



2022  
Lleida

27 · 1  
junio · juny  
juliol · juliol

Cataluña  
Catalunya

## 8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales



Organiza

## Detección e identificación de organismos relacionados con el decaimiento del roble en Galicia

RIAL MARTÍNEZ, C., PINTOS VARELA, C., REDONDO FRENANDEZ, V., AGUÍN CASAL, O., PÉREZ OTERO, R., ABELLEIRA ARGIBAY, A., FERREIROA MARTINEZ, V., SALINERO CORRAL, C. y MANSILLA VAZQUEZ, J.P.

Estación Fitopatológica Areeiro – Deputación de Pontevedra.

### Resumen

Desde la primavera de 2019 se observan, con mayor o menor incidencia según los años, decaimientos en distintas formaciones de *Quercus robur* en Galicia. Los síntomas que presentan los árboles en estas zonas son bastante inespecíficos: clorosis, defoliación, puntiseado, exudados en tronco y galerías de insectos. En algunos casos también se encuentran ejemplares muertos.

Por este motivo se recogieron muestras de suelo, raíz, ramas y corteza de árboles sintomáticos que fueron procesadas en laboratorio por distintas metodologías. Posteriormente los organismos detectados se identificaron por técnicas morfológicas y/o moleculares, dependiendo del caso.

Los resultados indican la presencia de 23 especies fúngicas, 2 oomicetos, dos bacterias y algunos coleópteros perforadores, además de cinípidos gallícolas, aunque éstos no causan daños en general, y una especie de isóptero. En general, los organismos detectados con mayor frecuencia fueron *Phytophthora cinnamomi*, *Armillaria mellea*, *Gibbsiella quercinecans* y los artrópodos *Lucanus cervus*, *Cerambyx cerdo* y *Reticulitermes lucifugus*, con porcentajes de incidencia superiores al 11% dependiendo de la zona de detección o aislamiento.

### Palabras clave

Debilitamiento, diagnóstico, patógenos, plagas, *Quercus*.

### 1. Introducción

El género *Quercus* domina gran parte de los bosques de la zona templada del hemisferio norte, y supone la vegetación clímax en el noroeste de la península ibérica (DÍAZ-MAROTO y VILA-LAMEIRO, 2007). Concretamente, *Quercus robur* es la especie arbórea dominante de los bosques nativos en las zonas de Galicia (noroeste de España) de clima oceánico húmedo (BARRIO ANTA y DIÉGUEZ-ARANDA, 2005). En la región presentan una amplia gama de edades y calidades como resultado de los diferentes usos y estados de conservación pues muchos de los bosques de robles han sido explotados intensamente y en muchos casos se han aplicado tratamientos silvícolas inadecuados (DÍAZ-MAROTO y VILA-LAMEIRO, 2008). Además de en masas naturales, diferentes especies de *Quercus*, y sobre todo *Q. robur*, constituyen desde antiguo la masa arbolada de las plazas y los parques forestales urbanos y semiurbanos de numerosos municipios gallegos, donde se celebran diferentes eventos de elevada concurrencia de la población. Tanto es así, que son abundantes las formaciones arboladas y los pies individuales de carballo que se encuentran protegidos mediante el Decreto 67/2007, de 22 de marzo, por el que se regula el “Catálogo Galego de Árbores Senlleiras”, donde se incluyen aquellos ejemplares concretos o rodales de árboles que por sus características extraordinarias o destacables (tamaño, edad, significación histórica o cultural, rareza, belleza, etc.) son consideradas reliquias botánicas objeto de respeto vecinal y con valor científico, cultural, didáctico, paisajístico u ornamental.

Al igual que ha sucedido con otras especies forestales, en Galicia en los últimos años se han venido observando diferentes síntomas, bastante inespecíficos, pero que implican decaimiento en los robles.

## 2. Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue conocer los agentes patógenos y las plagas implicados en el decaimiento del roble en Galicia.

