

Diplodia pinea (Desm.) Kickx y *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, principales hongos de chancro de las masas forestales de *Pinus radiata* D. Don del País Vasco.

Tesis Doctoral

Ignacio García Serna

Año 2011





Diplodia pinea (Desm.) Kickx y *Fusarium circinatum*
Nirenberg & O'Donnell, principales hongos de chancro de
las masas forestales de *Pinus radiata* D. Don en el País
Vasco

Tesis Doctoral
Ignacio García Serna
2011



Diplodia pinea (Desm.) Kickx y *Fusarium circinatum*
Nirenberg & O'Donnell, principales hongos de chancro de
las masas forestales de *Pinus radiata* D. Don en el País
Vasco

Codirectora: Dra. Dña. Eugenia Iturritxa Vélez del Burgo



Codirector: Dr. D. Gustavo Renobales Scheifler



AGRADECIMIENTOS

Ante todo y sobre todo, para Eugenia. El verbo agradecer se queda corto cuando tengo que expresar todo lo que te debo por haber podido entregar esta tesis. Toda tu ayuda e insistencia para que la pudiera llevar a cabo no se puede medir. Por eso mi más profundo y sincero agradecimiento.

Gustavo, corrector implacable y animador entusiasta, al que debo muchísimo por haberse implicado tanto para que esta tesis pudiera llegar a su final con bien. Muchísimas gracias por todo.

A toda mi familia con mi Madre (con mayúsculas) a la cabeza, que siempre han preguntado: “¿cómo va la tesis?” Gracias por todo vuestro ánimo.

También a la familia de Eugenia, que me han visto fines de semana con el ordenador en las reuniones familiares y siempre me han animado a terminar.

Jon y Sergio han respetado siempre mi decisión de centrarme en la tesis este último año y les he robado fines de semana de montaña que espero recuperar a partir de ahora. Muchas gracias por vuestra amistad.

A mis amigos de la “Funda”, Maider, Amador, Javi, Joseba, Jon (de nuevo) y también a Aitor. Muchas gracias por vuestro interés y por dejarme trabajar en tan magnífica “empresa”.

Y finalmente, un recuerdo muy entrañable a mi Padre que no pudo ver terminada esta tesis. Cada vez que paso por Urkiola me acuerdo mucho de ti. Esta tesis está dedicada a tu memoria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Pino radiata (<i>Pinus radiata</i> D. Don)	3
1.1.1 Características	4
1.1.2 Área de distribución	5
1.1.3 Distribución en cultivo	5
1.1.4 El pino radiata en el País Vasco	7
1.1.4.1 Orígenes e historia	7
1.1.4.2 Crecimiento y cultivo en el País Vasco	7
1.1.4.3 Importancia económica	8
1.1.4.4 Propiedades de la madera	9
1.2 Problemas sanitarios	9
1.2.1 Situación sanitaria actual	9
1.2.2 Gestión de <i>Diplodia pinea</i> y <i>Fusarium circinatum</i>	12
1.3 Justificación y objetivos	13
2. MARCHITEZ DE LOS BROTES: <i>Diplodia pinea</i>	15
2.1 Taxonomía	17
2.1.1 Nomenclatura	18
2.2 Morfología	19
2.2.1 Picnidios	19
2.2.2 Conidios	20
2.3 Variabilidad y morfotipos	21
2.3.1 <i>Diplodia scrobiculata</i>	22
2.4 Nombre común	22
2.5 Síntomas	22
2.5.1 Marchitez de los brotes	23
2.5.2 Chancros	24
2.5.3 Azulamiento de la madera	25
2.6. Daños	26
2.6.1 Daños en plantaciones	26
2.6.2 Pérdida del valor de la madera	26
2.6.3 Daños en vivero	27
2.6.4 Daños en semillas de pino	27
2.7 Hospedadores	27
2.8 Distribución	29
2.9 Infección	30
2.9.1 Fuentes de inóculo	30
2.9.2 Vías de dispersión	31
2.9.3 Vías de entrada en la planta y colonización de los tejidos	32
2.9.4 Ciclo de la enfermedad	32

3. CHANCRO RESINOSO: <i>Fusarium circinatum</i>	35
3.1 Taxonomía	37
3.1.1 Nomenclatura	38
3.1.2 Tipos de apareamiento	38
3.2 Morfología	39
3.2.1 Peritecio	39
3.2.2 Características en cultivo	40
3.2.3 Macroconidios	42
3.2.4 Microconidios	42
3.2.5 Clamidosporas	43
3.3 Nombre común	43
3.4 Síntomas	44
3.4.1. Marchitamiento y decoloración de acículas	45
3.4.2. Desección de las guías	45
3.4.3. Formación de chancros y exudados de resina	45
3.4.4. Piñas y semillas	46
3.4.5 Raíz	46
3.5 Diferencias entre síntomas generados por <i>Diplodia pinea</i> y <i>Fusarium circinatum</i>	47
3.6 Daños	47
3.6.1 Daños en plantaciones y poblaciones nativas	47
3.6.2 Daños en semillas de pino y vivero	48
3.7 Hospedadores	49
3.8 Distribución	51
3.8.1 Historia de la detección del chancro resinoso	52
3.8.2 Chancro resinoso en España	53
3.9 Infección	53
3.9.1 Vías de dispersión	54
3.9.1.1 Viento	54
3.9.1.2 Insectos	54
3.9.1.3 Factores humanos	56
3.9.2 Ciclo de la enfermedad	56
4. CARACTERIZACIÓN DE <i>Diplodia pinea</i> EN EL PAÍS VASCO	59
4.1 Introducción	61
4.1.1 Objetivos	62
4.2 Material y métodos	63
4.2.1 Muestreo	63
4.2.2 Aislamiento de cepas	66
4.2.3 Identificación molecular	66
4.2.4 Grupos de compatibilidad vegetativa (VCG). Líneas clonales	67
4.2.5 Morfología	68
4.2.5.1 Tamaño y forma de los conidios	68
4.2.5.2. Morfología y coloración del micelio	69
4.2.6 Velocidad de crecimiento de los micelios en cultivo agarizado	70
4.2.7 Patogenicidad de las cepas	71

4.3 Resultados	71
4.3.1 Muestreo y aislamiento de cepas	71
4.3.2 Caracterización molecular	74
4.3.3 Grupos de compatibilidad vegetativa (VCG). Líneas clonales	75
4.3.4 Morfología	77
4.3.4.1 Tamaño y forma de los conidios	77
4.3.4.2 Morfología y coloración del micelio	79
4.3.5 Desarrollo micelial. Velocidad de crecimiento	80
4.3.6 Patogenicidad de las cepas	82
4.4 Discusión	83
4.4.1 Identidad taxonómica y caracterización morfológica	83
4.4.2 Grupos de compatibilidad vegetativa y diversidad genotípica	85
4.4.3 Datos comparativos de <i>Fusarium circinatum</i>	88
4.5 Conclusiones	88
5. NIVELES DE RESISTENCIA EN CONÍFERAS UTILIZADAS EN PLANTACIONES ESPAÑOLAS FRENTE A LOS PATÓGENOS <i>Fusarium circinatum</i> y <i>Diplodia pinea</i>	91
5.1 Introducción	93
5.1.1 Mecanismos de resistencia a patógenos	93
5.1.1.1 Resistencia inducida	94
5.1.2. Factores que afectan a la relación hospedador-patógeno	96
5.1.2.1 Factores genéticos del hospedador	96
5.1.2.2 Estado fisiológico (influencia de la edad, situaciones de estrés, etc.)	97
5.1.2.3 Factores genéticos del organismo patógeno	97
5.1.2.4 Factores climáticos	98
5.1.3 Mecanismos de control	98
5.1.3.1 Selección de taxones menos susceptibles para sustituir a los actuales	98
5.1.3.2 Selección clonal de árboles resistentes	98
5.1.3.3 Resistencias inducidas	99
5.1.4 Objetivos	99
5.2 Material y métodos	100
5.2.1 Preparación del inóculo y métodos de inoculación	100
5.2.2 Material inoculado	104
5.3 Resultados	107
5.3.1 Resultados de los diferentes sets de inoculación	107
5.3.2 Resultados de las diferentes especies según los últimos cinco sets	119
5.3.3 Porcentaje de resistencia individual	121
5.4 Discusión	122
5.4.1 Variabilidad en función del origen y la edad de la planta	122
5.4.2 Variabilidad interespecífica	124
5.4.3 Variabilidad intraespecífica	127
5.5 Conclusiones	129

6. DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE PREDISPOSICIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE CHANCRO EN EL PAÍS VASCO	131
6.1 Introducción	133
6.1.1 Condiciones geográficas del País Vasco	135
6.1.2 Bioclimatología del País Vasco	137
6.1.2.1 Precipitaciones	139
6.1.2.2 Temperaturas	140
6.1.3 Pisos bioclimáticos	141
6.1.4 Objetivos	144
6.2 Material y métodos	144
6.2.1 Distribución	144
6.2.2 Definición de zonas de riesgo. Modelización	149
6.2.2.1 Variable dependiente	151
6.2.2.2 Variables independientes	151
6.3 Resultados	155
6.3.1 Muestreo	155
6.3.2 Distribución de <i>Diplodia pinea</i>	157
6.3.3 Distribución de <i>Fusarium circinatum</i>	158
6.3.4 Definición de zonas de riesgo. Modelización	159
6.3.4.1 Multicolinealidad	159
6.3.4.2 <i>Diplodia pinea</i>	159
6.3.4.3 <i>Fusarium circinatum</i>	162
6.4 Discusión	166
6.5 Conclusiones	172
7. RECOMENDACIONES DE GESTIÓN	173
7.1 Introducción	175
7.2 Propuestas de actuación: <i>Fusarium circinatum</i>	175
7.3 Propuestas de actuación: <i>Diplodia pinea</i>	178
7.4 Mejora genética	179
8. CONCLUSIONES	181
9. BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXOS	213
ANEXO 1	215
ANEXO 2	218
ANEXO 3	220
ANEXO 4	222
ANEXO 5	224
ANEXO 6	228

1. INTRODUCCIÓN



Plantaciones de pino radiata en el Parque Natural de Urkiola

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Pino radiata (*Pinus radiata* D. Don)

El pino radiata o pino de Monterrey (*Pinus radiata* D. Don) es originario de la costa Pacífica de Norteamérica (fig. 1.1). Es uno de los pinos con un área natural más reducida, limitándose actualmente a unas 4.000 ha en las proximidades de la Bahía de San Francisco (California) (Aizpuru et al. 1996). Taxonómicamente se encuadra dentro del subgénero *Pinus*, sección *Trifolius* subsección *Australes* (Farjon 2010). Las poblaciones naturales de esta especie se diferencian en 2 variedades con 5 orígenes: var. *radiata*, que engloba los 3 orígenes continentales (Año Nuevo, Monterrey y Cambria); y var. *binata* (Engelm.) Lemmon [incl. var. *cedrosensis* (J.T. Howell) Silba], en las islas de Guadalupe y Cedros, en Baja California (Brown 1998, Farjon 2010).

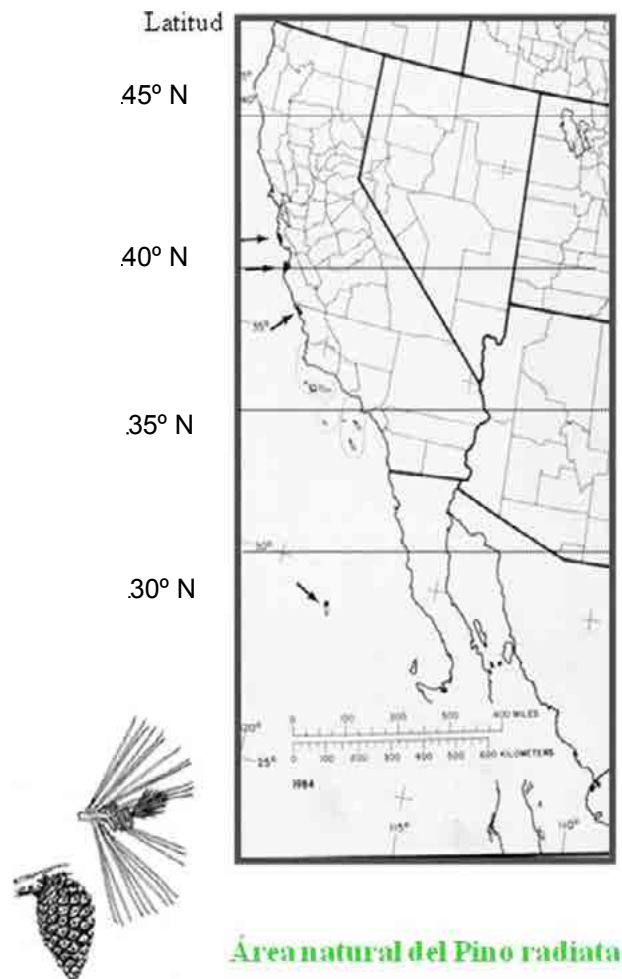


Fig. 1.1. Distribución de *Pinus radiata* en su zona original de California (EEUU) y las islas de Guadalupe y Cedros (México).

Fuente: McDonald & Laacke 1995

1.1.1 Características

Esta especie puede alcanzar los 30-40 m de altura, con la corteza de color marrón rojizo o marrón oscuro, poco gruesa y algo agrietada. Se reconoce por sus acículas agrupadas de tres en tres, de 7 a 15 cm de largo, aunque algunas se pueden encontrar en grupos de 2 (las acículas en parejas caracterizan a la variedad). El crecimiento es estrictamente monopólico, con un eje principal ortótropo y ramificaciones secundarias regularmente espaciadas en falsos verticilos. Si muere accidentalmente la guía principal, una o más ramificaciones pueden asumir su función, pero esto implica siempre una pérdida de la calidad por deformación del fuste. Sus piñas son ovoideas, cortamente pedunculadas y muy asimétricas, de 7 a 15 cm de largo, con apófisis de las escamas externas muy prominentes y que permanecen largo tiempo cerradas en el árbol (López 2001, López & Sánchez de Lorenzo 2004; figs. 1.2-1.4). El carácter serótino de las piñas constituye una adaptación al fuego, pues se abren rápidamente tras los incendios (Farjon 2010).



Fig. 1.2. a) Árbol joven; b) estróbilos masculinos; c) estróbilos femeninos de pino radiata.



Fig. 1.3. a) Acículas; b) repoblación forestal de pino radiata.



Fig. 1.4. Piña de pino radiata.

1.1.2 Área de distribución

Las poblaciones silvestres se encuentran en la actualidad en un proceso de declive, debido principalmente a la urbanización de buena parte de su área original y a la falta de incendios que estimulen la regeneración de aquellas poblaciones. A ello se ha venido a sumar, como se comenta en el capítulo 3º, la reciente entrada de *Fusarium circinatum* (Brown 1999a y 1999b, Farjon 2010).

1.1.3 Distribución en cultivo

Fuera de su región de origen, es una especie muy cultivada debido a su utilización en repoblaciones forestales. La mayor extensión actualmente se encuentra en el hemisferio sur, siendo en Australia y Nueva Zelanda la principal conífera productora de madera. En Nueva Zelanda ocupa 1.250.000 ha, en Chile 1.400.000 ha, en Australia 750.000 ha y en Sudáfrica 300.000 ha (Nowak 1993, Eldridge 1997, Libby 1997, Lavery & Mead 1998).

En el hemisferio norte, se cultiva a pequeña escala en Italia y, en cerca de 290.000 ha, en España. La mayor parte de la superficie está repartida por el País Vasco, Cataluña, Galicia, Asturias, Cantabria, Navarra y norte de las provincias de Burgos y León, habiéndose constituido por ello en un elemento del paisaje del norte de la Península Ibérica. También se encuentra en algunas repoblaciones forestales en Canarias. Cubre el 2,1% de la superficie forestal española. Aproximadamente el 50% de la superficie total está en la Comunidad Autónoma del País Vasco, donde supone el 42% de su superficie arbolada (Garayo 1991, Michel 2004; fig. 1.5). Existen diferencias en la superficie ocupada por *Pinus radiata* en el País Vasco según diferentes autores. Los datos más recientes del último inventario forestal realizado en el País Vasco (IKT 2005) indican una superficie de 137.466 ha de masas monoespecíficas. Aunque esta superficie aumentaría hasta las 145.000-150.000 ha si sumamos la ocupación de esta especie en masas forestales mixtas (Michel 2004).

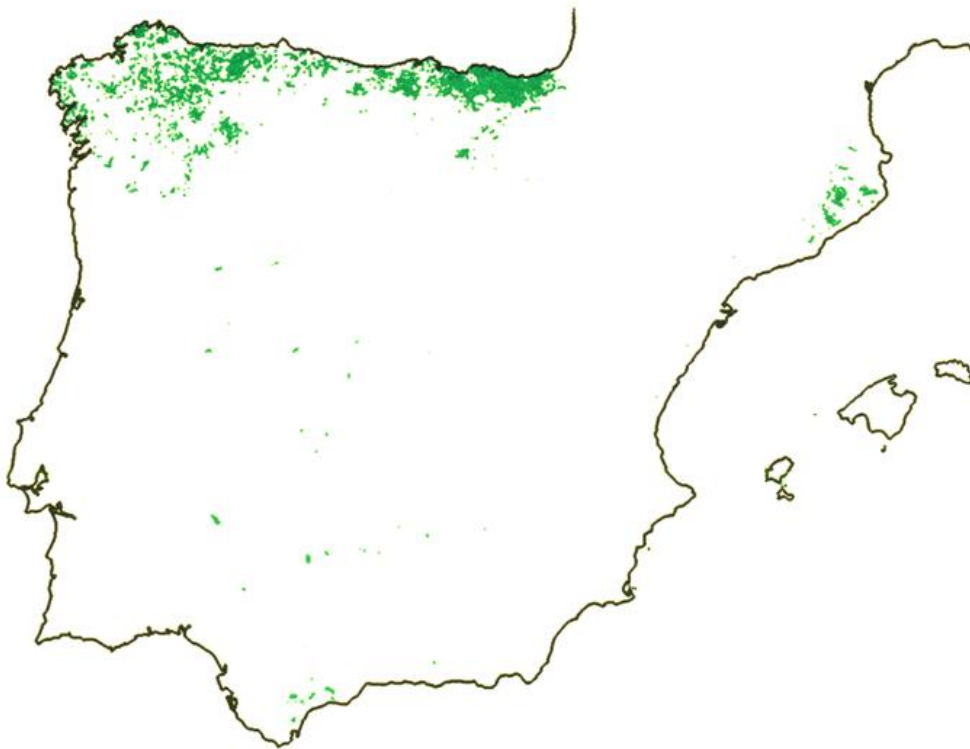


Fig. 1.5. Distribución de pino radiata en España.

Fuente: Ruiz de la Torre 2006

1.1.4 El pino radiata en el País Vasco

1.1.4.1 Orígenes e historia

El pino radiata fue introducido en un jardín de Lekeitio (Bizkaia) a mediados del siglo XIX (Cavanilles 1858). Este es el primer dato conocido sobre la presencia de la especie en España. Secall (1896) la propuso como apropiada para la silvicultura en España basándose en estudios previos de aclimatación. En el País Vasco las primeras repoblaciones se realizaron a finales del siglo XIX. En estas primeras experiencias se constituían masas forestales mixtas, formadas por mezclas de *Pinus radiata*, *P. pinaster* y *Cupressus macrocarpa*. La superficie aumentó lentamente hasta mediados de siglo XX como consecuencia de una política de repoblación forestal de los montes públicos emprendida por las diputaciones vascas. A partir de aquí disparó su crecimiento, llegando a superar las 160.000 ha. en la década de los setenta. Entonces se estabiliza, con algún ligero descenso, en torno a las 140.000-150.000 ha hasta la actualidad (Garayo 1991, Michel 2004, IKT 2005; fig. 1.6).



Fig. 1.6. Evolución de la superficie de pino radiata en el País Vasco.

Fuente: Michel 2004

1.1.4.2 Crecimiento y cultivo en el País Vasco

El pino radiata es una especie termófila y exigente en humedad ambiental. Es sensible al frío, sobre todo a las heladas tardías. En su zona de origen natural recibe escasas precipitaciones y tiene un crecimiento escaso. Pero cuando se repuebla en climas húmedos su crecimiento es muy rápido, con un turno de corta final de 30 a 35 años. No tolera suelos compactos ni mal drenados y los que favorecen su crecimiento son los silíceo-arcillosos profundos. Es una especie de media luz en etapas iniciales de su crecimiento, no soportando la sombra en etapas adultas. En el País Vasco el crecimiento medio anual es aproximadamente de 12 m³/ha, aunque en algunos casos puede alcanzar los 15 m³/ha/año (Garayo 1991, Montoya & Mesón 2004).

Debido a estos requerimientos su utilización en repoblaciones forestales se ha generalizado en la baja montaña de la vertiente cantábrica del País Vasco. Esta zona comprende la mayor parte de Bizkaia y Gipuzkoa más una zona del norte alavés (valles atlánticos, Garayo 1991). En Bizkaia se distribuye por toda la provincia con una extensión aproximada de 75.000 ha, en Gipuzkoa con una extensión de 50.000 ha, mientras que en Araba las masas de pino radiata se localizan principalmente en el norte y ocupan una superficie de 15.000 ha (IKT 2005; fig. 1.7).

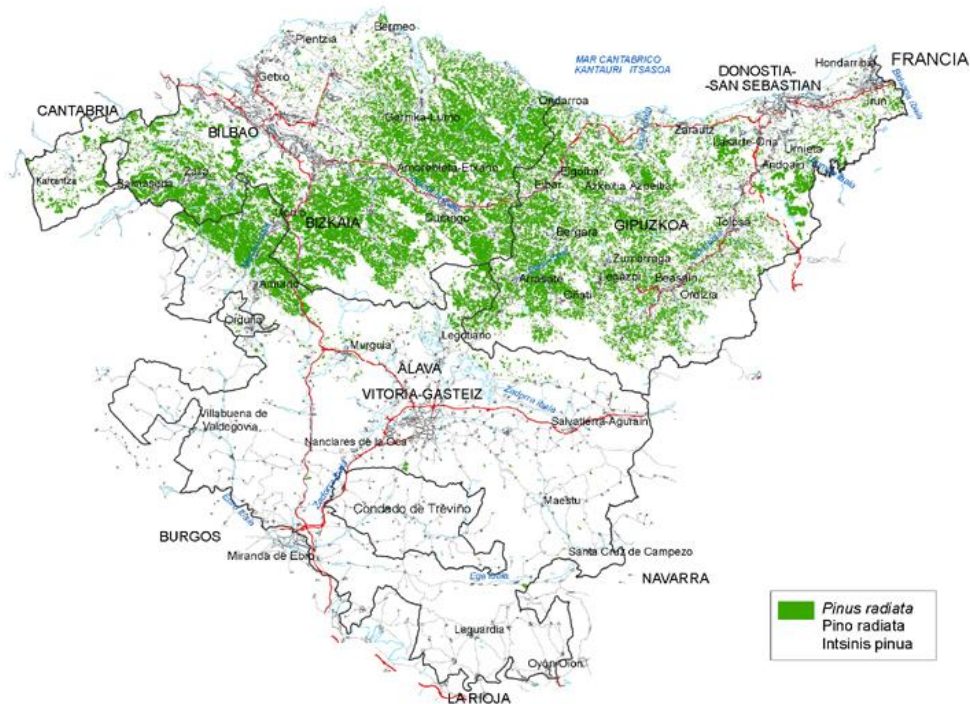


Fig. 1.7. Distribución de pino radiata en el País Vasco.
Fuente: IKT 2005

1.1.4.3 Importancia económica

Debido a su rapidez de crecimiento, es la especie forestal más importante desde el punto de vista económico dentro de la Comunidad Autónoma Vasca. Los estudios económicos sobre la producción de madera y rentabilidad económica de esta especie en el País Vasco, permiten entender el porqué de la expansión del pino radiata, así como la estabilidad de su actual superficie. Su producción anual alcanza una cifra global cercana a 1.800.000 m³ de madera, mientras que la producción media de madera ha sido de 331,67 m³/ha (Garayo 1991, Michel 2004). Estos valores, junto con la rentabilidad económica, propician que sea la principal especie forestal del País Vasco y forme parte dominante del paisaje de la zona atlántica de este territorio.

1.1.4.4 Propiedades de la madera

La madera de pino radiata tiene unas propiedades físico-mecánicas muy similares a las de otras coníferas. Si se establece un adecuado turno de corta y se ejecutan unas labores silvícolas bien planificadas, los rendimientos de madera aserrada limpia pueden ser altos. Para obtener un buen uso de la madera se debe separar cuidadosamente la parte procedente del interior del tronco (madera juvenil y duramen) de la procedente de las zonas exteriores en el proceso de aserrado. La parte del interior es más adecuada para fabricación de palés, encofrados, tableros aglomerados y pasta de celulosa. La madera más externa del tronco es de mayor calidad y apropiada para carpintería, mobiliario y elementos de decoración (Fernández-Golfín 1996).

Con el tiempo se han ido diversificando los aprovechamientos de esta especie y se ha conseguido un alto valor añadido de su madera (Johnson 1994). Este reconocimiento a la calidad de la madera y las altas producciones en el País Vasco, han provocado que sea exportada a otras comunidades autónomas donde se está utilizando para la industria de la carpintería y el mueble. Estos sectores demandan las mejores calidades de esta madera consiguiendo que se convierta en un cultivo altamente rentable (Ruiz et al. 1992, Asociación de propietarios forestales de Guipúzcoa 2003).

1.2 Problemas sanitarios

1.2.1 Situación sanitaria actual

Pero esta preponderancia puede verse amenazada. En este contexto de monocultivo se empiezan a observar problemas sanitarios. Se podría decir que los monocultivos forestales son en sí mismos generadores de plagas y/o enfermedades. Al estar compuestos por una sola especie, se dan las condiciones idóneas para que alguna especie de hongo o insecto pueda propagarse de manera muy rápida sin barreras por toda la masa forestal. De esta manera se puede convertir rápidamente en una grave amenaza para el cultivo en su conjunto (Dajoz 2001).

Situaciones de este tipo no ocurren en un bosque nativo, ya que la diversidad de flora y fauna que lo componen impide la aparición de plagas o enfermedades que puedan afectar al monte en su conjunto. Además, las especies de hospedadores y patógenos llevan evolucionando mucho tiempo de manera conjunta y se mantienen en un equilibrio más o menos dinámico. En efecto, las numerosas cadenas tróficas existentes mantienen al bosque en un equilibrio relativamente estable, dado que el incremento en la población de una especie genera el consiguiente crecimiento del número de sus predadores. Es decir, que la diversidad y una larga historia de evolución conjunta constituyen mecanismos de control para lograr el equilibrio que asegura la permanencia del ecosistema (Muñoz et al. 2003). Esta misma diversidad es importante a nivel genético y específico. Una estrecha base genética en una población disminuye sus capacidades de adaptación al entorno en caso de cambios drásticos. Es el caso de ataques de hongos en masas forestales. Si la variabilidad genética del monocultivo es baja pueden verse afectados la mayoría de los individuos cultivados (Torres 1993).

