

La traqueomicosis de *Diplodia* sp. sobre *Quercus* sp.

M.^a C. MUÑOZ LÓPEZ, P. COBOS SUÁREZ y G. MARTÍNEZ SAAVEDRA

Diplodia sp. se viene aislando en España desde 1979, asociado con la seca de ramas y ramillos de *Quercus* sp. En el presente trabajo, se estudian los síntomas de campo y caracteres de identificación en laboratorio. Asimismo, se comprueba mediante test en condiciones experimentales su comportamiento patógeno.

M.^a C. MUÑOZ LÓPEZ, P. COBOS SUÁREZ y G. MARTÍNEZ SAAVEDRA. Unidad Docente de Zoología y Patología Forestales. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Universidad Politécnica de Madrid.

Palabras claves: Seca de ramas, *Diplodia*, *Quercus*, test de patogenicidad.

INTRODUCCION

La primera observación de este hongo en España, asociado a las especies de *Quercus*, se obtuvo en 1978, tras el análisis de muestras de encina procedentes de Santa Bárbara (Huelva) (RUPÉREZ y MUÑOZ, 1980). En los años siguientes se fue confirmando su presencia con la detección de nuevos focos, de los que reseñamos los siguientes: En 1982, Las Herencias (Toledo); Boadilla del Monte (Madrid); Retuerta del Bullaque (Ciudad Real); El Pardo (Madrid); El Casar de Talamanca (Guadalajara). En 1983, Los Yébenes (Toledo). Entre 1984 y 1985, se obtuvieron numerosos registros en diversas provincias españolas. Prácticamente en todas aquellas muestras de ramillos secos recolectados.

Estas primeras observaciones, se obtuvieron sobre *Quercus ilex* L., junto con la identificación de otras especies fúngicas, de comportamiento desconocido, aunque probablemente saprofito o en todo caso sinérgico con el anterior (MUÑOZ y RUPÉREZ, 1987).

Problemas de interpretación taxonómica, no han permitido en todos los casos asignar con seguridad la especie del género que preponderantemente está actuando. El género *Diplodia*, y su teleomorfo *Botryosphaeria*, son muy polífagos, afectando a numerosas especies vegetales. Los caracteres de identificación de algunas especies son confusos, porque las biometrías de las estructuras reproductoras descritas por diferentes autores, a veces son coincidentes, y lógicamente van a depender del sustrato de análisis o del medio de cultivo agarizado empleado en el laboratorio para su aislamiento, que en muchos casos no está especificado.

En los trabajos más antiguos, se describen dos especies muy próximas: *Diplodia quercus* Fuckel y *Diplodia quercina* Westendrop. (ROLAND, 1945; BOYCE, 1961; GOIDANICH, 1964; LANIER *et al.*, 1976). Por otra parte, el género ha tenido una sinonimia muy empleada, *Sphaeropsis*, debido al aspecto que presentan sus conidios inmaduros.

La asociación de *Diplodia* con las especies de *Quercus* se sigue confirmando en los últimos años. Destacamos aquí las referencias más interesantes. Así, HECTH-POINAR *et al.* (1981) aíslan en California sobre *Quercus agrifolia* Née a *Diplodia quercina* West. comprobando su patogenia en inoculaciones sobre robles sanos. Otra cita esporádica se debe a KOWALSKI (1983). CROGHAN y ROBBINS (1986) consideran que *Botryodiplodia gallae* es el causante de canchales y «dieback» de ramas en diversas especies de robles en Michigan (USA). Últimamente, *Diplodia mutila* Fr. y su teleomorfo *Botryosphaeria stevensii* Shoem. es la especie que se aísla con más frecuencia, existiendo citas sobre *Quercus petraea* en Hungría (VAJNA, 1986), sobre *Quercus cerris* y *Quercus robur* en Italia (RAGAZZI y MESTURINO, 1987) y sobre *Quercus suber* en Cataluña (LUQUE y GIRBAL, 1989). Por otra parte, la presencia de especies de este hongo, también es reseñada recientemente por los especialistas europeos, como asociadas a la problemática conocida por «decaimiento de los robles» (Oak decline) (EPPO, 1990).

En la actualidad, podemos decir que en España, *Diplodia* sigue siendo el hongo que más frecuentemente se aísla en pies afectados de *Q. ilex* y *Q. suber*, existiendo también datos sobre *Q. faginea*.

Durante 1989, se realizó una prospección exhaustiva de los alcornoques de las provincias de Badajoz, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Córdoba, Gerona, Huelva, Jaén, Málaga y Sevilla. El objetivo de este estudio fue conocer la micoflora general de esta especie. Con mucho, la frecuencia de aislamiento de *Diplodia* fue superior a la de cualquier otro hongo, incluido *Hypoxyton mediterraneum* (MUÑOZ y COBOS, 1989 no publicado).

El presente trabajo, se ha orientado fundamentalmente hacia el estudio de la capacidad patogénica del hongo, mediante la inoculación de distintas cepas sobre plantas sanas.

Igualmente, se describen aspectos sintomatológicos de campo y de identificación en laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

Análisis directo del material vegetal

La observación al binocular de ramillos, ramas y frutos, facilita la localización de los cuerpos de fructificación del hongo (Figs. 1 y 2). Preparaciones microscópicas montadas en azul algodón al lactofenol, permite su identificación taxonómica.

Aislamiento

Secciones de ramillos, ramas o frutos, sin desinfección previa, sembradas en medio PDA e incubadas a temperatura ambiente bajo luz fluorescente continua, permite la obtención de colonias del hongo en pocos días (Fig. 3).

Inoculaciones

Encinas de una y dos savias, procedentes del vivero «El Serranillo» (Guadalajara), y originarias de bellota recogida en Horche, fueron inoculadas con cultivo joven del hongo, según tres procedimientos.