## 3. Metodología

Durante los años 2019-2021 se inspeccionaron 8 carballeiras de *Quercus robur* que presentaban decaimiento. En cada uno de los sitios, se realizó un reconocimiento visual de los árboles para detectar aquellos con síntomas, como clorosis, defoliación, ramas puntisecas, grietas o exudados en la corteza (Figura 1). En cada formación se recogieron muestras sintomáticas de 5 árboles. El tipo de muestra fue variable, en función de los síntomas observados.



Figura 1. Diferentes síntomas observados en ejemplares de *Quercus robur* en Galicia.

Se incluyeron también en este estudio muestras de 15 árboles de *Q. robur* recibidas en el servicio de diagnóstico de la Estación Fitopatológica Areeiro durante ese mismo período. Una de estas muestras se corresponde con un árbol incluido en el Catálogo Galego de Árbores Senlleiras: el carballo de Santa Margarita.

### *Análisis de hongos y oomicetos*

Las muestras sintomáticas se procesaron siguiendo diferentes metodologías en función del tipo de material vegetal: carpóforos, cortezas, exudados, hojas, madera, raíces, ramas, ramillos y suelo.

Las muestras de madera, corteza y raíz se sembraron en medios de cultivo generales y selectivos (AMs, K, PDA, SNA y V8 agar). Para ello, el material vegetal fue previamente desinfectado en una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 5 minutos y posteriormente aclarado con dos lavados sucesivos en agua destilada durante 10 minutos. Una vez lavadas las muestras se dejaron secar y se sembraron en los diferentes medios de cultivo en condiciones estériles. Las placas se incubaron a 22°C en oscuridad. Transcurrido un periodo de 24-48 h de incubación se observaron bajo microscopio óptico, se repicaron a nuevos medios de cultivo y se obtuvieron cultivos puros para su posterior análisis morfológico y /o molecular.

En caso de observarse exudados en la corteza, se sembraron directamente, sin desinfección previa siguiendo la metodología anterior.

Cuando el micelio se correspondía con hongos de la familia *Botryosphaeriaceae*, que no fructifican directamente en medio de cultivo, para forzar su esporulación se repicó a agar agua con acículas de pino estériles (CROUS et al. 2006). Las placas se incubaron bajo ciclos alternantes de 12h luz+ultravioleta cercano y 12h de oscuridad para estimular la formación de picnidios. Las características de los cultivos y de los conidios fueron determinantes para clasificar estos hongos a nivel de género, si bien, para llegar a especie o para su confirmación fue necesario el uso de técnicas moleculares.

Las muestras de hojas, ramas y ramillos se dispusieron en cámara húmeda. Para ello, la muestra vegetal se introdujo en un recipiente cerrado de vidrio o plástico sobre papel de filtro humedecido y se incubó a 25 °C con el objetivo de forzar la esporulación de los hongos y para su posterior estudio bajo lupa y microscopio.

La identificación molecular de los carpóforos, del micelio que estaba presente en las muestras y de los aislados obtenidos, tanto de hongos como de oomicetos, se realizó mediante amplificación, secuenciación y filogenia. El ADN genómico en todos los casos se extrajo a partir directamente de la seta, del micelio o de colonias puras de siete días de crecimiento usando el kit comercial E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Biot-tek) siguiendo el protocolo corto. Para los hongos se amplificaron diversas regiones ITS con los iniciadores ITS1F/ITS4 y ITS1f/its4B y en los oomicetos se amplificaron las regiones ITS (DC6/ITS4/ITS6) y la del factor de elongación (Elong-F/Elong-R). Los productos de PCR se secuenciaron en un analizador genético ABI PRISM 3500 y las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en diferentes bases de datos (ncbi.nlm.nih.gov, Fusarium-ID and Phytphthoradb.org).