Paralelamente a la introducción de especies exóticas de árboles en plantaciones forestales se produce una involuntaria introducción de patógenos forestales, que la mayor parte de las veces han pasado desapercibidos en los controles fitosanitarios, hasta que los síntomas en vivero o campo han hecho patente su presencia (Iturritya 2001, Iturritya et al. 2001). Otras especies fúngicas de carácter patógeno permanecen con niveles normales en ecosistemas naturales, pero pueden experimentar fluctuaciones poblacionales derivados de actuaciones humanas. Los monocultivos con alta densidad de plantación, manejos silvícolas inadecuados como podas, entresacas y matarrasas en épocas de alta capacidad de infección del hongo propician la propagación de enfermedades fúngicas (Iturritya & Ganley 2007). Terrenos sobreexplotados, con deficiencias nutricionales, pérdidas de suelo debidas a malas prácticas de tala y preparaciones agresivas de terrenos para la repoblación (quema de restos vegetales, subsolados, desbroces totales, etc.) debilitan las plantaciones y favorecen la aparición de estas enfermedades (Muñoz et al. 2003).

Los daños en las repoblaciones forestales generan un indiscutible impacto económico. Desde 1999 se vienen realizando evaluaciones globales de la situación sanitaria de las plantaciones forestales, demandadas por las asociaciones de forestalistas y financiadas en su totalidad por los Departamentos de Agricultura y Pesca y Universidades e Investigación del Gobierno Vasco. Algunos estudios anteriores también mencionan daños en las repoblaciones de pino radiata. Durante estas prospecciones se ha puesto de manifiesto la existencia de un importante número de daños en las masas forestales de pino radiata. Estos daños abarcan afecciones debidas a factores climáticos como heladas, sequías, fuertes vientos, tormentas, granizo e, incluso, inundaciones. También se han detectado problemas nutricionales como niveles bajos de fósforo o magnesio en suelo. En cuanto a los insectos, la plaga más importante es la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*), cuyas orugas causan intensas defoliaciones. En etapas de vivero y repoblaciones jóvenes se producen daños por insectos como *Hylobius abietis* y *Rhyacionia duplana*. En repoblaciones más desarrolladas aparecen los curculiónidos como *Pissodes notatus* y los escolítidos como *Tomicus piniperda* e *Ips sexdentatus* entre otros (Cobos-Suárez & Ruiz-Urrestarazu 1990, Iturritya 2001).

En cuanto a los hongos generadores de distintas enfermedades Iturritya (2001) detecta, entre otros, los siguientes:

Hongos de acícula: *Lophodermium nitens*, *L. pinastri*, *Cyclaneusma minus*, *C. niveum*, *Mycosphaerella dearnessii*, *Diplodia pinea*.

Hongos de raíces: *Armillaria* sp., *Heterobasidion annosum*. (fig. 1.8).

Hongos de ramas y troncos: *Diplodia pinea*, *Fusarium circinatum*.

Las especies de *Lophodermium* y *Cyclaneusma* son hongos defoliadores que aparecen asociadas al género *Pinus*. *Lophodermium nitens* y *L. pinastri* suelen defoliar acículas de más de dos años de las ramas inferiores del árbol. *Cyclaneusma niveum* casi siempre se desarrolla sobre acículas viejas y deterioradas por otras causas y en general, su carácter es saprófito. *Cyclaneusma minus*, en cambio, es un defoliador activo de acículas de todas las edades. La gravedad de los daños depende de las

condiciones climáticas. Se muestra más agresivo en periodos de lluvias con temperaturas no muy elevadas. Los periodos de infección pueden ampliarse y generar fases epidémicas prácticamente continuadas. Después de varios años de enfermedad solo permanecen las acículas de un año, lo que supone ralentización del crecimiento, pérdida de vigor y predisposición al ataque de otros agentes (Bega et al. 1978, Torres 1993, Iturrutxa 2001, Muñoz et al. 2003).

Mycosphaerella dearnessii es un defoliador activo de acículas de todas las edades y afecta a especies del género *Pinus*. En el País Vasco aparece sobre todo en la especie *Pinus radiata*. Puede causar la caída total de las acículas de 2 y 3 años. Si la enfermedad es muy intensa y se repite durante años consecutivos, puede defoliar gradualmente la copa y retrasar de forma drástica el crecimiento. En árboles jóvenes puede llegar a causar la muerte (Iturrutxa 2001, Patton 2003).

La enfermedad de la podredumbre de la raíz está causada por hongos del género *Armillaria* y afecta a las raíces de árboles y arbustos (incluso algunas herbáceas) en todo el mundo. Puede comportarse como parásito matando árboles y arbustos sanos y como saprófito descomponiendo madera muerta. Puede mantenerse como saprófito durante varias décadas colonizando tocones de árboles. En el País Vasco se ha detectado en repoblaciones de coníferas y frondosas, en bosques nativos, en viñedos y en algunos jardines urbanos. Es un hongo común y un problema frecuente. En Europa se conocen 6 especies de las cuales 5 se han detectado en el País Vasco (*Armillaria cepistipes*, *A. gallica*, *A. mellea*, *A. ostoyae* y *A. tabescens*). Los ejemplares afectados muestran un amarilleamiento generalizado del follaje que termina con la muerte del árbol debido al colapso generado en el sistema radicular. En el País Vasco las especies que causan más daños son *Armillaria mellea* y *A. ostoyae* (Iturrutxa 2007).

Otro hongo que causa problemas en las raíces es *Heterobasidion annosum*. Está considerado como uno de los principales patógenos de coníferas en el mundo. Aunque en España no se ha observado una gran incidencia (Muñoz et al. 2003), algunos estudios recientes en el País Vasco lo han detectado en *Pinus radiata*, *P. sylvestris*, *P. pinaster*, *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies* donde podría suponer un problema mayor de lo que se creía hasta ahora (Mesanza & Iturrutxa, pendiente de publicación). En general, los pies infectados sufren problemas de anclaje a causa de la degradación de las raíces gruesas de sujeción, con lo que quedan predispuestos al derribo por efecto del viento o del peso de la nieve, siendo ésta la causa principal de la muerte de los árboles infectados. Se trata de un hongo cuya detección puede ser difícil en campo, aunque su identificación se establece con facilidad en laboratorio, siendo la observación de los basidiocarpos el criterio más seguro de diagnóstico en el terreno. Estos pueden aparecer en partes podridas de árboles muertos o sobre pies vivos, ya sea entre los huecos del sistema radical o aprovechando galerías de animales, en la base de tocones o troncos, en raíces superficiales, en el interior del sistema radical de árboles derribados por el viento o dentro de tocones y troncos huecos (Sinclair et al. 1987).

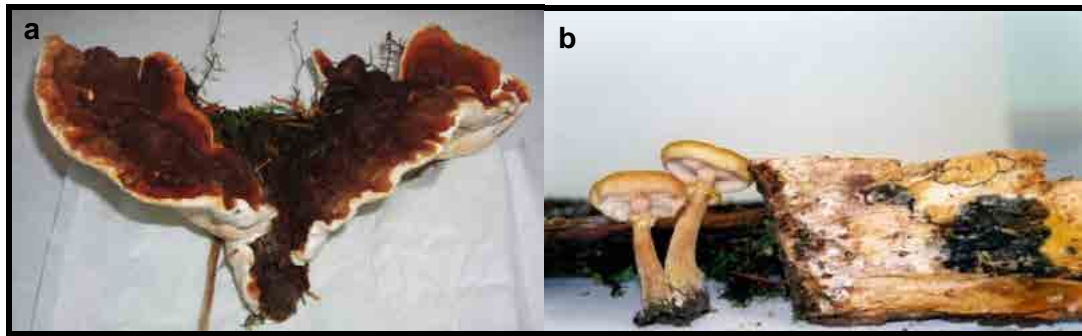


Fig. 1.8. a) *Heterobasidion annosum*; b) *Armillaria mellea*.

1.2.2 Gestión de *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum*

Dentro de este contexto de masas forestales amenazadas por diversas enfermedades, dos destacan por su virulencia y/o extensión. Son las enfermedades llamadas “marchitez de los brotes” y “chancro resinoso del pino”, producidas por los hongos *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* respectivamente. Como se tratará más por extenso en los capítulos siguientes, las pérdidas económicas en masas forestales de *Pinus radiata* asociadas a estas dos enfermedades pueden ser muy importantes (Iturrutxa 2001, Muñoz et al. 2003, Gordon 2006).

Los daños producidos por ambos hongos pueden llegar a producir la muerte de los árboles infectados. Aunque *Diplodia pinea* suele permanecer como saprófito, varios factores como la sequía, daños físicos y otros estreses de origen medioambiental, pueden desencadenar su carácter parásito y generar infecciones severas (Swart et al. 1987a, Nicholls & Ostry 1990, Blodgett et al. 1997, Paoletti et al. 2001). *Fusarium circinatum* se considera, en cambio, un parásito primario que necesita colonizar hospedadores para poder sobrevivir (Storer et al. 1995, Leslie & Summerell 2006).

Otro importante aspecto a tener en cuenta es la normativa sobre detección de *Fusarium circinatum* en España y Europa. El hecho de que sea una enfermedad de detección reciente, y que no se encuentre en muchos países de Europa, la ha convertido en una enfermedad de cuarentena. El 9 de junio de 2006 se publicó en el BOE el Real Decreto 637/2006 por el que se establece el Programa Nacional de erradicación y control del hongo *Fusarium circinatum*. Esto puede suponer medidas como la inmovilización de madera extraída de zonas donde se detecta la enfermedad impidiendo su comercialización. Para poder utilizar esa madera habría que tratarla con métodos de desinfección lo que encarece más su precio (Raposo 2006).

Países como Australia y Nueva Zelanda están creando planes de detección del hongo y medidas de erradicación temprana debido al posible perjuicio económico que podría suponer la contaminación de repoblaciones forestales de pino radiata por *Fusarium circinatum* (Gadgil et al. 2003, Cook & Matheson 2008). Estos autores demuestran que el retrasar todo lo posible la introducción no deseada de la enfermedad del chancro resinoso evitaría pérdidas económicas cuantiosas.

El control de *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea* es complicado porque son hongos capaces de sobrevivir en las acículas, ramas, brotes, madera y piñas durante un amplio periodo de tiempo (Peterson 1981, Storer et al. 1997 y 1998, OEPP/EPPO 2005), generando en la actualidad una gestión bastante difícil y costosa. Además, *Diplodia pinea* es uno de los varios hongos conocidos que pueden permanecer de forma asintomática en los tejidos de los pinos, lo que lo hace más difícilmente detectable (Stanosz et al. 2001, Blodget et al. 2003, Flowers et al. 2006).

1.3 Justificación y objetivos

La “marchitez de los brotes” y “el chancro resinoso del pino” son el principal problema de salud asociado a las plantaciones de *Pinus radiata* en el norte de España. Teniendo en cuenta el impacto negativo de estas enfermedades en la productividad de nuestras masas forestales, es necesario conocer lo mejor posible la biología de estos organismos para poder establecer parámetros adecuados de manejo. En este trabajo pretendemos estudiar la incidencia y distribución de estas enfermedades y caracterizar algunos aspectos de la biología de los patógenos que las producen. Este conocimiento podrá ser aplicado en el manejo de las repoblaciones forestales de pino radiata en el País Vasco, para tratar de minimizar los daños que generan estas enfermedades.

Este objetivo general se puede desglosar en estos otros objetivos parciales:

1. Caracterizar la población de *Diplodia pinea* en el área de estudio para comprender mejor sus mecanismos de actuación, daños producidos, diversidad de sus poblaciones y capacidad de infección y expansión.
2. Establecer niveles de resistencia y/o susceptibilidad frente a *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* en las especies del género *Pinus* nativas e introducidas en la Península Ibérica, así como en otras especies de coníferas utilizadas en repoblaciones forestales en el mismo entorno. De esta manera se pueden proponer alternativas a los cultivos forestales actuales.
3. Establecer la distribución de estos dos patógenos en el País Vasco, caracterizando las áreas donde se desarrollan. Así podemos conocer los factores del medio que condicionan su desarrollo e incrementan su agresividad.
4. Determinar los impactos potenciales de las enfermedades mediante la elaboración de mapas de riesgo de afección en el entorno del País Vasco. De esta manera podremos establecer una zonificación del territorio en función de los riesgos de que se desarrollen estas enfermedades en las repoblaciones forestales y proponer estrategias de control.

2. MARCHITEZ DE LOS BROTES: *Diplodia pinea*



Picnidos de *Diplodia pinea* sobre una piña de pino radiata

2. MARCHITEZ DE LOS BROTES: *Diplodia pinea*

2.1 Taxonomía

El sistema de clasificación natural de los hongos se basa, en buena parte, en el ciclo de desarrollo y en los órganos de producción de meiosporas, relacionados con la reproducción sexual. Pero en muchos hongos (unas 30.000 especies) sólo se conocen procesos de multiplicación vegetativa por conidios, siempre de naturaleza asexual, que se producen en conidiomas morfológicamente definidos, siempre de naturaleza asexual. No es posible decidir si es que la fase sexual no se conoce o es que el hongo ha perdido la capacidad de formarla. Estos hongos se han reunido en el grupo artificial de los hongos imperfectos o Deuteromicetos (Sitte et al. 1994), también conocidos como hongos mitospóricos (Hawksworth et al. 1995). La fase asexual del ciclo se denomina anamorfo, y teleomorfo la sexual. Un conocimiento cada vez mayor de los caracteres generales en su conjunto, permitirá, en el futuro, incluir cada vez mayor número de hongos imperfectos en las clases y órdenes del sistema natural, bien porque pueda establecerse la conexión entre los anamorfos y teleomorfos, o bien porque las técnicas moleculares permitan una ubicación sistemática precisa para hongos anamórficos (Hawksworth et al. 1995).

Así, si bien hasta fechas recientes *Diplodia pinea* se incluía en el grupo de los Deuteromicetos, en la actualidad las técnicas moleculares han permitido ubicarlo dentro de su grupo filogenético natural. Estas técnicas de análisis y comparación de ADN tienden no solamente a hacer desaparecer el grupo artificial y heterogéneo de los hongos imperfectos, sino también a modificar la clasificación actual. Sin embargo, aún conociéndose cada vez mejor la ubicación taxonómica de numerosos hongos mitospóricos, se sigue manteniendo la nomenclatura clásica por razones prácticas, dado que muchos de ellos tienen considerable importancia en procesos industriales o como patógenos. Para una propuesta global de las tendencias actuales en la clasificación de hongos, véase Hibbett et al. (2007).

Según esta nueva propuesta de clasificación *Diplodia pinea* se englobaría en las siguientes categorías: Reino Fungi, Subreino Dikarya, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Clase Dothideomycetes, Orden Botryosphaerales, Familia Botryosphaeriaceae (Hibbett et al. 2007, Phillips et al. 2008).

La familia Botryosphaeriaceae Theiss. & P. Syd. fue descrita en 1918 (Crous et al. 2006). Actualmente se conocen más de 2.000 taxones asociados a esta familia. La mayoría de las especies están representadas por estados anamorfos asociados a los géneros *Diplodia*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Sphaeropsis*. Además contiene el género teleomórfico *Botryosphaeria*, que da nombre a la familia (Slippers & Wingfield 2007). Durante mucho tiempo la taxonomía de esta familia ha sido muy confusa, pero los avances en técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía, han clarificado en gran medida este grupo (Smith & Stanosz 2001). Al género *Diplodia* se asignan anamorfos con conidios anchos (más de 10 µm), de gruesas paredes (de 0,5 a 2 µm) y casi siempre pigmentados en su fase de madurez (Zhou & Stanosz 2001).

Por otra parte, la distinción taxonómica entre los géneros *Sphaeropsis* y *Diplodia* no siempre ha estado clara. Mientras para algunos autores, como Denman et al. (2000), *Sphaeropsis* debería ser considerado sinónimo de *Diplodia*, otros como De Wet et al. (2003) mantienen la distinción entre géneros y sugieren que *Sphaeropsis sapinea* debería volver a llamarse con el antiguo nombre de *Diplodia pinea*. Sin entrar en esta discusión taxonómica, la aplicación de las reglas de nomenclatura obliga a que, dentro del género *Diplodia*, su nombre correcto sea *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f. (de Wet et al. 2008, Phillips et al. 2008), mientras que si se considera parte del género *Sphaeropsis* debe llamarse *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton (Blodgett et al. 2007, Eyles et al. 2007).

2.1.1 Nomenclatura

Durante bastante tiempo se creyó que la primera descripción de la especie había sido la realizada por Desmazières en 1842 bajo el nombre de *Sphaeria pinea* Desm. (Waterman 1943). Sin embargo ya en 1823 Elias Magnus Fries había descrito *Sphaeria sapinea*, hoy en día considerada la misma especie. Algunas otras especies descritas con posterioridad se incluyen hoy en día en la sinonimia, que además ha aumentado también debido a su ubicación en diferentes géneros a lo largo del tiempo.

El nombre admitido actualmente es:

Diplodia pinea (Desm.) J. Kickx f., *Fl. Crypt. Flandres* 1: 397 (1867)

A continuación mencionamos otros sinónimos con los que se ha designado a este hongo (Waterman 1943, Punithalingam & Waterston 1970, Sutton 1980, Index Fungorum 2008):

- Botryodiplodia pinea* (Desm.) Petr., *Annls mycol.* 20(5/6): 308 (1922).
Coniothyrium pinastri (Lév.) Tassi, *Bulletin Labor. Orto Bot. de R. Univ. Siena* 5: 25 (1902).
Diplodia conigena Desm., *Bot. Notiser.* 69 (1846).
Diplodia pinastri Grove, *J. Bot., London* 54: 193 (1916).
Diplodia sapinea (Fr.) Fuckel, *Jb. Nassau. Ver. Naturk.* 23-24 (1870) [1869-70].
Granulodiplodia pinea (Desm.) Zambett., *Bull. trimest. Soc. mycol. Fr.* 70: 331 (1955) [1954].
Granulodiplodia sapinea (Fr.) M. Morelet & Lanier, *Annales de la Société des Sciences Naturelles et d'Archéologie de Toulon et du Var* 203: 12 (1973).
Macrophoma pinea (Desm.) Petr. & Syd., *Feddes Repert., Beih.* 42: 116 (1926).
Macrophoma sapinea (Fr.) Petr., *Sydowia* 15(1-6): 311 (1962) [1961].
Macroplodia ellisii (Sacc.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) 3: 492 (1898).
Macroplodia pinastri (Lév.) Kuntze, *Revis. gen. pl.* (Leipzig) 3: 492 (1898).
Sphaeria pinea Desm., *Annls Sci. Nat., Bot., sér. 2* 15: 14 (1842).
Sphaeria sapinea Fr., *Syst. mycol.* (Lundae) 2(2): 491 (1823).
Sphaeropsis ellisii Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 3: 300 (1884).
Sphaeropsis ellisii Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 3: 300 (1884) var. *ellisii*.
Sphaeropsis pinastri (Lév.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 3: 300 (1884).
Sphaeropsis sapinea (Fr.) Dyko & B. Sutton, in Sutton, *The Coelomycetes* (Kew): 120 (1980).

2.2 Morfología

No se conoce la forma de reproducción sexual en esta especie, ni en condiciones de campo ni de laboratorio, por lo que la descripción de *Diplodia pinea* se fundamenta en los picnidios (cuerpos esporíferos asexuales) y en los conidios.

2.2.1 Picnidios

Se pueden desarrollar sobre corteza, brotes, acículas (fig. 2.1-c) y escamas de piña (fig. 2.1-b). Inicialmente se desarrollan inmersos en el tejido vegetal, emergiendo con el tiempo, negros, ovoides, y abriéndose al exterior por un ostiolo apical. Sus medidas son bastante variables y pueden oscilar entre los 330 μm y 675 μm de diámetro. La pared de los picnidios es multicelular con células fuertemente pigmentadas alrededor de la región del cuello (fig. 2.2). No existen conidióforos diferenciados, sino simples células conidiógenas que se desarrollan a partir de células de revestimiento del interior de la pared del picnidio (Punithalingam & Waterston 1970, Sutton 1980, Wang et al. 1986, Cedeño et al. 2001). Los picnidios maduran en 2 meses y entonces empiezan a diseminar los conidios (Peterson 1977 y 1981).

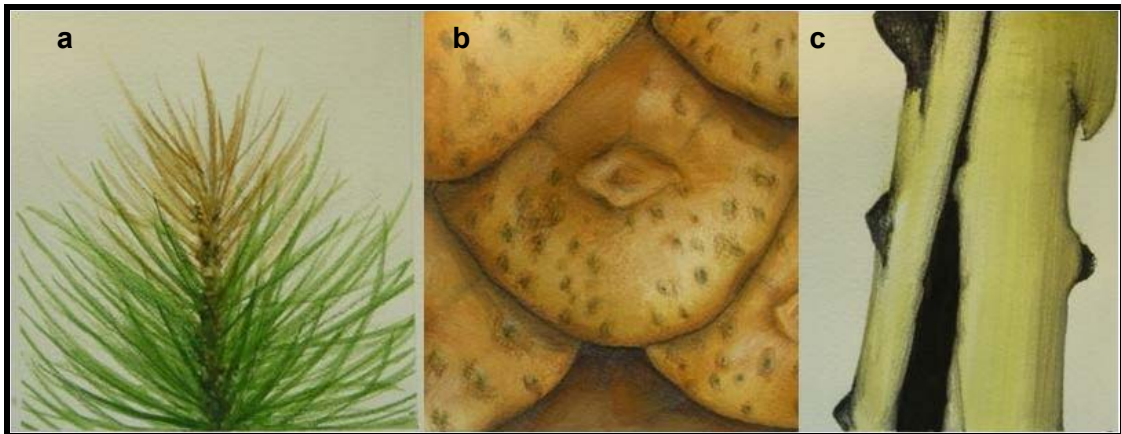


Fig. 2.1. Material de pino radiata infectado con *Diplodia pinea*: a) punta de una rama; b) escamas de una piña con picnidios; c) acícula con picnidios.

Dibujante: Araiz Mesanza.

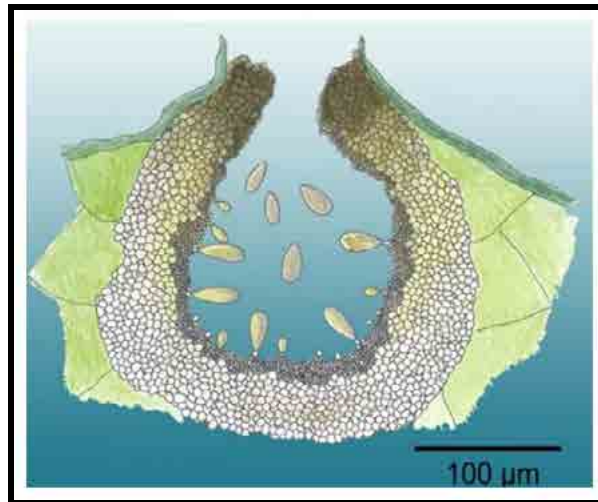


Fig. 2.2. Picnidio de *Diplodia pinea*.

Fuente: Arbofux 2010

2.2.2 Conidios

Los conidióforos quedan reducidos a simples células conidiógenas que tapizan la pared interior del picnidio. Los conidios recorren 3 estados hasta llegar a la madurez. Comienzan con una coloración hialina y siendo aseptados. En una segunda fase se van oscureciendo tomando a un color pardo pálido y siguen aseptados. Finalmente, la pared se vuelve marrón oscuro y el interior se torna rojizo (fig. 2.3). La pared de los conidios es lisa, redondeada hacia el ápice y despuntada hacia la base. Normalmente permanecen aseptados aunque pueden presentar un septo o raramente más de uno hacia el final de la maduración (Punithalingam & Waterston 1970, Sutton 1980, Wang et al. 1985 y 1986). Según Sutton (1980) las medidas se mantienen entre 30-45 µm de largo y 10-16 µm de ancho, aunque estas medidas pueden ser muy variables. Waterman (1943) da una serie de medidas cuyos extremos van desde 27 µm hasta 41 µm para el largo y desde 11,8 µm hasta 19 µm para el ancho.

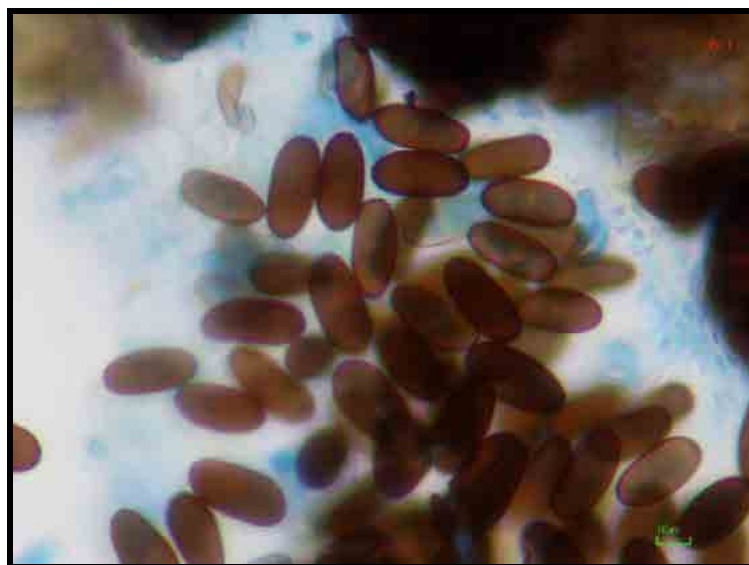


Fig. 2.3. Conidios de *Diplodia pinea*.

2.3 Variabilidad y morfotipos

Diplodia pinea es un organismo muy variable, tanto en morfología, como en la patogenicidad de sus distintas cepas (Kay et al. 2002). En la parte norte y central de Estados Unidos se han diferenciado 2 tipos de cepas: Las denominadas de tipo A muestran un micelio esponjoso que evoluciona del color blanco a un gris verdoso muy oscuro con el tiempo, crecen de forma rápida en medio PDA (Potato Dextrose Agar) y son patógenas en hospedadores tanto heridos como indemnes. Las cepas del tipo B se caracterizan por un micelio liso y adherido al medio, que evoluciona del blanco hasta el negro, con un crecimiento lento en medio PDA y que, para ser infectivas, necesitan que los hospedadores estén heridos previamente (Wang et al. 1985, Palmer et al. 1987).

En Francia, Morelet & Chandelier (1993) hicieron una diferenciación parecida, dividiendo las cepas en dos tipos que llamaron I y II. El tipo II coincidía en características de micelio y crecimiento con el tipo A. El tipo I era similar en características al tipo B aunque se diferenciaban en la velocidad de crecimiento. Stanosz et al. (1999), mediante caracterización de isozimas y marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), confirmaron la pertenencia del tipo I al morfotipo B y el tipo II al morfotipo A. Un morfotipo diferente, obtenido de cepas de Indonesia sobre *Pinus patula* y denominado C, fue propuesto por de Wet et al. (2000 y 2002). Las características de las cepas son muy similares al morfotipo A pero con una virulencia mayor. Sin embargo, Swart & Wingfield (1991a) manifiestan que en Sudáfrica existen más de dos morfotipos y que la población de *Diplodia pinea* podría formar un continuo de variación en sus características, sin posibilidad de diferenciación en morfotipos discretos.

