



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios  
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-458

---

---

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017  
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## Efectos del ataque combinado de *Curculio* spp. y *Phytophthora cinnamomi* en el desarrollo y supervivencia de plántulas de *Quercus ilex*

DÍAZ, A.<sup>1</sup>, SOLLA A.<sup>1,2</sup>, MARTÍN, M.A.<sup>1,2</sup> y BONAL, R.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Universidad de Extremadura, Av. Virgen del Puerto 2, 10600 - Plasencia, Cáceres, España (raulbonal@unex.es).

<sup>2</sup> Institute of Dehesa Research (INDEHESA), Universidad de Extremadura, España.

### Resumen

Se analizan las consecuencias de los daños causados por los perforadores de bellota *Curculio* spp. en la viabilidad de plántulas de encina y en su resistencia posterior a *Phytophthora cinnamomi*. Se plantearon las hipótesis (i) el estrés sufrido durante el desarrollo de la bellota por la larva de los coleópteros inducirá resistencia a infecciones posteriores por *P. cinnamomi* y (ii) bellotas atacadas por *Curculio* spp. generarán plantas más susceptibles al oomiceto debido a la pérdida de cotiledón. Mediante un experimento manipulativo en invernadero se observó que la infestación por *Curculio* spp. reducía las tasas de germinación y la probabilidad de emergencia de la parte aérea. Las bellotas infestadas germinaron antes probablemente por la perforación en la cubierta de la semilla. Debido a la pérdida de cotiledón, las bellotas infestadas dieron lugar a plántulas de menor biomasa total, que murieron antes por *P. cinnamomi* y en mayor proporción que las controles. La mayor vulnerabilidad al oomiceto podría deberse a la menor disponibilidad de reservas en los cotiledones para compensar la degeneración del sistema radicular provocada por *P. cinnamomi*. La plaga y patógeno estudiados tienen efectos negativos aditivos sobre la viabilidad de plántulas de encina.

### Palabras clave

Efectos maternos, gorgojo, regeneración, encina, dehesa

### 1. Introducción

A lo largo de su vida las plantas se enfrentan a plagas y patógenos que amenazan su supervivencia y/o reducen su potencial reproductor. Tradicionalmente, el estudio de los efectos negativos de plagas y patógenos sobre las plantas se solía plantear por separado, no teniéndose generalmente en cuenta las interacciones que podría haber entre ellos. Sin embargo, recientes revisiones sobre este tema han puesto de manifiesto la necesidad de tener una perspectiva más global y contemplar esas interacciones mediadas por la respuesta de la planta a los ataques de unos y otros (BIERE & BENNETT 2013). Existen complejas interacciones basadas en la capacidad de la planta de detectar y “responder” al ataque de plagas y patógenos. Las plantas son capaces de detectar a estos organismos y activar una serie de reacciones en cadena que, mediadas por complejos mecanismos hormonales, desencadenan la producción de metabolitos secundarios defensivos específicos (PIETERSE et al. 2012).

La infección por patógenos puede modificar características de la planta como la morfología, fisiología o la composición química de las hojas que van a afectar a la calidad de la misma como recurso alimenticio de los insectos. De hecho, algunos patógenos pueden inducir defensas en la planta contra insectos herbívoros (STOUT et al. 2006), y lo mismo puede ocurrir en el sentido contrario (ROSTÁS et al. 2003). El perjuicio final para la planta puede ser aditivo (si el efecto final es resultado de la suma del efecto que cada uno tendría por separado), sinérgico (si el efecto combinado es mayor que la suma) o antagónico (si es menor). Este último caso se daría cuando el ataque por un

agresor desencadena una respuesta en la planta que reduce los efectos negativos de otro agresor (BANSAL 2015). El resultado de la interacción entre plagas, patógenos y estresores abióticos, así como el perjuicio ocasionado a la planta, van a depender también del orden temporal en el que la planta se enfrenta a ellos.

Se ignoran las consecuencias del daño combinado de insectos perforadores de bellota y las infecciones de *Phytophthora cinnamomi* en la supervivencia de plántulas de *Quercus ilex* en las fases tempranas de su desarrollo. En *Quercus* sp., durante el primer año de vida (desde que está la semilla en el árbol hasta el establecimiento de la plántula) se produce la mayor mortalidad de plantas. En primer lugar, las bellotas de encina sufren en el árbol la depredación por insectos perforadores, principalmente larvas de coleópteros del género *Curculio* spp, conocidos comúnmente por el nombre de gorgojos de las bellotas.. Posteriormente, al caer al suelo pueden ser depredadas por grandes herbívoros o por roedores. Una vez emergidas, las plántulas deben superar la primera sequía estival, es aquí cuando tiene lugar la mayor mortalidad, especialmente si las plántulas se encuentran en lugares sin cubierta de matorral (PULIDO & DÍAZ 2005). A esta mortalidad natural por estrés hídrico se le suma el efecto negativo del patógeno *P. cinnamomi* (CORCOBADO et al. 2017), que actualmente se encuentra ampliamente distribuido en gran parte de los encinares del sureste peninsular (CORCOBADO et al. 2015). Este oomiceto se detectó por primera vez en 1991 en las dehesas y está provocando una mortalidad preocupante de encinas y alcornoques. Pudre las raicillas, anilla las raíces gruesas y puede matar árboles adultos, aunque la mortalidad es mucho mayor en plántulas al tener éstas un sistema radicular menos lignificado y desarrollado (REDONDO et al. 2015).