En las muestras de suelo se estudió la presencia de especies de *Armillaria* y *Phytophthora*. Para el análisis del género *Armillaria* se realizó una nested-PCR-RFLP. Para ello se extrajo el ADN genómico fúngico de cada muestra de suelo utilizando el kit UltraClean Soil® DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Inc.). Se amplificaron regiones ITS del ADN molde mediante nested-PCR. En la primera PCR se utilizaron los primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) y en la segunda, se amplificó una región delimitada por los primers AR1 y AR2, específicos para el género *Armillaria* (LOCHMAN et al., 2004). El producto de PCR de la segunda amplificación se digirió con las enzimas de restricción *MboI* y *HinfI*, según el método descrito por LOCHMAN et al. (2004). Los resultados de la digestión se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. Se obtuvieron así patrones que se compararon con los establecidos para cada una de las especies del género *Armillaria*. En el caso del análisis del suelo para el aislamiento de oomicetos del género *Phytophthora* se prepararon trampas vegetales con hojas de aguacate y pétalos de clavel (MANSILLA et al. 1993). Las placas se incubaron en condiciones de laboratorio durante 7 días y se observaron a partir del tercer día al microscopio para la determinación de la presencia o ausencia de esporangios de *Phytophthora*. Los trozos de hojas que capturaron esporangios se sembraron posteriormente en medio V8- agar y se incubaron en estufa a 23°C para su posterior análisis morfológico y molecular.

#### *Análisis de bacterias*

Para realizar el aislamiento de las bacterias implicadas en el diagnóstico de posibles enfermedades bacterianas, se seleccionaron partes del tronco con presencia de síntomas asociados. Estos generalmente eran exudados negruzcos en la corteza, que correspondían con zonas necrosadas en la zona cambial.

En las muestras, con la sintomatología anteriormente señalada, se retiraba la corteza y se apreciaba una necrosis vascular de tonalidad oscura. De la zona de avance tomamos varios trozos que son los que se utilizan para el aislamiento bacteriano. Se procedía de la siguiente manera: cada trozo seleccionado se pasó por tres lavados sucesivos en agua estéril. A continuación, se dilaceró en

agua estéril y se dejaron macerar durante unos minutos. Finalmente se sembraron en los medios de cultivo generales de bacterias (NA, KB, LPGA, SNA y TSBA). Las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron en oscuridad a 24 - 28 °C durante varios días (48 -72 h).

Una vez observado el crecimiento uniforme de colonias, generalmente circulares, blanquecinas y de borde redondeado, se seleccionaron y purificaron en TSBA para su identificación por técnicas moleculares. El análisis molecular de las colonias obtenidas consistió en la extracción del ADN bacteriano, amplificación, secuenciación y posterior filogenia de la región ARNrribosomal del 16S. El ADN extraído se amplificó con los iniciadores 13B-91E (MIGNARD y FLANDROIS, 2007).

#### *Análisis de artrópodos*

La extracción de insectos de las muestras recibidas en laboratorio se realizó de forma directa cuando se trataba de insectos foliares, y diseccionando las muestras de los órganos vegetales, generalmente leñosos, con signos de su presencia en el caso de insectos ocultos. Además, algunas muestras se colocaron en aparatos de extracción de Berlesse-Tullgren para la posible detección de pequeños microartrópodos.

## 4. Resultados y Discusión

A partir de las diferentes muestras de *Quercus robur* analizadas se han identificado una amplia diversidad de organismos. En la tabla 1 se muestra una relación de las especies y su incidencia.

#### *Hongos y Oomicetos*

Se identificaron un total de 23 especies fúngicas y 2 oomicetos. En las muestras de corteza *A. mellea* y *P. cinnamomi* fueron los patógenos detectados con un mayor porcentaje, con un 28 y 22% respectivamente.

En muestras de madera, principalmente de ramas y ramillos, *D. quercina* fue el patógeno aislado con mayor frecuencia, seguido de *D. seriata* y *S. hirsutum*. *D. quercina* es el agente causal de la antracnosis del roble. El hongo, además de colonizar hojas y yemas, infecta la corteza y el xilema, y con frecuencia causa pérdidas en ramillos que conducen a la muerte regresiva de los brotes. En Italia y otros países mediterráneos, *D. quercina* junto con *Biscogniauxia mediterranea*, *Botryosphaeria corticola* y *Pleurophoma cava*, se consideran algunos de los patógenos más importantes que causan el decaimiento del roble (HANIFEH et al., 2019).