La morfología y medidas de los conidios se han utilizado, junto a las características anteriores, para diferenciar los morfotipos A y B. Los conidios del morfotipo A son lisos observados al microscopio electrónico de barrido y son aseptados o poseen un solo septo, muy raramente hasta tres. Los conidios del morfotipo B aparecen punteados por pequeñas depresiones circulares y poseen de 1 a 3 septos (Wang et al. 1985 y 1986). Las medidas de conidios del morfotipo A van desde 27 μm a 45 μm de largo y desde 10 μm a 19 μm de ancho. Las medidas del morfotipo B van desde 37,5 μm a 41,5 μm de largo y desde 13 μm a 15,5 μm de ancho. El amplio rango de medidas de los conidios atribuidos a las cepas del morfotipo A y su solapamiento con el rango más estrecho del morfotipo B invalida este carácter para la distinción entre morfotipos (Wang et al. 1985 y 1986, Swart et al. 1991, Swart & Wingfield 1991a, Stanosz et al. 1996, Kay et al. 2002).

2.3.1 *Diplodia scrobiculata*

En 2003, de Wet et al., sin embargo, proponen la separación de estos 3 morfotipos mencionados en 2 especies distintas. Para ello se basan en la genealogía de múltiples genes y marcadores de microsatélites y concluyen que las cepas de los grupos A y C corresponden a *Diplodia pinea*. Para las cepas del morfotipo B postulan un nuevo taxón denominado *Diplodia scrobiculata* J. de Wet, Slippers & M. J. Wingf. La nueva especie se caracteriza, además de por las características mencionadas más arriba para el morfotipo B, por un micelio gris pálido a gris oscuro por la parte superior cultivado en medio MEA (Malt Extract Agar) y color gris oscuro a negro por la parte inferior de la placa. El crecimiento óptimo se produce a 25 °C y cubre toda la superficie del medio en una placa de Petri de 9 cm en 8 días. Los picnidios son oscuros e inmersos en las acículas de pino o el agar, aparecen aislados, sus medidas son (100-)150(-250) µm de diámetro y poseen un ostiolo papilado (cónico).

Más recientemente, y debido a la complejidad de diferenciar las características morfológicas de las dos especies, Smith & Stanosz (2006) diseñan cebadores específicos basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diferenciar entre los 2 taxones.

2.4 Nombre común

Diplodia pinea es un hongo de carácter saprófito que, bajo ciertas circunstancias, es capaz de infectar numerosas especies de gimnospermas. Produce una enfermedad que se conoce con varios nombres (Torres 1993, Nef & Perrin 1999, Stanosz 2003, Iturrity & Ganley 2007).

Alemán: Triebsterben der Kiefer, diplodia.

Castellano: Marchitez de los brotes, diplodia, chancro del ramillo, infección de yemas, infección por *Sphaeropsis*.

Holandés: Scheutsterfte.

Inglés: Diplodia blight, diplodia dieback, tip blight, shoot blight, collar rot, sap stain.

Italiano: Disseccamenti apicali da diplodia.

Noruego: Diplodia.

Portugués: Morte de topo para a base.

2.5 Síntomas

Diplodia pinea es un hongo de carácter saprófito que se comporta como parásito en determinadas condiciones de estrés del hospedador (sequía, heridas creadas por insectos, daños mecánicos, granizadas o fuertes vendavales, etc.). Además se puede mantener de forma asintomática en el hospedador esperando condiciones adecuadas para infectarlo (Smith et al. 2000). En estos casos produce la enfermedad llamada "marchitez de los brotes". Este nombre describe incompletamente la variedad de daños causados por el hongo a distintas partes del árbol en diferentes fases de su desarrollo. Los síntomas se pueden congregarse en 3 grupos.

2.5.1 Marchitez de los brotes

Es el síntoma más común asociado a la infección por *Diplodia pinea* y por eso es también el nombre común de la enfermedad (Waterman 1943, Marks & Minko 1969, Chou 1976a).

La primera indicación es la aparición de gotas de resina en los brotes activos durante el crecimiento y expansión de las acículas. Posteriormente se forman regueros de resina blanda pegada sobre los brotes, acículas, troncos, ramas y piñas de árboles enfermos (Peterson 1977, 1978 y 1981). Pasado un tiempo, las acículas se van tornando marrones, dejan de expandirse y los brotes comienzan a curvarse, mientras el tejido leñoso adquiere un color marrón rojizo (figs. 2.4 y 2.5). Los brotes dañados permanecen con las acículas secas unidas y después de unas tres semanas aparecen picnidios negros sobre la superficie de éstas. Los brotes, curvados, adquieren un aspecto seco y raquítrico. Los brotes terminales infectados exudan grandes cantidades de resina, entonces se curvan y acaban muriendo. En este caso las ramas laterales asumen la dominancia y una corona de ramas secundarias se desarrollan justo en la base del brote muerto. Los brotes muertos permanecen en el árbol y el hongo continúa esporulando en ellos (Swart et al. 1985).

El rápido marchitamiento del follaje en ramas o coronas enteras también sucede sin síntomas externos de chancros sobre el tronco. Los brotes languidecen, el follaje se vuelve clorótico, las acículas se tornan marrones y las ramas toman una apariencia de estar muertas. Esto genera una situación de colapso y de esta manera se produce la muerte de las ramas y ramillas (Iturrutxa 2001, Flowers et al. 2006).



Fig. 2.4. Masa forestal de pino radiata mostrando el típico color rojizo que produce la infección por *Diplodia pinea*.



Fig. 2.5. Brote de pino radiata afectado por *Diplodia pinea*.

2.5.2 Chancros

A partir de brotes o yemas infectadas se pueden generar chancros en las ramas. El hongo es capaz de desplazarse por la médula de la planta a partir de los brotes y así evitar las barreras defensivas externas del hospedador (Waterman 1943, Marks & Minko 1969). Si el hospedador se debilita por estrés de origen medioambiental, el hongo puede pasar de la médula a infectar el cámbium y los tejidos corticales. Entonces la corteza se abre, la zona se deprime y se produce exudación de resina formando los chancros (Nicholls 1981; fig. 2.6). Cuando la infección evoluciona puede provocar la formación de un callo, que en ocasiones puede llegar a ser bastante grande y deforme, alrededor del borde del chancro. La superficie de los chancros avanzados está hundida y se desprenden las partes muertas de la corteza quebradiza, por debajo de la cual se aprecia una oscura tinción de la madera. Si se cortan secciones del tronco a la altura de los chancros se puede observar que el tejido infectado se torna grisáceo o azulado (Iturrutxa 2001). Esta situación puede evolucionar hasta el anillamiento de las ramas secándolas (Swart et al. 1985).



Fig. 2.6. Chancro producido por *Diplodia pinea* sobre tronco de pino radiata.

2.5.3 Azulamiento de la madera

Además de los síntomas manifestados en coníferas vivas, *Diplodia pinea* puede causar coloraciones azuladas o grisáceas de la madera apeada o podada (Da Costa 1955; fig. 2.7). El podado de ramas deja zonas expuestas a la infección por donde penetra el hongo generando esa coloración azulada. La exposición al aire de las zonas infectadas con el hongo también se puede producir a través de abrasiones causadas durante la tala y la extracción, generando ese tono azulado de la madera.



Fig. 2.7. Azulamiento de la madera producido por *Diplodia pinea*.

2.6. Daños

2.6.1 Daños en plantaciones

La influencia de la marchitez de los brotes en el crecimiento del árbol y la calidad de la madera depende de que la infección se dé en los brotes laterales o en el brote terminal. Si la infección es en los brotes laterales el retraso en el crecimiento y las deformaciones son menores que en el caso de que se dé la infección en el brote terminal (Foster & Marks 1968). En el caso de *Pinus elliottii* se citan pérdidas de hasta el 40% de reducción en el crecimiento cuando muere la parte superior del árbol (Brown et al. 1981). Chou (2007) cita pérdidas para *Pinus radiata* que pueden reducir la producción de madera en un 40% y una pérdida de volumen comercializable de hasta el 63%. En el caso de árboles jóvenes, la muerte de unos pocos centímetros de la parte terminal puede conducir a la dominancia de las ramas laterales. Esto reduce considerablemente la calidad de los fustes debido al grosor de los verticilos formados. El incremento en el número de verticilos también genera considerables pérdidas en la calidad de la madera (Foster & Marks 1968, Wright & Marks 1970). En el País Vasco, este hongo puede retrasar varios años el crecimiento de los árboles, incluso puede matar gran cantidad de ejemplares según las condiciones meteorológicas y edafológicas, lo que supone alargar turnos de corta con pérdida de rendimiento económico y reducción de volúmenes de madera comercializables (Cobos-Suárez & Ruiz-Urrestarazu 1990, Iturritxa 2001).

El estrangulamiento de las ramas o troncos a la altura de los chancros causa la muerte de las partes distales del árbol, resultando una impresionante decoloración de las acículas en ramas y copa. La persistencia de esta situación en la copa de los árboles puede dar lugar a la apariencia de “cabeza de ciervo”, frenando considerablemente el crecimiento (Swart & Wingfield 1991a, Iturritxa 2001).

Los chancros, que pueden formarse tras el marchitamiento de la punta del árbol o tras heridas producidas por la poda, frecuentemente aparecen cerca de la punta del árbol, en la base de las ramas secundarias. Exudados de resina suelen correr a lo largo de la corteza del tronco. Las heridas de poda infectadas también desarrollan chancros que desfiguran el tronco, e incluso pueden anillar el árbol y matarlo (Gilmour 1964, Wright & Marks 1970, Iturritxa 2001).

2.6.2 Pérdida del valor de la madera

La enfermedad causada por *Diplodia pinea* está frecuentemente asociada con el azulado de los tejidos leñosos de troncos y ramas, generando una importante reducción en la calidad de la madera (Kierle 1978, Uzunović et al. 1999). La coloración azulada que se produce en la madera podada o talada se debe a la presencia de las hifas del hongo en el parénquima aunque las paredes celulares no sufren daños. Las propiedades estructurales de la madera no se ven afectadas, pero los efectos estéticos negativos que genera esa coloración deprecian considerablemente su valor (Swart et al. 1985, Iturritxa 2001). En el País Vasco también se ha detectado el azulamiento de tejidos de troncos y ramas en explotaciones forestales de *Pinus radiata* debido a la infección por *Diplodia pinea*, dando como consecuencia una depreciación en el valor de la madera (Iturritxa 1999 y 2001).

2.6.3 Daños en vivero

La marchitez de los brotes se puede producir en plántulas de vivero, sobre todo en zonas cuyos alrededores están ocupados por árboles adultos enfermos (Slagg & Wright 1943). También se pueden observar daños en la zona del cuello de la raíz producidos por *Diplodia pinea*. La zona del cuello de la raíz comienza a decolorarse, cubrirse de resina y a desarrollar picnidios en su superficie. El follaje se torna clorótico y las acículas mueren. Los tejidos del cuello radicular y las inmediaciones cercanas del tronco pueden volverse necróticos en estados avanzados de la enfermedad. Las pérdidas pueden llegar a suponer el total del cultivo (Darvas et al. 1978, Wingfield & Knox-Davies 1980a, Palmer & Nicholls 1983).

En *Pinus taeda* y *P. elliottii* adultos de Sudáfrica se han citado daños en la raíz producidos por *Diplodia pinea*. Los síntomas se manifiestan como lesiones radiales de color azulado oscuro en las raíces jóvenes, que se pueden extender hacia las raíces más grandes e incluso llegar al tronco. Las acículas se vuelven cloróticas y pierden el color. Estos daños ocurren bajo condiciones de estrés hídrico que debilitan los árboles haciéndolos susceptibles a la invasión del patógeno por las raíces (Wingfield & Knox-Davies 1980b).

2.6.4 Daños en semillas de pino

Los síntomas resultantes de la asociación de la semilla de *Pinus radiata* con *Diplodia pinea* incluyen la reducción de su germinación, desecación parcial o total y necrosis de los tejidos vegetales. A pesar de que una parte de las semillas pueden germinar, las plántulas resultantes se pueden ver afectadas por el hongo y desecarse en gran número tras la nascencia (Iturrirxa et al. 2001).

2.7 Hospedadores

Diplodia pinea es capaz de parasitar diferentes especies de coníferas, sobre todo, numerosas especies del género *Pinus* (Waterman 1943, Punithalingam & Waterston 1970, Wingfield & Knox-Davies 1980b, Wang et al. 1985, Swart et al. 1987a y 1988, Rees & Webber 1988, Stanosz et al. 1997 y 1999, Blodgett & Stanosz 1999, de Wet et al. 2008).

En las tablas 2.1 y 2.2 mencionamos las especies del género *Pinus* y otras coníferas citadas como hospedadores de *Diplodia pinea* de acuerdo a los autores anteriores. En la primera de ellas se muestra también la ubicación taxonómica de cada especie dentro del género *Pinus*, según la clasificación de Farjon (2010). Los nombres han sido actualizados (entre paréntesis) según el mismo autor (Farjon 2001 y 2010).

Tabla 2.1. Especies del género <i>Pinus</i> susceptibles a <i>Diplodia pinea</i>	
<i>Pinus</i> subg. <i>Strobus</i>	
Sect. <i>Parrya</i> Subsect. <i>Cembroides</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus culminicola</i> 	Sect. <i>Quinquefolius</i> Subsect. <i>Strobi</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus flexilis</i> • <i>Pinus griffithii</i> (= <i>P. wallichiana</i>) • <i>Pinus strobus</i>
<i>Pinus</i> subg. <i>Pinus</i>	
Sect. <i>Pinus</i>	
Subsect. <i>Pinaster</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus canariensis</i> • <i>Pinus eldarica</i> (= <i>P. brutia</i> var. <i>eldarica</i>) • <i>Pinus halepensis</i> • <i>Pinus pinaster</i> • <i>Pinus pinea</i> • <i>Pinus merkusii</i> • <i>Pinus roxburghii</i> 	Subsect. <i>Pinus</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus kesiya</i> • <i>Pinus massoniana</i> • <i>Pinus mugo</i> • <i>Pinus nigra</i> • <i>Pinus resinosa</i> • <i>Pinus sylvestris</i> • <i>Pinus thunbergii</i>
Sect. <i>Trifolius</i>	
Subsect. <i>Contortae</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus banksiana</i> • <i>Pinus contorta</i> • <i>Pinus virginiana</i> 	Subsect. <i>Australes</i> (cont.) <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus echinata</i> • <i>Pinus elliotii</i> • <i>Pinus greggii</i> • <i>Pinus muricata</i> • <i>Pinus oocarpa</i> • <i>Pinus palustris</i> • <i>Pinus patula</i> • <i>Pinus radiata</i> • <i>Pinus rigida</i> • <i>Pinus taeda</i>
Subsect. <i>Ponderosae</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus coulteri</i> • <i>Pinus devoniana</i> • <i>Pinus michoacana</i> (= <i>P. devoniana</i>) • <i>Pinus ponderosa</i> • <i>Pinus pseudostrobus</i> 	
Subsect. <i>Australes</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus caribaea</i> 	

Aparece también afectando a otras especies de coníferas:

Tabla 2.2. Otras especies de coníferas susceptibles a <i>Diplodia pinea</i>	
Pinaceae	
<i>Abies balsamea</i>	<i>Larix laricina</i>
<i>Abies concolor</i>	<i>Picea abies</i>
<i>Abies excelsa</i> (= <i>A. alba</i>)	<i>Picea mariana</i>
<i>Cedrus atlantica</i>	<i>Picea pungens</i>
<i>Cedrus deodara</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
<i>Larix decidua</i>	<i>Pseudotsuga taxifolia</i> (= <i>P. menziesii</i>)
Cupressaceae	
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>
<i>Cupressus lusitanica</i>	<i>Platycladus orientalis</i> (= <i>Thuja orientalis</i>)
<i>Cupressus macrocarpa</i>	
Araucariaceae	
<i>Araucaria cunninghamii</i>	

2.8 Distribución

La enfermedad causada por el hongo *Diplodia pinea* se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Al ser un patógeno de coníferas, y sobre todo del género *Pinus*, se encuentra allá donde existen los pinos de forma natural (Anderson et al. 1984, Fraedrich et al. 1994). Los pinos tienen una distribución natural casi exclusiva de latitud norte. Únicamente una especie de pino (*Pinus merkusii*) sobrepasa el ecuador en el sureste asiático en Sumatra (López & Sánchez de Lorenzo 2004, Farjon 2010). Sin embargo *Diplodia pinea* puede alcanzar territorios donde el hospedador es cultivado como una especie exótica, lo que ha hecho que se expanda ampliamente asociada a cultivos forestales de coníferas, tanto en el hemisferio norte como en el sur (Chou 1987, Chou & Mac Kenzie 1988, Swart & Wingfield 1991b, Paoletti et al. 2001; fig. 2.8). Es un importante patógeno en repoblaciones forestales de coníferas en países como Sudáfrica, Nueva Zelanda, Australia, Chile o Estados Unidos (Chou 1978, Wingfield & Knox-Davies 1980b, Nicholls & Ostry 1990).

En los siguientes países se ha citado la presencia de *Diplodia pinea* (Punithalingam y Waterson 1970, Wang et al. 1985, Rees & Webber 1988, Mohali 1997, Stanosz et al. 1999, Smith et al. 2000, Hildebrand 2005, Koltay 2007, Milijašević & Lazarev 2007):

- África: Kenia, Lesoto, Madagascar, Malauí, Mauricio, Mozambique, República Democrática del Congo, Suazilandia, Sudáfrica, Tanzania, Uganda, Zambia, Zimbabue.
- América: Argentina, Bahamas, Brasil, Canadá, Chile, Estados Unidos, Honduras, Jamaica, México, Nicaragua, Paraguay, Uruguay, Venezuela.
- Asia: China, India, Indonesia, Israel, Japón, Malasia, Siria, Tailandia, Taiwán, Turquía.

Europa: Alemania, Austria, Bélgica, Croacia, Eslovenia, España, Francia, Gran Bretaña, Holanda, Hungría, Italia, Portugal, República Checa, Rumanía, Rusia, Serbia y Montenegro, Suecia.

Oceanía: Australia, Nueva Zelanda.



Fig. 2.8. Países en los que se ha detectado presencia de *Diplodia pinea*.

2.9 Infección

2.9.1 Fuentes de inóculo

En árboles adultos las piñas maduras (a partir del segundo año) son la fuente más importante de inóculo (Swart et al. 1985). *Diplodia pinea* suele infectar las piñas de segundo año al inicio de la estación de crecimiento, incluso antes que otras partes del árbol (Peterson 1977). Para este trabajo, la mayor parte de las muestras de *Diplodia pinea* sobre *Pinus radiata* se han obtenido durante los muestreos de campo a partir de piñas maduras. En muchos árboles encontramos piñas con picnidios aunque en el resto de las partes del árbol no se apreciara infección ninguna. Hay que tener en cuenta, además, que *Pinus radiata* es un árbol serótino, con piñas que permanecen varios años sin caer, y actúan como un foco infeccioso casi permanente.

El patógeno puede persistir en tejido infectado más de 400 días y, al ser un saprófito común en escombros, restos de árboles, piñas, etc., persiste activo en los mismos, constituyendo una fuente importante de inoculación y dispersión. Estos restos, si no se retiran en viveros de planta forestal, pueden constituir una fuente de inóculo que contamine las raíces de plántulas de nuevas cosechas (Wingfield & Knox-Davies 1980b, Iturrutxa 2001, Stanosz et al. 2001). El micelio también puede actuar como propágulo vegetativo en el caso de la semilla de pino radiata (Iturrutxa et al. 2001).

2.9.2 Vías de dispersión

Los conidios representan la vía principal de propagación. Estos se diseminan por agentes meteorológicos como el viento y las gotas de lluvia, o asociados a insectos perforadores de madera (Wingfield & Palmer 1983, Swart et al. 1987a). Haddow & Newman (1942) demuestran la dispersión de conidios a través de un fluido secretado por el insecto del pino *Aphrophora parallela*.

Los conidios de *Diplodia pinea* se liberan con tiempo húmedo y durante toda la estación vegetativa. Son más abundantes en primavera y principios de verano, cuando los nuevos brotes del hospedador están creciendo y son más susceptibles a la infección (Peterson 1981, Swart et al. 1987b, Chou & MacKenzie 1988, Swart & Wingfield 1991a). De forma ocasional puede haber infecciones en otoño (Nef & Perrin 1999). Swart et al. (1987b) demuestran que los picos de diseminación de conidios coinciden con periodos lluviosos y calurosos (fig. 2.9).

La madera infectada puede ser transportada a grandes distancias para su uso y convertirse así en una fuente de dispersión de la enfermedad (Iturrity & Ganley 2007). La venta de semilla puede suponer también una fuente de dispersión del hongo a grandes distancias (García-Serna et al. 1997, Iturrity et al. 2001; véase más adelante, capítulo 4).

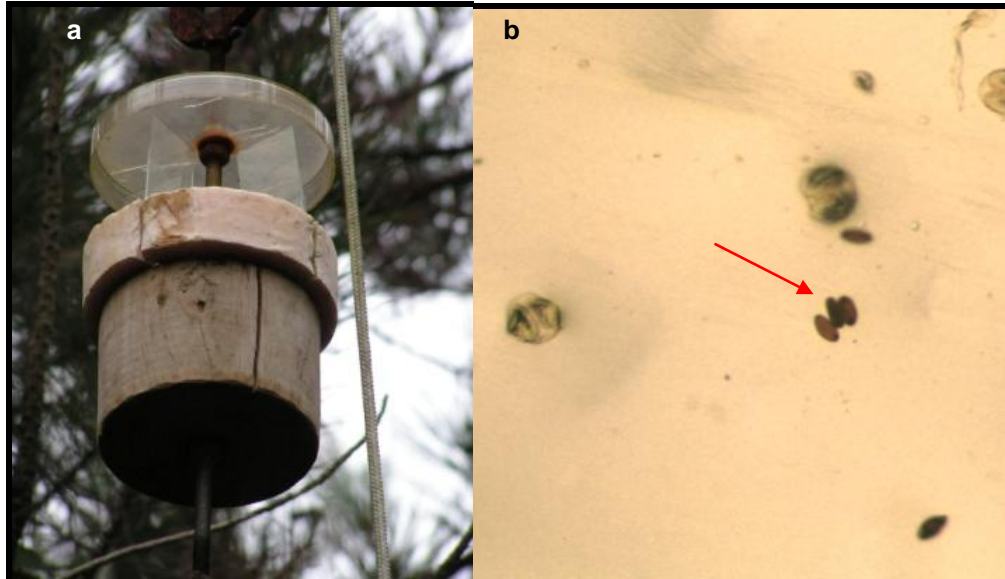


Figura 2.9. a) Trampa para captura de esporas de *Diplodia pinea*. b) Esporas detectadas al microscopio en un portaobjetos preparado para captar esporas.

2.9.3 Vías de entrada en la planta y colonización de los tejidos

En el caso de tejidos jóvenes de las ramas en crecimiento, el hongo penetra a partir de agregaciones de hifas sin necesidad de que este tejido se encuentre dañado previamente (Peterson 1977).

Las acículas maduras (más de un año) y las ramas de más de un año no se muestran susceptibles a la infección salvo que se encuentren dañadas. Las heridas generadas en el hospedador tras ataques de insectos, granizadas, ramas rotas o podas se pueden convertir en vías fáciles para la infección (Chou 1978, Chou & MacKenzie 1988). Se ha comprobado que *Diplodia pinea* puede permanecer sobre acículas, piñas y troncos sin generar síntomas y, cuando se dan circunstancias de estrés hídrico en el hospedador, aprovecha esa debilidad para comenzar la infección (Stanosz et al. 2001 y 2005, Stanosz 2003).

Sobre la penetración del hongo a través de heridas generadas en la poda, Gilmour (1964) encontró que el nivel de infección en *Pinus radiata*, parece estar correlacionado con el tipo de herramienta utilizado. Si la poda se realizaba con tijeras la infección llegaba al 12%, mientras que si se usaban herramientas como hachas o sierras la infección podía superar el 50%.

Una vez que el hongo ha penetrado es capaz de desplazarse por la médula de la planta y de aquí infectar el cámbium y los tejidos corticales. Una vez comenzada la colonización del hospedador, en pocas semanas pueden desarrollarse picnidios con conidios maduros en cualquier parte del árbol y aparecer ciclos secundarios de infección si los tejidos se muestran susceptibles o las condiciones ambientales le son favorables. El patógeno puede pasar el invierno como conidios en los picnidios o como hifas inmersas en los tejidos del hospedador (Marks & Minko 1969, Chou 1982b, Swart et al. 1987b).

2.9.4 Ciclo de la enfermedad

En la fig. 2.10. mostramos el ciclo de la enfermedad con las principales fuentes y vías de dispersión del hongo *Diplodia pinea*.

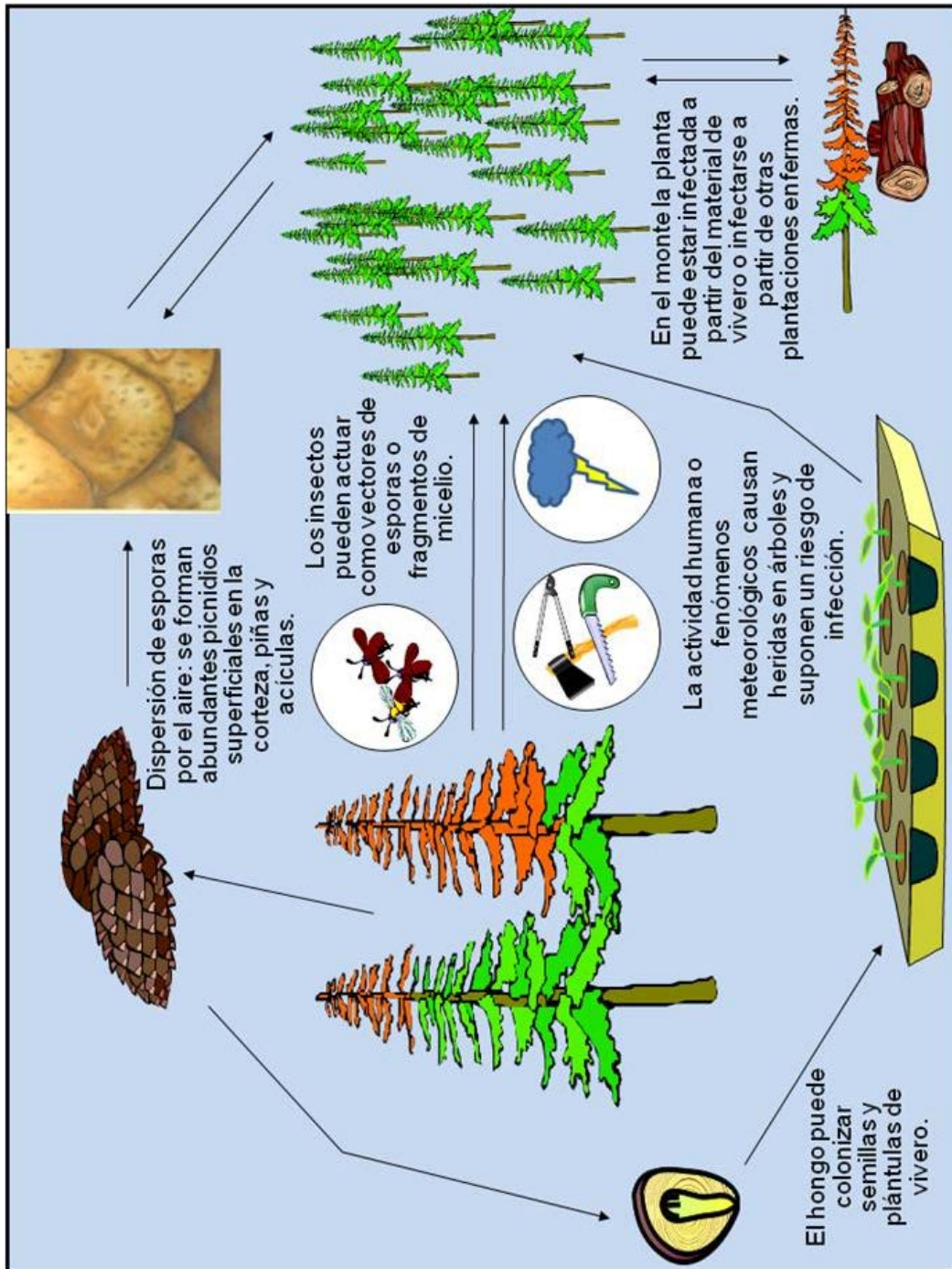


Fig. 2.10. Ciclo de la enfermedad generada por *Diplodia pinea*

3. CHANCRO RESINOSO: *Fusarium circinatum*



Muestra de pino radiata infectada por *Fusarium circinatum*

3. CHANCRO RESINOSO: *Fusarium circinatum*

3.1 Taxonomía

El hongo causante del chancro resinoso del pino es también un hongo mitospórico, perteneciente al género *Fusarium*. Este género engloba una gran cantidad de especies, con teleomorfos en el género *Gibberella*, de la familia Nectriaceae. Su posición sistemática es la siguiente:

Reino Fungi, Subreino Dikarya, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Nectriaceae (Hibbett et al. 2007).