El ataque a bellotas por larvas de *Curculio* spp. es siempre previo al del patógeno y podría por tanto condicionar el efecto de este último o condicionar la supervivencia de la plántula ante las infecciones. Las hembras de estos coleópteros perforan las bellotas para introducir el oviscapto en el interior y hacer la puesta, normalmente un huevo por semilla (DESOUHANT et al. 2000; BONAL & MUÑOZ 2008). La larva se desarrolla dentro de una sola bellota y se alimenta de los cotiledones hasta que completa su crecimiento. La larva provoca la muerte de la bellota si durante su desarrollo depreda el embrión, situado en el ápice de la misma; si esto ocurre no habrá germinación. Sin embargo, esto no siempre es así, ya que la larva puede terminar su crecimiento sin llegar al ápice y, en ese caso, la bellota podrá germinar aunque la plántula dispondrá de menos reservas para su desarrollo al haber sido los cotiledones parcialmente consumidos (SORIA et al. 1996; BONAL et al. 2007). Las bellotas que sobreviviesen al ataque de *Curculio* spp. podrían aportar regeneración natural, si bien el haber sido parcialmente depredadas por *Curculio* spp. tal vez condicione la supervivencia de la planta. La depredación del cotiledón supone una pérdida de reservas que afecta la biomasa total de la plántula (SORIA et al. 1996; ROSTÁS et al. 2003; STOUT et al. 2006; BONAL et al. 2007), lo que podría alterar su capacidad de supervivencia ante sucesivos estreses. Por ejemplo, en plántulas de encina procedentes de bellotas sanas pero de diferente tamaño se ha observado que aquellas que tienen un sistema radicular menos desarrollado (menos biomasa) son más vulnerables a la desecación durante el verano (LLORET et al. 2004). La interacción entre plagas y patógenos en la supervivencia de las encinas durante su primer año de vida no se ha estudiado hasta ahora, y es relevante debido a la creciente incidencia del patógeno *P. cinnamomi* en las dehesas.

Se plantean las hipótesis (i) bellotas dañadas por *Curculio* spp. son más susceptibles a *P. cinnamomi* pues la pérdida de cotiledón implica menor vigor de las plántulas, y (ii) el daño mecánico generado por el insecto en la bellota condiciona la capacidad defensiva de la plántula induciendo resistencia a *P. cinnamomi*.

## 2. Objetivos

Se pretende: (1) cuantificar el efecto de la infestación por *Curculio* spp. en la germinación y emergencia de bellotas de encina; (2) estudiar las consecuencias de la infestación de las bellotas por *Curculio* spp. en términos de pérdida de biomasa, cambios en la arquitectura y susceptibilidad a *P.*

*cinnamomi* de las plántulas; (3) evaluar la influencia de la arquitectura de la plántula en la mortalidad final por *P. cinnamomi*.

### 3. Metodología

#### Material vegetal y diseño experimental

Las bellotas utilizadas se recogieron de 10 árboles de una misma población en un encinar del término municipal de Toledo (coordenadas 04° 01´ 33´´O y 39° 53´ 26´´N; altitud 557 m.s.n.m.). A finales de octubre de 2014 se recolectaron 805 bellotas, aproximadamente una mitad sanas y otras atacadas por *Curculio* spp., distinguibles al presentar un agujero de puesta característico (BONAL & MUÑOZ 2008). Las bellotas fueron desinfectadas con etanol al 50%, etiquetadas y puestas a germinar en bandejas entre arena y turba en condiciones de laboratorio 25°C (Figura 1a). Las bandejas se cubrieron con un film para mantener la humedad, y tras la emergencia de la radícula fueron pesadas individualmente y trasladadas al invernadero del Centro Universitario de Plasencia (40°02'06"N, 6°04'59"O; 374 m s.n.m.) a luz natural bajo una malla de sombreo del 50%.

Las plantas se dispusieron en un diseño aleatorio "Split-split", replicado en 7 bloques. El diseño experimental incluyó la inoculación (dos niveles: plantas inoculadas y plantas no inoculadas) como el factor principal, la presencia de daños por gorgojo en bellotas (dos niveles: presente y ausente) como el primer factor "Split" de división, y las 10 familias (brinzales medio hermanos de los 10 árboles madre) como el segundo factor de división. Cada bloque estuvo compuesto por dos bandejas de 40 alveolos. En cada bandeja se incluyeron 2 tipos de bellota x 10 árboles madre x 2 brinzales de cada familia = 40 brinzales. En total se plantaron 560 brinzales correspondientes a 7 bloques x 2 tratamientos de inoculación x 2 tipos de bellota x 10 árboles madre x 2 brinzales. Los brinzales dentro de cada una de las 14 bandejas utilizadas se dispusieron al azar. Plantas de 4 bandejas control se destruyeron en dos tandas, antes de la inoculación y al final del periodo vegetativo, para evaluar su morfología.

#### Inóculo e inoculación

El inóculo se preparó autoclavando dos veces frascos Erlenmeyer de 1 L que contenían 500 cm<sup>3</sup> de vermiculita, 40 cm<sup>3</sup> de avena y 350 mL de zumo de 8 vegetales (V8) diluido (200 mL de zumo y 3 g de CaCO<sub>3</sub> diluidos en un litro de agua), e introduciendo posteriormente en los frascos 4 fragmentos de 2x2 cm de una colonia de *P. cinnamomi* (UEX<sub>1</sub>) crecida en PDA (Jung et al. 1996). Los frascos se incubaron 5-6 semanas a 23°C hasta la total colonización del sustrato por el micelio del patógeno (Figura 1b). El 22 de abril de 2015 se inocularon las plantas introduciéndose 20 mL de inóculo en cada alveolo, lo que supuso una proporción de inóculo del 5% del sustrato (vol.). Un día antes de inocular el sustrato fue humedecido mediante riego abundante y, a los días de inocular, los alveolos se sumergieron en agua hasta un nivel de encharcamiento de 1-2 mm por encima del sustrato (48 h), todo ello para favorecer la adaptación y esporulación del patógeno. Los encharcamientos de 48 h se repitieron cada 4-5 semanas.