En hojas fue común la presencia de oidio (*Erysiphe alphitoides*), abolladuras causadas por *Taphrina caerulescens*, y en un único ejemplar se aisló el hongo *Colletotrichum fioriniae*. En ramas y tronco se identificaron carpóforos de *Fistulina hepatica*, *Meripilus giganteus*, *Phlebia acerina*, *Rutstroemia firma* y *Tremella fuscisuccinea*.

En raíz se identificó *Armillaria gallica*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Ilyonectria cyclaminicola*, *I. pseudodestructans* y *P. cinnamomi*. En suelo se detectó presencia de *A. mellea* en un 21% de las muestras, *P. cinnamomi* en un 43% y *Pythium* sp. en el 5%.

Tabla 1. Relación de organismos detectados y porcentaje de incidencia\*

Zona de aislamiento/ detección	Nº muestras analizadas	Organismos detectados/ Incidencia*	
		Hongos, oomicetos y bacterias	Artrópodos
Raíz	25	<i>Armillaria gallica</i> (12%) <i>Fusarium oxysporum</i> (12%) <i>Fusarium solani</i> (12%) <i>Ilyonectria cyclaminicola</i> (8%) <i>Ilyonectria pseudodestructans</i> (8%) <i>Phytophthora cinnamomi</i> (12%)	
Corteza, exudados	45	<i>Armillaria mellea</i> (28%) <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Neofusicoccum parvum</i> <i>Phytophthora cinnamomi</i> (22%) <i>Stereum hirsutum</i> <i>Brenneria goodwinii</i> <i>Gibbsiella quercinecans</i> (13%)	
Ramas y ramillos	14	<i>Diplodia sapinea</i> <i>Diplodia seriata</i> <i>Discula quercina</i> <i>Peniophora quercina</i> <i>Phaeoacremonium fraxinopennsylvanicum</i> <i>Phaeoacremonium viticola</i> <i>Stereum hirsutum</i> <i>Tubakia dryina</i>	<i>Lucanus cervus</i> (28%) <i>Cerambyx cerdo</i> (14%) <i>Coraebus florentinus</i> (10%) <i>Zeuzera pyrina</i> <i>Reticulitermes lucifugus</i> (14%) <i>Andricus quercustozae</i> <i>Biorhiza pallida</i>
Hojas	14	<i>Colletotrichum fioriniae</i> <i>Erysiphe alphitoides</i> <i>Taphrina caerulescens</i>	<i>Andricus curvator</i> <i>Neuroterus numismalis</i>
Carpóforos	14	<i>Fistulina hepatica</i> <i>Meripilus giganteus</i> <i>Phlebia acerina</i> <i>Rutstroemia firma</i> <i>Tremella fuscosuccinea</i>	
Suelo	37	<i>Armillaria mellea</i> (25%) <i>Phytophthora cinnamomi</i> (43%) <i>Pythium sp.</i> (12%)	

\*Solo se indica la incidencia cuando es mayor de 5%



## Bacterias

Las bacterias *Gibbsiella quercinecans* Brandy et al. y *Brenneria goodwinii* Denman et al. han sido aisladas en 8 muestras, lo que representa una incidencia del 13% y el 4% respectivamente en el conjunto de las muestras de corteza analizadas. Estas bacterias junto al buprestido *Agrilus biguttatus* están implicadas en el síndrome conocido como Acute Oak Decline (AOD) (DENMAN et al., 2014) que puede causar la muerte relativamente rápida de diferentes especies de *Quercus*.

Este síndrome se caracteriza principalmente por los exudados negruzcos que aparecen en el tronco, de los árboles afectados, y que se corresponden con lesiones necróticas en la zona cambial de las que se aíslan, con más regularidad, entre otras las bacterias *G. quercinecans*, *Brenneria goodwinii* y *Rahnella victoriana*. Próximas a estas lesiones, de forma frecuente, también se encuentran galerías de *A. biguttatus* (DENMAN et al, 2018). Sin embargo, en este estudio no se ha detectado la presencia de este insecto en ninguna de las muestras analizadas.