Inoculación del pecíolo

En 6 plantas de 1 savia y 6 de 2 savias, más 2 plantas utilizadas como testigos, se practicó una incisión sobre 3 pecíolos por planta, con un bisturí desinfectado. Sobre ésta, se dispuso en cada caso, una unidad de inóculo, constituida por una pastilla de agar con micelio joven de 6 mm de diámetro, y una pastilla de agar estéril, de las mismas características se situó en la incisión practicada a los testigos. Se aseguró el contacto del inóculo mediante una cinta de parafilm.

Inoculación del tallo

En 6 plantas de 1 savia y 6 de 2 savias, más los correspondientes testigos, se practicó una incisión en el tallo, mediante el levantamiento parcial del cortex con un bis-

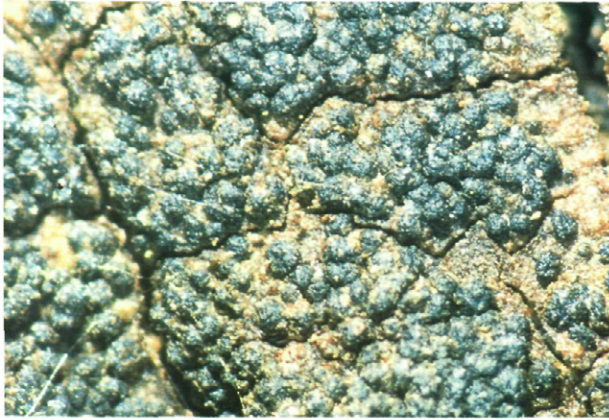


Fig. 1.—Observación a la lupa de picnidios de *Diplodia* presentes en ramas afectadas.

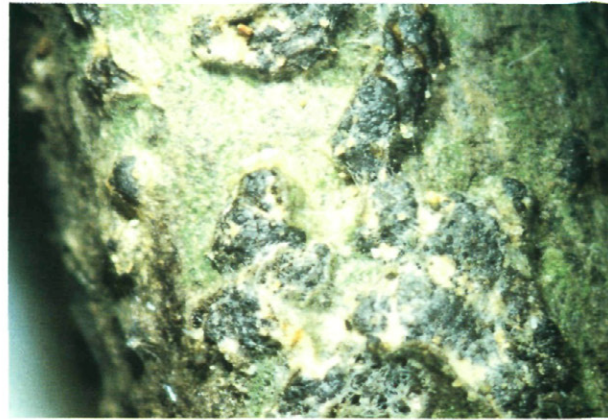


Fig. 2.—Observación a la lupa de pseudotecios de *Botryosphaeria* presentes en ramas afectadas.

turí desinfectado. En contacto con el xilema, se depositó una unidad de inóculo como la anteriormente descrita, y agar estéril en el caso de los testigos. Posteriormente, se sujetó el inóculo con la propia corteza levantada y una cinta adhesiva de parafilm.

Inyección de una suspensión de propágulos

La unidad de inóculo, en este caso se consideró tras triturar una placa de Petri de

Fig. 3.—Aislamiento de colonias de *Diplodia* en PDA a partir de material vegetal.



80 mm de diámetro en 200 cc de agua destilada. 20 cc de esta suspensión se inyectaron en 2 puntos del tallo de cada encina, distanciados entre sí aproximadamente 45 mm. Un total de 6 encinas de 1 savia y 6 de 2 savias fueron inoculadas de esta forma. Los testigos se inyectaron con 20 cc de agua destilada estéril.

Las plantas, regadas periódicamente, fueron situadas en condiciones de temperatura y fotoperíodo controlado. La temperatura mínima del ensayo se situó en 6 °C y la máxima a 20 °C. Siendo las medias 15 °C. Fotoperíodo de 2000-3000 LUX, 16 h/día.

Los reaislamientos del hongo, y el estudio de su movilidad en las plantas a partir del punto de inóculo, se realizó mediante la siembra en PDA de secciones correlativas del total del tallo o por siembra directa de hojas con pecíolo inoculado.

RESULTADOS

Aspectos sintomatológicos

La presencia de *Diplodia* está constantemente asociada a la siguiente sintomatología:

«Seca» de ramillos y ramas distales, acompañada de una fuerte defoliación, que



Fig. 4.—Defoliación total.

en algunos pies es total (Fig. 4). Las hojas acusan la interrupción del movimiento de savia, y adquieren típicamente una tonalidad pajiza o atabacada general (Figs. 5 y 6). Como consecuencia de estas necrosis foliares, el árbol va perdiendo más o menos rápidamente su follaje. El resultado final, es la aparición de ramillos puntisecos según un efecto clásico de «dieback» (Fig. 7). No obstante, se observan variaciones en estos síntomas, tanto en la coloración como en el tiempo de defoliación. Así, no es infrecuente, encontrar árboles cuyas hojas permanecen muertas pero prendidas durante un cierto tiempo, o bien éstas, presentan coloraciones más bien rojizas. Este aspecto, puede confundirse con la conocida sintomatología que presentan los ataques del buprésido *Coroebus florentinus* Herbst. y que es consecuencia del anillamiento de las ramas que producen sus galerías larvarias.

Fig. 5.—Atabacamiento de hojas.



Las ramas y ramillos afectados por *Diplodia*, presentan resquebrajaduras corticales y zonas deprimidas constituyendo canchales de distinto tamaño. El leño se oscurece o aparece con estriaciones, y es frecuente que bajo las áreas muertas, se produzca una proliferación de chupones o ramillos adventicios nuevos, de escasa viabilidad, que no tardan en secarse igualmente.

La observación detallada de estas áreas permite distinguir incluso macroscópicamente y con un poco de experiencia, los cuerpos de fructificación.

Localización y zonas de aislamiento

Ramillos y ramas

En los análisis efectuados a finales de invierno, es frecuente detectar los cuerpos de fructificación del teleomorfo *Botryosphae-*



Fig. 6.—Generalización de los daños.

Fig. 7.—«Dieback».