El género *Fusarium* ha sido dividido de diversas maneras, en grupos infragenéricos llamados secciones, basadas en caracteres anamórficos, aunque muchas de estas secciones son artificiales (O'Donnell & Gray 1995, Mulé et al. 1997).

La sección *Liseola* se estableció para especies de *Fusarium* que producen microconidios en cadenas y/o falsas cabezas (agrupación física de células sin cohesión morfológica, fig. 3.2-b), pero que no producen clamidosporas. En un principio se incluyeron en esta sección 6 taxones, entre especies y variedades, que más tarde se redujeron a una única especie: *Fusarium moniliforme*. La taxonomía de este grupo ha evolucionado con varias revisiones, en las que el concepto de especie biológica se ha aplicado de forma amplia. Esto ha generado la agrupación de algunas especies en el complejo teleomorfo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. *Gibberella fujikuroi* es en realidad un complejo de especies politípico con anamorfos en *Fusarium*. En la actualidad se han reconocido hasta 46 líneas filogenéticas distintas en este grupo (Leslie & Summerell 2006).

Dentro del complejo *Gibberella fujikuroi* se engloban especies que causan importantes daños en diversos cultivos, entre los que se encuentra el chancro de la especie de pino, *Fusarium circinatum*, especie de difícil identificación (Correll et al. 1992).

La historia taxonómica de esta especie ha sido bastante compleja, y en consecuencia los nombres utilizados han ido variando a lo largo del tiempo. Cuando fue reconocido por primera vez en 1946, fue designado como una especie aún no descrita de *Fusarium* perteneciente a la sección *Liseola* (Hepting & Roth 1946). Tres años más tarde fue encuadrado dentro de *F. lateritium* Nees como una forma especial: *F. lateritium* f. sp. *pini* Hepting (Snyder et al. 1949). 'Forma especial' es una categoría que se utiliza en especies parásitas, para identificar grupos únicamente según su especificidad hacia un determinado hospedador.

En los años 70, las cepas aisladas a partir del chancro resinoso del pino, con abundantes microconidios en falsas cabezas y sin clamidosporas, se asignaron a *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wollenw. & Reinking de la sección *Liseola* (Dwinel 1978, Kuhlman et al. 1978, Kuhlman 1982). La variedad fue en 1983 elevada a nivel de especie, como *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas (Nelson et al. 1983).

En 1991, Correll et al. testaron 167 cepas adscritas a *Fusarium subglutinans* y especies relacionadas, obtenidas de diferentes hospedadores (pino, sorgo, maíz, arroz, caña de azúcar, piña). Hicieron ensayos de patogenicidad en pino y concluyeron que todas las cepas de *Fusarium subglutinans* procedentes de otros hospedadores diferentes del pino resultaban no virulentas en el pino radiata. Así pues, estos autores justifican la consideración de la forma patogénica en pinos, como una forma especializada específica y proponen una nueva designación: *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* J.C. Correll et al.

Posteriormente, Correll et al. (1992) apoyaron la propuesta anterior con ensayos sobre ADN mitocondrial. Demostraron que el ADN mitocondrial era invariable entre cepas de pino de *Fusarium subglutinans*. Estos mismos podían ser diferenciados de otras cepas aisladas de *Fusarium subglutinans* que no procedían de pino basándose en análisis de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) del ADN mitocondrial.

Finalmente, Nirenberg & O'Donnell (1998) describen sobre bases morfológicas la especie *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. En el mismo trabajo describen también el teleomorfo, obtenido en cultivo en laboratorio, al que denominan *Gibberella circinata*. Sin embargo, la publicación de este nombre no es válida, por incumplir uno de los requisitos establecidos por el Código (insuficiente información para localizar el tipo, Leslie & Summerell 2006). En 2002 Britz et al. validan el nombre *Gibberella circinata*.

3.1.1 Nomenclatura

Anamorfo

Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell, *Mycologia* 90: 442 (1998).

[= *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson et al. f. sp. *pini* J.C. Correll et al., *Plant Disease* 75: 680 (1991)].

Teleomorfo

Gibberella circinata Nirenberg & O'Donnell ex Britz, T.A. Cout., M.J. Wingf. & Marasas, *Sydowia* 54:16 (2002).

3.1.2 Tipos de apareamiento

En la mayoría de los hongos ascomicetos heterotálicos filamentosos, los genes responsables del apareamiento sexual están localizados en un único locus, denominado MAT (del inglés "mating type"), del que existen dos idiomorfos: MAT-1 y MAT-2. El apareamiento solamente ocurre entre individuos con diferentes genes MAT. El sistema de apareamiento es bipolar cuando, como aquí, existen solamente dos idiomorfos (Coppin et al. 1997, Kronstad & Staben 1997, Kerényi et al. 1999).

El teleomorfo o forma sexual *Gibberella circinata* ha sido obtenido en laboratorio mediante cruzamiento de los MAT-1 y MAT-2 compatibles en cultivo (Britz et al. 1998, 1999 y 2002, Steenkamp et al. 2000). Covert et al. (1999) demuestran que la temperatura juega un papel importante en la formación del teleomorfo y concluyen que la temperatura óptima es de alrededor de 17 °C.

La forma *Gibberella circinata* no ha sido observada en campo hasta la fecha, aunque hay razones para suponer que la recombinación sexual podría darse en condiciones de campo (Wikler et al. 2000, Britz et al. 2005). Esta posibilidad podría generar recombinación y posibilidad de aparición de tipos nuevos. Las cepas encontradas en el País Vasco están asociadas exclusivamente al tipo MAT-2 (Iturrutxa et al. 2011). Sin embargo, Pérez-Sierra et al. (2007) mencionan la aparición de los dos tipos en el norte de España, sugiriendo que la reproducción sexual podría ocurrir en esta región. Aunque algunos estudios en California muestran que la coincidencia de los dos tipos en condiciones de laboratorio no necesariamente supone reproducción sexual (Gordon et al. 1996 y 2006b), el riesgo de que se produzca en España no debe ser subestimado.

3.2 Morfología

Fusarium circinatum es difícil de distinguir de otras especies del complejo *Gibberella fujikuroi*, en especial de la especie cercana *Fusarium subglutinans*, de la que hasta hace poco se consideraba una forma especial (Correll et al. 1991). La aplicación de técnicas moleculares basadas en las diferencias de las secuencias de genes es la manera más fiable de identificar estas especies (O'Donnell et al. 1998 y 2000, Steenkamp et al. 1999, Schweigkofler et al. 2004).

3.2.1 Peritecio

El peritecio es de forma ovoide a subpiriforme, de alrededor de 325 µm de largo por 230 µm de ancho, finamente punteado alrededor del ápice pero liso en el resto, de color morado oscuro en agua con KOH al 3%, tornándose rojo en ácido láctico al 100%. La pared del peritecio tiene un grosor de 30 a 35 µm aunque se estrecha alrededor del ostiolo hasta los 15 a 20 µm (fig. 3.1). Los ascos son cilíndricos, de 85-100 x 7,5-8,5 µm. Las ascosporas, en número de 8 por asco, son de elipsoidales a fusiformes, lisas, hialinas y separadas con un septo medio en un primer momento. Posteriormente se pueden desarrollar varios septos más. Miden (9,4-)11,1-12,6-14(-16,6) x (4,5-)4,7-5,1-5,5(-6) µm (Nirenberg & O'Donnell 1998, Leslie & Summerell 2006; fig. 3.1).



Fig. 3.1. Peritecio con ascosporas de *Gibberella circinata*.
Dibujante: Araiz Mesanza

3.2.2 Características en cultivo

Como el peritecio no se ha descubierto en campo, la descripción de esta especie recae en las características en cultivo. Para la identificación morfológica de las especies de *Fusarium* se utilizan características de las cepas en diferentes medios de cultivo (Fisher et al. 1982). A continuación mostramos las características que muestran los cultivos de *Fusarium circinatum* en medio PDA, tal y como describen Nirenberg & O'Donnell (1998). Leslie & Summerell (2006) describen algunas características que se manifiestan de forma más clara en medios CLA y SNA.

Medio PDA (Potato Dextrose Agar)

El micelio es aéreo, de consistencia pilosa o lanosa, de color blanco que se torna gris violáceo en el centro (fig. 3.2-a). La coloración en el reverso es blanco grisácea en el exterior volviéndose violeta oscuro hacia el centro de la colonia (fig. 3.2-b). El crecimiento es radial con una media de expansión de 4,7 mm/día a 20 °C. No hay olor perceptible. La esporulación comienza muy temprano en el micelio aéreo, los conidios se unen en falsas cabezas, los esporodocios aparecen después de 2 o 3 semanas. Los conidióforos se establecen sobre el micelio aéreo y se encuentran fuertemente ramificados. Las ramas terminan en una o 2 fiálides que frecuentemente se asocian con hifas estériles circinadas.

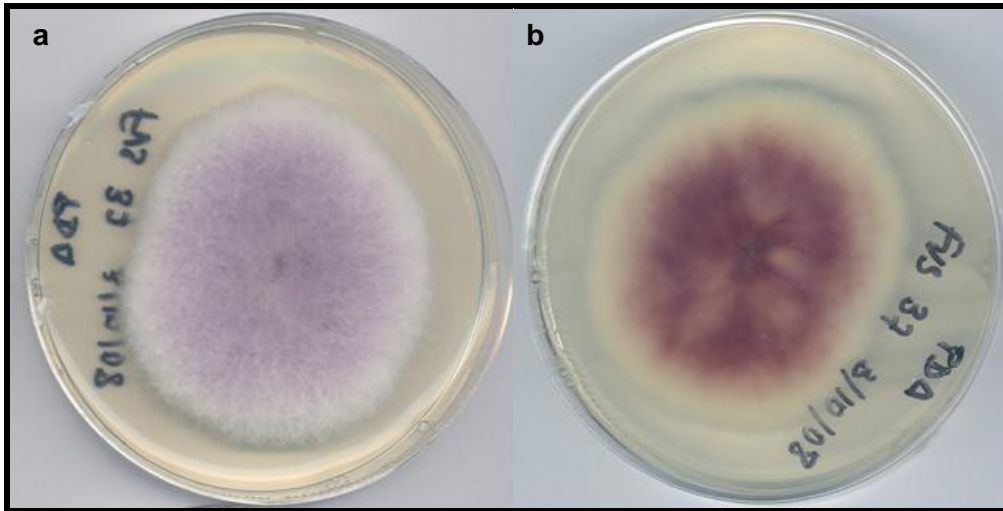


Fig. 3.2. Micelio de *Fusarium circinatum* en medio PDA: a) anverso; b) reverso.

Medio CLA (Carnation Leaf-piece Agar)

Los esporodoquios con macroconidios son escasos y pueden ser difíciles de encontrar. Los esporodoquios han sido detectados en medio CLA y, esporádicamente, sobre corteza de pino radiata en condiciones naturales en el País Vasco (Iturrirxa 2001; fig. 3.4). Los macroconidios, delgados y de finas paredes, son los típicos del complejo *Gibberella fujikuroi* (fig. 3.5). Los microconidios se producen en mono y polifálides (tipos de células conidiógenas en forma de botella, Herrera & Ulloa 1990) que son similares en estructura a las de *Fusarium subglutinans* (fig. 3.5). Las hifas circinadas (enrolladas), que dan nombre a la especie, se pueden detectar en este medio (fig. 3.3-a) pero son más fáciles de observar en medio SNA.

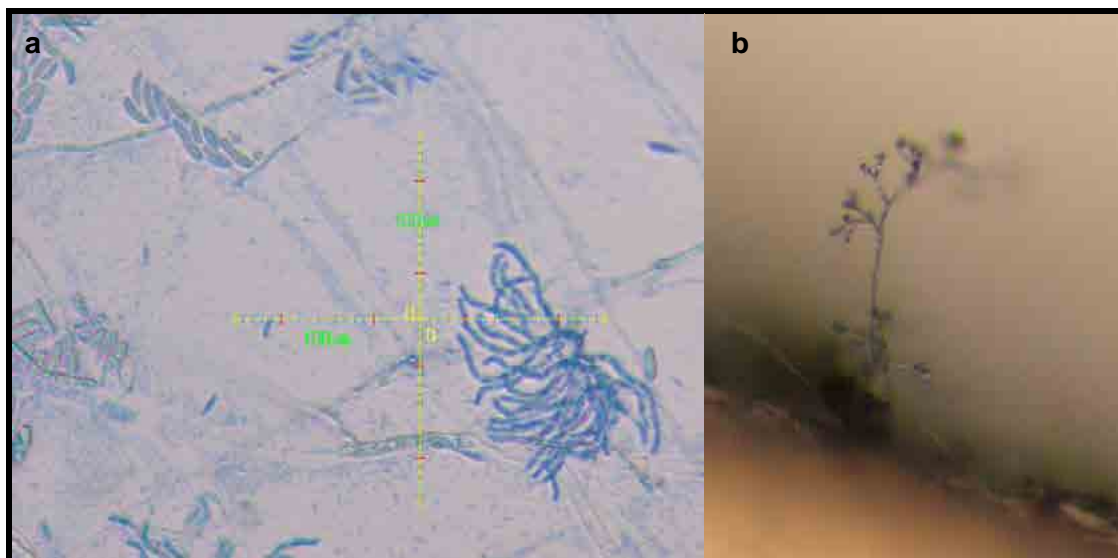


Fig. 3.3. *Fusarium circinatum*, medio CLA: a) Hifas circinadas; b) microconidios agrupados en falsas cabezas.

Medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar)

En este medio se detectan hifas estériles curvadas o circinadas, características de esta especie. El grado de curvatura de las hifas se resalta más en este medio y son mucho más abundantes que en medio CLA. Para observar el resto de características del hongo son más adecuados los medios CLA y PDA.

3.2.3 Macroconidios

Los esporodoquios son masas compactas de hifas cortas que constituyen un estroma en forma de cojinete. En los extremos de dichas hifas (conidióforos) se producen las esporas o conidios (Herrera & Ulloa 1990). Los esporodoquios de *Fusarium circinatum* son difíciles de encontrar aunque pueden detectarse esporádicamente en campo. Lo más frecuente es encontrarlos en cultivo en medio CLA y se distinguen por ser esponjosos y de color rosado (fig. 3.4). Los macroconidios son relativamente finos y muestran tres o cuatro septos casi siempre (fig. 3.5). Las células apicales son curvadas, mientras que las basales están poco desarrolladas. Sus medidas son: (32-)33,7-38,2-42,7(-48) x (3,2-)3,4-3,6-3,7(-3,8) μm (Nirenberg & O'Donnell 1998).

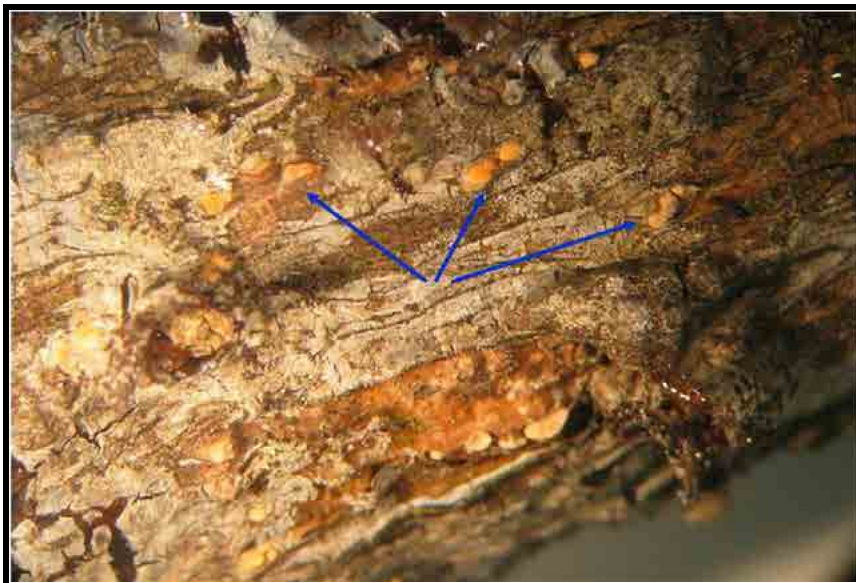


Fig. 3.4. Esporodoquios de *Fusarium circinatum*.

3.2.4 Microconidios

Son ovoides u ovalados y carecen de septos (figs. 3.3-b y 3.5). Se presentan en micelio aéreo de forma aislada o agregados en falsas cabezas. Las células conidiógenas son mono o polifiálides, pudiendo estas últimas aparecer en gran cantidad (fig. 3.5). En cultivos en medios CLA y SNA son abundantes en el micelio aéreo generado. Sus medidas son: (7-)8,5-9,7-10,9(-12) x (2,5-)2,8-3,2-3,6(-3,9) μm (Nirenberg & O'Donnell 1998).

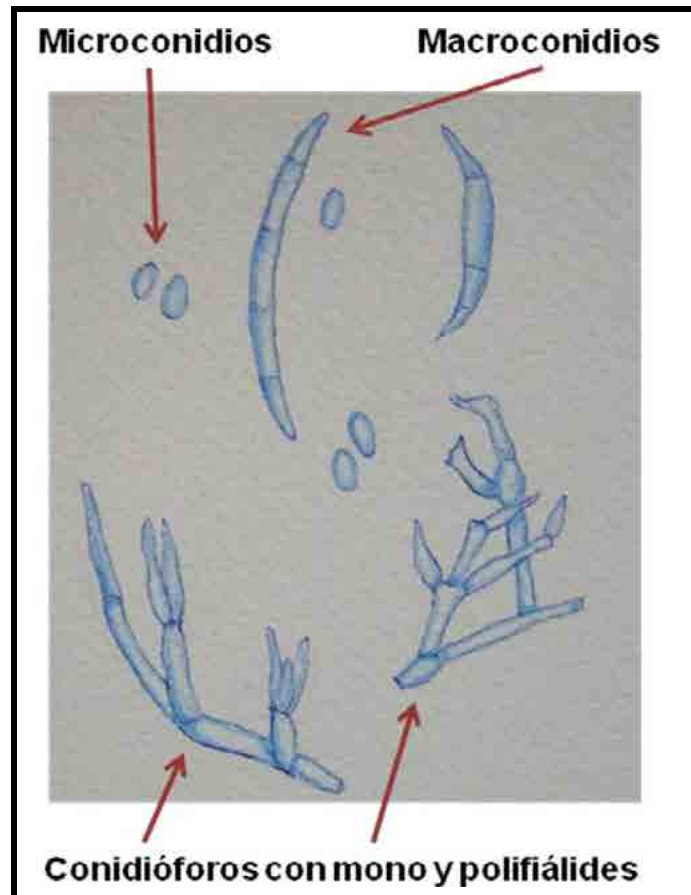


Fig. 3.5. Conidióforos, macroconidios y microconidios de *Fusarium circinatum*.
Dibujante: Araiz Mesanza

3.2.5 Clamidosporas

Las clamidosporas son esporas de origen asexual con una gruesa pared, lo que les permite una larga latencia en espera de desarrollarse en condiciones adecuadas (Herrera & Ulloa 1990). No se encuentran en esta especie, aunque en algunas cepas se producen hifas que pueden parecerse superficialmente a clamidosporas o pseudoclamidosporas.

3.3 Nombre común

La enfermedad producida por *Fusarium circinatum* recibe los siguientes nombres (Hepting & Roth 1946, Iturrityxa 2001):

Castellano: Chancro resinoso del pino, cáncer del pino.
Inglés: Pine pitch canker.

3.4 Síntomas

La diferenciación de síntomas de las dos enfermedades de chancro que estamos estudiando es difícil de establecer en campo. En muchos casos se hace necesaria la identificación en laboratorio para tener la certeza de cuál de los dos hongos es el causante de la enfermedad (Iturrirxa 2001, Pintos et al. 2005).

Fusarium circinatum es uno de los patógenos más destructivos en los pinos. Infecta a diferentes estructuras vegetativas y reproductoras en diferentes estados de madurez y produce gran diversidad de síntomas. De forma general los síntomas son los siguientes: Las acículas se tornan desde amarillas a rojas y caen; la punta de las ramas afectadas, secundarias, terciarias o el eje principal, al principio de la infección se secan (fig. 3.6) y se forman chancros resinosos en estructuras vegetativas (Hepting & Roth 1946, Blakeslee & Oak 1979, Gordon et al. 1998a y 1998b). También las plántulas jóvenes, las piñas y las semillas pueden verse afectadas. Los síntomas del chancro resinoso varían en función de la especie de pino y las prácticas silvícolas llevadas a cabo (Dwinell et al. 1985).



Fig. 3.6. Pino radiata con la punta seca debido a la infección por *Fusarium circinatum*.

3.4.1. Marchitamiento y decoloración de acículas

En *Pinus radiata* las acículas de los pinos en brotes jóvenes y ramas más viejas comienzan a marchitar y pierden su color, tornándose marrones. Pueden permanecer en el árbol durante más de un año decolorándose, llegando a adquirir una coloración marrón grisácea (Ammon & Mukund 2000).

3.4.2. Desección de las guías

El síntoma típico del chancro del pino es la muerte de la guía principal del árbol y/o de ramas secundarias afectadas. Este es el resultado de una lesión que puede estrangular a la rama afectada a la altura del punto de infección y matarla. Aunque el patógeno se desarrolla tanto hacia la parte distal como hacia la parte basal de la planta desde el punto de infección, en algunos casos el crecimiento no se extiende hacia abajo y no ocasiona daños visibles en el resto del árbol. Si se produce la muerte de la guía principal, alguna de las ramas del verticilo superior no afectadas puede adquirir la dominancia. La enfermedad se puede extender, tras repetidas infecciones, a la nueva guía. Con el tiempo se puede ocasionar una copa con una amplia muerte de ramas (Dwinell et al. 1985, Kraus & Witcher 1977).

Los nuevos crecimientos desarrollados por encima del punto de infección, rápidamente marchitan, tornándose marrones y muriendo. Las ramas de 1^{er} y 2^o orden de la parte superior del árbol se encuentran frecuentemente afectadas. La muerte de la punta es común en *Pinus elliotii* var. *elliotii*, *P. taeda*, *P. echinata*, *P. clausa* y *P. radiata* (Correll et al. 1991).

En México el chancro resinoso produce la muerte de las ramas y brotes en especies como *Pinus douglasiana*, *P. leiophylla* y *P. arizonica* var. *stormiae* (Guerra-Santos & Tovar 1991). En las islas de Japón Amamioshima y Okinawa se ha observado muerte de la guía en *Pinus luchuensis* (Muramoto et al. 1988, Muramoto & Dwinell 1990).

3.4.3. Formación de chancros y exudados de resina

Este hongo provoca la aparición de chancros (fig. 3.7), dando el nombre común a la enfermedad. Los chancros se localizan en áreas donde el tejido de la planta ha sido destruido por el hongo. Pueden formarse en pequeñas ramas, ramas gruesas e incluso en el tronco principal de los pinos. Estos permanecen cubiertos por la corteza del árbol. Brotes y ramas mueren debido a los chancros formados en el tejido vegetal. Los chancros inferiores en el tronco pueden ocasionar la muerte del árbol completo por estrangulamiento (Blakeslee et al. 1980, Correll et al. 1992).

Una característica de esta enfermedad es que el tejido leñoso por debajo de donde se localiza el chancro está empapado en resina, dando a la madera una apariencia oscura. Esta característica es la que le ha dado el nombre de chancro resinoso (Blakeslee et al. 1980).

Los chancros resinosos en *Pinus elliotii* var. *elliotii* son frecuentes en árboles de huertos semilleros, y se asocian con la sacudida de estos para la recogida de la

piña (Dwinell & Phelps 1977). Los chancros en el tronco son muy comunes en *Pinus radiata*, *P. virginiana*, *P. palustris* y *P. strobus* (Correll et al. 1991).

En México el chancro en los troncos se produce en especies como *Pinus pseudostrobus* (= *P. estevezii*) (Guerra-Santos & Tovar 1991). En las islas de Japón Amamioshima y Okinawa, *Pinus luchuensis* se ve afectado también por resinación en los troncos (Muramoto et al. 1988, Muramoto & Dwinell 1990).

En el abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) las exudaciones de resina no se asocian a las infecciones por chancro resinoso. En este caso se forma un tejido calloso sobre la infección (Adams 1989, Storer et al. 1994a). En cambio sí se produce la desecación de las guías (Storer et al. 1995).



Fig. 3.7. Chancros sobre troncos de pino radiata causados por *Fusarium circinatum*.

3.4.4. Piñas y semillas

La infección por *Fusarium circinatum* causa la muerte de estróbilos femeninos y piñas maduras, deteriora las semillas de varias especies de pino y causa mortalidad de plántulas en vivero (Mc Cain et al. 1987).

La contaminación de piñas de *Pinus echinata* y *P. radiata* en una inspección superficial parece ser externa y afectar sólo a la superficie de las escamas. Pero un análisis más exhaustivo ha detectado contaminación en algunos lotes de semillas, por lo que se ha demostrado que el hongo tiene la facultad de penetrar en el interior de las piñas (Dwinell 2001).

3.4.5 Raíz

En Sudáfrica el hongo causa una severa enfermedad de raíz en plántulas de *Pinus patula* en viveros forestales. La raíz se seca y no permite la absorción de agua produciendo la muerte de las plántulas (Wingfield et al. 1999).