El complejo AOD afecta principalmente a árboles adultos de *Q. robur* y *Q. petraea* y ha sido citada en diferentes países europeos principalmente en Reino Unido (DENMAN & WEBBER, 2009). En España *G. quercinecans*, *Brenneria goodwinii* han sido aisladas de *Q. robur* (GONZALEZ Y CIORDIA 2019) y *G. quercinecans* además de *Q. ilex* y *Q. pirenaica* (BRANDY et al 2010). Existen diferentes hipótesis sobre el papel o implicación de estas bacterias en el AOD ya que intervienen diferentes organismos cuya etología no está definida. DOONAN et al. (2019) sugieren que *B. goodwinii* es el agente principal causante de la necrosis dentro de AOD, mientras que *G. quercinecans* y otros miembros del patobioma podrían tener un papel secundario en el desarrollo de la enfermedad.

## Artrópodos

En cuanto artrópodos, en las muestras analizadas no se ha detectado la presencia de ninguna especie nueva para la entomofauna de Galicia. Al margen de diferentes especies de cinípidos formadores de agallas (principalmente *Andricus curvator*, *Andricus quercustoxae*, *Biorhiza pallida* y *Neuroterus numismalis*) y de algún exuvio de Cicadellidae, el resto de insectos detectado ha correspondido a especies de perforadores de madera, cuya presencia ha estado directamente relacionada con la edad de los pies muestreados. En este sentido, las especies más abundantes han sido *Lucanus cervus* y *Cerambyx cerdo*, que se han encontrado en la práctica totalidad de carballeiras urbanas y en el árbol singular (“senlleiro”) muestreado, debido a que se trata de pies maduros de cerca de cien años o más. La actividad perforadora de sus larvas provoca importantes daños fisiológicos y mecánicos, con las subsecuentes consecuencias negativas sobre la vitalidad y la estabilidad de los pies afectados.

También dentro del orden Coleoptera se ha detectado en varios casos, y especialmente en la primavera de 2019, larvas del buprestido *Coraebus florentinus*, que provoca la muerte de ramas en arbolado adulto, lo que da lugar a un decaimiento progresivo y pérdida de vigor (JURC et al., 2009). Igualmente, la única muestra en que hemos encontrado al Lepidoptera Cossidae *Zeuzera pyrina* correspondía a una rama viva, mientras que termitas de la especie *Reticulitermes lucifugus* han aparecido en buena parte del arbolado maduro que se encontraba en peor estado.

Cualquiera de estas especies puede desempeñar un papel destacado en el decaimiento del roble, ya que impiden que los árboles debilitados se recuperen y que el ecosistema supere el umbral de reversibilidad (SALLÉ et al., 2014).

## 5. Conclusiones

En este estudio se han identificado un amplio número de organismos (hongos, oomicetos, bacterias e insectos) que están afectando al estado sanitario de los robles en Galicia. Muchos de estos agentes no son patógenos o plagas primarios capaces de atacar tejidos sanos; la mayoría son oportunistas que colonizan los tejidos cuando han sido previamente debilitados por factores bióticos o abióticos (LUQUE et al., 2000). La detección de *Phytophthora cinnamomi* corrobora una vez más que este patógeno tiene un papel destacado en el decaimiento y mortalidad de *Quercus* spp. (PÉREZ-SIERRA et al., 2013). Sin embargo, son necesarios más estudios (muestreos, pruebas de patogenicidad) para poder establecer el papel que juegan los diferentes organismos identificados en el decaimiento de *Quercus robur* en Galicia.

## 6. Agradecimientos

Los autores agradecen a Ana García Servia, Raquel Romero Salgueiro, Susana Canosa Rodríguez, Paula Moital Pérez, Ana Belén Castro García y Carmela Menduiña Santomé, técnicas de laboratorio de la Estación Fitopatológica Areeiro, su labor en el procesamiento de las muestras.