#### Toma de datos

El peso de las bellotas ( $W_{as}$ ) se estimó a partir de  $W_{ac} = (D_{ac} \cdot \pi \cdot L \cdot W) \cdot (1 - D_{ac} \cdot L/W)$ , fórmula desarrollada por BONAL et al. (2007) donde  $D_{ac}$  es la densidad de los tejidos de la bellota, y  $L$  y  $W$  son la longitud y la anchura máxima (mm), respectivamente. Se utilizó esta estimación a partir de las medidas lineales de la bellota porque el peso de la misma no pudo usarse directamente al depender de la cantidad de cotiledón consumido por las larvas en el caso de las bellotas atacadas por *Curculio* spp. Desde su colocación inicial en las bandejas del laboratorio a finales de octubre, las bellotas se revisaron a diario para registrar la fecha de germinación y el número de agujeros de salida de larvas. Las bellotas que germinaban se llevaban el mismo día a las bandejas de siembra donde se colocaban

en el alveolo correspondiente de acuerdo a la planta madre de la que procedían y a su categoría (atacadas por *Curculio* spp. o no).

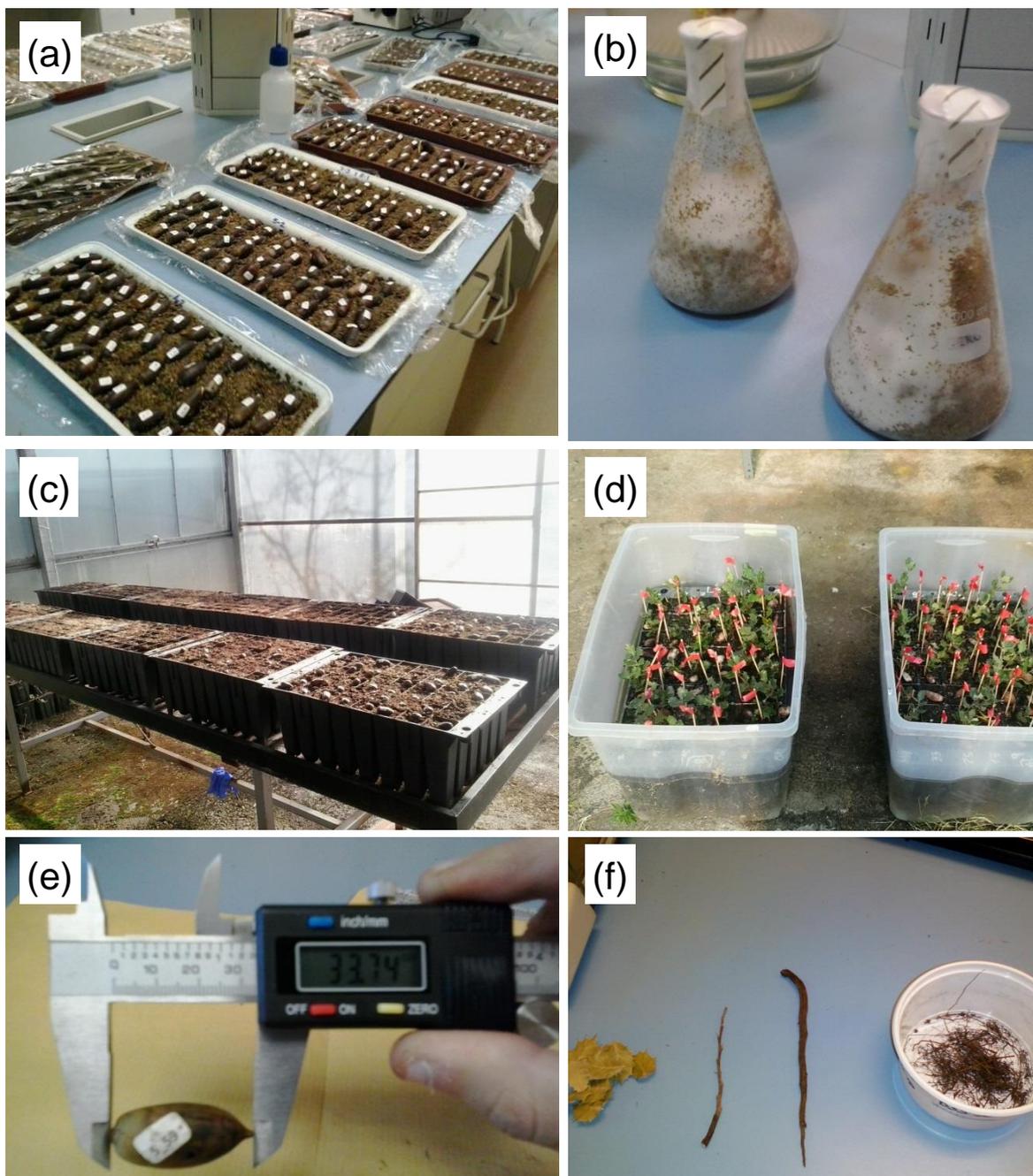


Figura 1. Bellotas en el laboratorio durante la germinación (a); matraces Erlenmeyer conteniendo el inóculo de *Phytophthora cinnamomi* (b); disposición de las bandejas en el invernadero (c); contenedores utilizados para encharcar periódicamente las bandejas (d); medición de la longitud de una bellota (e); y separación de tejidos secos de una plántula antes de pesar.

Tras la inoculación (22 de abril de 2015) se registró la mortalidad de las plantas cada miércoles, y se anotaron rebrotes hasta diciembre de 2015 (final del experimento). Justo antes de la inoculación se midió la altura de todas las plántulas (medida no destructiva) y se levantaron dos bandejas control en las que a todas las plantas se les midió además el peso del tallo y de la raíz gruesa, peso de la raíz fina y número, peso y superficie de las hojas mediante el programa Imagen J.

