{min}$ (gs_3) se relacionó con los siguientes parámetros radiculares: P y F. Esta relación significa, que a medida que incrementa la producción de raíces nuevas, las plantas tendrán valores de conductancia estomática mayores ($HT= 26,84\pm 1,76 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), mientras que para aquellas progenies que se consideran susceptibles, los valores de los parámetros morfológicos son menores, y su gs ($HS= 21,69\pm 1,37 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Las relaciones entre las medidas de crecimiento de raíces y la conductancia estomática han sido reportadas por otros autores (Var Der Driesseche *et al.*, 1991; Nardin *et al.*, 1999), observándose cómo a medida que incrementa el crecimiento de las raíces, aumentará su conductancia estomática.

La resistencia a enfermedades patológicas se ha estudiado por numerosos autores. Así se encontraron ejemplares de *Ulmus minor* resistentes a la grafiosis (Solla 2000), así como poblaciones de *Theobroma cacao* L. resistentes a *P. megakarya*. La resistencia al patógeno *P. cinnamomi* también ha sido estudiada para diferentes especies del género *Persea* (Kellam and Coffey 1984) y para plantas de *E. marginata* por Stukely *et al.* (1994).

Después de los análisis llevados a cabo en la presente tesis doctoral, se ha verificado que la variabilidad entre progenies en la tolerancia a la enfermedad generada por *P.cinnamomi* también existe tanto en plantas de *Q.ilex* como en *Q.suber*. Así, a través de la medida de parámetros morfológicos radiculares, se han seleccionado, en primer lugar, progenies de *Q.suber* con elevada capacidad de tolerancia al patógeno. Estas progenies son aquellas que se localizan con valores más elevados en el ranking de la tabla 4.11.

El estudio completo de parámetros morfológicos y fisiológicos en plantas de *Q.ilex*, permitió indagar en las familias extremas del ranking, proponiendo a las progenies ZRE8, PGE6, COE23 y CPE10, como candidatas para llevar a cabo actuaciones que permitan propagar estas familias, con la finalidad de conseguir plantas tolerantes al patógeno que genera esta enfermedad.

De esta manera se llevan a cabo dos tipos de actuaciones. De un lado, se podrán llevar a cabo actuaciones de siembra en vivero, de semillas recolectadas de los progenitores clasificados como tolerantes y una vez establecidas, insertarlas en programas de reforestación de bosques en zonas afectadas por la enfermedad, para estudiar su desarrollo en campo, en diferentes lugares afectados por la enfermedad. De otro lado establecer líneas de propagación *in vitro* de individuos destacados dentro de familias tolerantes con el objetivo de la conservación de sus genotipos, como se ha realizado en otras especies forestales afectadas por *Phytophthora* spp (Hüberli *et al.*, 2002; Paulin *et al.*, 2008). Esto puede servir para la recuperación de bosques afectados en el suroeste

de la Península Ibérica, así como para la reforestación de tierras agrícolas marginales y recuperación de superficies incendiadas.

Además se ha estudiado que los valores mayores obtenidos en distintos parámetros radiculares evaluados se correlacionan con una mayor capacidad de las plantas a formar raíces en campo y consecuentemente, una mayor capacidad de las mismas para evitar situaciones de estrés (Villar *et al.*, 1997).

De cara a llevar a cabo diferentes estrategias de conservación basadas en la mejora genética en las superficies afectadas por la enfermedad y ocupadas en su mayor parte por arboles de encina y alcornoque, deberán distinguirse dos escenarios. En primer lugar aquellas localidades en las que se evidencia la presencia del patógeno existiendo condiciones edáficas y fisiográficas favorables. En este caso el proceso del decaimiento es lento reduciendo progresivamente la densidad de pies. Por tanto la recuperación de masas forestales en estas zonas afectadas deberá basarse en una estrategia conservadora empleando plantas con elevada variabilidad genética y con un buen comportamiento frente al patógeno. Además estas plantas poseerán un buen potencial de formación de raíces que complementado con buenas prácticas culturales mejoraría la tolerancia de las plantas a la infección.

De otro lado existirán superficies forestales en las que las condiciones edáficas y fisiográficas resulten desfavorables. En éstas se darán situaciones de tendencia a encharcamiento, texturas muy finas y capas impermeables a escasa profundidad, entre otras. Actualmente en estas superficies la densidad del arbolado ha quedado muy reducida si no ha desaparecido completamente (Tapias *et al.*, 2006). Por ello sería necesario contar con plantas altamente tolerantes como serían las plantas propagadas a partir de las familias seleccionadas en el presente estudio.

No obstante dado que en las nuevas plantaciones de *Quercus* se pretende la persistencia de arboles durante decenas de años cualquier medida se encontraría amenazada por una posible adaptación genética del patógeno o bien por un incremento de la susceptibilidad de las plantas al sometimiento continuado a la infección. No se descartan las posibles variaciones de resistencia a la enfermedad con la edad de la planta.

7. CONCLUSIONES

La suspensión de micelio de *P. cinnamomi* es un método eficaz de infección. La dosis de inóculo de *P. cinnamomi* influyó sobre la formación de raíces nuevas generando un estrés hídrico que se tradujo en valores menores de Ψ para ambas especies. La dosis adecuada para cada una de las especies estudiadas es de 10ml de inóculo para plantas de encina de la mezcla del micelio de *P. cinnamomi* contenido en 3 placas Petri con 300 ml agua destilada. En alcornoque se tomaron 15ml de inóculo para plantas de encina de la mezcla del micelio de *P. cinnamomi* contenido en 6 placas Petri con 300 ml agua destilada.

La evaluación de producción de raíces nuevas post-infección, constituye una alternativa para la estimación de la enfermedad, logrando establecer una serie de parámetros cuantitativos como indicadores de la sintomatología generada por la infección, puesto que supone una actividad cuantificable y más precisa que la mera valoración visual de la planta.

Hay una clara diferenciación en la sintomatología ante el ataque del patógeno entre *Q. ilex* y *Q. suber*, que permitirán tratar las especies de forma diferente en posteriores ensayos. *Q. ilex* es más susceptible, y reduce la formación de raíces nuevas en función de la dosis. *Q. suber* reduce el peso y ramificaciones formando raíces más largas y delgadas.

Se ha encontrado diferencias significativas entre la capacidad formadora de raíces de dos procedencias de *Q. ilex*. La procedencia de Sierra de Cádiz- Ronda se ha mostrado más tolerante. En *Q. suber*, no se han encontrado diferencias entre procedencias. En *Q. ilex*, la enfermedad es más evidente en la región extremeña, sin embargo, las plantas de la región de Sierra de Cádiz y Ronda poseen mecanismos de desarrollo de sistema radicular más fuertes. En *Q. suber*, los parámetros respondieron de la misma forma ante la infección, independientemente de la procedencia. La variabilidad de respuesta dentro de la procedencia (entre progenies) es más grande que entre procedencias.