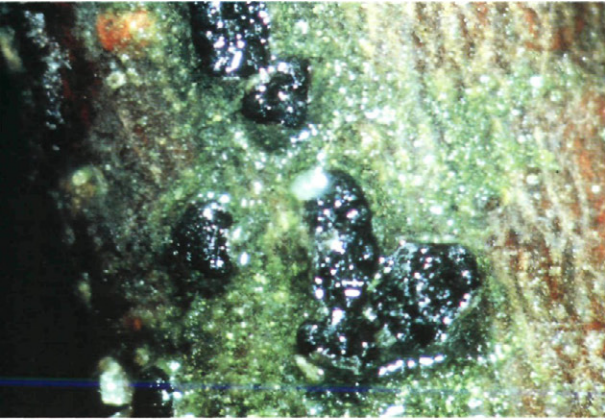


Fig. 8.—Cuerpo de fructificación de *Botryosphaeria*.

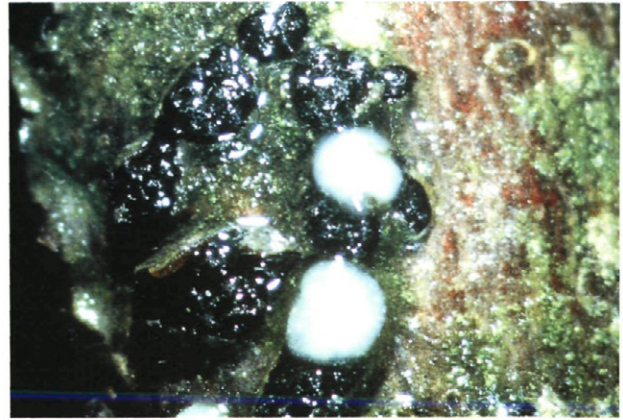


Fig. 9.—Gota mucilaginoso sobre el ostiolo de *Botryosphaeria*.

ria. Esto indica que el hongo pasa el invierno en el estado sexual. Los cuerpos de fructificación sexuales, son pseudotecios de color negro y suelen presentarse agrupados. Su aspecto externo es rugoso y de 2-3 mm de diámetro (Fig. 8). En el momento de la esporulación, el ostiolo se cubre con una gota mucosa de color blanco-amarillento (Fig. 9). Las ascosporas son típicamente unicelulares, ovoides, hialinas o débilmente coloreadas, y presentan un ligero ensanchamiento en una de sus paredes (Fig. 10).

El anamorfo puede observarse en prima-

vera, verano y otoño. Los picnidios del hongo (Fig. 11) aparecen en solitario o más frecuentemente en grupos numerosos sobre las áreas infectadas y las resquebrajaduras (Fig. 1). Los conidios inmaduros son ovoides, hialinos y unicelulares (tipo *Sphaeropsis*). En el mismo cuerpo de fructificación pueden encontrarse distintos estados de madurez según la siguiente secuencia: variación de la coloración hacia el amarillento o dorado; aparición de un tabique mediano; obscurecimiento del conidio en la madurez (Figs. 12, 13 y 14).

Fig. 10.—Ascosporas.

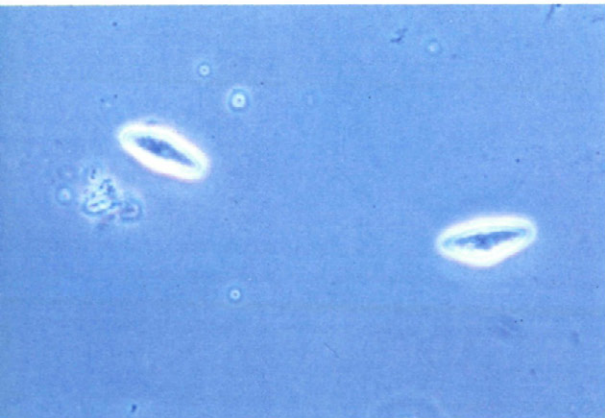
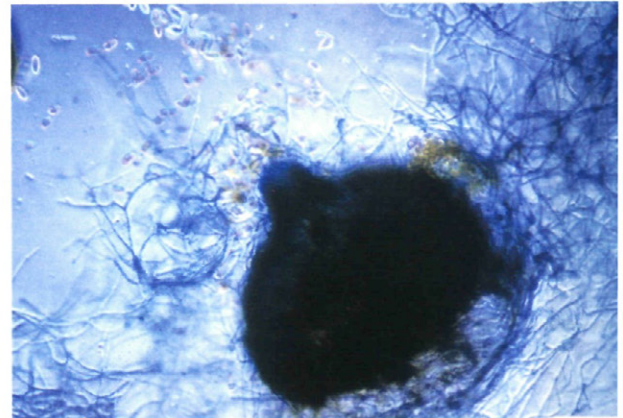


Fig. 11.—Picnidio de *Diplodia* al microscopio.



Tronco

La presencia de los cuerpos de fructificación anteriormente descritos, se constata también en los troncos, apareciendo subcorticales y en las fendas que se producen en la corteza.

Con frecuencia, se observa en los pies afectados una exudación más o menos abundante de savia coloreada, que deja manchas ferruginosas sobre la corteza. Su origen puede ser una respuesta del árbol a los ataques fúngicos. No obstante, por el momento no se ha demostrado que *Diplodia* sea la causa estricta de esta manifestación, puesto que también se presenta en alcornques afectados por *Hypoxylon mediterraneum* o por otros hongos de pudrición de la subdivisión *Basidiomycotina*. Sí se ha comprobado en los análisis microscópicos de estos exudados la presencia de conidios de *Diplodia* dispersos.

Frutos

En recientes análisis se han detectado picnidios sobre bellotas (Figs. 15 y 16). Este aspecto resulta de gran interés, si pensamos en la incidencia que el hongo pueda tener en la producción de fruto viable. Externamente, estos cuerpos de fructificación muestran una predisposición a manifestarse en el ápice del fruto, es decir en la zona correspondiente con la formación y emergencia de la radícula (Fig. 17). Alrededor del borde de la cúpula también son frecuentes las agrupaciones de picnidios (Fig. 18).