3.5 Diferencias entre síntomas generados por *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum*

En campo es posible la aparición de las dos enfermedades juntas en una misma zona o incluso en un mismo árbol (Iturrutxa 2001). Esta circunstancia hace que los síntomas que generan estas dos especies en campo puedan confundirse. La identificación del agente causal puede basarse en algunos casos en la detección de picnidios (*Diplodia pinea*) o bien de esporodoquios (*Fusarium circinatum*). Sin embargo, las estructuras formadoras de esporas no siempre estarán presentes, aún cuando la infección por cualquiera de los dos agentes esté bien desarrollada. El resto de síntomas como ramas secas, chancros, brotes marchitos o decoloración de acículas no son lo suficientemente característicos como para asegurar con certeza si se trata de una enfermedad u otra. Teniendo en cuenta que las dos enfermedades pueden aparecer juntas es necesario en todos los casos confirmar la identificación preliminar con análisis de laboratorio.

Las muestras se dividen y cultivan en cámara húmeda y medio PDA. En cámara húmeda se desarrollan fácilmente picnidios y conidios que permiten la identificación de *Diplodia*. Para la identificación a nivel de especie se utilizan marcadores moleculares (ver capítulo 4). La coloración de los micelios permite diferenciar claramente *Diplodia pinea* del género *Fusarium*. Si aparece micelio característico de *Fusarium* (ver este capítulo más arriba) se transfiere a medio CLA en el que se desarrollan las características necesarias para identificarlo a nivel de especie (hifas circinadas).

En madera cortada, el azulamiento de los troncos no se da en ningún caso debido a *Fusarium circinatum*. En estos casos se podría establecer que el causante es *Diplodia pinea*, pero hay otro tipo de hongos (Ophiostomatales) que pueden generar este tono azulado en la madera, por lo que de nuevo es necesario comprobar la enfermedad con técnicas de laboratorio (Iturrutxa 2001).

3.6 Daños

3.6.1 Daños en plantaciones y poblaciones nativas

Fusarium circinatum causa la reducción del crecimiento y una alta mortalidad en poblaciones naturales de pino radiata y repoblaciones de otras especies de pino en el sur y el oeste de Estados Unidos (Gordon 2006). La mayoría de especies de pino con interés comercial son susceptibles a *Fusarium circinatum* por lo que el impacto económico que puede suponer su irrupción en repoblaciones forestales puede generar grandes pérdidas. Debido a la gravedad de los daños que produce esta enfermedad, preocupa que *Fusarium circinatum* se disperse por zonas en las que *Pinus radiata* es una especie nativa o donde se ha establecido como especie exótica, tanto en plantaciones como viveros (Aegerter et al. 2003). De hecho, lo primero ya ha ocurrido y *Fusarium circinatum* es en la actualidad el principal problema sanitario de la masa original de pino radiata en California, poniendo en peligro de extinción las poblaciones naturales de esta especie (Storer et al. 1995, Farjon 2010).

La oficina de la Bahía de Monterrey de la Sociedad de Vegetación Nativa de California ha solicitado al Departamento de Pesca y Caza del Estado de California, incluir el pino de Monterrey nativo (*Pinus radiata* D. Don) dentro de la lista de especies amenazadas, debido a una alarmante disminución de sus poblaciones. Una de las principales razones para la inclusión de esta especie en tal lista es la enfermedad del chancro resinoso. Solamente un 3% de la población nativa de *Pinus radiata* se supone resistente al patógeno y un 85% de su superficie se encuentra en zonas afectadas. (Rogers 2002, Gordon 2006, Farjon 2010).

En cuanto a los problemas económicos que plantea o puede plantear en las áreas de cultivo de pinos susceptibles, puede mencionarse el ejemplo de Sudáfrica, cuyas repoblaciones de pino constituyen el 50% de la industria forestal (Roux et al. 2007), y en las que se ha detectado este parásito en 2007 (Porter et al. 2009). Anteriormente sólo se consideraba una enfermedad de viveros forestales, donde producía serias pérdidas económicas (Viljoen et al. 1994). El paso de la enfermedad desde viveros a repoblaciones supone una gran preocupación, por la gran mortalidad que provoca en los árboles. Este hecho generaría un gran impacto negativo en la rentabilidad de estas repoblaciones (Coutinho et al. 2007). Esta preocupación por las posibles pérdidas económicas se manifiesta también en otros países donde se ha detectado el hongo, como Japón, Chile y España (Kobayashi & Muramoto 1989, Iturrutxa 2001, Wingfield et al. 2002).

En Australia y Nueva Zelanda, donde no se ha detectado la enfermedad, se estima que las pérdidas económicas que podría causar la irrupción de *Fusarium circinatum* en sus repoblaciones de pino, supondrían pérdidas de hasta un 20% de la producción de madera (Gadgil et al. 2003).

3.6.2 Daños en semillas de pino y vivero

La incidencia de este hongo en la superficie de la semilla de pino es muy variable según las zonas y las especies de pino. Entre los principales daños asociados a esta enfermedad, se produce un deterioro de las semillas que se localiza en la testa y también en su interior, aunque aquí en menor medida, afectando al gametofito y al tejido embrionario (Anderson et al. 1984, Dwinell 2001 y 2004).

Ensayos realizados con tratamientos superficiales de semillas infectadas con *Fusarium circinatum* hacen pensar que esta afección es un tanto superficial, ya que se elimina con dichos tratamientos. Se sugiere que pueden descontaminarse mediante la aplicación de una solución de agua oxigenada al 20 % durante 5 minutos (Dwinell 2001 y 2004). Los fungicidas Benomilo y Tiram también son tratamientos eficaces. Sin embargo, hay casos en los que se ha detectado infección en el embrión de la semilla por lo que los tratamientos anteriores no mostrarían una eficacia total (Iturrutxa et al. 2001).



Fig. 3.8. Plántulas de pino radiata dañadas por *Fusarium circinatum* en un vivero.

3.7 Hospedadores

Hasta la fecha *Fusarium circinatum* se ha encontrado en unas cuantas especies del género *Pinus* y en una especie del género *Pseudotsuga*. En las tablas siguientes (tablas 3.1 y 3.2) se listan algunos de estos hospedadores en los cuales se ha probado que *Fusarium circinatum* puede manifestarse (Storer et al. 1995, Dwinell 1999, Gordon et al. 2001, Aegerter et al. 2003, Gadgil et al. 2003). Los nombres han sido actualizados (entre paréntesis) según Farjon (2001 y 2010).

Tabla 3.1. Especies del género <i>Pinus</i> subgénero <i>Pinus</i> susceptibles a <i>Fusarium circinatum</i>	
Sect. <i>Pinus</i>	
Subsect. <i>Pinaster</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus canariensis</i> • <i>P. halepensis</i> • <i>P. pinaster</i> • <i>P. pinea</i> 	Subsect. <i>Pinus</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus densiflora</i> • <i>P. luchuensis</i> • <i>P. nigra</i> • <i>P. sylvestris</i> • <i>P. thunbergii</i>
Sect. <i>Trifolius</i>	
Subsect. <i>Contortae</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus clausa</i> • <i>P. contorta</i> • <i>P. virginiana</i> 	Subsect. <i>Australes</i> (cont.) <ul style="list-style-type: none"> • <i>P. caribaea</i> var. <i>caribaea</i> • <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> • <i>P. echinata</i> • <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> • <i>P. elliotii</i> var. <i>densa</i> • <i>P. greggii</i> • <i>P. herrerae</i> • <i>P. jaliscana</i> • <i>P. leiophylla</i> • <i>P. muricata</i> • <i>P. occidentalis</i> • <i>P. oocarpa</i> • <i>P. palustris</i> • <i>P. patula</i> • <i>P. pringlei</i> • <i>P. pungens</i> • <i>P. radiata</i> • <i>P. radiata</i> var. <i>binata</i> • <i>P. radiata</i> x <i>attenuata</i> • <i>P. rigida</i> • <i>P. serotina</i> • <i>P. taeda</i> • <i>P. tecunumanii</i>
Subsect. <i>Ponderosae</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus arizonica</i> • <i>P. coulteri</i> • <i>P. devoniana</i> • <i>P. douglasiana</i> • <i>P. durangensis</i> • <i>P. estevezii</i> (= <i>P. pseudostrobus</i>) • <i>P. hartwegii</i> • <i>P. maximinoi</i> • <i>P. michoacana</i> (= <i>P. devoniana</i>) • <i>P. montezumae</i> • <i>P. oaxacana</i> (= <i>P. pseudostrobus</i> v. <i>apulcensis</i>) • <i>P. ponderosa</i> • <i>P. pseudostrobus</i> • <i>P. rudis</i> (= <i>P. hartwegii</i>) • <i>P. sabiniana</i> • <i>P. torreyana</i> 	
Subsect. <i>Australes</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus attenuata</i> • <i>P. caribaea</i> var. <i>bahamensis</i> 	

Tabla 3.2. Especies de <i>Pinus</i> subgénero <i>Strobus</i> y <i>Pseudotsuga</i> susceptibles a <i>Fusarium circinatum</i>	
<i>Pinus</i> subg. <i>Strobus</i>	
Sect. <i>Parrya</i> Subsect. <i>Cembroides</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus cembroides</i> • <i>P. discolor</i> (= <i>P. cembroides</i> var. <i>bicolor</i>) 	Sect. <i>Quinquefolius</i> Subsect. <i>Strobi</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pinus ayacahuite</i> • <i>P. strobus</i>
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	

3.8 Distribución

La enfermedad del chancro resinoso de los pinos asociada al hongo *Fusarium circinatum* se ha citado en varios países a lo largo del mundo (fig. 3.9, basada en Hepting & Roth 1953, Kobayashi & Muramoto 1989, Viljoen et al. 1994, Lee et al. 2000, Britz et al. 2001, Wingfield et al. 2002, Landeras et al. 2005, Carlucci et al. 2007, Bragança et al. 2009).

África: Sudáfrica.

América: Chile, Estados Unidos, Haití, México.

Asia: Corea del Sur, Japón.

Europa: España, Italia, Portugal.

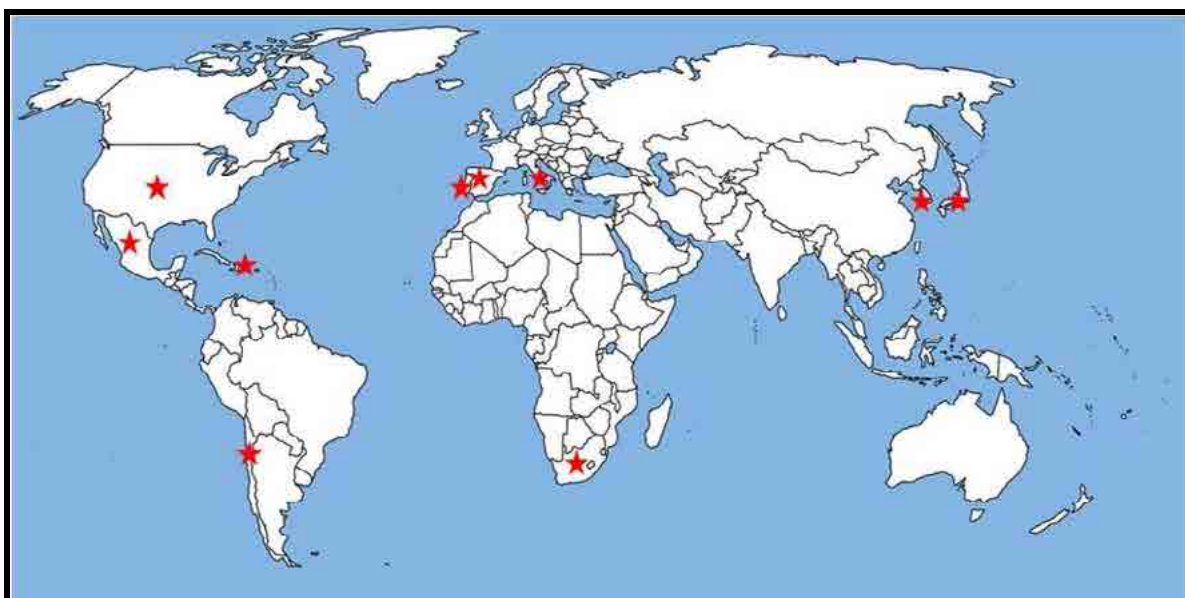


Fig. 3.9. Países en los que se ha detectado presencia de *Fusarium circinatum*.

3.8.1 Historia de la detección del chancro resinoso

Hasta los años 80 la enfermedad del chancro resinoso se encontraba localizada en el sureste de los Estados Unidos, en Carolina del Norte sobre *Pinus virginiana*, donde fue hallada por primera vez en 1945 y en Haití, donde fue descubierta en 1953 sobre *P. occidentalis*. (Hepting & Roth 1946 y 1953, Berry & Hepting 1959). Pero a partir de la segunda mitad de 1980 comienza a detectarse su expansión a otros lugares, asociada a las plantaciones de pinos. Desde 1986 se considera una importante enfermedad en California, a raíz de su descubrimiento en el condado de Santa Cruz sobre *Pinus radiata* (Storer et al. 1994a). En 1987 se registra en Japón sobre *Pinus luchuensis* en las islas de Amamiyoshima y Okinawa (Kobayashi & Muramoto 1989). En el mismo año se detecta en México (Rodríguez 1989). Desde entonces se ha detectado en 19 especies de pino en la zona central de México (Guerra-Santos 1999).

En California la enfermedad está presente en los bosques nativos de pino radiata, en las plantaciones costeras de la misma especie, e incluso en algunos árboles utilizados como pinos de navidad (Storer et al. 1994a, Gordon et al. 2001). El chancro resinoso aparece circunscrito a las zonas costeras californianas, con la excepción de una única localidad en Sierra Nevada donde el hospedador era *Pseudotsuga menziesii* (Vogler et al. 2004).

Además de en California en el oeste y Carolina del Norte en el sureste, en Estados Unidos ha ido apareciendo en varios estados más del sureste, en los que permanece como un problema crónico de plantaciones y viveros de pinos. Estos estados son Alabama, Arkansas, Carolina del Sur, Florida, Georgia, Luisiana, Misisipi, Tennesi, Texas y Virginia (Dwinell et al. 1985, Wingfield et al. 2008). Se esperaba que la enfermedad llegara incluso a Canadá pero hasta la actualidad no se tiene constancia de ello. Como dato más reciente, el Ministerio de Agricultura y Montes de Nueva Zelanda, (MAF, New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry) con fecha de 29 de abril de 2010 ha declarado segura la importación de materiales de reproducción desde Canadá, entre otros países, respecto a *Fusarium circinatum* (MAF 2010).

En 1990, se registró en Sudáfrica un patógeno que provocaba podredumbre radicular en plántulas de *Pinus patula* de vivero y que se identificó como *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* (Viljoen et al. 1994, Viljoen et al. 1997a y 1997b). También en plantas de vivero de *Pinus radiata*, se ha citado en Chile (Wingfield et al. 2002). En estos dos países se consideraba hasta fechas recientes que el patógeno, aún estando bien establecido en plantas de vivero, todavía no había pasado a campo (Viljoen et al. 1995, Wingfield et al. 2002). Sin embargo, Porter et al. (2009) indican que ya se ha encontrado un punto de infección de esta enfermedad sobre *Pinus radiata* en campo en Sudáfrica.

En países como Corea del Sur, Italia y Portugal la detección de *Fusarium circinatum* ha sido más reciente (Lee et al. 2000, Carlucci et al. 2007, Bragança et al. 2009).

3.8.2 Chancro resinoso en España

En España se ha citado secuencialmente, en diferentes regiones, dependiendo de la dedicación de los laboratorios locales de diagnóstico a la detección de la enfermedad. La primera cita corresponde a Galicia, en ejemplares de *Pinus radiata* y *P. halepensis* de vivero, en 1995 (Collar-Urquijo 1995). En 1998 se detectó en el País Vasco en *Pinus radiata*, en viveros con planta a raíz desnuda (Dwinell et al. 1998, Dwinell 1999, Ridley & Dick 2000). Landeras et al. (2005) la citan en viveros de Asturias, sobre *Pinus radiata*, *P. pinaster* y *P. sylvestris*. La primera observación en plantaciones del País Vasco se hizo en 2004, en *Pinus radiata* (Iturritxa et al. 2011).

En el norte de España el chancro resinoso representa una seria amenaza para las plantaciones comerciales de coníferas como *Pinus radiata*, *P. pinaster*, *Pseudotsuga menziesii*, etc. y para las poblaciones nativas de *Pinus pinaster* y *P. sylvestris* (Landeras et al. 2005). La presencia de esta enfermedad y su asociación con insectos de la madera es una seria amenaza para la industria forestal del País Vasco (Romón et al. 2007). Pérez-Sierra et al. (2007) muestrearon poblaciones de *Fusarium circinatum* sobre *Pinus radiata*, *P. nigra*, *P. pinaster* y *P. sylvestris* en Galicia, Asturias y Cantabria. En los estudios de caracterización detectaron los dos tipos MAT. Esto es un riesgo adicional puesto que el hongo podría recombinarse en la naturaleza y aumentar su capacidad de infección (Wikler et al. 2000, Britz et al. 2005)

3.9 Infección

Fusarium circinatum parece que no tiene la capacidad de infectar tejido sano. Sin embargo, cuando el hongo es capaz de colonizar al hospedador a través de alguna herida, puede extenderse a todas las partes del árbol a partir del punto de infección (Blakeslee et al. 1978a, Correll et al. 1991).

Kuhlman et al. (1982) demostraron que las plantas con heridas pueden ser infectadas por conidios transportados por vía aérea. En un estudio con plántulas de *Pinus elliotii* y *P. taeda*, heridas y situadas bajo árboles infectados de un huerto semillero, un 52% desarrollaron chancro resinoso. Por el contrario, no observaron la enfermedad en las plántulas de control no heridas.

A pesar de que *Fusarium circinatum* no produce clamidosporas, puede sobrevivir en el suelo durante al menos 12 meses y causar problemas, tanto en pre-como en post-emergencia de las plántulas (Viljoen et al. 1994). Debido a esta capacidad de permanecer en el suelo puede actuar como un patógeno de raíces (Dwinell et al. 1985, Gordon 1999).

A partir del punto de infección *Fusarium circinatum* crece intercelularmente a través del córtex de forma bastante rápida. El patógeno ataca las células del parénquima a lo largo y ancho del tallo, causando aberturas en el córtex y médula. La infección en el córtex en *Pinus virginiana* y *P. elliotii* tiende a ser difusa. Pero en *Pinus taeda* y *P. serotina* las áreas infectadas están rodeadas de un peridermo que crea una apariencia de lesión discreta tratando de confinar la infección. Aunque en algunas especies este peridermo se muestre efectivo en la contención, en los casos de *Pinus taeda* y *P. serotina* el hongo es capaz de continuar la infección. Las paredes de las células de la médula se lignifican y se observan primordios de esporodoquios en las

axilas de yemas que emergen directamente debajo de un brote muerto (Barrows-Broadus & Dwinell 1983).

3.9.1 Vías de dispersión

3.9.1.1 Viento

Fusarium circinatum genera esporoquios en los tejidos infectados y esporula durante todo el año. Los conidios se dispersan por el viento durante tiempo húmedo. Son producidos en los esporoquios y se pueden dispersar debido a las salpicaduras de agua que pueden transportarlos al aire. La frecuencia en la formación de esporoquios varía según las especies de pino afectadas (Blakeslee & Rockwood 1978, Correll et al. 1991). Los máximos de dispersión aérea de los conidios suceden cuando se producen precipitaciones acompañadas de fuertes vientos. Los conidios así dispersados pueden iniciar nuevas infecciones en ramas y brotes dañados (Blakeslee et al. 1978a). Esta vía de infección se considera rara en las masas de *Pinus radiata* de California (Gordon 2006).

3.9.1.2 Insectos

Los insectos pueden desarrollar un papel importante en la diseminación de los conidios. En California se consideran el principal agente transmisor de la enfermedad en *Pinus radiata* (Fox et al. 1990 y 1991, Hoover et al. 1995 y 1996). Matthews (1962) relacionó brotes cíclicos de chancro resinoso en *Pinus elliotii* con daños producidos por una polilla del género *Rhyacionia*. En Florida, el curculiónido *Pissodes nemorensis* traslada el hongo de forma natural y es capaz de generar la enfermedad al atacar plántulas de *Pinus elliotii* (Blakeslee et al. 1978b).

Los conidios pueden viajar en la superficie de los cuerpos de varias especies de insectos y transmitir la enfermedad. Hasta el momento, *Fusarium circinatum* ha sido aislado a partir de los insectos mostrados en la tabla 3.3. (Matthews 1962, Blakeslee et al. 1978b, Kuhlman et al. 1982, Correll et al. 1991, Storer et al. 1994b y 1995, Dallara et al. 1995, Hoover et al. 1995 y 1996, Romón et al. 2007).

Estudios realizados en parcelas urbanas en California muestran la tendencia que tienen muchos árboles a mantener una leve afección antes de que alguno de ellos esté visiblemente dañado. Este modelo se explica con la hipótesis del papel de los insectos como vectores de la enfermedad, al herir y de ese modo inocular ramas jóvenes más o menos al azar. Los insectos no muestran predilección por un tipo de árbol en concreto. De este modo, cuando la mayor parte de los árboles están libres de la enfermedad, hay una gran probabilidad de que una nueva rama de ese árbol sea infectada. Esto supone que muchos árboles pueden tener ramas infectadas sin haber desarrollado la enfermedad de forma patente (Deghi et al. 1995, Hoover et al. 1995 y 1996).

Orden Coleoptera	
Familia Scolytidae (Barrenillos de las cortezas)	Familia Anobiidae (Carcomas)
<i>Conophthorus radiatae</i>	<i>Ernobius punctulatus</i>
<i>Dendroctonus valens</i>	Familia Colydiidae
<i>Hylastes attenuatus</i> (fig. 3.10-b)	<i>Lasconotus nucleatus</i>
<i>Hylurgops palliatus</i>	<i>L. pertenuis</i>
<i>Hypothenemus eruditus</i>	Familia Curculionidae (Gorgojos)
<i>Ips mexicanus</i>	<i>Brachyderes incanus</i>
<i>I. paraconfusus</i>	<i>Orthotomicus erosus</i>
<i>I. plastographus</i>	<i>Pissodes nemorensis</i>
<i>I. sexdentatus</i> (fig. 3.10-a)	<i>P. radiatae</i>
<i>Pityophthorus carmeli</i>	Orden Lepidoptera
<i>P. nitidulis</i>	Familia Olethreutidae
<i>P. pubescens</i>	<i>Rhyacionia</i> spp.
<i>P. pulchellus</i>	Familia Sesiidae (Sesias)
<i>P. setosus</i>	<i>Synanthedon sequoiae</i>
	Orden Hemiptera
	Familia Cercopidae (Chinches espumadoras)
	<i>Aphrophora canadensis</i>

Tabla 3.3. Insectos asociados a la dispersión de esporas de *Fusarium circinatum*.

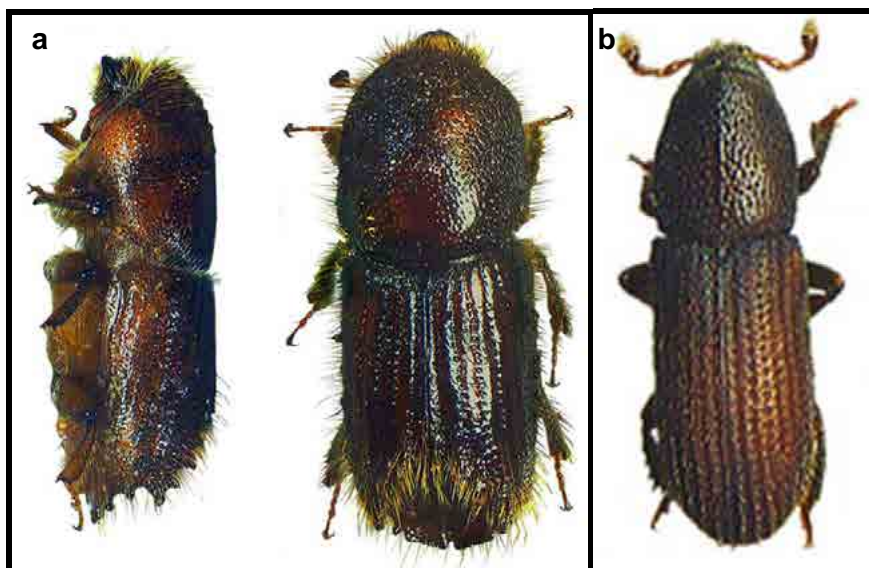


Fig. 3.10. a) *Ips sexdentatus*; b) *Hylastes attenuatus*.

3.9.1.3 Factores humanos

En California se ha observado una distribución lenta y gradual del hongo a partir de áreas infectadas inicialmente. Pero la localización de la enfermedad en zonas muy lejanas y aisladas de los centros importantes de infección parece indicar el transporte de forma asistida por medios humanos. Entre estos podrían estar la madera para leña, corteza de pino para jardinería, árboles de navidad, etc. (Owen & Adams 1999).

Por otra parte, Gadgil & Flint (1983) realizaron un estudio en el que demostraban que hongos patógenos e insectos podían ser transportados en material de acampada de unas zonas a otras, de manera que no puede descartarse este potencial mecanismo de expansión.

El suelo puede ser un agente de dispersión de la enfermedad porque puede adherirse al calzado, a maquinaria, a vehículos y a la superficie de contenedores de planta mal limpiados (Gadgil et al. 2000).

Las semillas pueden ser otro mecanismo de dispersión del hongo. Storer et al. (1998) realizaron una serie de ensayos en los que consiguieron aislar *Fusarium circinatum* de la superficie de semillas extraídas de piñas aparentemente sanas de *Pinus radiata*. En el caso de piñas enfermas extrajeron semillas de las que aislaron el hongo, tanto de la superficie como del interior. También aislaron el hongo de plántulas germinadas a partir de semillas extraídas de piñas aparentemente sanas.

Cuando la recolección de semilla se hace de árboles en apariencia sanos pero en áreas afectadas por la enfermedad, el hongo puede permanecer latente y no manifestarse hasta que las plántulas nacen en el vivero (Iturrity et al. 2001).

Gadgil et al. (2003), en el plan de manejo que han desarrollado para el hipotético caso de que esta enfermedad llegara a Australia y Nueva Zelanda, llaman también la atención sobre las posibles formas de dispersión del hongo que englobarían factores humanos (semillas, suelo, coches, equipamiento de acampada), insectos, viento, etc.

3.9.2 Ciclo de la enfermedad

En la fig. 3.10. mostramos el ciclo de la enfermedad con las principales fuentes y vías de dispersión del hongo *Fusarium circinatum*.