El objetivo fue conocer el efecto de la infestación por gorgojo en el desarrollo de la plántula antes de la inoculación del patógeno y extrapolarlo a las plántulas sometidas a la inoculación en las que estas medidas destructivas no podían tomarse a priori. Al final del experimento (diciembre de 2015) todas estas medidas se tomaron en todas las plantas que quedaban vivas, y también se levantaron dos bandejas de un segundo control, correspondiente a plántulas no inoculadas. El objetivo de este segundo control era poder comparar al final del experimento la mortalidad y el desarrollo de las plántulas atacadas por el patógeno (provenientes tanto de bellotas atacadas por gorgojo y sanas) con un control de plántulas no inoculadas.

#### Análisis de datos

Ante variables dependientes de tipo binomial (germina la bellota/no germina, emerge la plántula/no emerge, muere la planta/no muere) se utilizaron Modelos Lineales Generalizables (GLZ) mixtos mediante el paquete de R lme4. El árbol madre se consideró factor aleatorio. Ante variables dependientes continuas (peso de plántula, biomasa por superficie de hoja, etc.) se utilizaron Modelos Lineales Generales (ANCOVAS, ANOVAS multifactoriales) mixtos mediante el software Statistica v.10. La evolución de la mortalidad de los brinzales según el tipo de bellota se analizó mediante el procedimiento Survival Time Analysis, que modeliza la mortalidad y calcula probabilidades de supervivencia a partir del estadístico Kaplan-Meier. La significación de este análisis se obtuvo a través de un test no paramétrico (Gehan's).

#### 4. Resultados

La tasa de germinación fue significativamente mayor en las bellotas sanas que en las infestadas, 95% vs 66% respectivamente ( $Z=-2,9$ ;  $P=0,003$ ). La germinación se vio favorecida por un mayor tamaño de bellota ( $Z=0,07$ ;  $P<0,001$ ). Dado que la interacción *infestación*  $\times$  *peso de la bellota* no fue significativa en la germinación ( $Z=0,7$ ;  $P=0,460$ ), el efecto positivo del tamaño de la bellota se observó tanto en bellotas sanas como en bellotas infestadas. El número medio de días necesario para germinar desde la siembra fue significativamente mayor en las bellotas sanas, 23,1 vs. 20,5 días respectivamente ( $Z=7,1$ ;  $P<0,001$ ).

La mayoría de las bellotas presentaron un solo agujero de salida de larvas (Figura 2). El número de agujeros estuvo relacionado con la cantidad de larvas que hubo dentro y con la intensidad de la depredación. En una submuestra de 45 bellotas infestadas y diseccionadas tras haber salido las larvas, se observó que el número de agujeros estuvo correlacionado con el peso seco de los excrementos de las larvas en el interior (Spearman  $r=0,36$ ;  $P=0,014$ ). De acuerdo con esto, la tasa de germinación de las bellotas infestadas (una vez tenido en cuenta el efecto del tamaño de la bellota) fue menor cuanto mayor fue el número de agujeros de salida ( $Z=2,5$ ;  $P<0,001$ ) (Figura 2).

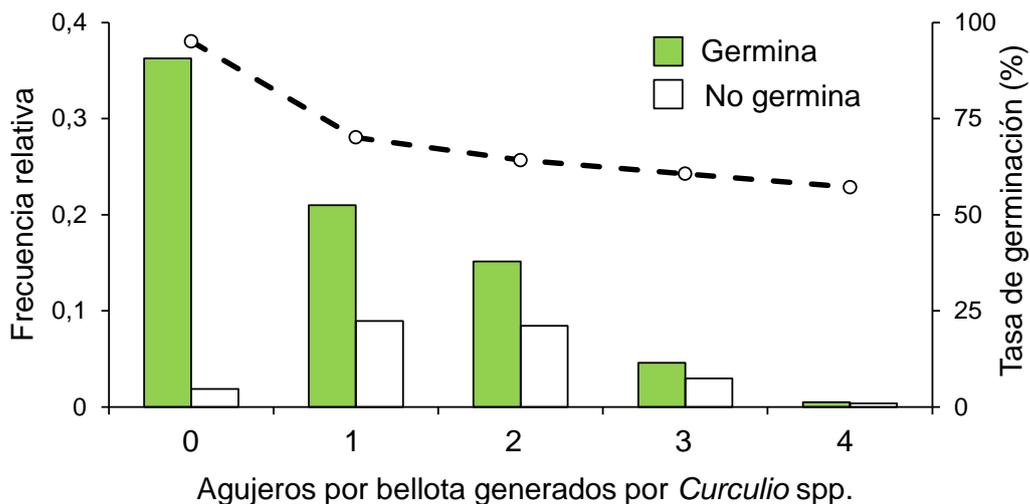


Figura 2. Frecuencias relativas de bellotas que germinaron (verde) y que no germinaron (blanco) según el número de agujeros de salida generados por *Curculio* spp. En el eje derecho se representa la tasa de germinación.

Una vez emitida la radícula, la falta de emergencia aérea fue más frecuente en bellotas infestadas por gorgojo que en sanas, 16% vs. 8% respectivamente ( $Z=-2,5$ ;  $P=0,011$ ). El peso de la bellota no tuvo influencia en la emergencia aérea ( $P=0,907$ ).

A los 5 meses de desarrollo, la biomasa total (parte aérea + raíz) de las plantas provenientes de bellotas infestadas por gorgojo fue casi la mitad que la biomasa de las plantas que provenían de bellotas sanas ( $1,17\pm 0,08$  vs.  $2,14\pm 0,11$  g). Las bellotas de mayor tamaño dieron lugar a plántulas con mayor biomasa total (raíz + parte aérea) ( $F_{1, 59}=19,82$ ;  $P<0,001$ ) y para un mismo tamaño de bellota, las plántulas germinadas a partir de bellota con gorgojo tuvieron menor peso que las plántulas germinadas a partir de bellota sana ( $F_{1, 59}=38,05$ ;  $P<0,001$ ) (Figura 3a). La interacción *infestación*  $\times$  *peso de bellota* no fue significativa en la biomasa de las plantas.