Externamente, las bellotas afectadas presentan síntomas de enanismo, y decoloraciones rojizas más o menos delimitadas. Internamente los cotiledones presentan podredumbres secas y una invasión total por el micelio fúngico (Fig. 19).

Cultivos

Sobre PDA, sólo se han obtenido cuerpos de fructificación asexuales. El micelio del hongo se desarrolla con rapidez rodean-

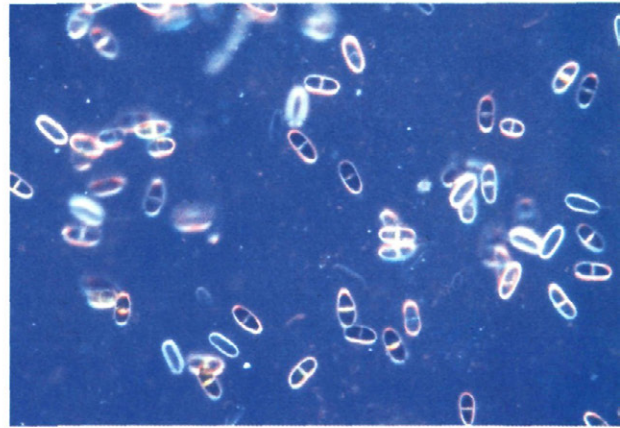
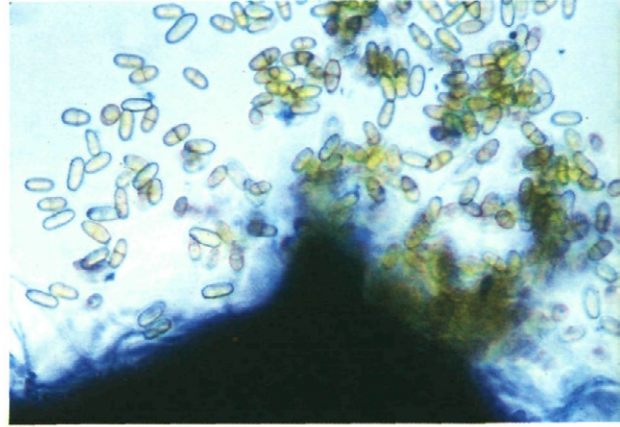


Fig. 12.—Emisión de conidios.

Fig. 13.—Conidios en diferente estado de madurez.

Fig. 14.—Conidio maduro y conidio en formación.



Fig. 15.—Fruto afectado de un ramillo seco.

Fig. 16.—Bellotas afectadas.



do las secciones de planta enfermas. Inicialmente, es de color blanco y aéreo (Fig. 20). Paulatinamente, va adoptando una coloración ligeramente verdosa (Fig. 21), al tiempo que se forman acumulaciones algodonosas, más o menos esféricas de micelio blanco (Fig. 22). Estos puntos serán el origen de los picnidios, los cuales, a medida que se van formando (Fig. 23) determinarán el aspecto final negruzco y costriforme que presenta la colonia como consecuencia del desarrollo del estroma fúngico y el elevado número de picnidios que cubren la placa (Fig. 24).

Los resultados de los estudios realizados sobre el comportamiento térmico del hongo *in vitro*, indican su euritermia y una cierta termotolerancia, desarrollando micelio dentro de un amplio rango de temperaturas. A la temperatura mínima considerada (5 °C) el crecimiento es escaso. El punto cardinal máximo se sitúa a los 35 °C. Los 40 °C determinan el cese de desarrollo, no obstante, esta temperatura no es letal, puesto que la colonia reinicia su crecimiento cuando las placas se disponen sobre bandeja de laboratorio a temperatura ambiente. Los óptimos se han obtenido a 25-30 °C, según las cepas estudiadas.

Inoculaciones

A los 15 días del inicio del ensayo, se registraron los primeros síntomas en las plantas de 2 años inoculados por incisión del pecíolo. Algunas hojas se habían desprendido, y otras se encontraban ligeramente prendidas. En todos los casos los pecíolos estaban necróticos, progresando esta alteración por el nervio central de la hoja (Fig. 25). El análisis de estas zonas sobre medio agarizado determinó el reaislamiento del hongo.

Fig. 17.—Apice del fruto con picnidios de *Diplodia*.

Fig. 18.—Borde de la cúpula con cuerpos de fructificación.

Fig. 19.—Corte de bellota. Se observa la afectación de los cotiledones.



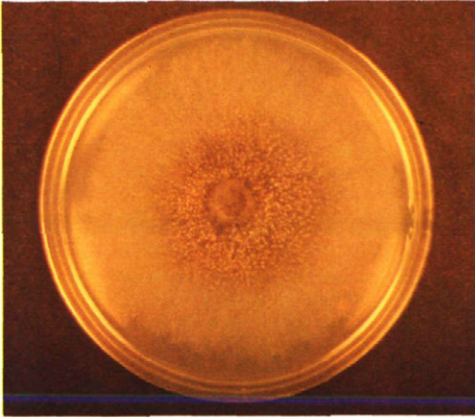


Fig. 20.—Aspecto inicial de la colonia.