Se ha encontrado diferencias en la respuesta en la tolerancia a la infección de *P. cinnamomi* por parte de las diferentes progenies evaluadas tanto en encina como en alcornoque. La repetición del ensayo con mayor número de plantas de encina confirma su grado de tolerancia.

Las medidas de parámetros fisiológicos resulto un mecanismo útil para observar diferencias entre progenies y permite evaluar la afección del patógeno en *Q. ilex*. Se ha encontrado una correlación entre la capacidad de formación de raíces, la conductancia estomática y el potencial hídrico. Se observan progenies susceptibles que contribuyen al ahorro de agua, aunque la tendencia encontrar a las progenies ahorradoras en el grupo de las tolerantes. Esto sugiere un mecanismo de respuesta alternativo a la infección. De un lado contribuirán a regenerar su sistema radicular y de otro a potenciar el ahorro de agua.

8. CONCLUSIONS

The suspension mycelium of *P. cinnamomi* is an effective method of infection. The dose inoculum of *P.cinnamomi* influenced root formation generating new water stress resulting in lower values of Ψ for both species. The suitable dose for each of the species studied is 10ml of inoculum for holm oak plants mycelia mix *P. cinnamomi* in 3 petri dishes containing 300 ml with distilled water. In cork oak 15ml inoculum was taken for plants mycelia mix *P. cinnamomi* in 6 petri dishes containing 300 ml with distilled water.

The evaluation of production of new roots post-infection, is an alternative for estimating the illness, obtaining a set of quantitative parameters as indicators of the symptomatology caused by infection, since it involves a more precise and quantifiable activity than merely visual assessment of plant

There is a clear difference in the symptoms before the attack the pathogen between *Q. ilex* and *Q. suber*, which allow species treated differently in subsequent assays. *Q. ilex* is more susceptible, and reduces the formation of new roots depending on the dose. *Q. suber* reduces weight and branches forming long and thin roots

We found significant differences between the roots forming ability of the two provenances of *Q. ilex*. The origin of Sierra de Cadiz-Ronda has been more tolerant. In *Q. suber*, we weren't found differences between provenances. In *Q. ilex*, the disease is most evident in the RE, however, plants in the region of Sierra de Cadiz and Ronda have mechanisms of development of stronger root system. In *Q. suber*, parameters responded the same way to infection, regardless of the source. The variability of response within the origin (among progenies) is larger than among provenances.

We found differences in the response to infection tolerance of *P. cinnamomi* by different progenies evaluated in cork and oak. Repeating the test with more oak floors, confirms their tolerance.

Measurements of physiological parameters a useful mechanism to observe differences between progenies and to evaluate the condition of the pathogen in *Q. ilex*. We found a correlation between the ability of root formation, stomatal conductance and water potential. Susceptible progenies are observed that contribute to water saving, although the trend found in the progenies saving the tolerant group. This suggests a mechanism of alternative response to infection. On the one hand help to regenerate its root system and another to promote water conservation.

9. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

León I., García J.J., Fernández M., Vázquez-Piqué J., Cravador A., Tapias R. 2012. Variability in response to infection of *Phytophthora cinnamomi* Rands in different progenies of *Quercus ilex* ssp *ballota*. The Sixth Meeting of the International Union of Forest Research Organizations IUFRO -Working Party 7-02-09. Phytophthora in Forest and Natural Ecosystems. Córdoba (Spain) 9th-14th September 2012. P.118.

León I., García J.J., Fernández M., Vázquez-Piqué J., Cravador A., Tapias R. 2012. Variabilidad en la respuesta a *Phytophthora cinnamomi* Rands. en parámetros morfológicos medidos en diferentes progenies de plántulas de *Quercus ilex* spp.*ballota*. Aceptado para 6º Congreso Forestal Español que se celebrará en Vitoria-Gasteiz del 10 al 14 de Junio de 2013.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abelleira A. y cols (1996). “*Armillaria mellea* (Vahl: Fries) Kummer” ficha nº 21; “*Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. Chancro del Castaño”, ficha nº 36” y “*Phytophthora cinnamomi* (Rands) Tinta del Castaño”, ficha nº 58. Libro: Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales. MAPA-Madrid.
- Abril, M. y R. Hanano. 1998. Ecophysiological responses of three evergreen woody Mediterranean species to water stress. *Acta Oecologica* 19: 377-387.
- Ackerly D.D., Reich P.B. 1999. Convergence and correlations among leaf size and function in seed plants: a comparative test using independent contrast. *American Journal of Botany*. 86: 1272-1281.
- Alejano Monge R., Domingo Santos J. M., Fernández Martínez M. (Coords) 2011. Manual para la gestión sostenible de las dehesas andaluzas. ISBN 978-84-615-4002-0.
- Allué Andrade J.L. 1990. Atlas fitoclimático de España. Taxonomías. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. 221 pp. Madrid.
- Andivia E., Fernández M., Vázquez-Piqué J. 2011. Autumn fertilization of *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Desf.) Samp. nursery seedlings: effects on morpho-physiology and field performance. *Annals of Forest Science*. 68:543-553.
- André P., Laudelout H., 1992. Le dépérissement du chêne – état de la question et bibliographie. *For. Wallonne*. 14: 16–20.
- Arnott J. T., Grossnickle S.C., Puttonen P., Mitche A.K., Folk R.S. 1993. Influence of nursery cultura on growth, cold hardiness, and drought resistance of yellow cypress. *Can. J. For. Res.* 23: 2537-2547.

B

- Baquedano F., Castillo J. 2006. Comparative ecophysiological effects of drought on seedlings of the Mediterranean water-saver *Pinus halepensis* and water-spenders *Quercus coccifera* and *Quercus ilex*. *Trees*. 20: 689-700.
- Batini F.E. 1974. Susceptibility of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla* seedlings to infection by *Phytophthora cinnamomi* in nutrients solution. *For. Dep., W. Aust., Res. Pap.* 14.4pp.