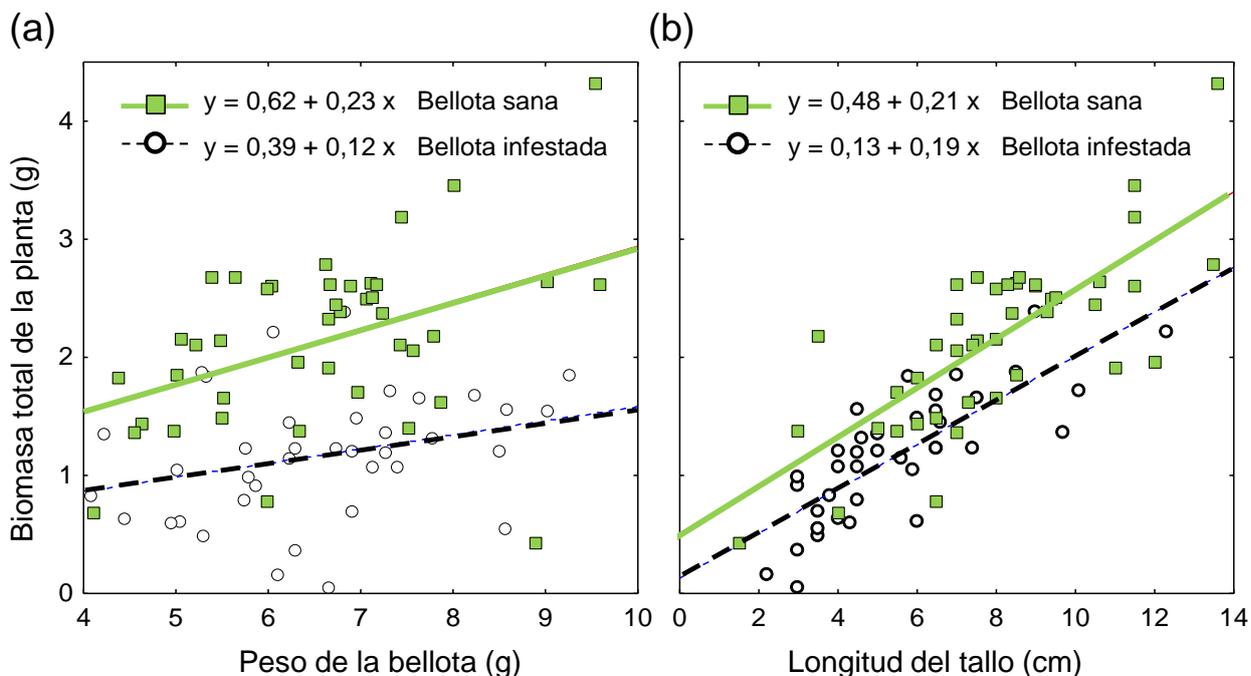


Figura 3. Relación entre el peso de plántulas de *Quercus ilex* y el de su bellota (a), y entre el peso de las plántulas y su altura (b) a partir de bellotas sanas o infestadas por *Curculio* spp.

La infestación por gorgojo produjo cambios en la arquitectura de las plántulas: menor peso y mayor inversión de biomasa en la parte aérea con respecto a la raíz en comparación a las plántulas provenientes de bellotas sanas (ratios parte aérea: parte radicular (g:g) de  $0,67 \pm 0,04$  vs  $0,57 \pm 0,02$ , respectivamente,  $F_{1, 59} = 5,76$ ;  $P = 0,025$ ). A consecuencia de la mayor inversión en parte aérea, la altura de plántulas resultantes de bellotas con gorgojo fue mayor de lo que cabría esperar por su biomasa total; el test GLM mostró que la biomasa total de las plántulas estuvo relacionada positivamente con la altura de la parte aérea ( $F_{1, 59} = 62,17$ ;  $P < 0,001$ ), pero además el factor infestación resultó significativo ( $F_{1, 59} = 51,37$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 3b).

Por otro lado, las plántulas de bellotas infestadas presentaron una menor inversión por unidad de hoja (menor biomasa por superficie foliar) que las plántulas a partir de bellotas sanas ( $0,031 \pm 0,001$  vs.  $0,046 \pm 0,001$  g/cm<sup>2</sup>, respectivamente). No obstante, estas diferencias se atribuyen al menor peso de las plántulas procedentes de bellotas infestadas, pues en el modelo (GLM) considerando conjuntamente el efecto *infestación* (variable independiente) y el *peso de la plántula* (covariable), se obtuvo falta de significación en la *infestación* ( $F_{1, 56} = 0,08$ ;  $P < 0,72$ ) mientras que la covariable fue altamente significativa ( $F_{1, 56} = 57,13$ ;  $P < 0,001$ ). En otras palabras, las plantas a partir de bellotas infestadas tuvieron las hojas menos engrosadas por ser más pequeñas.

Tanto el ataque por *Curculio* spp. como la infección por *P. cinnamomi* tuvieron un efecto negativo sobre el desarrollo de las plántulas aunque por diferentes motivos. *Curculio* spp. generó pérdida de cotiledón y *P. cinnamomi* pudrición elevada del sistema radicular (Figura 4). Respecto a las plántulas procedentes de bellotas no infestadas y no inoculadas, se observaron reducciones del 41%, 46% y 58% del peso de las raíces por la presencia del patógeno, *Curculio* spp. y *Curculio* spp. + patógeno, respectivamente. Las diferencias en el peso de las raicillas entre estas cuatro clases de plántulas fueron significativas ( $F_{1, 275} = 14,21$ ,  $P < 0,001$ ). El análisis a posteriori (test LSD) confirmó que el ataque por *Curculio* spp. y la infestación por el patógeno tuvieron efectos negativos aditivos significativos (Figura 4).