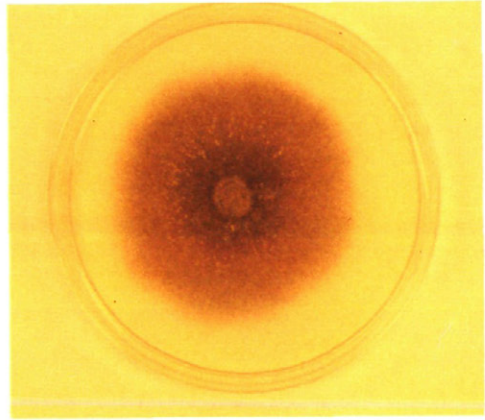
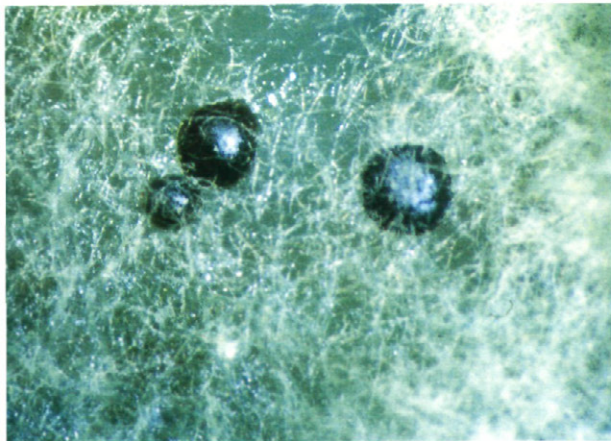
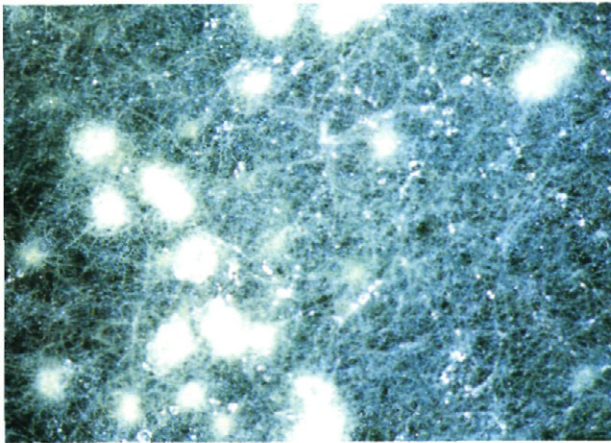


Fig. 21.—Variación de la coloración. Tonalidad olivácea.



En este mismo período, las plantas inoculadas por el método de incisión en tallo, no presentaban ningún síntoma en hojas, sin embargo, se observó la decoloración pardo-rojiza de los tejidos corticales y del xilema en las zonas de contacto del inóculo (Fig. 26). No obstante, no se procedió al reaislamiento del hongo en estos momentos, decidiendo esperar la evolución del ensayo y la aparición de otro tipo de síntomas, particularmente en hojas, si el hongo actuaba vascularmente.

En esta primera lectura, los ensayos realizados por inyección de inóculo, no presentaron ningún síntoma evidente de alteración.

La segunda lectura, se realizó al mes de la iniciación de los ensayos. Durante este tiempo, los síntomas observados de forma general en las plantas inoculadas, y no presentes en los testigos, se tradujeron en una pérdida paulatina de hojas, todavía verdes, o parcialmente atabacadas, aunque este último síntoma, que se observa frecuentemente en campo, no es muy manifiesto en los ensayos de laboratorio. La pérdida de follaje es particularmente evidente en las

Fig. 22.—Acumulación del micelio. Inicio de la formación de los picnidios.

Fig. 23.—Picnidios formados en medio de cultivo.

inoculaciones efectuadas en el tallo, tanto por incisión como por inyección. Ningún cambio se observó en las plantas inoculadas en el peciolo.

A partir de este momento, se registró una evolución muy lenta en las plantas inoculadas. Como hechos más característicos de esta fase, hay que mencionar la aparición de rebrotes nuevos compuestos por hojas de tamaño grande, que no obstante perdían turgencia hasta desecarse y el avance de la defoliación de las hojas primarias.

A los cuatro meses del ensayo, se decidió realizar la última lectura, mediante el análisis total de las plantas inoculadas sobre PDA. Para ello se seccionaron los tallos, y se numeraron estas porciones con el fin de estimar la movilidad del hongo a partir de los puntos de inoculación. Observaciones al binocular y al microscopio permitieron detectar el avance subcortical del mi-

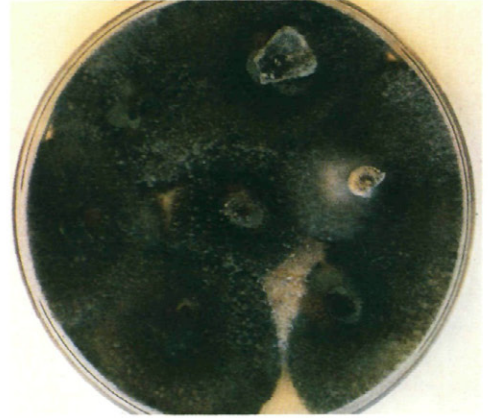


Fig. 24.—Aspecto costriforme final de las colonias de *Diplodia*.

Fig. 25.—Necrosis del nervio central de la hoja por inoculación en peciolo.



Fig. 26.—Necrosis en tallo provocada por la inoculación.



celio de una sección a otra y la colonización interior de los vasos (Figs. 27 y 28). Los resultados obtenidos figuran en los cuadros siguientes:

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los test de patogenicidad, indican que las cepas de *Diplodia* aisladas de encinas y alcornoques tienen un comportamiento patógeno en condiciones experimentales. El reaislamiento del hongo en las secciones practicadas a las plantas, situadas en posición anterior y/o posterior a los puntos de inóculo confirma la capacidad del hongo para progresar en los tejidos del hospedante. Esta movilización, supone al menos un avance mínimo del micelio de 4 cm durante los 4 meses de duración del ensayo.