- Baptista F.J., Bailey B.J. 2005. Measuring and Modelling Transpiration Versus Evapotranspiration of a Tomato Crop Grown on Soil in a Mediterranean Greenhouse. Proc. IC on Greensys Eds.: G. van Straten et al. Acta Hort. 691.
- Barklund P., Wahlstroem K., 1998. Death of oaks in Sweden since 1987. In: Disease / Environment Interactions in Forest Decline. Proceedings Workshop Party IU-FRO 7.02.06, March 16–21, 1998, Vienna, Austria. Ed. by Cech, T. L.; Hartmann, G.; Tomiczek, C. Vienna, Austria: Federal Forest Research Centre, p. 193.
- Bayerische Akademie der Wissenschaften (ed.).1993. Zustand und Gefährdung der Laubwälder. Rundgespräche der Kommission für Ökologie 5. München, Germany: F. Pfeil.
- Beadle C.L., Neilson R.E., Talbot H. and Jarvis P.G. (1985). Stomatal conductance and photosynthesis in a mature Scots pine forest. I. Diurnal, seasonal and spatial variation in shoots, *Journal of Applied Ecology*, 22, 557-571.
- Begg J. E. 1980. Morphological adaptation of leaves to water stress. In: Turner, N. C. y Kramer, P. J. (Eds.) *Adaptations of Plants to Water and High Temperature Stress*, John Wiley and Sons. New York. USA. pp. 7-20.
- Belisario A., Galli M., Wajnberg E. 2009. Evaluation of *Juglans* species for resistance to *Phytophthora cinnamomi*: differences in isolate virulence and response to fosetyl. *Al. Forest of Pathology* 39: 168-176.
- Bongarten B.C., Teskey R.O. 1986. Water relations of loblolly pine seedlings from diverse geographic origins. *Tree Physiol.* 1: 265- 276.
- Brasier C.M. 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature*. 360, 539.
- Brasier C. M., 1993a. *Phytophthora cinnamomi* as a contributory factor or European oak declines. In: *Recent advances in studies on oak decline* (N. Luisi, P. Lenario y A. Vanini, eds.), Brindisi, pp. 49-58.
- Brasier C.M., Robredo F., Ferraz J.F.P. 1993b. Evidence for *P. cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathol.* 42: 140-145.
- Brasier C.M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. Sci. For* 53; 347- 358.
- Brito de Carvalho J. H. 1993. «Stress» do Sobreiro e da Azinheira ou Doença de Lopes Pimentel? CIDER, Univ. Algarve, Faro. 24 pp.
- Bryan W.C. 1973. Height growth of shortleaf pine progenies from trees selected for resistance to littleleaf disease. U.S. Dep. Agric. For. Serv. Res. Note SE-185.

- Burghardt M., Riederer M. 2003. Ecophysiological relevance of cuticular transpiration of deciduous and evergreen plants in relation to stomatal closure and leaf water potential. *J Exp Bot* 54(389):1941–1949. doi:10.1093/jxb/erg195.
- Bussotti F., Bettini D., Grossini P., Ansuino S., Nibbi R., Soda C., Tani C. 2002. Structural and functional traits of *Quercus ilex* in response to water availability. *Environmental Experimental Botany*. 47:11-23.
- Butcher T.B. 1987. Genotypic variation in resistance to *Phytophthora cinnamomi* in the *Pinus radiata* species. M. Sc. (Agric.) thesis. University of Western Australia, Perth, Australia.
- Butcher T.B., Stukely M.J.C. and Chester G.W. 1984. Genetic variation in resistance of *Pinus radiata* to *Phytophthora cinnamomi*. *For. Ecol. Manage.* 8:197-220.
- Butin H. 1995. Tree diseases and disorders. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Byrt P.N. and Holland A.A. 1978. Infection of axenic *Eucalyptus* seedlings with *Phytophthora cinnamomi* zoospores. *Aust. J. Bot.* 26:169:176.
- C**
- Cabi. 1991. Distribution Maps of Plant Diseases. 32. CAB International. Wallingford (GB).
- Caetano P., Ávila M.E., Trapero, A. and Coelho, A.C. 2007. *Phytophthora cinnamomi* Populations on *Quercus* Forests From Spain and Portugal. *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems*. August 26-31, 2007, Monterey, California.
- Cahill D.M., Bennett I. J., McComb J.A. 1992a. Resistance of micropropagated *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Dis.* 76: 630-632.
- Cahill D.M., Bennett I. J., McComb J.A. 1993. Mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathology* 42: 862-872.
- Cahill D.M., McComb J.A. 1992b. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. Marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 40: 315-32.
- Carevic F. 2010. Evaluación de la producción de bellota de *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Desf) Samp., y de factores ecofisiológicos influyentes, en dehesas de la provincial de Huelva. Tesis Doctoral. E.S.I. Universidad de Huelva. 141pp.
- Carevic F., Fernández M., Alejano R., Vázquez Piqué F.J., Tapias R., Corral Pazos E., Domingo J. 2010. Plant Water Relations and Edaphoclimatic Conditions Affecting

Acorn Production in a Holm Oak (*Quercus Ilex* L. Ssp. *Ballota*) Open Woodland. Agroforestry Systems. Vol. 78. Núm. 3. 2010. Pag. 299-308.

Cobos J.M., Montoya R., Tuset J.J. 1993. New damage to *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Ed. By Luisi, N., Lerario, P., Vannity, A. Putignano: Tipolitografía Radio, pp. 163-170.

Coelho A.C., Horta M., Neves D., Cravador A. 2006. Involvement of a cinnamyl alcohol deshydrogenase of *Quercus suber* in the defence response to infection by *Phytophthora cinnamomi*. Physiological and Molecular Plant Pathology 69. 62-72.

Costa M., Morla C., Sainz H., 1998. Los bosques ibéricos: una interpretación geobotánica. Planeta, Barcelona.

D

Davis S.D. y Mooney H.A. 1986a. Tissue water relations of four co-occurring chaparral shrubs. Oecologia 70: 527-535.

David T.S., Henriques M.O., Kurz- Besson C., Nunes J., Valente F., Vaz M., Pereira J.S., Siegwolf R., Chaves M.M., Gazarini L.C., David J.S. 2007. Water-use strategies in two co-occurring Mediterranean evergreen oaks: surviving the summer drought. Tree Physiology 27, 793-803.

Davison E.M., Tay F.C.S. 1995. Predictions of where minimal damage to jarrah roots could result in tree death. *New Phytologist* 131, 393- 401.

Dawson P., Weste G. 1984. Impact of root infection by *Phytophthora cinnamomi* on the water relations of two *Eucalyptus* species that differ in susceptibility. Phytopathology. 74: 486-90.

Delatour C. 1983. Les dépérissements de chênes en Europe. *Biologie et Forêt* 35: 265-282.

Dodd R.S., Afzal-Rafii Z. 2004. Selection and dispersal in a multispecies oak hybrid zone. *Evolution* 58: 262- 269.

Dodd R.S., Hüberli D., Douhovnikoff V., Harnik T.Y., Afzal- Rafii Z. and Garbelotto M. 2005. Is variation in susceptibility to *Phytophthora ramorum* correlated with population genetic structure in coast live oak (*Quercus agrifolia*)?. *New Phytologist*. 165. 203-214.