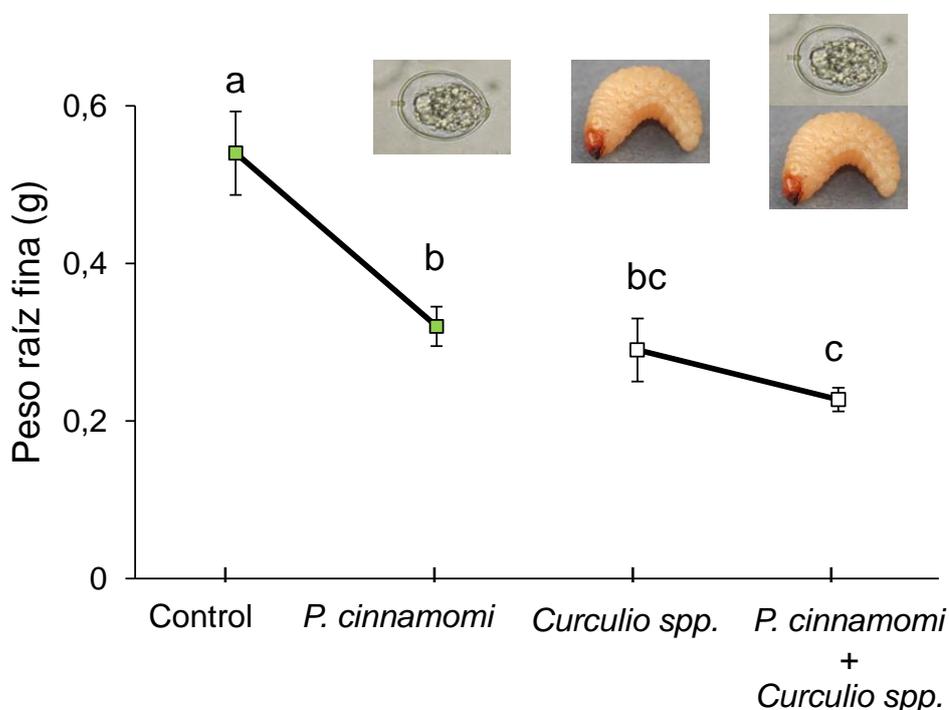


Figura 4. Biomasa total de las raíces finas en plantas no inoculadas (control), inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*, procedentes de bellotas con *Curculio* spp. y procedentes de bellotas con *Curculio* spp. y además inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95%.

Las tasas de mortalidad de las plantas no inoculadas e inoculadas con *P. cinnamomi* fueron 0,0% y 45,4%, respectivamente. El ataque por *Curculio* spp. acentuó los efectos negativos de la inoculación por *Phytophthora* en la supervivencia de las plántulas (49,5% vs. 41,4%). Un modelo GLZ conjunto considerando la supervivencia de las plántulas inoculadas como variable dependiente (variable binomial sobrevive/muere) y el factor ataque por *Curculio* spp. y la covariable altura de la plántula previa a la inoculación del patógeno como independientes, mostró que la probabilidad de sobrevivir fue menor en las plántulas que provenían de bellotas atacadas por el insecto ( $Z=3,06$ ;  $P<0,001$ ) que en las plántulas que provenían de bellotas sanas. Este efecto negativo fue independiente del tamaño de la plántula, que tuvo por su parte un efecto positivo en la probabilidad de supervivencia al patógeno ( $Z=-2,85$ ;  $P=0,020$ ). Las tasas de mortalidad de las plantas inoculadas fue similar según las bellotas tuvieran 1, 2 y 3 de agujeros (53,4%, 45,9% y 47,8%, respectivamente;  $P=0,388$ ). La supervivencia a la inoculación del patógeno no sólo fue menor en las plántulas procedentes de bellotas atacadas por *Curculio* spp., sino que la mortalidad fue además más temprana que en plantas inoculadas de bellota sana (17,6 vs. 19,3 semanas, respectivamente), si bien las diferencias entre las curvas de supervivencia de ambos grupos de plantas fueron marginalmente significativas (Figura 5;  $P=0,093$ ).

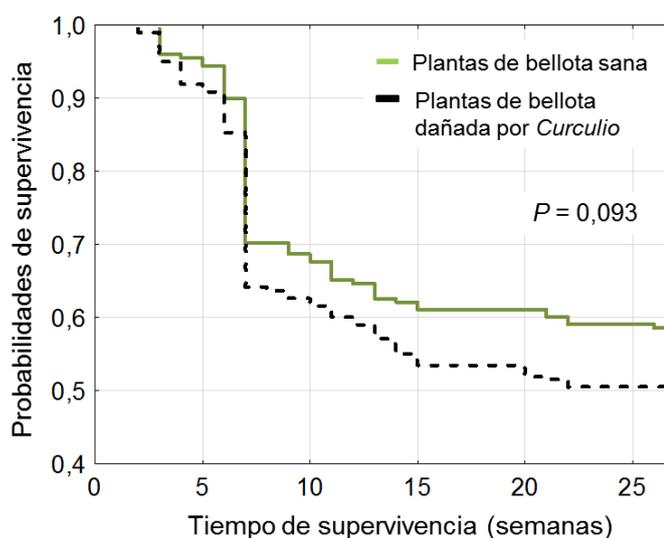


Figura 5. Representación de probabilidades de supervivencia de brinzales de *Quercus ilex* inoculados con *Phytophthora cinnamomi* y germinados a partir de bellotas sanas o infestadas por *Curculio* spp. La inoculación se realizó en la semana 0.