Por otra parte, la sintomatología observada en las plantas de ensayo, conlleva una pérdida gradual de hojas. Estas hojas pre-

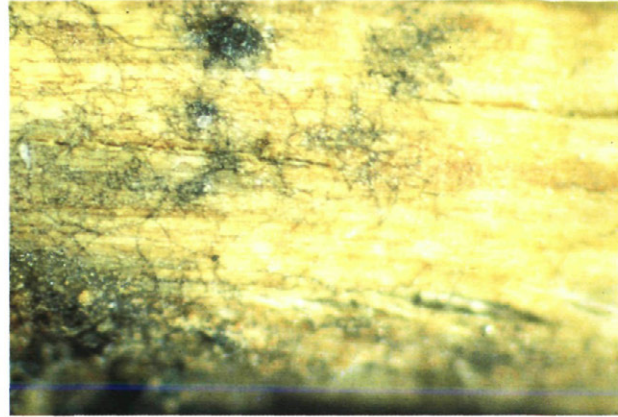
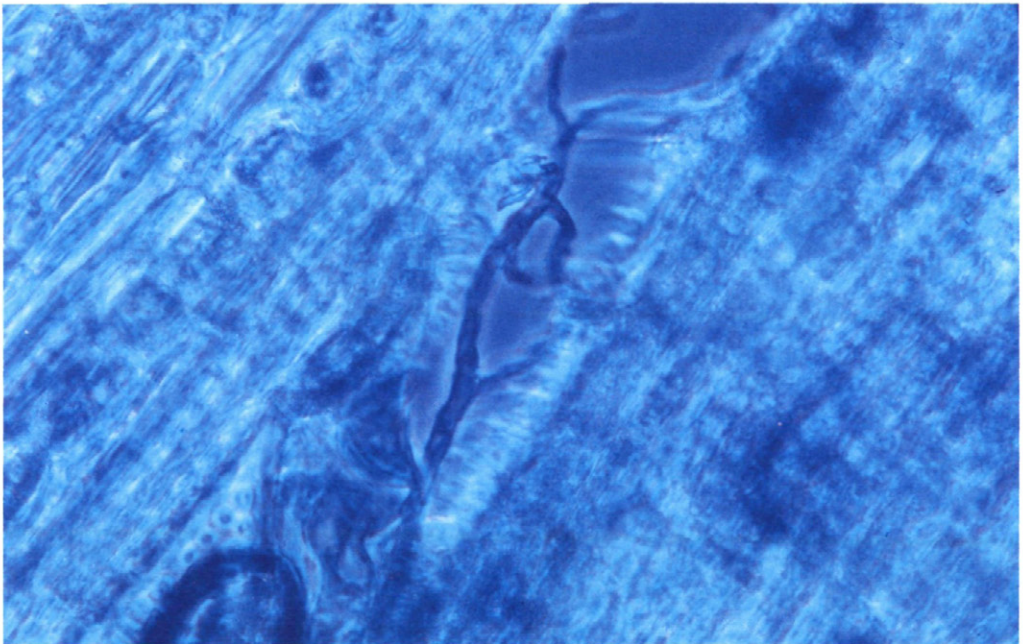


Fig. 27.—Avance subcortical del micelio y formación de agrupaciones fructíferas.

sentan clorosis a partir del segundo mes de experimentación y en la mayoría de los casos, manchas necróticas, principalmente en la base del limbo, pero que no llegan a extenderse totalmente antes de caer. Esta situación no coincide plenamente con el ata-

Fig. 28.—Colonización de los vasos del xilema por el micelio.



ENSAYO N.º 1: INOCULACION EN PECIOLO

Cuadro 1.—Plantas de 1 savia

Planta n.º	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9
1	—	Ph	D*	D	D *	D/Ph	Ph	D *	Ph
2	—	—	Ph	D *	Ph	D *	D	D *	D
3	Ph	Ph	D *	Ph	D *	D	D/Ph	Ph	s
4	s	s	Ph	D *	D	D */Ph	Ph	D *	D
5	Ph	D *	D/Ph	D *	D	D	D */Ph	D/Ph	Ph
6	—	—	D *	D/Ph	D *	D	D *	D/Ph	Ph
T-1	—	s	s+	s/Ph	s+/Ph	s	s	s+	s
T-2	—	—	s+	s	s+	s/Ph	s/Ph	s+	s

S: Secciones; * Sección que incluye el punto de inóculo; + Sección de herida en Testigo; D: Diplodia; Ph: Phoma; s: sa-profitos; — ningún aislamiento.

Cuadro 2.—Plantas de 2 savias

Planta n.º	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	S-11	S-12	S-13
1	Ph	Ph	D *	Ph	s	s	s	D *	D	Ph	D *	D	s
2	Ph	D *	Ph	Ph	D *	D/Ph	Ph	D *	D/Ph	Ph	s	—	—
3	s	Ph	D *	D	Ph	Ph	D *	D/Ph	Ph	D *	D *	D *	s
4	Ph	D *	Ph	s	s	s	s	s	s	D *	D	D *	D
5	s	Ph	D *	D/Ph	Ph	Ph	D *	D/Ph	Ph/s	s	D *	D	D/s
6	Ph	Ph	D *	Ph	Ph	Ph	D *	D	D *	D	D/Ph	s	s
T-1	Ph	Ph	Ph	Ph+	Ph	Ph+	Ph	Ph+	Ph	s	s	s	s
T-2	Ph/s	Ph/ s+	Ph/s	Ph/ s+	Ph/s	Ph/s	s+	s	s	s	—	—	—

S: Secciones; * Sección que incluye el punto de inóculo; + Sección de herida en Testigo; D: Diplodia; Ph: Phoma; s: sa-profitos; — ningún aislamiento.

ENSAYO N.º 2: INOCULACION POR INCISION EN TALLO

Cuadro 3.—Plantas de 1 savia

Planta n.º	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9
1	—	D *	D	Ph	Ph	s	s	s	s
2	D	D *	D/Ph	Ph	Ph	s	s	s	s
3	D	D	D *	D	D/Ph	Ph	s	—	—
4	—	D *	D	D/Ph	Ph	Ph	s	—	—
5	—	—	—	D *	D	D/Ph	Ph	s	—
6	s	D	D	D *	D	D/Ph	s	s	s
T-1	—	—	Ph	Ph++	s	s	s	—	—
T-2	s	s	Ph++	s	s	—	—	—	—

S: Secciones; * Sección que incluye el punto de inóculo; + Sección de herida en Testigo; D: Diplodia; Ph: Phoma; s: sa-profitos; — ningún aislamiento.