Donaubauer E. 1998. The role of pathogens in the present Oak decline in Europe- A literature review. *Eur. J. For. Path.* 28: 91-98.

Ducamp M., Nyasse S., Thevenin J.M., Blaha G., Despreaux D., Cilas C. 2004. Genetic diversity of cocoa tree *Phytophthora* pathogens. In: Cilas, C., Despreaux D. (Eds.),

Improvement of Cocoa Tree Resistance to *Phytophthora* Diseases. Cirad, Repères, (167p).

E

Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases world-wide. St paul, Minesota, USA: APS Press.

F

Fereres E., Acevedo, Heenderson D.W. and. Hsiao T.C. 1978. Seasonal changes in water potencial and turgor maintenance in sorghum and maize under water stress. *Physiol. Plant* 44: 261-267.

Fernández M., Arias M.T., Ruiz F y Pardos J.A. 2003. Influencia del estado hídrico de *Eucalyptus globulus* Labill. en el nivel de ataque por *Phoracantha semipunctata* F. XV Reunión de la SEFV & VIII Congreso Hispano-Luso. Palma de Mallorca (España) septiembre.

Fernández M. 2008. Utilidad de parámetros hídricos de árbol para la selección clonal de *Eucalyptus globulus* Labill. frente al ataque por larvas de *Phoracantha semipunctata* (Fab.). *Boletín CIDEU*, 5-6: 57-68.

Fernández, M., Tapias, R., Alesso, P., Ruiz, F., López, G. 2010. Morpho physiological parameters as a tool for early selection of *Eucalyptus globulus* Labill. clones against climate change. *Proc. Mixed and pure forests in a changing world*. 6-8 october, Vila Real, Portugal.

Fernández M., Tapias R., Alesso P. 2010. Adaptación a la sequía y necesidades hídricas de *Eucalyptus globulus* Labill. en Huelva. *Boletín del CIDEU* 8-9. 31-41. ISSN 1885-5237.

Fernández- Escobar R. 2002. Tratamientos de la seca mediante inyecciones al tronco de los árboles. Jornada sobre la seca de la Encina. 27 de Noviembre. Huelva.

Fernández – Escobar R., Gallego F.J., Benlloch M., Membrillo J, Infante J., Perez de Algaba A., 1999. Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials. *European Journal of Forest Pathology*, 29-38.

Fernández Rebollo P., Carbonero Muñoz M. D., Blázquez Carrasco A. (Coords), 2008. La dehesa en el norte de Córdoba. Perspectivas futuras para su conservación. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba.

Ferraz J.P., Cravador A., Moreira A.C., Caetano P. 2003. Seca, amenaza para la industria del corcho. *Europacork* 8.

Franceschini A., Linaldeddu B.T., Scanu B. 2010. Serious outbreak of Holm oak decline on Caprera Island, Italy. SourceIOBC/WPRS Bulletin. 2012. Meeting Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "Integrated protection in oak forests", Tempio Pausania, Italy, 4-7 October 2010. 76:101-108.

G

Gallego F. J., Pérez de Algaba A., Fernández- Escobar R. 1999. Etiology of oak decline in Spain. Eur. J. For. Path. 29, 17-27.

Gallo LL.L. 1990. Search for resistance to *Phytophthora* root rot in West Indian avocado rootstock in the Canary Islands. EPPO Bulletin (20): 95-99.

Garbelotto M., Huberli D., Shaw D. 2006. First report of an infestation of *Phytophthora cinnamomi* in natural oak woodlands of California and its differential impact on two native oak species. SourcePlant Disease. 90: 5, 685.

García F., Pozo J.D. 1993. Ensayo de eficacia de un fungicida y un abono foliar para el control de "seca de encina". Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y comercio. Junta de Extremadura.

Gibbs J. N., Greig B. J., 1997. Biotic and abiotic factors affecting the dying back of pedunculate oak *Quercus robur* L. Forestry 70, 399–406.

Gimeno T.E., Pias B., Lemos-Filhos J.P., Valladares F. 2009. Plasticity and stress tolerance override local adaptation in the response of Mediterranean holm oak seedlings to drought and cold. Tree Physiol. 29: 87-98.

Gratani L., Meneghini M., Pesoli P., Crescente M.F. 2003. Structural and functional plasticity of *Quercus ilex* seedlings of different provenances in Italy. Trees. 17: 515-521.

H

Hachemi Merouani, Manuela Branco, João Santos Pereira, Maria Helena Almeida. 2001. A conservação a longo prazo de sementes do sobreiro. Manual práctico. (DIVAPRA Agricultural Genetics, University of Turin, Italy).

Hasall D.M. 1978. A comparison of *Phytophthora cinnamomi* infection in *Eucalyptus maculate*, a field resistant species. Aust. J. Bot. 26: 643:655.

Hardham A.R. 2001. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. Australasian Plant Pathology 30, 91-98.

Hardman A.R. 2005. Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*. Molecular Plant Pathology 6(6), 598-604.

Hartmann G., Blank R. 1992. Winterfrost, Kahlfraß und Prachtkäferbefall als Faktoren im Ursachenkomplex des Eichensterbens in Norddeutschland. Forst Holz 47, 443–452.

Hartmann G., Nienhaus F., Butin H. 1995. Farbatlas Waldschäden, 2nd edn. Stuttgart, Germany: Ulmer

Hartmann G., Blank R. 1998. Aktuelles Eichensterben in Niedersachsen – Ursachen und Gegenmaßnahmen. Forst Holz 53, 733–735.

Hickman J. C. 1970. Seasonal course of xylem sap tension. Ecology 51: 1052-1056.

Hüberli D, Tommerup I.C., Hardy G. 1997. The role paragynous and amphigynous antheridia in sexual reproduction of *Phytophthora cinnamomi*. *Mycological Research* 101, 1383-8.

Hüberli D, Tommerup I.C., Colquhoun I.J., Hardy G. 2002. Evaluation of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in seed-grown trees and clonal lines of *Eucalyptus marginata* inoculated in lateral branches and roots. *Plant pathology*. 51: 435, 442.

I

Infante J.M., Domingo F., Fernández-Alés R., Joffre R., Rambal S. 2003. *Quercus ilex* transpiration as affected by a prolonged drought period. *Biol. Plant.* 46: 49-55.

J

Jordan A. P. and Tainter F. H., 1996. The susceptibility of southern Appalachian oaks to *Phytophthora cinnamomi*. *Castanea* 61:348-355.

Juzwik J., Gust K.M., Allmaras R.R. 1998. Influence of cultural-practices on edaphic factors related to root disease in *Pinus* nursery seedlings. *Plant and Soil*, 207: 195-208.

K

Kellam M.K. and Coffey M.D. 1985. Quantitative Comparison of the Resistance to *Phytophthora* Root Rot in Three Avocado Rootstocks. *Phytopathology*. 75:230-234.