## 5. Discusión

Los daños por *Curculio* spp. y por *P. cinnamomi* tuvieron consecuencias negativas para la supervivencia temprana de las plántulas de encina. El daño por gorgojo no desencadenó en las plantas ningún mecanismo que pudiera hacerlas más resistentes al patógeno; por el contrario, la susceptibilidad a *P. cinnamomi* fue máxima en las plántulas que procedían de bellotas infestadas por larvas de *Curculio* spp..

La infestación favoreció el adelanto de la germinación, que fue significativamente más tardía en las bellotas sanas. La bellota está cubierta por un pericarpio leñoso que la protege de la

deshidratación y necesita, por tanto, un ambiente húmedo para que el interior de la semilla se hidrate y se desencadene la germinación. Los agujeros de salida de las larvas son lo suficientemente grandes como para que el agua entre por ellos y acelere todo el proceso. Sin embargo, a pesar de este adelanto, la tasa de germinación fue significativamente menor en las bellotas infestadas. El motivo es que en una bellota con gorgojo siempre existe el riesgo de que el embrión sea depredado por las larvas de *Curculio* spp. mientras se alimentan dentro de la bellota. Este riesgo es menor cuanto más grande es la bellota y mayor cuanto mayor es el número de larvas que se desarrollan juntas (BONAL et al. 2007). Los datos muestran que lo más frecuente es que hubiese una larva por bellota, al igual que en otros estudios (DESOUHANT et al. 2000; BONAL & MUÑOZ 2008) y confirman el efecto negativo del número de larvas por bellota en la probabilidad de germinación. Otra razón por la que la tasa de germinación puede ser menor es por la pérdida de cotiledón en las bellotas con gorgojo, ya que disponer de más reservas aumenta las probabilidades de éxito. Esto ocurre también en las bellotas sanas, en las que el tamaño de la bellota está positivamente relacionado con la probabilidad de germinación (GÓMEZ 2004).

Una vez emitida la radícula, los efectos negativos del daño continuaron, pues en las bellotas atacadas por gorgojo la probabilidad de que la parte aérea de la plántula no llegase a emerger fue el doble que en las bellotas sanas. Este efecto se ha documentado en pocas ocasiones (BONAL et al. 2007) y podría deberse, una vez más, a la falta de recursos en las bellotas infestadas para lograr completar su desarrollo. El efecto negativo de la infestación por gorgojo también se tradujo en una menor biomasa total de las plántulas. Las bellotas más grandes producen plántulas con más biomasa pero, tal como se ha visto en otros estudios (BONAL et al. 2007), las dañadas producen plántulas más pequeñas de lo que cabría esperarse de acuerdo al volumen de la bellota. La relación lineal del tamaño de la bellota y el tamaño de la plántula hacen pensar que todo el cotiledón es usado para formar plántula. Esto contrasta con las semillas de algunas plantas tropicales, en las que la relación entre tamaño de la semilla y de la plántula es exponencial negativa, con lo que parte del cotiledón tiene como función ser una reserva para “tolerar” la depredación llegado el caso (SOUSA et al. 2003).

Las plántulas procedentes de bellotas infestadas por *Curculio* spp. también tuvieron una arquitectura diferente a las plántulas de bellotas no infestadas. En relación al reparto de biomasa, destaca la mayor inversión en la parte aérea respecto a la raíz de las plantas de bellotas infestadas. Por otro lado, las plántulas procedentes de bellotas atacadas por gorgojo tuvieron una menor biomasa por unidad de superficie de hoja, aunque esto fue un subproducto de su menor tamaño. De hecho, el análisis demostró que la biomasa por unidad de superficie foliar estuvo positivamente relacionada con el peso total (raíz+parte aérea) de la plántula, y que al incluir esta variable las características de la bellota de procedencia (infestada o no) no tuvo ningún efecto significativo. Estos resultados apuntan a que las plántulas pequeñas, originadas a partir de menos recursos, invierten estos recursos en formar tejido fotosintético para recuperarse a costa de disminuir el grosor de la hoja. La razón de esta estrategia podría estar basada en la limitación que para una planta puede suponer el no disponer de suficiente superficie foliar con la que fijar carbono durante los primeros estadios. Esta estrategia no está exenta de riesgos, sobre todo en un clima Mediterráneo. Un menor engrosamiento foliar facilita la evapotranspiración y por tanto también aumenta el riesgo de morir por desecación; por otro lado, el menor desarrollo proporcional de la raíz en las plántulas procedentes de bellotas atacadas por gorgojo puede amenazar la supervivencia de la plántula a la sequía estival (CUBERA et al. 2012).

Las encinas interrumpieron su crecimiento en altura al ser inoculadas con *P. cinnamomi*. Este resultado es similar a las observaciones de LUQUE et al. (1999) en plántulas de *Q. suber* inoculadas con este mismo patógeno. Se confirma el efecto del patógeno como causante de podredumbre radicular. La inoculación de *P. cinnamomi* en plántulas de seis meses puede generar hasta pérdidas de biomasa radicular del 85,6% y 94,5% para *Q. suber* y *Q. ilex*, respectivamente (ROBIN et al. 2006). Las tasas de mortalidad observadas están en el rango de las observadas en plántulas de encina de igual edad (35-70% según CORCOBADO et al. 2017).

Las plántulas más pequeñas presentaron una mayor tasa de mortalidad a consecuencia del patógeno. La razón podría ser el menor desarrollo, lignificación y suberización del sistema radicular, que las haría más vulnerables al ataque del oomiceto. Esto justificaría por qué las plántulas de bellotas infestadas, de menor tamaño, fueron más susceptibles a *P. cinnamomi*; sin embargo, la infestación por gorgojo tuvo un efecto negativo adicional, ya que la mortalidad por *P. cinnamomi* de plántulas de bellotas infestadas fue mayor que en las sanas independientemente del tamaño de la plántula. El motivo de la mayor mortalidad podría ser, una vez más, la falta de recursos disponibles en las plantas de bellotas dañadas, por ejemplo carbohidratos. Esta hipótesis está por confirmar.