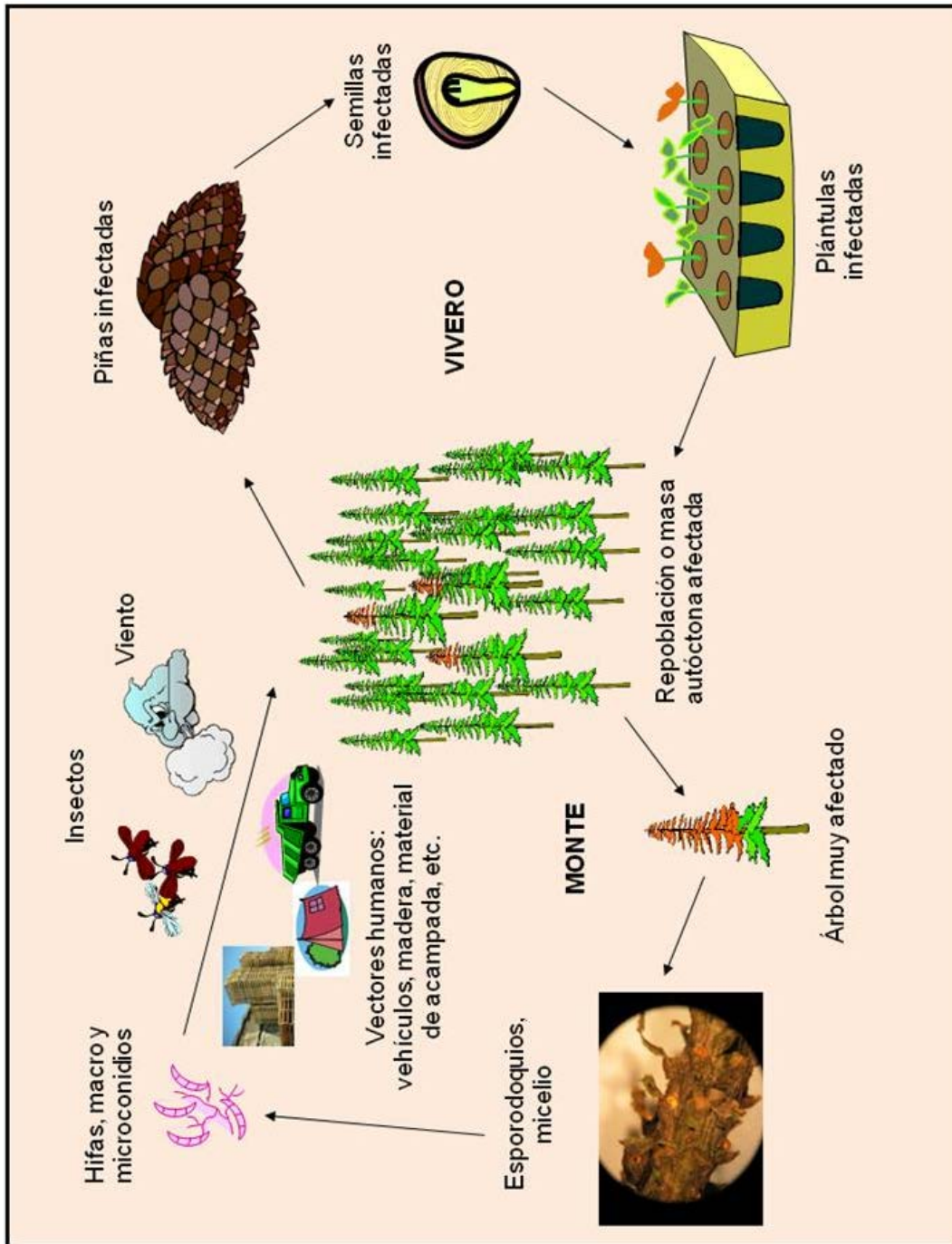


Fig. 3.11. Ciclo de la enfermedad generada por *Fusarium circinatum*.

4. CARACTERIZACIÓN DE *Diplodia pinea* EN EL PAÍS VASCO



Determinación de grupos de compatibilidad vegetativa

4. CARACTERIZACIÓN DE *Diplodia pinea* EN EL PAÍS VASCO

4.1 Introducción

La diversidad genotípica de una población es un parámetro importante para guiar el desarrollo de futuras estrategias de gestión. En el capítulo 2 ya hemos mencionado la existencia de cierta variabilidad en las poblaciones de *Diplodia pinea*, que se traduce en los llamados morfotipos, descritos en base a las características morfológicas de las colonias, y cuyo estudio dio lugar a la descripción de *Diplodia scrobiculata*, taxón muy próximo al que aquí nos ocupa. En el presente capítulo trataremos de explorar más profundamente la posible diversidad existente en *Diplodia pinea*, utilizando no solo las características de crecimiento de las colonias, sino también los llamados Grupos de Compatibilidad Vegetativa.

La diversidad siempre se crea por mutación, pero en organismos sexuales se incrementa gracias al proceso de recombinación meiótica. Por su parte, los organismos asexuales como los hongos mitospóricos, en principio de propagación clónica, pueden mantener ciertos niveles de diversidad gracias a mutaciones que diferencian unas líneas clonales de otras, o bien por procesos de parasexualidad. En muchos hongos, cuando las hifas –tanto de la misma colonia como de colonias distintas– contactan entre ellas, fusionan sus paredes en el punto de contacto (anastomosis) e intercambian núcleos o material citoplasmático. A partir de aquí pueden formarse hifas heterocariontes (con dos núcleos genéticamente diferentes en el mismo citoplasma) o, si ambos núcleos se fusionan temporalmente (diploidización) y sufren una ulterior haploidización, puede formarse un núcleo genéticamente distinto de los dos originales por medio de procesos de entrecruzamiento mitótico. Este fenómeno, capaz de crear diversidad genética por medios asexuales, se denomina parasexualidad. Fue descubierto en los años 60 en *Aspergillus nidulans*, y se ha convertido en una poderosa herramienta para la creación de nuevas variedades de interés industrial, aunque no se conoce con suficiente precisión su alcance en las poblaciones silvestres (Deacon 1997).

Sin embargo, no siempre son posibles las anastomosis entre hifas de la misma especie. En muchos casos se observa una incompatibilidad post-fusión entre hifas que hace que, tras la fusión de las paredes, mueran los citoplasmas anastomosados junto con algunos de los adyacentes. El proceso va acompañado por un depósito de compuestos, gracias a lo cual puede percibirse a simple vista una línea oscura que marca el contacto entre las dos colonias incompatibles. Este fenómeno, muy extendido entre los hongos mitospóricos, se denomina incompatibilidad vegetativa, y está gobernado por genes de compatibilidad, con un número variable de alelos en el locus de compatibilidad (incompatibilidad alélica; Carlile et al. 2001). Así pues, estos genes actúan como una barrera efectiva frente a la heterocariosis y la parasexualidad, permitiéndola únicamente entre colonias próximas genéticamente, que comparten los mismos alelos de compatibilidad. Tales colonias se dice que forman parte del mismo Grupo de Compatibilidad Vegetativa (VCG).

La determinación de los VCG se ha convertido en una herramienta útil para estimar la diversidad genética y se ha utilizado ampliamente para determinar la variabilidad en poblaciones de hongos mitospóricos (Proffer & Hart 1988, Adams et al. 1990, Leslie 1993, Meijer et al. 1994, Mc Donald 1997, Smith et al. 2000).

La caracterización de los Grupos de Compatibilidad Vegetativa existentes en *Diplodia pinea* en el País Vasco, además de servirnos para la estimación de su diversidad genotípica, también es útil para la detección de potenciales entradas de nuevos genotipos procedentes de otras regiones, un dato de importancia primordial para el desarrollo de estrategias de gestión. Durante los últimos años la necesidad de semilla de *Pinus radiata* para repoblaciones forestales ha supuesto la importación desde países como Chile y Nueva Zelanda al no poder cubrirse la demanda con material del País Vasco. A pesar de que *Diplodia pinea* es un organismo ampliamente distribuido, con este trabajo también queremos determinar si en el País Vasco hemos sufrido nuevas introducciones de cepas de *Diplodia pinea* en viveros y plantaciones, ya que su presencia se ha detectado en semillas recolectadas en plantaciones y en semillas importadas de Nueva Zelanda y Chile (Iturrutxa et al. 2001).

4.1.1 Objetivos

Así pues, los objetivos de este estudio son los siguientes:

- Precisar la identificación taxonómica de los hongos implicados en los síntomas atribuidos a *Diplodia pinea* en las plantaciones de coníferas del País Vasco.
- Conocer la estructura y variabilidad genética existente en la población de *Diplodia pinea* en el País Vasco.
- Caracterizar, desde el punto de vista morfológico y de su patogenicidad en *Pinus radiata*, los Grupos de Compatibilidad Vegetativa que existan en *Diplodia pinea* en el País Vasco.
- Detectar la posible entrada en nuestro territorio de nuevas cepas del hongo. Este conocimiento es muy importante para poder establecer estrategias efectivas de control de la enfermedad.

4.2 Material y métodos

4.2.1 Muestreo

Las cepas de *Diplodia pinea* se obtuvieron de diferentes especies de pino, aunque la mayoría se colectaron en *Pinus radiata*. El área de muestreo se localizó principalmente en la zona cantábrica del País Vasco, área en la que *Pinus radiata* ocupa unas 145.000 ha y se considera la principal especie forestal desde el punto de vista económico (Michel 2004, IKT 2005). Además, también se obtuvo alguna cepa en área mediterránea del País Vasco y la empresa Gestión Ambiental Viveros y Repoblaciones de Navarra nos cedió material infectado de *Pinus radiata* de la zona noroeste de Navarra. También se han utilizado en el estudio cepas del hongo aisladas de semillas de *Pinus radiata* importadas desde Chile y Nueva Zelanda.

Los puntos de muestreo se localizaron siguiendo los trazados de pistas forestales tratando de detectar masas de árboles afectados. En zonas sin síntomas aparentes se recolectaban muestras para su procesamiento en laboratorio. El carácter saprófito de *Diplodia pinea* y su capacidad para mantenerse en el hospedador sin producir síntomas (Stanosz et al. 2001 y 2005) supone que se puede detectar en zonas sin daños. En la mayoría de estos casos se detectaron piñas con picnidios aunque no se detectaran daños en los árboles.

En el caso de detectarse zonas afectadas, el muestreo se orientaba hacia árboles con síntomas de decaimiento y se intensificaba la recolección de muestras para detectar el máximo número posible de hongos patógenos incidiendo, sobre todo, en los de chancro. El periodo de muestreo se extiende desde 2004 hasta 2008. Las muestras se recolectaron de piñas o de ramas dependiendo de los síntomas y de la disponibilidad del material.

La recolección de muestras se ha realizado mediante un muestreo jerárquico de tres niveles: área, plantación y árbol (Smith et al. 2000; fig. 4.1).

El nivel de área se compuso de 100 muestras de diferentes localidades en el País Vasco. Para el segundo nivel, plantación, se seleccionaron 10 árboles de una misma plantación en el paraje de Somokurtzio en el municipio de Zalla en Bizkaia y se recogió una muestra por cada árbol (fig. 4.9). Para el nivel jerárquico de árbol se seleccionó un ejemplar con síntomas de la enfermedad en esta misma plantación. Se recogieron 14 muestras desde la copa hasta las ramas afectadas más bajas (una muestra de la punta, 2 en el siguiente verticilo, 3 en el siguiente y 4 en cada uno de los dos más bajos; fig. 4.10).

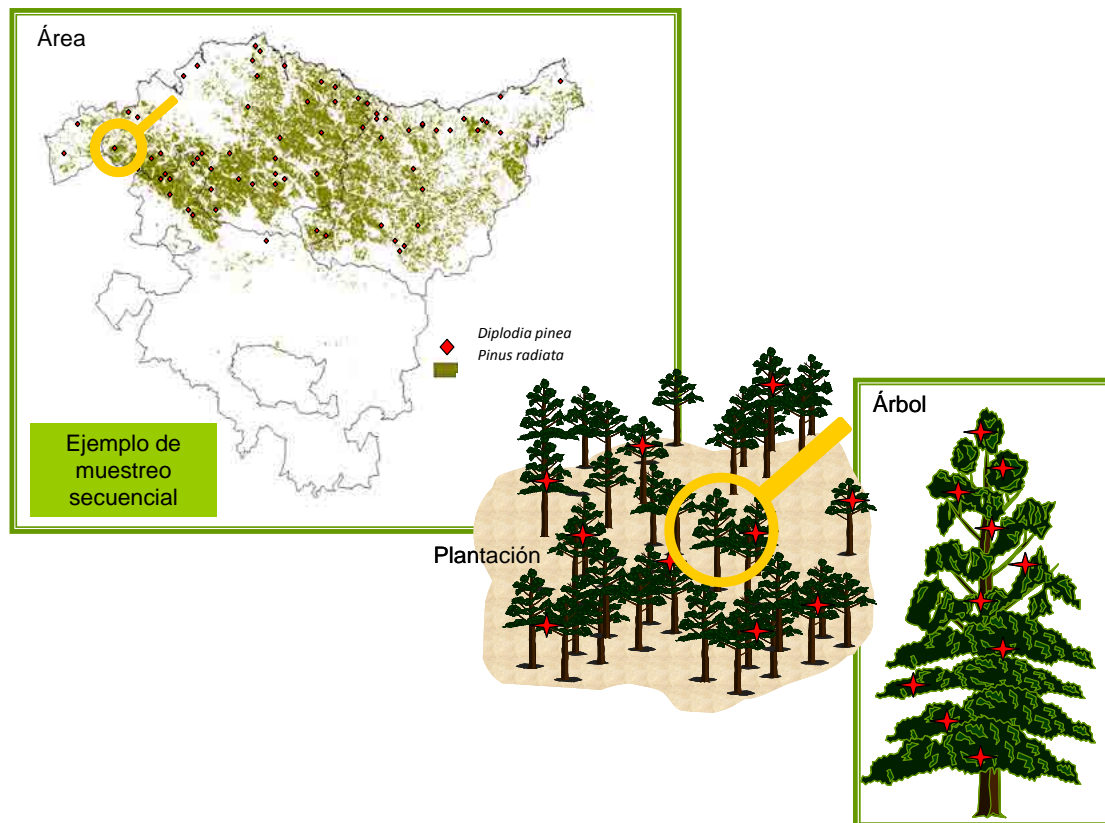


Fig. 4.1. Ejemplo de muestreo jerárquico.

En el nivel de área se incluyeron muestras de otras especies de pinos y de *Chamaecyparis lawsoniana*, debido a la capacidad de *Diplodia pinea* para infectar casi todas las especies del género *Pinus* y otras coníferas (Swart & Wingfield 1991a, Cedeño et al. 2001). La lista de localidades muestreadas se indica en el anexo 1 y en la fig. 4.2 se puede ver un mapa con la posición de las localidades muestreadas.

Además, hemos incluido en el estudio 19 cepas de Nueva Zelanda y Chile. Estas cepas se obtuvieron muestreando lotes de semillas importadas desde estos países durante los años 1996 a 2004 por la empresa Oihanberri, S. A. y analizadas por el Servicio de Semillas y Plantas de Vivero del Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco.

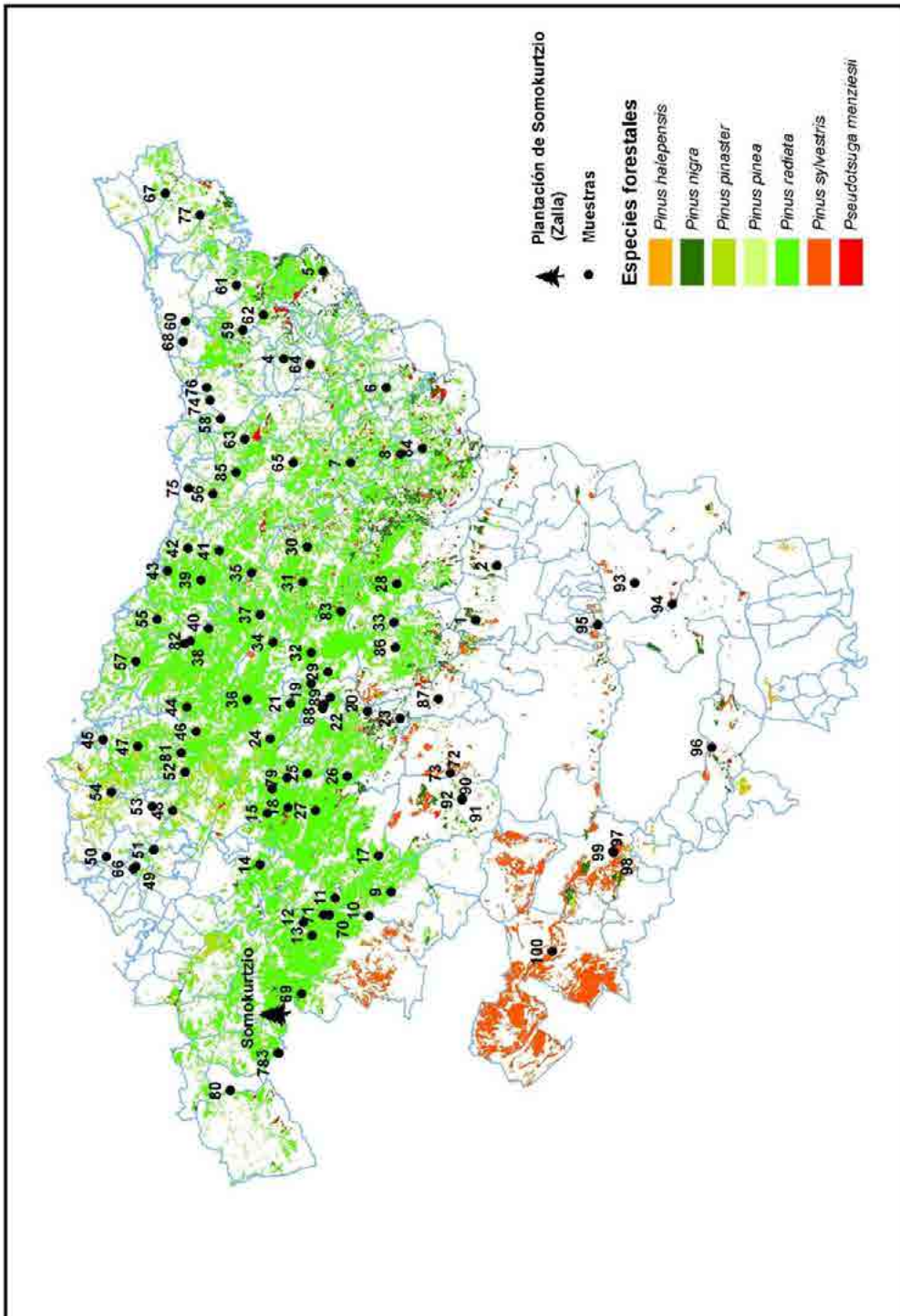


Fig. 4.2. Mapa del País Vasco con las localidades muestreadas.

4.2.2 Aislamiento de cepas

Las muestras se recortaron en fragmentos de aproximadamente 0,5 cm que se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos en una solución de hipoclorito sódico al 2% durante un minuto. Estos fragmentos se colocaron en medio MEA (Malt Extract Agar) a una temperatura de 25 °C en oscuridad (Farrell et al. 1997).

Una vez obtenidas las cepas, se identificaron morfológicamente utilizando las características mencionadas por Sutton (1980). Las colonias, de rápido crecimiento y con pigmentos oscuros, se transfirieron a placas con medio agar-agua y acículas de pino estériles. Se confirmó la identificación de las cepas de *Diplodia pinea* que desarrollaron picnidios y conidios. A partir de aquí se obtuvieron cultivos monospóricos (de Wet et al. 2003). En los casos en los que no se obtuvieron picnidios pero la morfología se correspondía con *Diplodia pinea*, se obtuvieron cultivos monospóricos mediante la técnica de transferencia de puntas de hifas (Galsky et al. 1973). Una copia de la colección de cultivos de *Diplodia pinea* se mantuvo en papeles de filtro a 4 °C y en oscuridad. Otra copia se mantuvo como reserva a -20 °C.

4.2.3 Identificación molecular

El estudio molecular de las distintas cepas se basó en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada para la detección específica de *Diplodia pinea* y *Diplodia scrobiculata* por Smith & Stanosz en 2006.

Las cepas se pusieron a crecer en medio PDA en placas de Petri durante 7 días a 20 °C. El micelio desarrollado se extrajo de las placas y se utilizó para la extracción del ADN. Para el proceso de extracción de ADN se siguió el protocolo del kit de extracción Quiagen (Smith & Stanosz 2006).

El ADN obtenido de las diferentes cepas fue amplificado mediante PCR con los cebadores BotR, DpF y DsF. Las secuencias de los cebadores se alinean con el DNA ribosómico de la subunidad pequeña de los ribosomas mitocondriales (mt SSU rDNA) de *Diplodia pinea* y *Diplodia scrobiculata* (Smith & Stanosz 2006).

Secuencias de los cebadores:

- BotR: GCTTACACTTTCATTTATAGACC
- DpF: CTTATATATCAAACCTATGCTTTG
- DsF: CTTATATATCAAACCTAATGTTTG

La pareja de cebadores DpF/BotR amplifica un fragmento de 700 pares de bases de *Diplodia pinea* y no amplifica ningún fragmento de *Diplodia scrobiculata*. La pareja DsF/BotR amplifica un fragmento de 700 pares de bases de *Diplodia scrobiculata* y ninguno de *Diplodia pinea*.

Para la reacción de PCR se utilizaron de 2 a 10 ng de DNA del hongo, 1 μM de cada cebador, 200 μM de cada dNTP (bases nitrogenadas), 1 x buffer (tampón ácido Tris bórico-EDTA), 2 mM de MgCl_2 y 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, MD); todo ello se llevó a cabo en un volumen total de 50 μl . La reacción se llevó a cabo con la siguiente secuencia de ciclos: 1 ciclo de 5 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95 $^{\circ}\text{C}$, 1 minuto a 53 $^{\circ}\text{C}$, 1 minuto a 72 $^{\circ}\text{C}$, seguidos de 1 ciclo de 5 minutos a 72 $^{\circ}\text{C}$. Se utilizó un termociclador BIO_RAD. El tamaño de los fragmentos se comprobó en geles de agarosa al 1 % en tampón ácido Tris bórico-EDTA (TBE) (Smith & Stanosz 2006).

4.2.4 Grupos de compatibilidad vegetativa (VCG). Líneas clonales

Se realizaron todas las combinaciones posibles entre las cepas aisladas, en medio OMA (Oat Meal Agar). Las cepas de cada origen se enfrentan entre sí en todas las combinaciones posibles. Las placas se incubaron a 20 $^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 4-6 días. La formación de una barrera de micelio oscuro entre cepas muestra diferentes grupos de compatibilidad (fig. 4.3-b). Las cepas compatibles fusionan sus micelios sin la formación de ninguna barrera y forman parte de un mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG), o línea clonal (Smith et al. 2000; fig. 4.3-a).

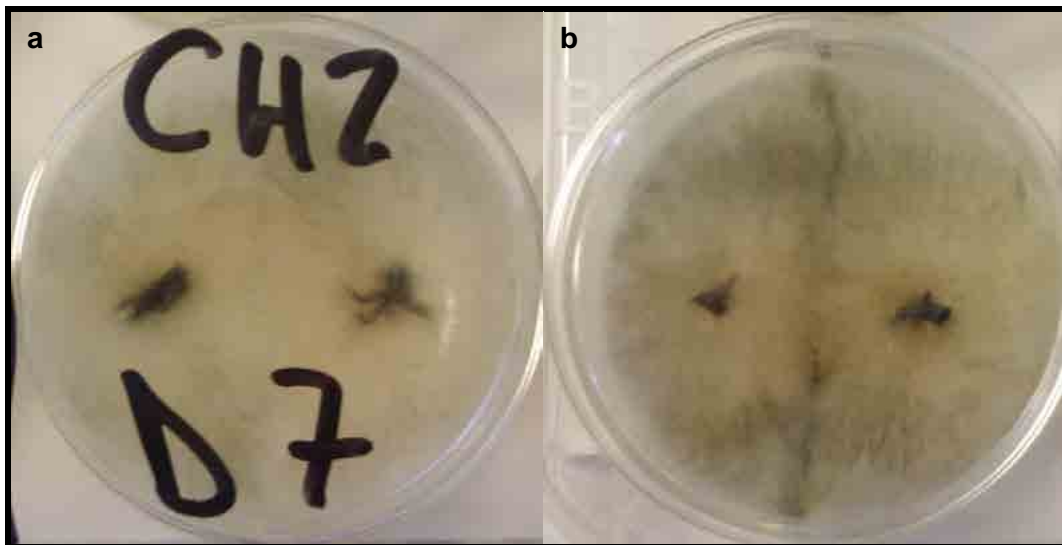


Fig. 4.3. Distintas cepas de *Diplodia pinea* enfrentadas en medio OMA: a) cepas compatibles; b) cepas incompatibles.

La diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa obtenidos se estimó mediante 3 índices:

- La relación **S/N**, donde S es el número de tipos de compatibilidad vegetativa y N es el tamaño muestral (Anagnostakis et al. 1986, Cortesi et al. 1996, Robin et al. 2000).

- Los resultados de diversidad genotípica (**G**) se expresaron según Stoddart y Taylor (Stoddart 1983, Stoddart & Taylor 1998). Esta estimación se basa en el número y frecuencia de genotipos (en este caso VCG) que aparecen en una población. Aplicado a nuestro caso sería:

$$G = 1/\sum f_x \cdot (x/N)^2$$

f_x = Nº de genotipos (VCG) observados x veces en la muestra

x = El nº de veces que un genotipo (VCG) aparece en la muestra

N = Tamaño de la muestra

- El porcentaje de diversidad máxima (**Ĝ**) se calculó dividiendo la diversidad genotípica (G) entre el tamaño de la muestra (N) de cada grupo contemplado y multiplicándolo por 100. Esto nos permite comparar diferentes poblaciones a pesar de su diferente tamaño muestral (Smith et al. 2000, Burgess et al. 2001 y 2004).

4.2.5 Morfología

4.2.5.1 Tamaño y forma de los conidios

De cada línea clonal o VCG se seleccionó una cepa tipo (ver tabla 4.3), y éstas se pusieron a crecer en placas de Petri con medio PDA. Después de 3-4 días, se colocaron acículas de pino radiata esterilizadas directamente sobre el micelio y las placas se incubaron a 20 °C bajo luz fluorescente. Se utilizaron cuchillas de bisturí para cortar pequeños segmentos de acículas con picnidios. Las muestras se sumergieron en agua esterilizada y fueron congeladas a -20 °C en una pletina, para ser cortadas con un microtomo de congelación. Los picnidios se cortaron por la mitad para observar las esporas. Se realizaron preparaciones montadas con solución de azul de lactofenol (Wang et al. 1985). Las preparaciones se examinaron con un microscopio de luz visible Nikon. Se tomaron medidas de longitud, anchura y número de septos de 30 conidios de cada muestra (Kay et al. 2002; fig. 4.4). Se aplicó un análisis de varianza a las medidas de los conidios. Para la comparación de las medias de la longitud y anchura de los conidios se aplicó la prueba DHS (diferencia honestamente significativa) de Tukey (Madden et al. 1982).