Kinloch B. 1992. Distribution and frequency of a gene for resistance to white- pine blister rust in natural population of sugar pine. *Canadian Journal of Botany* 70: 1319-1323.

Knops M.H., Koenig W.D. 2000. Annual variation in xylem potential in California oaks. *Madroño*. 47:106-108.

Kozłowski T. T., Kramer P.J. y Pallardy S.G. 1991. The physiological ecology of woody plants. Academic Press. Toronto.

- Kramer P.J. 1983. Water relations on plants. Academic Press, New York, 496 p.
- Kwak M.J., Lee S.H., Woo S.Y. 2011. Physiological and biochemical traits of different water and light intensities on cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings. African Journal of Biotechnology. 10:68, 15305-15319.

L

- Larcher W. 1995. Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. Water, radiation, salts and other stresses. 2nd Ed. Acad. Press. New York, USA. 606 pp.
- Lo Gullo M. A. y Salleo S. 1988. Different strategies of drought resistance in three Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. New Phytologist 108: 267-276.
- Lopes Pimentel A. 1946. O sobreiro também é parasitado pela *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis., agente da <<doença da tinta>> do castanheiro. *Publ. Dir. Ger. Serv. Flor. E Aquic.* 13: 45-49.
- Luisi N., Lerario P., Vannini A. (eds), 1993. Recent Advances in Studies on Oak Decline. Bari, Italy: Università degli Studi, Dipartimento di Patologia vegetale.
- Luisi N., Lerario P., y Vannini A. (eds.), 1993. Recent advances in Studies on oak decline. Proc. Int. Congress, Brindisi, Italy 13- 18 September 1992.

M

- Mansilla J.P., Pintos C., Salinero M^a.C.1993. Aislamiento e identificación en la provincial de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña. *Bol. San.Veg. Plagas*, 19:541-549.
- Malajczuk N., McComb A.J., and Parker C.A. 1977. Infection by *Phytophthora cinnamomi* Rands of roots of *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn. ex Sm. *Aust. J. Bot.* 25: 483-500.
- Marañón T. 1986. Plant species richness and canopy effect in the savanna-like "dehesa" of S.W. Spain. *Ecologia Mediterranea* 12:131-141.
- Marañón T. 1988. Agro-sylvo-pastoral systems in the Iberian Peninsula: dehesas and montados. *Rangelands* 10(6): 255-258.
- Marçais B., Dupuis F., Desprez-Loustau M. L. 1996. Susceptibility of the *Quercus rubra* root system to *Phytophthora cinnamomi*; comparison with chesnut and other oak species. *Eur. J. For. Path.* 26. 133-143.

- Marks G.C., Smith I.W. 1991. The cinnamon fungus in Victorian Forests. *Lands Forests Bull.* 31, 1-33.
- Martín Bellido M., 1996. "La dehesa". *Agricultura*. 762: 44-49.
- Maurel M., Robin C., Capdevielle X., Loustau D., Desprez-Loustau M.L. 2001a. Effects of variable root damage caused by *Phytophthora cinnamomi* on water relations of chestnut saplings. *Ann. For. Sci.* 58: 639-651.
- Maurel M., Robin C., Capron G, Desprez-Loustau. 2001b. Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass accumulation, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak chestnut species. *For. Path.* 31:353-369.
- McComb J.A., Hinch J., Clarke A.E. 1987. Expression of field resistance in callus tissue inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*. 77: 346-51.
- McComb J.A., Bennet I.J., Stukely M.J.C., Crane C. 1991. Selections and propagation of jarrah for dieback resistance. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society*. 10: 86-90.
- Mendgen K., Hahn M., Deising H. 1996. Morphogenesis and mechanism of penetration by plant pathogenesis fungi. *Ann. Rev. Phytopathol* (34): 367-386.
- Merouani H., Branco M., Santos Pereira J., Almeida M.E. 2001. A conservação a longo prazo de sementes do sobreiro. *Manual práctico*. (DIVAPRA Agricultural Genetics, University of Turin, Italy).
- Miller PM. 1955. V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45:461-462
- Mircetich S. M., Campbell R. N., Matheron M. E. 1977. *Phytophthora* trunk canker of coast live oak and cork oak trees in California. *Plant Dis. Rep.* 61:66-70.
- Mitchell D. J. 1978. Relationships of inoculum levels of several soilborne species of *Phytophthora* and *Pythium* to infection of several hosts. *Phytopathology* 68:1754-1759.
- Montoya J. M. 1992. Mortandad de *Quercus*, la perspectiva silvícola y los antecedentes climáticos. *Ecología* 6: 123-130.
- Montoya R. 1981. Silvicultura mediterránea de los suelos pseudogley. *Bol. Estac. Cen. Ecol.* 10: 3-10.
- Moralejo E., García-Muñoz J.A., Descals E. 2009. Susceptibility of Iberian trees to *Phytophthora ramorum* and *P. cinnamomi*. *Plant Pathology*. 58, 271-283.

Moreira A.C., Ferraz J.F.P., Clegg J.M. 1997. Susceptibility of *Quercus suber* and *Quercus rotundifolia* to infection to *Phytophthora cinnamomi*, Proceedings del 10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Montpellier.pp:427-431.

Munnecke D.E. 1984. Establishment of micro-organisms in fumigated avocado soil to attempt to prevent reinvasion of the soil by *Phytophthora cinnamomi*. *Transactions of the British Mycological Society* 83, 287-294.

Myers B., Craig I. 1988. Changes in water potential of *Pinus radiata* fascicles during temporary storage. *Journal Forest Science*. 18:3-8.

N

Nadhezhdina N., Ferreira M.I., Silva R., Pacheco C.A. 2008. Seasonal variation of water up-take of a *Quercus suber* tree in Central Portugal. *Plant Soil* 305, 105-119.

Nardini A. y Tyree M.T. 1999. Root and shoot hydraulic conductance of seven *Quercus* species. *Annals of Forest Science* 56: 371-377.

Navarro R.M., Fernández P., Ruíz J.M. 2000a. Evaluación de los daños producidos por la Seca de especies del género *Quercus* spp. en Andalucía. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

Navarro R.M., Fernandez P., Ruiz J.M. 2000b. Manual de campo para el Inventario de Daños sobre masas de *Quercus* sp. afectadas de daños de Seca. servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

Navarro R.M., Cerrillo R.M., Fernandez Rebollo P., Trapero A., Sanchez M.E. 2001. Desarrollo de modelos de evaluación de daños producidos por la Seca de especies del género *Quercus* L. en Andalucía. Propuestas de solución. Informe Final 2001. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

Navarro R.M., Fernandez P., Ruiz J.M. 2001b. Efecto del descorche y del desbroce sobre el crecimiento diametral del alcornoque (*Quercus suber* L.) y las condiciones microclimáticas del suelo. Resultados preliminares. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente.