La interacción entre la plaga y el patógeno estudiados tiene consecuencias negativas para la supervivencia de la encina durante su primer año de vida. A diferencia de otro estudio (BIERE & BENNETT 2013), la infestación por las larvas de gorgojo no desencadena ningún mecanismo que disminuya el efecto negativo del patógeno. Es más, los cambios que se producen en la anatomía de la planta (menor desarrollo del sistema radicular) la harían más vulnerable a *P. cinnamomi*. Aparte, la perforación del pericarpio, que facilita la entrada de microorganismos patógenos al endospermo, podría generar pudrición y ser un factor de riesgo adicional que aumentara la mortalidad si la bellota fuera infectada al caer al suelo.

## 6. Conclusiones

Se constata un efecto aditivo, no sinérgico, de *Curculio* spp. y *P. cinnamomi* de cara a disminuir el potencial de regeneración de *Q. ilex*. Desde el punto de vista práctico, se concluye que (i) en suelos infestados por *P. cinnamomi* resulta todavía más necesario controlar la calidad de la bellota que se utiliza en las siembras, que no debería estar afectada por perforadores, (ii) para incentivar la regeneración natural es necesario un control integrado, enfocado no sólo a *P. cinnamomi* sino a *Curculio* spp.

## 7. Agradecimientos

A Julián Mora por la ayuda prestada en algunas mediciones. R. Bonal y M.A. Martín han sido contratados con financiación de la Secretaría General de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura. Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad en el marco de los proyectos AGL2014-54739-R y AGL2014-53822-C2-1-R.

## 8. Bibliografía

BANSAL, S. 2015. The Interactive Effects of Drought and Herbivory on Ecophysiology of Trees. Combined stresses in plants. Mahalingam, Ramamurthy. Ed Springer. Germany.

BIERE, A.; BENNETT, A.E. 2013. Three-way interactions between plants, microbes and insects. *Funct Ecol* 27, 567-573.

BONAL, R.; MUÑOZ, A.; DÍAZ, M. 2007. Satiation of predispersal seed predators: the importance of considering both plant and seed levels. *Evol Ecol* 21, 367-380.

BONAL, R.; MUÑOZ, A. 2008. Seed growth suppression constrains the growth of seed parasites: premature acorn abscission reduces *Curculio elephas* larval size. *Ecol Entomol* 33, 31-36.

CORCOBADO, T.; MORENO, G.; AZUL, A.M.; SOLLA, A. 2015. Seasonal variations of ectomycorrhizal communities in declining *Quercus ilex* forests: interactions with topography, tree health status and *Phytophthora cinnamomi* infections. *Forestry* 88, 257-266.

- CORCOBADO, T.; MIRANDA-TORRES, J. J.; MARTÍN-GARCÍA, J.; JUNG, T.; SOLLA, A. 2017. Early survival of *Quercus ilex* subspecies from different populations after infections and co-infections by multiple *Phytophthora* species. *Plant Pathol* DOI: 10.1111/ppa.12627.
- CUBERA, E.; MORENO, G.; SOLLA, A.; MADEIRA, M. 2012. Root system of *Quercus suber* L. seedlings in response to herbaceous competition and different watering and fertilisation regimes. *Agroforest syst* 85, 205-214.
- DESOUHANT, E.; DEBOUZIE, D.; PLOYE, H.; MENU, F. 2000. Clutch size manipulations in the chesnut weevil, *Curculio elephas*: fitness of oviposition strategies. *Oecologia*, 122, 493-499.
- GÓMEZ, J.M. 2004. Bigger is not always better: conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. *Evolution* 58, 71-80.
- LLORET, F.; PEÑUELAS, J.; ESTIARTE, M. 2004. Experimental evidence of reduced diversity of seedlings due to climate modification in a Mediterranean type community. *Global Change Biol* 10, 248-258.
- LUQUE, J.; COHEN, M.; SAVÉ, R.; BIEL, C.; ÁLVAREZ, I.F. 1999. Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L. *Ann Forest Sci* 56, 19-26.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S.C.M. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Bi* 28, 489-521.
- PULIDO, F.; DÍAZ, M. 2005. Regeneration of a Mediterranean oak: A whole-cycle approach. pp. 92-102. Madrid.
- REDONDO, M.A.; PÉREZ-SIERRA, A.; ABAD-CAMPOS, P.; TORRES, L.; SOLLA, A.; REIG-ARMIÑANA, J.; GARCÍA-BREIJO, F. 2015. Histology of *Quercus ilex* roots during infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Trees* 29, 1943-1957.
- ROBIN, C.; MOREL, O.; VETTRAINO, A.M.; PRELERON, C.; DIAMANDIS, S.; VANNINI, A. 2006. Genetic variation in susceptibility to *Phytophthora cambivora* in European chesnut (*Castanea sativa* L.). *For Ecol Manag* 226, 199-207.
- ROSTÁS, M.; SIMON, M.; HILKER, M. 2003 Ecological cross-effects of induced plant responses towards herbivores and phytopathogenic fungi. *Basic Appl Ecol* 4, 43-62.
- SORIA, F.J.; CANO, E.; OCETE, M.E. 1996. Efectos del ataque de fitófagos perforadores en el fruto de la encina (*Quercus rotundifolia* Lam.). *Bol San Veg Plagas* 22, 427-432.
- SOUSA W.P.; KENNEDY P.G.; MITCHELL B.J. 2003. Propagule size and predispersal damage by insects affect establishment and early growth of mangrove seedlings. *Oecologia* 135,567-575.
- STOUT, M.J.; THALER, J.S.; THOMMA, B.P.H.J. 2006. Plant-mediated inter-actions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthro- pods. *Ann Rev Entomol* 51, 663-689.