## 7. Bibliografía

- BARRIO ANTA, M.; DIÉGUEZ-ARANDA, U. 2005. Site quality of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) stands in Galicia (northwest Spain). *European Journal of Forest Research*, 124: 19–28.
- BRADY, C.; DENMAN, S.; KIRK S.; VENTER S., RODRÍGUEZ-PALENZUELA P.; COUTINHO T. 2010. Description of *Gibbsiella quercinecans* gen. nov., sp. nov., associated with Acute Oak Decline. *Syst Appl Microbiol.* 33(8): 444-50.
- DOONAN, J.; Denman, S.; Pachebat, J. A.; McDonald, J. E. 2019. Genomic analysis of bacteria in the acute oak decline pathobiome. *Microbial Genomics* 1-14
- CROUS, P.W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W.F.O. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*. 55: 235-253
- DENMAN, S., & WEBBER, J. 2009. Oak declines: new definitions and new episodes in Britain. *Quarterly Journal of Forestry*, 103(4), 285-290.
- DENMAN, S.; BROWN, N.; KIRK, S.; JEGER, M.; WEBBER, J. 2014. A description of the symptoms of Acute Oak Decline in Britain and a comparative review on causes of similar disorders on oak in Europe, *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 87, 4, 535–551,
- DENMAN, S., DOONAN, J.M., RANSOM-JONES, E., BROBERG, M., SARAH, PLUMMER, SUSAN, KIRK, KELLY, SCARLETT, ANDREW, R., GRIFFITHS, KACZMAREK, FORSTER, J., PEACE, A., GOLYSHIN, P.N., HASSARD, F., BROWN, N., KENNY, J.G., & MCDONALD, J.E. 2018. Microbiome and infectivity studies reveal complex polyspecies tree disease in Acute Oak Decline. *ISME Journal*, Volume 12. 386-399



DÍAZ-MAROTO, I. J.; VILA-LAMEIRO, P. 2007. Deciduous and semi-deciduous oak forests (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pyrenaica*) floristic composition in the Northwest Iberian Peninsula. *Biología*, vol. 62, no 2, 163-172.

DÍAZ-MAROTO, I. J.; VILA-LAMEIRO, P. 2008. Pedunculate oak (*Quercus robur* L.) silviculture in natural stands of NW Spain: Environmental conditioners. *Forest Ecology and Management*, vol. 256, no 4, 702-711.

GALICIA. Decreto 67/2007, do 22 de marzo, polo que se regula o Catálogo Galego de Árbores Senlleiras. Diario Oficial de Galicia de 22 de marzo de 2007, núm. 74.

GONZÁLEZ, A. J.; CIORDIA, M. 2019. *Brenneria goodwinii* and *Gibbsiella quercinecans* isolated from weeping cankers on *Quercus robur* L. in Spain. *Eur J. of Plant Pathol.* 56: 965 - 969.

HANIFEH, S.; ZAFARI, D.; SOLEIMANI, MJ.; RAVANLOU, A. 2019. *Discula quercina* as a possible causal agent of dieback on oak trees in Iran. *Forest Pathology* 49 (1), e12468.

JURC, M.; BOJOVIĆ, S.; KOMJANC, B.; KRČ, J. 2009: Xylophagous entomofauna in branches of oaks (*Quercus* spp.) and its significance for oak health in the Karst region of Slovenia. — *Biologia* 64/1: 130–138.

LOCHMAN, J.; SERY, O.; MIKES, V.; 2004. The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 105-110.

LUQUE, J.; PARLADÉ, J.; PERA, J. 2000. Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology* 30:247-263.

MANSILLA, J.P.; PINTOS, C.; SALINERO, C, 1993. Aislamiento y detección en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands. como patógeno de viña. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 19: 541-549.

MIGNARD S.; FLANDROIS, J.P.; 2007. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods* 67:574-81.

PÉREZ- SIERRA, A.; LÓPEZ-GARCÍA, C.; LEÓN, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P.; JUNG, T. 2013. Previously unrecorded low-temperature *Phytophthora* species associated with *Quercus* decline in a Mediterranean forest in eastern Spain. *Forest Pathology* 43 (4): 331-339.

SALLÉ, A.; NAGELEISEN, L.M.; LIEUTIER, F. 2014. Bark and wood boring insects involved in oak declines in Europe: current knowledge and future prospects in a context of climate change. *Forest Ecology and Management*, vol. 328, 79-93.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.; 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. En: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKI, J.J.; WHITE, T.J. (eds.): *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. pp. 315-322. Academic Press, San Diego, USA.