Navarro R.M., Fernandez P., Ruiz J.M. 2001c. Manual de Campo para el Inventario y Censo de Masas de *Quercus* Afectadas de Daños de Seca. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

Navarro R.M., Fernandez P., Ruiz J.M., Vidiella A. 2001d. El síndrome de la Seca en masa de *Quercus* sp. en Andalucía. III Congreso Forestal Español.

Navarro R.M., Fernandez P., Trapero A., Sanchez E., Herrera M. 2001e. Principales agentes causantes de la Seca em masas de *Quercus* sp. en Andalucía. III Congreso Forestal Español, 6.

Navarro R.M., Vidiella A. 2001f. Propuestas de Asociaciones de Tratamiento Integral de encinares-alcornocales en Andalucía. Servicio de Ordenacion de Recursos Forestales. . Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

Navarro Cerrillo R. M., Gallo Ibanez L., Sanchez Hernandez M. E., Fernandez Reboillo P., Trapero Casas A.2004. Effect of phosphoric fertilization on the resistance of holm oak and cork oak to *Phytophthora cinnamomi* Rands. [Spanish]. Investigacion Agraria, Sistemas y Recursos Forestales. 13: 3, 550-558. 26.

Nyassé S., Cilas C., Hérail C., Blaha G.1995. Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. Crop Prot. 14 (8), 657-663.

O

Ogaya R., Peñuelas J. 2003. Comparative field study of *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*: photosynthetic response to experimental drought conditions. Environmental Experimental Botany. 50:137-148.

Ogaya R., Peñuelas J. 2006. Contrasting foliar responses to drought in *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. Biologia Plantarum. 50: 373-382.

Oleksyn J., Przybyl K. 1987. Oak decline in the Soviet Union – scale and hypotheses. Eur. J. For. Path. 17: 321–336.

Oleksyn J., Modrzyński J., Tjoelker M.G., Zytkowski R., Reich P.B., Karolewski P., 1998. Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects: common garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. Funct. Ecol. 12: 573-590.

Ortíz Hernández Y.D.; Livera-Muñoz M.; Colinas-León M. T.; Carrillo-Salazar J. A. 1999. Estrés hídrico e intercambio de CO₂ de la pitahaya (*Hylocereus undatus*). Agrobiencia 33(4): 397-405.

P

Palmroth S., Berninger F., Nikinmaa E., Lloyd J., Pulkkinen P., Hari, P., 1999. Structural adaptation rather than water conservation was observed in Scots pine over a range of wet to dry climates. Oecologia. 121: 302-309.

Paulin D., Ducamps M., Vezian-Bonnelayre K., Eskes A.B. 2005. Evaluation par le test d'inoculation sur feuille du niveau de résistance de trente clones vis-à-vis de plu-

sieurs espèces de *Phytophthora*. In: International Cocoa Research Conference, 14, 2003-10-13/2003-10-18, Accra, Ghana, vol.1, pp. 85-93.

- Paulin D., Ducamp M., Lachenaud P. 2008. New sources of resistance to *Phytophthora megakarya* identified in wild cocoa tree populations of French Guiana. *Crop Protection*. 27:1143-1147.
- Pearcy R., Ehleriger J., Mooney H., Rundel P. 1989. *Plant physiological ecology: field methods and instrumentation*. Cambridge University Press. 457 pp.
- Pena- Rojas K., Aranda X., Joffre R., Fleck I. 2005. Leaf morphology, photochemistry and water status changes in resprouting *Quercus ilex* during drought. *Functional Plant Biology*. 32: 117-130.
- Pesoli P., Gratani L., Larcher W. 2003. Response of *Quercus ilex* from different provenances to experimentally imposed water stress. *Biologia Plantarum*. 46: 577-581.
- Peñuelas J.L., Ocaña L. 1996. *Cultivo de plantas forestales en contenedor*. MAPA. Mundi-Prensa, Madrid.
- Pérez J.T., Buzarco A., Vazquez F.M., Pérez M.C., Esparrago F. 1993. La seca de la encina (*Quercus rotundifolia* Lam.) y del alcornoque (*Q.suber*.L.) en la provincial de Badajoz. 1988-1992. In: Congreso Forestal Español, Lourizán, Vol. III, 397-402.
- Pérez-Latorre A.V., Cabezudo B. 2006. Phenomorphology and eco-morphological characters of *Rhododendron* lauroid forests in the Western Mediterranean (Iberian Peninsula, Spain) *Plant Ecol.*, 187 (2006), pp. 227-247.
- Pesoli P., Granati L., Larcher W. 2003. Responses of *Quercus ilex* from different provenances to experimentally imposed water stress. *Biol. Plant.*46: 577-581.
- Pettitt T.R., Finlay A.R., Scott M.A., Davies E.M. 1998. Development of a system simulating commercial production conditions for assessing the potential spread of *Phytophthora cryptogea* root rot of hardy nursery stock in recirculating irrigation water. *Ann. Appl. Biol.*, 132: 61-75.
- Peuke, A.D., Schrami, C., Hartung, W., Rennenberg, H., 2002. Identification of drought-sensitive beech ecotypes by physiological parameters. *New Phytol.* 154: 373-387.
- Phillips D., Grant B.R., Weste G.M. 1987. Histological changes in roots of an avocado cultivar. Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*. 77:691-8.
- Pita P., Pardos J.A. 2001. Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. *Tree Physiology*, 21: 599-607.

Plumbe A.M., Willmer C.M. 1986. Phytoalexins, water-stress and stomatal. III. The effects of some phenolics, fatty acids and other compounds on stomatal responses. *Phytologist*. 103: 17-22.

Podger F. D. 1972. *Phytophthora cinnamomi*, a cause of lethal disease in indigenous plant communities in Western Australia. *Phytopathology* 62: 972-981.

Premachandra G.S., Saneoka H., Fujita K., Ogata K.S. 1992. Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by water deficits in Sorghum. *J Exp Bot* 43:1569–1576. doi:10.1093/jxb/43.12.1569.

Q

Quisinberry J., Roark B., McMichael B. 1982. Use of transpiration decline curves to identify drought-tolerant cotton germplasm. *Crop Science*. 22: 918-922.

R

Ragazzi A., Fedi I. D. y Mesturino L. 1989. The oak decline: a new problem in Italy. *Eur. J. For. Path.* 19: 105-110.

Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I. 1998. Status of oak decline studies in Italy and some views of the European situation. In: disease/environment interactions in forest decline. Ed. By Cech T. L., Hartmann G., Tomiczek C., Proc. Workshop party IUFRO 07/02/2006, March 16-21, 1998, Viena, Austria. Viena, Austria: Federal forest research centre, p. 202.