Cuadro 4.—Plantas de 2 savias

Planta n.º	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	S-11	S-12	S-13
1	s	s	s	D *	D	Ph	Ph	Ph	Ph	s	s	s	s
2	s	s	D	D *	D	Ph	Ph	Ph	Ph	Ph	s	—	—
3	s	s	D *	D	Ph	Ph	Ph	Ph	s	s	s	—	—
4	s	s	s	s	D *	D	s	s	—	—	—	—	—
5	D	D *	D	Ph	s	s	s	s	s	s	—	—	—
6	s	s	s	D *	D	Ph	Ph	s	s	s	—	—	—
T-1	—	Ph	Ph	Ph+	s	s	s	—	—	—	—	—	—
T-2	—	—	—	—+	Ph	Ph	—	—	—	—	—	—	—

S: Secciones; * Sección que incluye el punto de inóculo; + Sección de herida en Testigo; D: Diplodia; Ph: Phoma; s: sa-
profitos; — ningún aislamiento.

ENSAYO N.º 3: INOCULACION POR INYECCION EN TALLO

Cuadro 5.—Plantas de 1 savia

Planta n.º	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9
1	—	s	D *	D	D *	D	D/Ph	D/Ph	—
2	—	—	D *	D	D *	D	s	s	—
3	—	—	D *	D	D *	D	D	s	s
4	s	s	D *	D	D *	D	D/Ph	s	—
5	s	s	D *	D	D *	D	—	—	—
6	s	s	D *	D	—	D *	D	s	s
T-1	—	—	Ph+	Ph	s	—	—	—	—
T-2	—	—	—+	Ph	s	—	—	—	—

S: Secciones; * Sección que incluye el punto de inóculo; + Sección de herida en Testigo; D: Diplodia; Ph: Phoma; s: sa-
profitos; — ningún aislamiento.

Cuadro 6.—Plantas de 2 savias

Planta n.º	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	S-11	S-12	S-13
1	s	s	s	D*	D*	D	D	D	D/Ph	Ph	s	—	—
2	—	s	s	Ph	D*	D	D	D*	D	D	s	s	—
3	s	s	D	D	—	D	D	D	s	—	—	—	—
4	s	s	Ph	D*	D	D	D*	D	s	—	—	s	—
5 **	s	D	D	D*	D	D	D	D	D*	D	D	s	s
6	Ph	D	D*	D	Ph	s	s	D*	D	D	s	—	—
T-1	—	—	Ph+	—	—	—+	s	s	s	—	—	s	—
T-2	—	—	Ph+	—	—	—+	s	s	—	—	—	—	—

S: Secciones; * Sección que incluye el punto de inóculo; + Sección de herida en Testigo; D: Diplodia; Ph: Phoma; s: sa-
profitos; — ningún aislamiento; ** planta muerta al finalizar el ensayo.

bacamiento generalizado que a menudo se observa en campo. Es probable que los efectos de la exposición de las hojas ya afectadas a temperaturas altas en condiciones naturales, incidan en estas diferencias.

En los análisis también se ha detectado con cierta frecuencia colonias de *Phoma sp.* Este hongo, en principio se considera secundario, debido a su presencia mucho más abundante en las plantas testigos, las cuales, por el contrario no muestran ninguna sintomatología anormal.

Tanto las secciones del tallo inicialmente en contacto con el inóculo fúngico, como las próximas invadidas por el micelio con posterioridad, muestran síntomas internos de necrosis.

Por otra parte, se han iniciado unos estudios conducentes al conocimiento del comportamiento enzimático de *Diplodia* y su implicación en el proceso de patogénesis.

El estudio de la capacidad enzimática tiene gran interés para completar o matizar la información que se obtiene en los ensayos de inoculación, que al ser realizados en condiciones de máxima ventaja para los microorganismos inoculados, puede a veces no corresponderse plenamente con las situaciones de campo, donde otros factores de difícil reproducción en laboratorio, tanto de índole abiótico como biótico, contribuyen mediante sus interrelaciones, a modificar y/o restaurar los equilibrios.

Los hongos fitopatógenos, poseen entre otras características, una que es muy importante porque les permite la colonización del hospedador, y ésta es, la capacidad para producir enzimas que degradan los polímeros de las paredes celulares vegetales.

Se han determinado en esta primera fase, las actividades relacionadas con la peptina, por ser el polímero más accesible para el patógeno. En este sentido, se ha valorado la producción de poligalacturonasas, endopoligalacturonasas y peptinliasas.

Diplodia produce una actividad poligalacturonasa alta, cuya implicación es clara en las enfermedades vasculares, ya que capacita el avance y colonización del xilema, mediante la degradación de la lámina me-

dia. Como consecuencia de ello, se producen disgregaciones y maceraciones en los tejidos vegetales, y en último caso la muerte celular. Además, se forman geles pépticos que obstruyen los vasos impidiendo el aporte de agua y sales minerales a las partes superiores de la planta (FERNÁNDEZ ALVAREZ *et al.*, 1991).

La purificación y caracterización de estas proteínas así como estudios con otros aislamientos, se está llevando a cabo en estos momentos.

Con respecto a la relación de *Diplodia* con el actual problema denominado genéricamente «decaimiento de los robles» podemos exponer las siguientes consideraciones:

En un análisis general, hay dos tipos de síntomas claros que son observables en campo: a) Pérdida gradual de copa. b) Muerte súbita. Dentro de cada uno de ellos, a su vez se pueden diferenciar distintos estados evolutivos o formas de manifestación sobre los que por el momento no vamos a entrar en discusión, ya que siguen siendo objeto de estudio.

El primero de los síntomas, sin duda es el más generalizado, no sólo en España, sino también en otros países europeos. Podemos decir, que se ajusta más al concepto de «decaimiento» que en sí mismo lleva implícito una evolución en el tiempo.