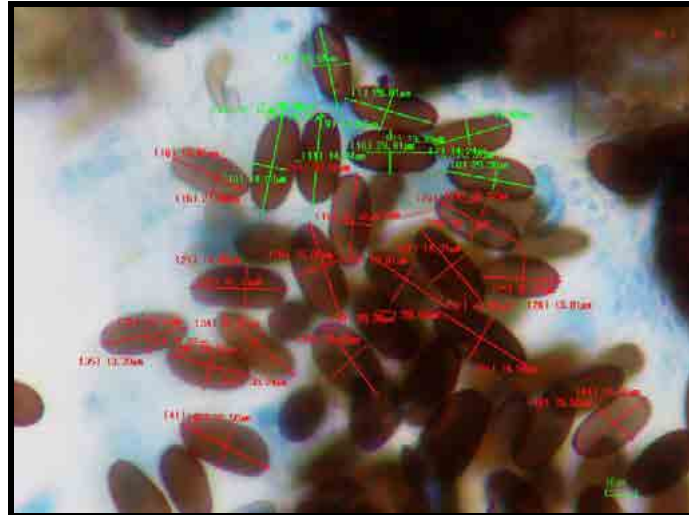


Fig. 4.4. Medición de conidios de *Diplodia pinea* al microscopio.

4.2.5.2. Morfología y coloración del micelio

Se pusieron dos copias de cada cepa a crecer en medio PDA en condiciones de oscuridad. Los cultivos se examinaron a los 2, 5, 10, 15 y 20 días y se tomaron datos de coloración y morfología del micelio para detectar los posibles morfotipos diferentes de la población estudiada. Las cepas se clasificaron en diferentes categorías según que el micelio tuviera un crecimiento de tipo algodonoso o creciera de forma lisa y pegado a la superficie de agar (Palmer et al. 1987, Kay et al. 2002).

Para su clasificación se establecen las siguientes categorías en función de lo observado (figs. 4.5-a y 4.5-b):

- Micelio algodonoso: **A**
- Micelio liso: **L**

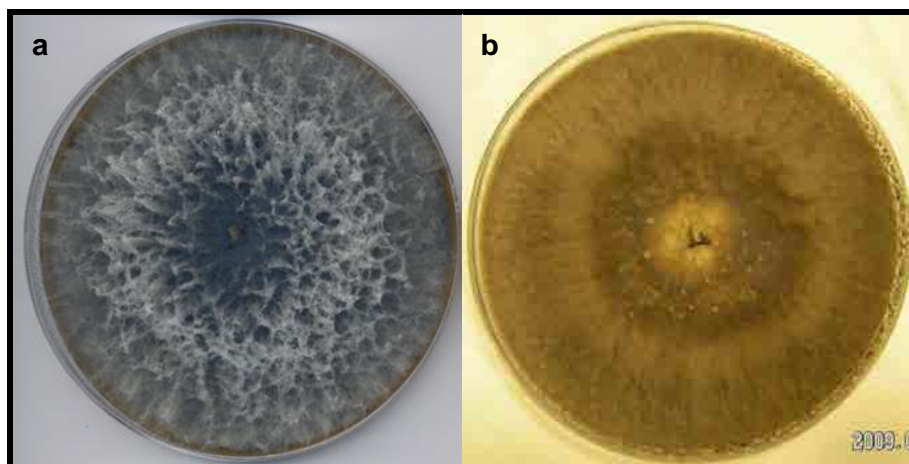


Fig. 4.5. *Diplodia pinea* cultivada en PDA: a) micelio algodonoso; b) micelio liso.

Para el estudio de la coloración del micelio, se clasifican los tonos de color en 6 categorías. Se estimó el color de las cepas cada 5 días (fig. 4.6):

- Blanquecino: **0**
- Grisáceo claro: **1**
- Gris verdoso: **2**
- Gris verdoso oscuro: **3**
- Gris oscuro: **4**
- Negro: **5**

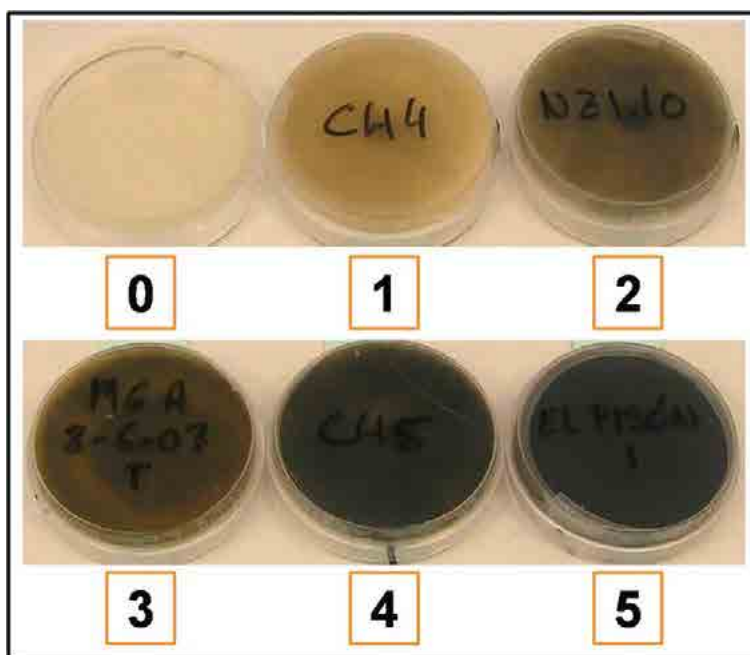


Fig. 4.6. Clave de color de micelio.

4.2.6 Velocidad de crecimiento de los micelios en cultivo agarizado

En la especie *Diplodia pinea* han sido reconocidos diferentes grupos teniendo en cuenta la morfología y velocidad de crecimiento de los cultivos. Se considera que el morfotipo A crece más rápido en medio agarizado que el morfotipo B (= *Diplodia scrobiculata*) (Palmer et al. 1987).

La velocidad de crecimiento de las cepas se estudió a 2 temperaturas diferentes (10 °C y 20 °C) en una cámara de cultivo SANYO MLR350. El micelio de cada cepa se depositaba en el centro de 4 placas Petri (45 mm de diámetro) con medio PDA, considerando cada placa una repetición, y tomando mediciones cada 2 días. Para medir el crecimiento de las colonias de cada cepa a cada temperatura, se consideran el eje de máximo crecimiento y su perpendicular, se miden los diámetros de crecimiento utilizando un calibre digital (Kay et al. 2002). Los resultados, expresados en mm/día, se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y test DHS (diferencia honestamente significativa) de Tukey (Madden et al. 1982).

4.2.7 Patogenicidad de las cepas

Hemos determinado la patogenicidad de las diferentes cepas mediante inoculaciones con micelio en plantas de *Pinus radiata*. El origen de la planta es País Vasco, semilla categoría C [Categoría de semillas definida por la Directiva 1999L0105-ES-15.01.2000-000.001-2 (Consejo de la Unión Europea de 22 de diciembre de 1999)]. A las plantas, de 2 años de edad, se les recortó la punta del brote terminal de un año, se depositó el micelio en la herida y se realizaron medidas de las lesiones a las 2, 3 y 4 semanas con un calibre digital (fig. 4.7). Se llevaron a cabo un total de 3 repeticiones por cepa (Kay et al. 2002). Los resultados, expresados en mm/día, se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) (Madden et al. 1982, Swart & Wingfield 1991b). Todo el proceso se llevó a cabo en invernadero de seguridad, tipo P2, a 25 °C y 80 % de humedad relativa.



Fig. 4.7. Plántulas de *Pinus radiata* inoculadas con micelio de *Diplodia pinea*.

4.3 Resultados

4.3.1 Muestreo y aislamiento de cepas

Tras los muestreos y posterior aislamiento de las muestras se obtuvieron un total de 83 cepas (ver listado con sus características en el anexo 2). Las cepas obtenidas durante los años 2006 y 2007 tuvieron que ser retiradas por problemas de contaminación:

- 53 de País Vasco. Según los tres niveles jerárquicos, 29 del nivel de área (código **PV**), 10 del nivel de plantación (código **SO**) y 14 del nivel de árbol (código **D**), (figs. 4.8, 4.9 y 4.10).
- 10 del material de Navarra (código **NA**).
- 9 de lotes de semilla importada de Chile (código **CH**).
- 10 de lotes de semilla importada de Nueva Zelanda (código **NZ**).
- Y una obtenida de *Chamaecyparis lawsoniana* (código **WP74**).

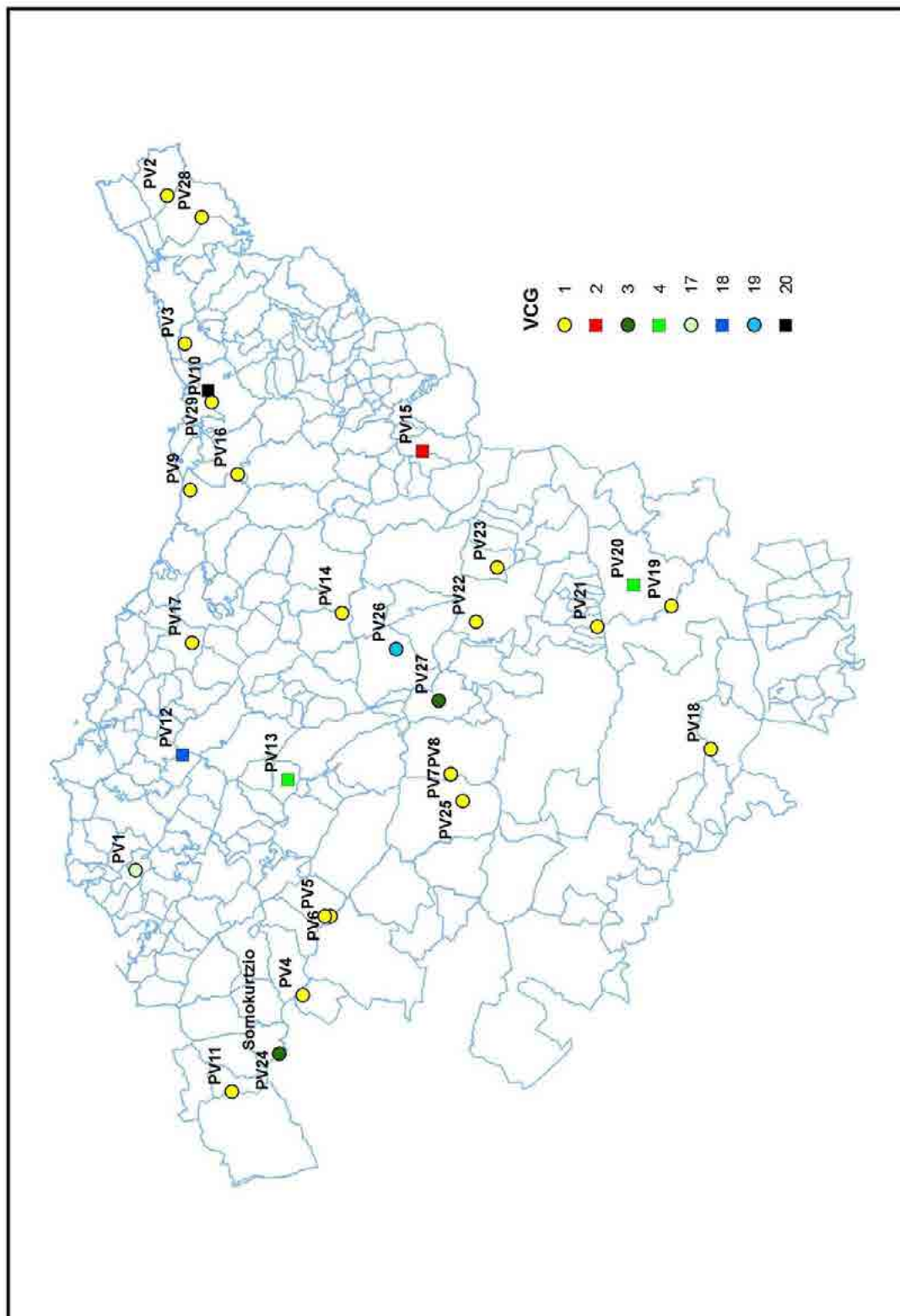


Fig.4.8. Mapa con la localización de las cepas del nivel de área de País Vasco. En diferentes colores se muestran los VCG a los que pertenece cada cepa.

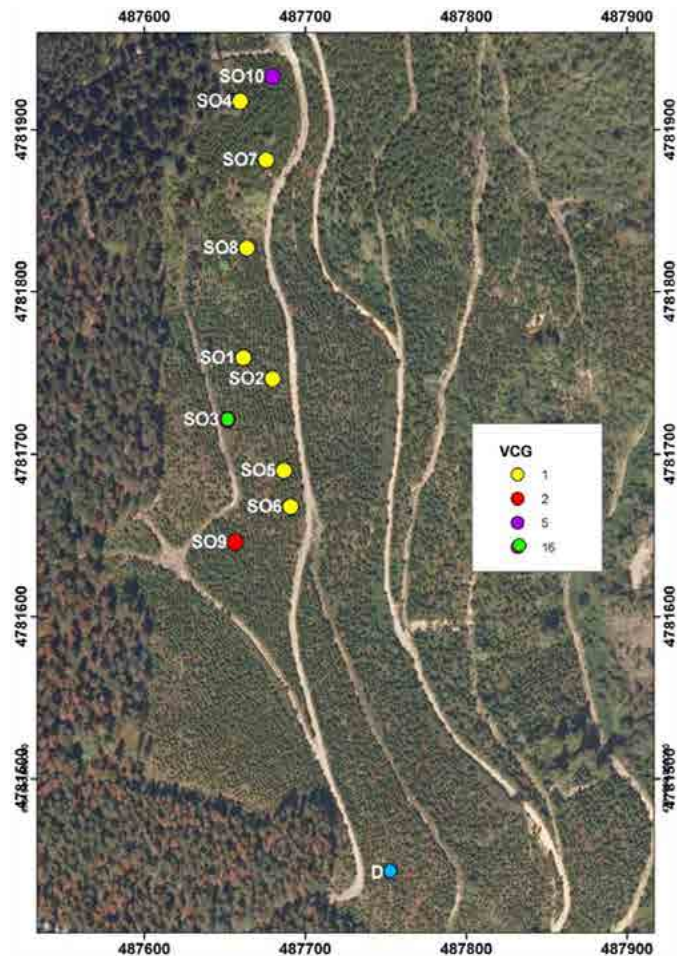


Fig.4.9. Localización de las cepas del nivel de área de País Vasco en la parcela de Somokurtzio (Zalla). En diferentes colores se muestran los VCG a los que pertenece cada cepa. El punto D corresponde a la localización del muestreo del nivel de árbol.

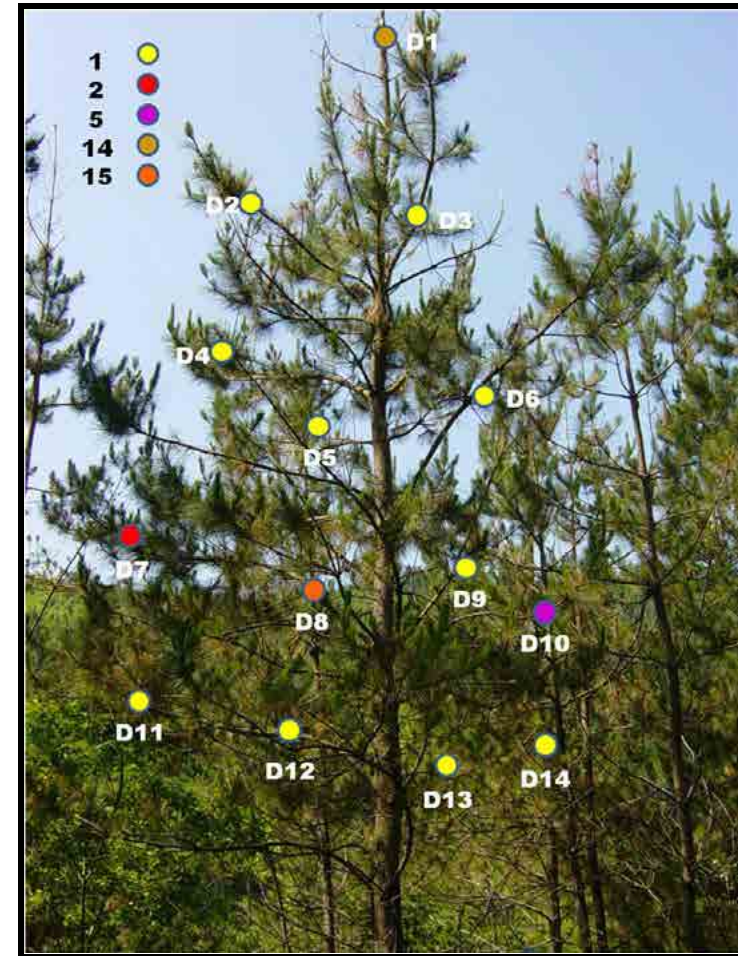


Fig.4.10. Esquema de situación por verticilos de las muestras en el nivel de árbol. En diferentes colores se muestran los VCG a los que pertenece cada cepa.

4.3.2 Caracterización molecular

Al aplicar las 2 combinaciones de cebadores en las muestras de ADN procedentes de cada una de las cepas analizadas en este estudio, se observa que sólo se produce amplificación de un fragmento de aproximadamente 700 pares de bases para una de las combinaciones de cebadores: BotR/DpF, y en todas las muestras, excepto la obtenida en *Chamaecyparis lawsoniana* (WP74). La combinación de cebadores BotR/DsF no amplificó ningún fragmento (fig. 4.11).

Por tanto, concluimos que todas las cepas de *Diplodia* englobadas en este estudio pertenecen a la especie *Diplodia pinea* con la excepción de la obtenida de *Chamaecyparis lawsoniana*.

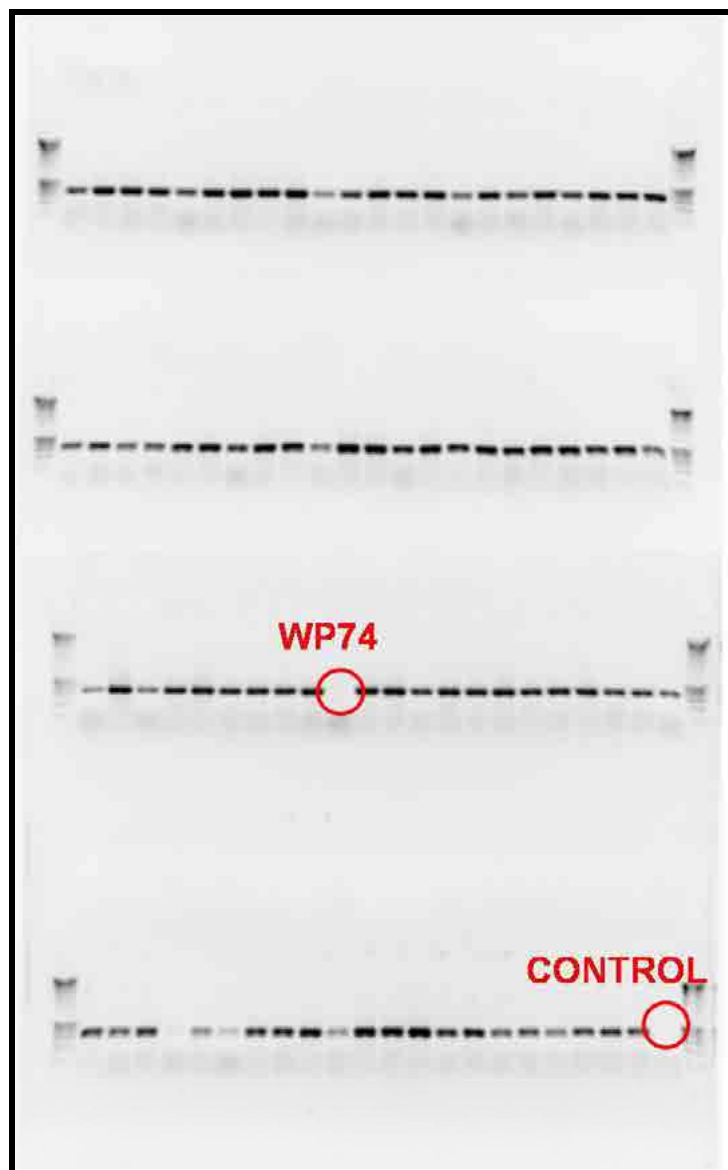


Fig. 4.11. Geles de agarosa mostrando las bandas representativas de *Diplodia pinea*. La cepa WP74 y el control no muestran la banda.

4.3.3 Grupos de compatibilidad vegetativa (VCG). Líneas clonales

El análisis de los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) de las distintas cepas de *Diplodia pinea* obtenidas para este estudio, más la cepa WP74 obtenida de *Chamaecyparis lawsoniana*, revela la existencia de un total de 21 grupos diferentes, cada uno de ellos integrado por un número variable de cepas (desde 1 a 51). En la tabla 4.1 se muestran los VCG para las cepas de *Diplodia pinea* obtenidas en coníferas procedentes de plantaciones del País Vasco, Navarra y semillas importadas de Chile y Nueva Zelanda. Para cada VCG se indican las distintas cepas que lo componen.

La distribución de los VCG de las cepas pertenecientes al País Vasco en los tres niveles jerárquicos se puede ver en las figuras 4.8, 4.9 y 4.10.

VCG	CEPAS	Nº DE CEPAS
1	PV2, PV3, PV4, PV5, PV6, PV7, PV8, PV9, PV10, PV11, PV14, PV16, PV17, PV18, PV19, PV21, PV22, PV23, PV25, PV28, SO1, SO2, SO4, SO5, SO6, SO7, SO8, D2, D3, D4, D5, D6, D9, D11, D12, D13, D14, NA2, NA3, NA4, NA6, NA7, NA8, NA9, NA10, NZ3, NZ4, NZ5, NZ6, NZ9, NZ10	51
2	PV15, SO9, D7, CH2	4
3	PV24, PV27, NA1	3
4	PV13, PV20	2
5	SO10, D10	2
6	CH3, CH4, CH6, CH7, CH8, CH9	6
7	CH1	1
8	CH5	1
9	NZ1	1
10	NZ2	1
11	NZ7	1
12	NZ8	1
13	NA5	1
14	D1	1
15	D8	1
16	SO3	1
17	PV1	1
18	PV12	1
19	PV26	1
20	PV29	1
21	WP74	1

Tabla 4.1. Se muestran los diferentes VCG con las cepas que los componen.

El grupo más importante (VCG 1) engloba la mayoría de cepas estudiadas con procedencias de País Vasco, Navarra, incluyendo también 6 cepas de Nueva Zelanda. El segundo grupo más numeroso (VCG 6) engloba únicamente cepas chilenas no detectadas hasta ahora en el País Vasco. El grupo 2 contiene tres cepas del País Vasco junto con otra chilena. Los grupos 3 a 5 incluyen diversas cepas del País Vasco junto con una de Navarra. El resto de grupos incluyen solamente una cepa cada uno. Los VCG 7 a 12 están formados por cepas chilenas y neozelandesas incompatibles con todas las obtenidas en el País Vasco. Las figuras 4.8 y 4.9 muestran que no existe un patrón geográfico definido en la distribución de los diferentes VCG. El grupo 1, mayoritario, aparece en toda el área muestreada. Es interesante señalar, sin embargo, que algunos grupos minoritarios (2, 5, 14, 16) aparecen cuando aumenta el detalle del muestreo, a la escala de plantación o de árbol.

El VCG 21 está formado exclusivamente por la cepa WP74 obtenida a partir de una muestra en *Chamaecyparis lawsoniana*.

En la tabla 4.2 damos los diferentes valores de los índices utilizados para estimar la diversidad de las diferentes poblaciones de *Diplodia pinea* obtenidas en este estudio. Las cepas del País Vasco se diferencian entre los 3 niveles jerárquicos del muestreo.

POBLACIÓN	NIVEL JERÁRQUICO	TAMAÑO DE MUESTRA	Nº DE VCG	Nº DE CEPAS POR VCG	S/N	G	Ĝ (%)
Chile		9	4	6/1/1/1	0,44	2,07	23
Nueva Zelanda		10	5	6/1/1/1/1	0,5	2,50	25
Navarra	Área	10	3	8/1/1	0,3	1,8	18
País Vasco	Área	29	7	20/2/2/1/1/1/1/1	0,23	2,04	7,03
País Vasco	Plantación	10	4	7/1/1/1	0,4	1,92	19,2
País Vasco	Árbol	14	5	10/1/1/1/1	0,36	1,88	13,43
País Vasco + Navarra	Área + Área	39	9	28/3/2/1/1/1/1/1/1	0,23	1,89	4,85
País Vasco + Navarra	Área + Área + Plantación + Árbol	63	13	45/3/3/2/2/1/1/1/1/1/1/1/1	0,21	1,92	3,05
TOTAL		82	20	51/6/4/3/2/2/1/1/1/1/1/1/1/1/1/1	0,24	2,5	3,04

Tabla 4.2. Índices de diversidad de las distintas poblaciones de *Diplodia pinea*.

Los resultados de diversidad genotípica se muestran bastante bajos y similares en todos los grupos considerados. Las muestras obtenidas de semilla de Chile y, sobre todo, las de Nueva Zelanda se han mostrado algo más diversas que las del País Vasco. En cambio, cuando tenemos en cuenta los porcentajes de diversidad máxima encontramos algunas diferencias. Se da un porcentaje más bajo para el nivel de área en el País Vasco que para los niveles de plantación y de árbol. Los mayores porcentajes de diversidad genética se dan de nuevo en las cepas estudiadas de Chile y Nueva Zelanda. Se dan valores intermedios en la población de Navarra y los niveles de plantación y árbol del País Vasco. Si contemplamos conjuntamente la población del País Vasco junto a la de Navarra el porcentaje de diversidad todavía decrece más que la del País Vasco sola. Y si contemplamos todos los niveles de País Vasco más las muestras de Navarra el porcentaje todavía desciende un poco más.

4.3.4 Morfología

4.3.4.1 Tamaño y forma de los conidios

En la tabla 4.3 podemos observar las medias de las medidas de anchura y longitud de los conidios, agrupándolas dentro de cada uno de los VCG del apartado anterior. Sobre estas medidas se aplica un análisis de varianza con una significación ($p \leq 0.05$). El VCG 17, compuesto únicamente por la cepa PV1, no produjo picnidios en cultivo por lo que no se pudieron estimar sus medidas. Todos los valores obtenidos concuerdan con las medidas atribuidas a *Diplodia pinea* en la bibliografía (ver capítulo 2), excepto los de la cepa WP74 (VCG 21). Los conidios de la cepa WP74 son bastante menores que los que se suponen para *Diplodia pinea* (fig. 4.12). Hemos aplicado un test DHS (diferencia honestamente significativa) de Tukey para la agrupación de medias.