Rambal S. 1994. Water balance and pattern of root water uptake by *Quercus coccifera* L. evergreen scrub. *Oecologia* 62: 18-25.

Ramírez-Valiente J.A., Valladares F., Gil L., Aranda I. 2009. Population differences in juvenile survival under increasing drought are mediated by seed size in cork oak (*Quercus suber* L.). *Forest Ecol. Manag.* 257: 1676-1683.

Redfern D.B., Boswell R., Proudfoot J. 1993. Forest Condition. *For. Comm. Res. Inform.* 236. Edinburgh, UK: Forestry Commission.

Riederer M, Schreiber L. 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J Exp Bot* 52:2023– 2032. doi:10.1093/jexbot/52.363.2023.

Rivas Martínez S., Saenz Lain C. 1991. Enumeración de los *Quercus* de la Península Ibérica. *Rivasgodaya* 6: 101-110.

Robichaux R.H. 1984. Variation in the tissue water relations of two sympatric Hawaiian *Dubautia* species and their natural hybrid. *Oecologia*. 65: 75-81.

Robin C., Capron G. and Desprez-Loustau M.L. 2001. Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathology* (2001) 50, 708-716.

- Robin C., Desprez-Loustau M. L. 1998a. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. Eur. J. Plant. Path. 104, 465-475.
- Robin C., Desprez-Loustau M. L., Capron G., Delatour C. 1998b . First record in France and pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oak. Annales Des Sciencies Forestières 55, 69- 83.
- Robin C., Desprez- Loustau M. L., Delatour C. 1992. Factors influencing the enlargement of trunk cankers of *Phytophthora cinnamomi* in red oak. Can. J. For. Res. 22: 367-374.
- Rodà F., Retana J., Gracia C.A., Bellot J. 1999. Ecology of mediterranean evergreen oak forest. Springer, Berlin- Heidelberg, Germany.
- Rodríguez-Estévez V., García A., Perea J., Mata C., Gómez A.G. 2007. Producción de bellotas en la dehesa: factores influyentes. Archivo de Zootecnia. 56:25-43.
- Romero M.A., Sánchez M.E., Trapero A. 2007. Red Andaluza de daños sobre ecosistemas forestales. Tratamientos con funguicidas para el control de chancros causados por *Botryosphaeria* en alcornoques. Servicio de Ordenación de Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.
- Rösel K., Reuther M. (eds), 1995. Differentialdiagnostik der Schäden an Eichen in den Donauländern. Schlußbericht. GSF-Bericht 11 / 95. Neuherberg /München, Germany: GSF.
- Rossmann A. Y., Palm M. E. 2006. Why are *Phytophthora* and other oomycota not true fungi. Outlooks on Pest Management.17: 5, 217-219.
- Ruíz de la Torre J. 2006. Flora mayor. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Dirección General para la Biodiversidad, MMA, Madrid.
- S**
- Sala A., Tenhunen J.D. 1994. Site-specific water relations and stomatal response of *Quercus ilex* L. in a mediterranean watershed. Tree Physiology. 14: 601-617.
- San Miguel Ayanz A. (1994): *La dehesa española. Origen, tipología, características y gestión.* Fundación Conde del Valle de Salazar, Madrid.
- Sánchez M.E., Caetano P., Ferraz J. y Trapero A. 2000. El decaimiento y muerte en encinas de tres dehesas de la provincia de Huelva. Bol. San. Veg. Plagas, 26: 447-464.
- Sánchez M.E., Muñoz M., Brasier C.M., Trapero A. 2001. Identity and pathogenicity of two *Phytophthora* taxa associated with a new root disease of olive trees. Plant Dis., 85:411-416.

- 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. Proceedings of the Thid International IUFRO Working Party. Meeting at Freising, Germany.
- Sánchez M.E., Andicoberry S., Trapero A. 2004. Patogenicidad de *Phytophthora* spp. Causante de podredumbre radical de *Quercus ilex* ssp. *Ballota* en viveros forestales. Bol. San. Veg. Plagas, 30: 385-401, 2004.
- Sánchez-Vilas J., Retuerto R. 2007. *Quercus ilex* shows significant among population variability in functional and growth traits but maintains invariant scaling relations in biomass allocation. Int. J. Plant Sci. 168: 973-983.
- Sardinero S., Fernández Cancio A., Pereira I., y Manrique E. 2000. Oak decline and vegetation dynamics in Southwestern Spain. INIA Report for Research Project 1FD97-0911-C3-1, Instituto Nacional de investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Spain.10pp.
- Schlag M. G. 1994. Das europäische Eichensterben_und seine Ursachen-von einem phytopathologischen Standpunkt aus gesehen. Cbl. Ges. Forstwes. 111, 243–266.
- Scholander P. F., Hemmingsen E., Garey W. 1965. Sap pressure in vascular plants. Science 148: 339-346.
- Serrano L. and Peñuelas J. 2005. Contribution of physiological and morphological adjustments to drought resistance in two Mediterranean tree species. Biologia Plantarum 49 (4): 551-559.
- Shearer B. L. y Tippet J.T. 1989. Jarrah dieback: the dynamics and management of *Phytophthora cinnamomi* in the Jarrah (*Eucalyptus marginata*) forest of south-western Australia. Departament of Conservation and Land Management, Western Australia. Research Bulletin No. 3, 1-76.
- Sherald J., Santamour F., Hajea R. 1994. A Dutch elm disease resistant triploid elm. Can. J. For. Res. 24: 647-652.
- Siwecki R., Liese W. (eds) 1991. Oak Decline in Europe. Proceedings of the International Symposium, Kornik/Poland, May 15–18, 1990. Kornik/Poland: Polish Academy of Sciences.
- Smith I.M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H., Archer S.A. 1992. Manual de enfermedades de las Plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.671pp.
- Snowdon, P. 2000. Nutritional disorders and other abiotic stresses of *Eucalyptus*, In: Keane P.J., Kile G.A., Podger F.D., Brown B.N. (eds.). *Diseases and pathogens of Eucalyptus*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 2000, pp. 385–410.