La «seca» de ramillos y ramas puede irse sucediendo a lo largo de varios años y dar lugar finalmente a la muerte del árbol. Sería la forma *crónica* de la enfermedad. Si pensamos que han transcurrido 12-13 años desde que se aisló por primera vez *Diplodia* de estas zonas muertas, no es imposible pensar que ha estado y está jugando un papel importante en el anillamiento de las ramas, sólo o en combinación con otros agentes de similar comportamiento. Tampoco parece casual su relación desde el principio con el problema actual de las quercíneas, ya que las observaciones de distintos especialistas europeos, coinciden en situar el comienzo del decaimiento de estas especies arbóreas a finales de los años 60.

Con respecto al segundo de los síntomas,

estaríamos frente a la forma *aguda* de la enfermedad, que puede determinar la muerte del árbol en un solo período vegetativo. Indudablemente las posibles causas en este caso son más diversas, incluidas un elevado potencial de inóculo del hongo antes considerado. La generalización brusca de los daños conduce a varias hipótesis. Desde el punto de vista micopatológico, podría tratarse de un agente que vive en el suelo y produce podredumbre del sistema radical. En este caso los datos que se conocen se refieren a *Armillariella mellea* (Vahl ex Fr.) Kumm, bastante más extendido de lo que parece, y *Phytophthora cinnamomi* Rands. que se ha aislado en algunos focos. Sin embargo, no es posible por el momento adjudicarles un papel exclusivo y/o preponderante, puesto que no se confirma su presencia en un elevado número de análisis.

En cualquiera de los casos, siempre hay factores que al incidir sobre el vigor del arbolado, favorecen el establecimiento y la dispersión de los organismos causantes de enfermedades, los cuales, fundamentalmente son parásitos oportunistas. Estos factores se encuadran por regla general den-

tro de los llamados abióticos (clima, intervenciones de distinto tipo en el medio, etc.). La sequía quizás es la causa más evidente, ya que sin duda tiene ese efecto potencial, al reducir la resistencia de los hospedadores y por lo tanto favorecer el desarrollo de las enfermedades fúngicas.

En nuestra opinión, estamos frente a un complejo de factores biológicos y abióticos, en combinación con condiciones climáticas excepcionalmente adversas, y la mejora de estas últimas determinaría sin duda que la grave situación actual de nuestros robles no llegase a un punto sin retorno. No obstante, es necesario continuar con los estudios sobre la distribución, bionomías y el comportamiento de los agentes ya detectados con el fin de establecer si es posible medidas adecuadas de control.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a D. Ramón Montoya de Icona el suministro de las plantas utilizadas en los ensayos de patogenia.

ABSTRACT

MUÑOZ LÓPEZ, M.^a C.; COBOS SUÁREZ, P.; MARTÍNEZ SAAVEDRA, G. (1992): La traqueomicosis de *Diplodia sp.* sobre *Quercus sp.* *Bol. San. Veg. Plagas*, **18** (3): 641-657.

Diplodia sp. it is being isolated in Spain since 1979 on dead branches and twigs of *Quercus sp.* Various different field symptoms and laboratory features of identification are studied in this project. At the same time their pathogenic behaviour in laboratory conditions is tested.

Key words: Dieback, *Diplodia*, *Quercus*, pathogenic test.

REFERENCIAS

- BOYCE, J. S., 1961: *Forest Pathology*. Ed. Mc Graw-Hill. Nueva York.
- CROGHAN, F. C.; ROBBINS, K., 1986: Cankers caused by *Botryodiplodia gallae* associated with oak sprout mortality in Michigan. *Plant disease*, **70**: 76-77.
- EPPO, 1990: Ad hoc meeting on oak decline. EPPO Technical, document n.º 1.004.
- FERNÁNDEZ, N.; VÁZQUEZ, C.; COBOS, P.; MUÑOZ, C., 1991: *Diplodia*: un problema actual en los encinares españoles. Su capacidad enzimática. Actas del XIII Congreso Nacional de Microbiología. Salamanca (pendiente de publicación).
- GOIDANICH, G., 1964: *Manuale di Patologia Vegetale*. Vol. IV. Ed. Agricole Bologna.
- HECHT-POINAR, E. I.; BRITTON, J. C.; PARMENTER, J. R., 1981: Dieback of oaks in California. *Plant Disease*, **65**: 281.
- KOWALSKY, T., 1983: Vonkommen von Pilzen in durch

- Luftenrunreinigung geschädigten Wäldern im Oberschelesische und Krakauer. *Eur. J. For. Path.*, **13**: 46-59.
- LANIER, L.; JOLY, P.; BONDOUX, P.; BELLEMERE, A., 1976: *Mycologie et Pathologie Forestière*. 2 vol. Ed. Masson et Cie. Paris.
- LUQUE, J.; GIRBAL, J., 1989: Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryodiplodia stevensii*. *Eur. J. For. Path.*, **19**: 7-13.
- MUÑOZ, C.; RUPÉREZ, A., 1987: La patología de la encina en España. *Bol. San. Veg. Plagas*, **13**: 203-212.
- MUÑOZ, C.; COBOS, P., 1989: Estudio de la micoflora del alcornoque (no publicado).
- RAGAZZI, A.; MESTURINO, L., 1987: *Diplodia mutila* in Italia: associata al «deperimento della quercia»? *L'Italia Forestale e Montana*, **4**: 264-274.
- ROLAND, G., 1945: Etude faite sur une trachéomycose du Chêne occasionnée par un *Diplodia*. *Parasitica*, **1**: 11-36.
- RUPÉREZ, A.; MUÑOZ, C., 1980: Grave enfermedad de las encinas. *Bol. Serv. Plagas e Insp. Fitop.*, **6**(1): 108.
- VAJNA, L., 1986: Branch canker and dieback of sessil oak (*Quercus petraea*) in Hungary caused by *Diplodia mutila*. *Eur. J. For. Path.*, **16**: 223-229.

(Aceptado para su publicación: 10 febrero 1992)