- Sonesson K. 1999. Oak decline in southern Sweden. *Scand. J. For. Res.* 14, 368–375.
- Solla Hach A. 2000. Mejora genética de *Ulmus minor* Miller: Selección de ejemplares resistentes a la grafiosis. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Superior de Ingenieros de Montes. Tesis Doctoral. 136pp.
- Soria S., López M. y López M. 1997. Presencia, sintomatología y daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación con la seca de la encina. *Ecología* 11: 295-301.
- Sousa Santos M. N. D., Moura Martins A. M. 1993. Cork oak decline. Notes regarding damage and incidence of *Hypoxylon mediterraneum*. In: Recent Advances in Studies on Oak Decline. Ed. by Luisi, N., Lerario, P., Vannini, A., Bari, Italy: Università degli Studi, Dipartimento di Patologia vegetale, pp. 115–121.
- Stamps D.J., Waterhouse G.M., Nethook F.S. and Hall G.S. 1990. Revised Tabular Key to the Genus *Phytophthora*. Mycological Papers nº162. CAB Internacional.
- Stukely M.J.C., Crane C. E. 1994. Genetically based Resistance of *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 84:650-656.
- Szepesi A. 1997. Forest health status in Hungary. *Environ. Poll.* 98, 393–398.

T

- Tapias R., Fernández M., Sáenz A., Alcuña M.M., José V., Inchusa A., Moreira A.C., Cravador A. 2004. Variability of tolerance/resistance of *Quercus suber* L. seedlings to *Phytophthora cinnamomi* Rands. Evaluation of survival. Huelva. Universidad de Huelva. Vol. 500. 2008. Pag. 237-246. ISBN: 978-84-96826.
- Tapias R., Fernández M., Sáenz A., Alcuña M.M., José V., Inchusta A., Moreira A.C. y Cravador A. 2005a. Variabilidad de la resistencia/ tolerancia de plántulas de encina (*Quercus ilex* ssp. *ballota* L.) al patógeno *Phytophthora cinnamomi* Rands. Evaluación de supervivencia y crecimiento. IV Congreso Forestal Español. Zaragoza, Septiembre 2004.
- Tapias R., Fernández M., Salvador L., Santana R., García J., Alcuña M.M., José V., Inchusta A., Vázquez J., Torres E., Cravador A. 2005b. Physiological effect of *Phytophthora cinnamomi* infestations in *Quercus suber* seedlings. SUBERWOOD 2005 Conference. New challenges for integration of cork oak forest and products. Pag. 267-277. ISBN: 978-84-96826.
- Tapias R., Fernández M., Moreira A.C., Sánchez E. y Cravador A. 2006. Posibilidades de la variabilidad genética de encinas y alcornoques en la conservación y recuperación de bosques amenazados por la "seca". Comunicación invitada. Bol. Inf. CIDEU 1: 45-51. ISSN 1885- 5237. 2006.

- Tello J., Vares F., Lacasa A. 1991. Pruebas de patogenicidad en: Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos, 5: 81-82. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación.
- Thomas F. M., Blank R., Hartmann G. 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of a oak decline in Central Europe. For. Path. 32, 277-307.
- Tinus R, 1996. Root growth potential as an indicator of drought stress history. *Tree Physiol.* 16: 795-799.
- Tippett J.T., Hill T.C. 1984. Role of periderm in resistance of *Eucalyptus marginata* roots against *Phytophthora cinnamomi*. European Journal of Forest Pathology. 14: 431-9.
- Tognetti R., Longobucco A., Miglietta F., Raschi A. 1998. Transpiration and stomatal behaviour of *Quercus ilex* plants during the summer in a Mediterranean carbón dioxide spring. *Plant, Cell and Environment.* 21: 613-622.
- Torres J.J. 1985. El *Hypoxyylon mediterraneum* (De Not) Mill y su comportamiento en los encinares y alcornoques andaluces. *Bol. San. Veg. Plagas* 11: 185- 191.
- Trapero A., Romero M.A., Sánchez J.E., Jiménez J.J., Sánchez M.E. 2006. La seca de encinas y alcornoques en Andalucía: decaiminetos y Enfermedad. *Bol. Inf. CIDEU.* 1: 7-14.
- Trujillo-Viramontes F., Zavaleta-Mejía E., Pojas-Martínez R.I., Lara.J. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de Resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annuum*). *Nematropica* Vol 15. N°1 2005.
- Turner N.C. Adaptation to water deficits: A Changing Perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 175-190. 1986.
- 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 alcornoques. *Bol. Sanid. Veg. Plagas* 22, 491-499.
- V**
- Valladares F., Martínez-Ferri E., Balaguer L., Pérez-Corona E., Manrique E. 2000. Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-used strategy? *New Phytol.* 148: 79-91.
- Van Den Driessche R., 1991. Influence of container nursery regimes on drought resistance of seedlings following planting. II. Stomatal conductance, specified leaf area, and root growth capacity. *Can. J. For. Res.* 21: 566-572.

Vannini A., Valentini R. y Luisi N. 1996. Impacto f drought and *Hypoxylon mediterraneum* on oak decline in the Mediterranean region. *Ann. Sci. For* **53**: 753- 760.

Viera Natividade J. 1950. *Subericultura*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, DGF, Lisboa. 387 pp.

Villar-Salvador P, Ocaña Bueno L, Peñuelas Rubira J, Carrasco Manzano I, Domínguez Lerena S, Reinilla Estrada I. 1997. Relaciones hídricas y potencial de formación de raíces en plántulas de *Pinus halepensis* Mill. Sometidas a diferentes niveles de endurecimiento por estrés hídrico. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales.4:81-92.

Villar- Salvador P., Ocaña L., Peñuelas J., Carrasco I. 1999. Effect of wáter stress conditioning on the wáter relations, root growth capacity, and the nitrogen and non-structural carbohydrate concentration of *Pinus halepensis* Mill. (Aleppo pine) seedlings. *Ann. For. Sci.* 56:459:465.

Villar-Salvador P, Planelles R, Enríquez E, Peñuelas Rubira J (2004a) Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performance relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *For Ecol Manag* 196:257–266.

Villar-Salvador P, Planelles R, Oliet J, Peñuelas-Rubira J.L, Jacobs DF, González M. (2004b) Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. *Tree Physiol* 24:1147–1155.

Villar-Salvador P, Puértolas J, Planelles R, Peñuelas Rubira J (2005) Effect of nitrogen fertilization in the nursery on the drought and frost resistance of Mediterranean forest species. *For Syst (formerly Inv Agrarias: Sist Rec For)* 14:408–418.

Villar-Salvador P, Puértolas J, Cuesta B, Peñuelas Rubira J, Heredia-Guerrero N, Rey-Benayas J.M. 2012. Increase in size and nitrogen concentration enhances seedling survival in Mediterranean plantations. Insights from an ecophysiological conceptual model of plant survival. *New Forest*. DOI 10.1007/s11056-012-9328-6.

W

Weste G.M., Marks G.C. 1987. The biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australasian forest. *Annual Review of Phytopathology* 25: 207-29.

Z

Zentmyer G.A., Chen D. 1969. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in pure culture. *California Avocado Society*. 53:103-107.

Zentmyer G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. *Phytopathological Monograph* 10. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN, 96pp.