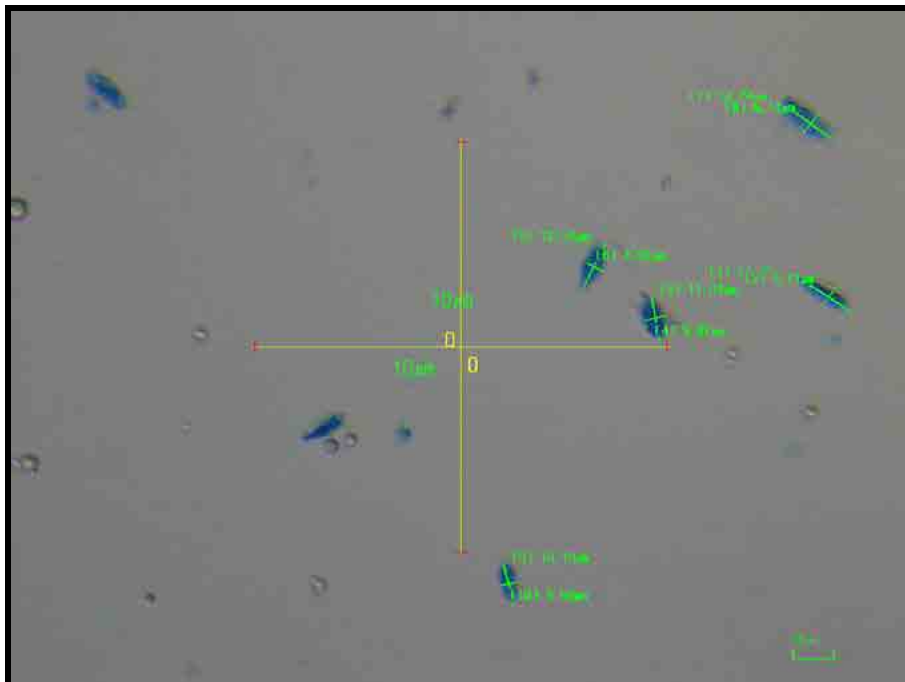


Fig. 4.12. Conidios de la cepa WP74.

VCG	CEPA	n	ANCHO					LARGO				
			Media	DHS de Tukey (a,b,c)	Error típico	Intervalo de confianza (95%)		Media	DHS de Tukey (a,b,c)	Error típico	Intervalo de confianza (95%)	
						Límite inferior	Límite superior				Límite inferior	Límite superior
1	PV21	28	14,56	de	0,15	14,26	14,85	36,5	efg	0,37	35,76	37,23
2	PV15	30	15,48	e	0,26	14,97	15,99	34,03	cde	0,64	32,77	35,3
3	PV27	30	13,74	cd	0,26	13,23	14,25	36	defg	0,64	34,74	37,27
4	PV20	30	14,69	de	0,18	14,33	15,05	38,48	g	0,45	37,58	39,37
5	SO10	30	13,3	c	0,26	12,79	13,8	33,77	cde	0,64	32,51	35,04
6	CH7	30	14,06	cd	0,07	13,93	14,19	34,74	cdef	0,17	34,41	35,06
7	CH1	25	15,48	e	0,31	14,87	16,08	38,71	g	0,77	37,2	40,22
8	CH5	30	11,78	b	0,26	11,27	12,28	36,66	efg	0,64	35,4	37,92
9	NZ1	28	13,95	cd	0,26	13,43	14,47	33,05	bcd	0,65	31,77	34,34
10	NZ2	30	13,69	cd	0,27	13,17	14,22	32,94	bc	0,67	31,63	34,24
11	NZ7	19	13,46	cd	0,26	12,95	13,97	32,31	bc	0,64	31,05	33,57
12	NZ8	30	14,58	de	0,26	14,08	15,09	34,71	cdef	0,64	33,45	35,97
13	NA5	30	13,25	c	0,26	12,74	13,76	34,96	cdef	0,64	33,7	36,22
14	D1	30	14,07	cd	0,26	13,56	14,58	33,87	cde	0,64	32,61	35,13
15	D8	26	13,63	cd	0,18	13,28	13,97	33,61	cde	0,44	32,76	34,47
16	SO3	30	15,39	e	0,26	14,88	15,9	36,3	efg	0,64	35,04	37,56
17	PV1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	PV12	30	14,32	cde	0,27	13,79	14,84	30	b	0,67	28,69	31,31
19	PV26	30	13,95	cd	0,26	13,44	14,45	32,25	bc	0,64	30,99	33,51
20	PV29	30	15,51	e	0,26	15,01	16,02	37,57	fg	0,64	36,31	38,84
21	WP74	30	6,4	a	0,26	5,88	6,92	12,99	a	0,65	11,7	14,27

Tabla 4.3. Medidas medias de los conidios pertenecientes a cada grupo de compatibilidad vegetativa (VCG). Se dan medidas de ancho, largo y límites superior e inferior. Valores con la misma letra no difieren significativamente con un test DHS de Tukey.

4.3.4.2 Morfología y coloración del micelio

En el gráfico siguiente se muestran las características morfológicas del micelio de las cepas estudiadas. En el eje Y se muestra el número de cepas de cada tipo y en el eje X se muestran los orígenes contemplados para las cepas de este estudio (fig. 4.13).

- **PV:** País Vasco nivel de área
- **SO:** País Vasco nivel de plantación
- **D:** País Vasco nivel de árbol
- **NA:** Navarra
- **CH:** Chile
- **NZ:** Nueva Zelanda
- **WP74:** Cepa obtenida en *Chamaecyparis lawsoniana*

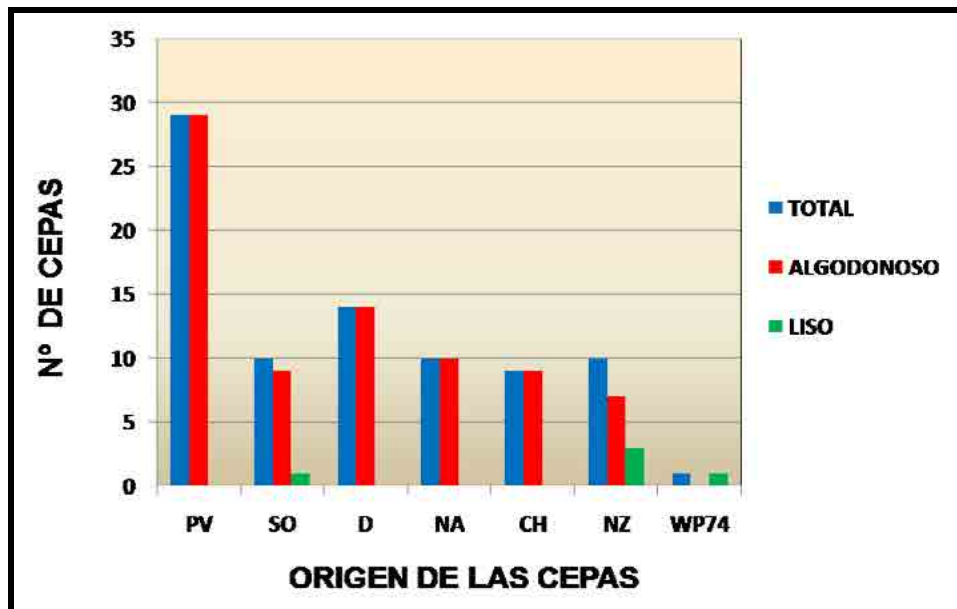


Fig. 4.13. Gráfico donde se muestra el tipo de micelio según el origen de la cepa.

La mayoría de las muestras presentan micelio algodonoso típico de los morfotipos A y C de *Diplodia pinea*. Una de las cepas de País Vasco (SO3), tres cepas de Nueva Zelanda (NZ1, NZ2 y NZ8) y la cepa WP74 muestran un micelio de tipo liso. Cada una de ellas forma un único VCG mostrando ser cepas clonales incompatibles con las demás.

La figura 4.14 muestra la evolución del color del micelio cada 5 días. Los resultados se han dado para cada grupo de compatibilidad vegetativa. Como se observa en la tabla de evolución de la coloración miceliar, casi todas las cepas se vuelven totalmente oscuras a medida que pasa el tiempo en cultivo. Las únicas excepciones, que no se vuelven oscuras completamente con el tiempo, son las mismas que presentan micelio liso: cepas NZ1, NZ2, NZ8, SO3 y WP74, correspondientes a los VCG 9, 10, 12, 16 y 21, respectivamente. Es significativo el hecho de que, salvo SO3 (País Vasco a nivel de plantación), son cepas de origen

neozelandés, además de la cepa obtenida sobre *Chamaecyparis lawsoniana*. En los siguientes gráficos marcaremos estos grupos morfológicamente distintos subrayándolos para diferenciarlos de los demás.

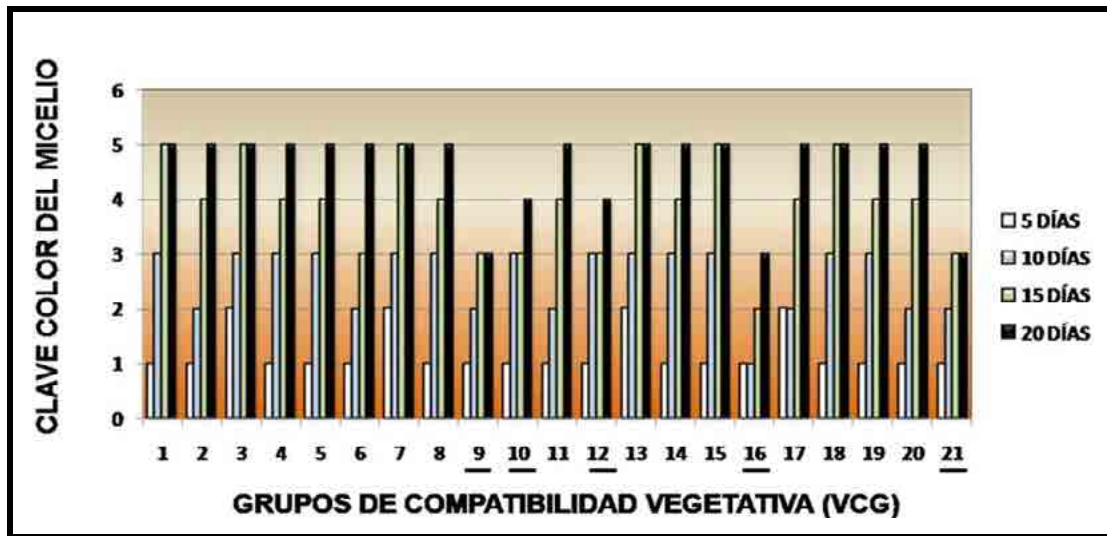


Fig. 4.14. Gráfico donde se muestra la clave de color de las cepas estudiadas a través del tiempo.

4.3.5 Desarrollo miceliar. Velocidad de crecimiento

En los dos gráficos siguientes se muestran los crecimientos radiales medios en mm/día, a 10 °C y 20 °C, de los diferentes VCG (figs. 4.15 y 4.16).

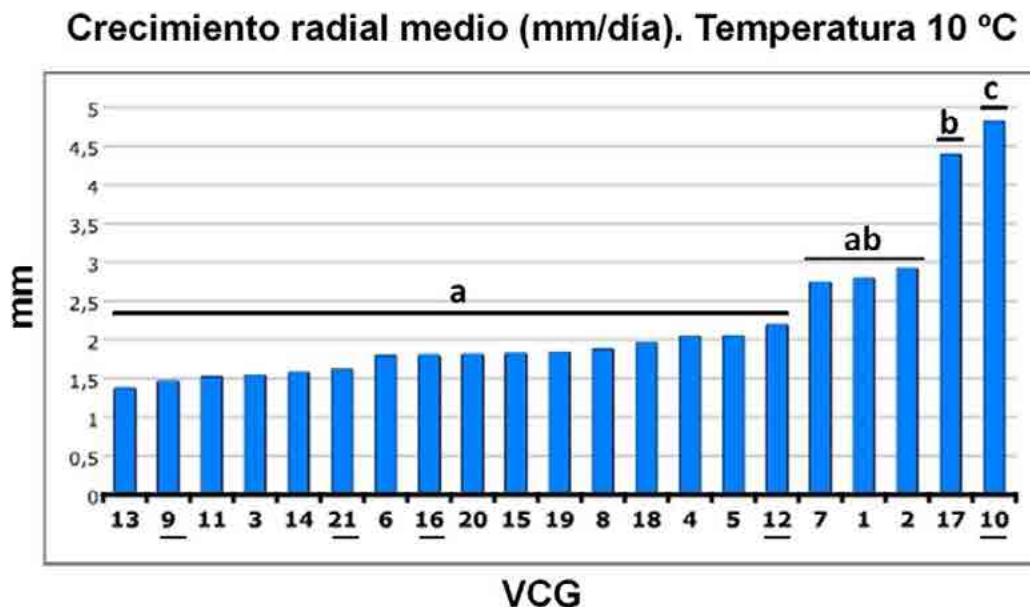


Fig. 4.15. Crecimiento radial medio (mm/día) de los diferentes grupos de compatibilidad vegetativa a la temperatura de 10 °C.

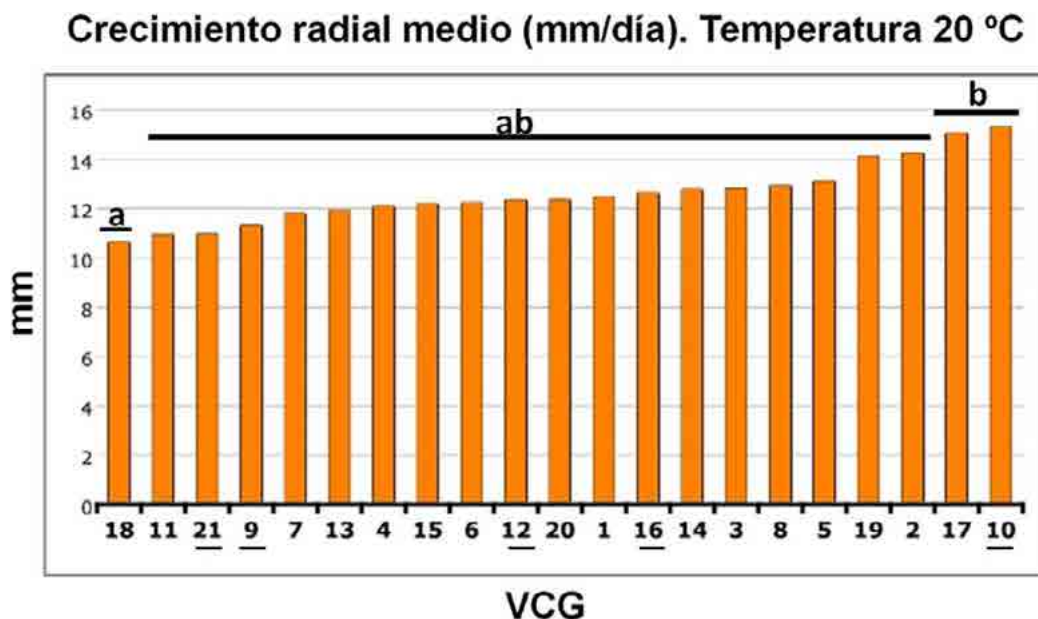


Fig. 4.16. Crecimiento radial medio (mm/día) de los diferentes grupos de compatibilidad vegetativa a la temperatura de 20 °C.

Se han detectado diferencias significativas entre grupos de compatibilidad vegetativa en las dos temperaturas ensayadas. Para la temperatura de 10 °C con una $F = 8,72$ y una $p < 0,01$. Para la temperatura de 20 °C con una $F = 1,96$ y una $p = 0,012$. Las cepas con los crecimientos más rápidos en ambos casos (10 °C y 20 °C) pertenecen a los grupos de compatibilidad 2, 10 y 17. El número 10 contiene únicamente la cepa NZ2, procedente de las semillas importadas de Nueva Zelanda, mientras que el número 17 corresponde a una cepa aislada del País Vasco (PV1). El grupo 2, que contiene tres cepas vascas y una chilena, se encuentra inmediatamente después de los anteriores a las dos temperaturas. En la tabla 4.4 se muestran los datos del análisis de varianza.

ANOVA		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
mm/día 20 °C	Inter-grupos	78,29	20	3,91	1,96	0,012
	Intra-grupos	289,26	145	1,99		
	Total	367,56	165			
mm/día 10 °C	Inter-grupos	47,28	20	2,36	8,72	< 0,01
	Intra-grupos	39,31	145	0,27		
	Total	86,59	165			

Tabla 4.4. Datos del análisis de varianza del crecimiento radial medio de los diferentes VCG.

4.3.6 Patogenicidad de las cepas

La media de las lesiones que hemos obtenido en las inoculaciones con las cepas de este estudio alcanzó al cabo de una semana el valor de 23,43 mm, en la segunda semana fue de 33,39 mm y al final de la tercera semana llegó a 40,2 mm. En el anexo 3 se muestran los datos de las inoculaciones de todas las cepas agrupadas por VCG. En el anexo 4 se dan las medidas de las lesiones de las inoculaciones para todas las cepas de este estudio. En estos anexos se puede ver que hay valores mínimos de infección en algunos casos que indicarían cierta resistencia por parte de los individuos inoculados. Las diferencias entre los valores mínimos y máximos son muy altas, por ejemplo, de 4 a 163 mm en el VCG 1 en la tercera semana. Este hecho puede suponer una alta variabilidad en la resistencia de los distintos individuos de pino radiata inoculados en el ensayo.

El VCG 10 con la cepa NZ2 es el que ha producido las lesiones medias más grandes. En los ensayos de crecimiento en medio PDA también daba los resultados mayores. No pasa lo mismo con el VCG 17 con la cepa PV1, que siendo uno de los de máximo crecimiento en medio PDA, en el caso de la patogenicidad se encuentra entre los grupos menos infectivos.

A partir de los resultados obtenidos en las lesiones medias causadas por las cepas correspondientes a los VCG detectados, no se han observado diferencias significativas entre ellos a un nivel de significación del 0,05 (análisis ANOVA). Los valores obtenidos a partir del análisis se muestran en la tabla siguiente (tabla 4.5).

VCG		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
PRIMERA SEMANA	Inter-grupos	8018,68	20	400,93	0,98	0,49
	Intra-grupos	93430,48	228	409,78		
	Total	101449,16	248			
SEGUNDA SEMANA	Inter-grupos	12202,57	20	610,13	0,82	0,68
	Intra-grupos	168952,42	228	741,02		
	Total	181154,99	248			
TERCERA SEMANA	Inter-grupos	17477,71	20	873,89	0,82	0,68
	Intra-grupos	240926,83	227	1061,35		
	Total	258404,54	247			

Tabla 4.5. Resultados obtenidos al aplicar el análisis de varianza a los datos de las lesiones causadas en el ensayo de patogenicidad.

Es importante destacar que todas las cepas testadas han resultado ser patogénicas, incluida la cepa WP74 obtenida en *Chamaecyparis lawsoniana*, causantes de lesiones en el tejido vegetal inoculado. Ninguna de las cepas mostró una respuesta hipovirulenta.

4.4 Discusión

4.4.1 Identidad taxonómica y caracterización morfológica

Aunque se han hecho progresos en la clarificación taxonómica de la familia Botryosphaeriaceae, la amplia variabilidad morfológica que presenta hace difícil establecer criterios de este tipo para la identificación. Debido a esto, últimamente se empiezan a utilizar las técnicas moleculares para completar las descripciones morfológicas de las especies (Phillips et al. 2008).

Una de nuestras cepas, WP74, aislada sobre *Chamaecyparis lawsoniana*, queda bien individualizada y separada de todas las demás, tanto por el menor tamaño de los conidios como por la forma de sus colonias en PDA (lisas y de tonalidad verde oscura diferente al resto), además de por su incompatibilidad vegetativa con todas las demás cepas. El análisis molecular de mtSSU rDNA también descarta que se trate de *Diplodia pinea* o *Diplodia scrobiculata*. Con los datos morfológicos de que disponemos, esta cepa podría corresponder a las especies *Fusicoccum aesculi* (teleomorfo *Botryosphaeria dothidea*) o *Neofusicoccum parvum* (teleomorfo *Botryosphaeria parva*). Estas especies son complicadas de distinguir basándose en criterios morfológicos y se necesitaría un análisis molecular específico para diferenciarlas (Smith & Stanosz 2001, Slippers et al. 2004). Es reseñable el hecho de que también muestra capacidad patogénica en *Pinus radiata*.

Por otra parte, el análisis molecular de mtSSU rDNA muestra, de acuerdo con la metodología propuesta por Smith & Stanosz (2006), que ninguna de las cepas aisladas en este trabajo se corresponde con *Diplodia scrobiculata*, y deben atribuirse, pues, a *Diplodia pinea*.

Diplodia scrobiculata es una especie que, hasta el momento, solo se ha encontrado en Estados Unidos, México, Francia y, muy recientemente, en Sudáfrica. A diferencia de *Diplodia pinea*, que se ha aislado de un gran número de especies de coníferas, *Diplodia scrobiculata* solo ha aparecido sobre *Pinus banksiana*, *P. resinosa* y *Cedrus deodara* (Wang et al. 1985, Palmer et al. 1987, Morelet & Chandelier 1993, Smith & Stanosz 1995, Stanosz et al. 1996 y 1999, Blodgett et al. 2007, Bihon et al. 2010). El hecho de que aparezca tan cerca de España nos hace pensar que podría encontrarse en nuestras masas forestales aunque hasta el momento no haya sido detectada.

Diferenciarlas únicamente en base a los tamaños esporales no parece posible pues los tamaños de los conidios de *Diplodia scrobiculata* quedan englobados dentro del amplio rango que presentan los de *Diplodia pinea*. Las longitudes medias de *Diplodia scrobiculata* se encuentran en el rango 37,5-41,5 μm mientras que el rango de *Diplodia pinea* se encuentra entre los valores 27-45 μm (Wang et al. 1985 y 1986, Swart et al. 1991, Swart & Wingfield 1991a, Stanosz et al. 1996, Kay et al. 2002). Sobre un total de 548 mediciones, los tamaños esporales de nuestra muestra son de 29-40 x 11-16 μm . Del conjunto, sólo los VCG 4 y 7 muestran unas medidas de conidios que se acercan a los valores mostrados para *Diplodia scrobiculata*, con medias de longitud de 38,48 μm y 38,71 μm , en cualquier caso dentro del rango propio de *Diplodia pinea*. Una característica como el diámetro de los picnidios podría ser

diagnóstica, dado que en *Diplodia scrobiculata* se describen como más pequeños (100-250 μm) que en *Diplodia pinea* (330-650 μm), pero este carácter es probablemente muy variable. De hecho, los autores de la descripción de *Diplodia scrobiculata* (de Wet et al. 2003) no mencionan este carácter como diagnóstico. En cuanto a la forma de las colonias, aunque se encuentran diferencias entre las diferentes cepas estudiadas, ninguna parece ajustarse al patrón descrito para el morfotipo B (colonias lisas, muy oscuras).

La patogenicidad es otra característica distintiva. Mientras que *Diplodia pinea* (morfotipos A y C) es un importante patógeno, *Diplodia scrobiculata* (morfotipo B) se muestra como un patógeno débil (de Wet et al. 2003). En nuestro caso todas las cepas estudiadas han resultado ser patogénicas y capaces de producir lesiones. En ningún caso ha habido respuesta hipovirulenta característica de *Diplodia scrobiculata*.

Así pues, podemos atribuir todas las cepas estudiadas, con la excepción de WP74, a *Diplodia pinea*. En conjunto presentan una amplia variabilidad morfológica tanto en las dimensiones de conidios –que ya hemos mencionado– como en morfología de micelios en cultivo.

Casi todas las cepas de País Vasco, Navarra, Nueva Zelanda y Chile de este estudio muestran características que las identifican como *D. pinea* del morfotipo A en cuanto a morfología y crecimiento del micelio y medidas de los conidios. Solamente 4 cepas (NZ1, NZ2, NZ8 y SO3) correspondientes a los VCG 9, 10, 12 y 16 muestran características algo diferentes respecto a la morfología descrita para el morfotipo A de *Diplodia pinea*. Su micelio es liso en vez de esponjoso y su coloración a los 20 días en cultivo es más clara que en el resto de cepas. Podría tratarse de otro morfotipo no descrito, diferenciado únicamente por la morfología de sus colonias en agar y, por el momento, sin correlación significativa con características de otro tipo (velocidad de crecimiento, dimensiones esporales, patogenicidad), como se ve en la tabla 4.3 y en las figuras 4.15 y 4.16. Este hecho pone de manifiesto la dificultad en el momento presente para dar cuenta de la variabilidad existente en *Diplodia pinea*.

Aunque varios grupos han trabajado sobre la idea de morfotipos bien diferenciados en *Diplodia pinea* (Wang et al. 1985, Palmer et al. 1987, Morelet & Chandelier 1993, Stanosz et al. 1999, de Wet et al. 2000 y 2002) en otros estudios se sugiere que no siempre se pueden caracterizar las diferentes cepas de forma clara dentro de estos morfotipos con características exclusivamente morfológicas (Swart et al. 1991, Swart & Wingfield 1991a, Blodgett & Stanosz 1997 y 1999). Kay et al. (2002) apoyan esta idea con estudios sobre cepas de *Diplodia pinea* recolectadas en Nueva Zelanda. Estos autores señalan que existe una considerable variación entre cepas en cuanto a morfología y coloración del micelio y dimensiones de los conidios encontrando cepas con características intermedias entre los morfotipos A y B. La verificación de la existencia de morfotipos en *Diplodia pinea* y la diferenciación a nivel de especie debe realizarse con técnicas moleculares (Smith & Stanosz 2001 y 2006, de Wet et al. 2003).

4.4.2 Grupos de compatibilidad vegetativa y diversidad genotípica

La diversidad genotípica es un parámetro poblacional importante. Dado que *Diplodia pinea* parece reproducirse únicamente de forma asexual, una forma muy utilizada para estimar la diversidad de sus poblaciones es la búsqueda de grupos de compatibilidad vegetativa o VCG (Leslie 1993). Burgess et al. (2001) estimaron diversidad genotípica para varias poblaciones de *Diplodia pinea* mediante VCG y, paralelamente, con marcadores microsatélites SSR (Short Sequence Repeat). Los resultados fueron similares para las dos técnicas.

La diversidad genotípica (G) encontrada en los niveles de árbol, plantación y área son bastante similares. En cambio los porcentajes de diversidad máxima (\hat{G}) son mayores en los niveles de plantación y árbol que en el nivel de área de forma bastante llamativa. La distribución de VCG encontrada en este estudio sugiere la existencia de un grupo predominante, ampliamente extendido por todo el territorio (VCG 1, compartido con Navarra y con Nueva Zelanda), y probablemente el mejor adaptado a estas condiciones. Junto a él aparecen varios más, de distribución mucho más puntual, quizá debido a que sean de origen más reciente o a que están en desventaja competitiva frente al anterior. La situación se repite en las tres escalas de análisis (área, plantación, árbol). Los VCG minoritarios pueden surgir localmente por mutaciones espontáneas, o han podido igualmente ser importados vía semillas debido a la capacidad de *Diplodia pinea* de propagarse en las semillas.

En los niveles jerárquicos de plantación y árbol han aparecido algunos VCG minoritarios no detectados al nivel de área. Estos VCG pueden ser dinámicos y evolucionar, por lo que en futuros muestreos para detectar variabilidad en *Diplodia pinea* sería conveniente mantener este tipo de muestreo jerárquico. De esta manera se podría detectar si estos grupos se van expandiendo o algunos de los encontrados solamente en semilla aparecen en campo.

Análisis realizados durante años por el Servicio de Semillas y Plantas de Vivero del Gobierno Vasco demuestran que *Diplodia pinea* es un hongo común en la semilla de *Pinus radiata* comercializada en el País Vasco (Iturrutxa et al. 2001). El sistema de recolección de semilla de *Pinus radiata* en el País Vasco se basa en la selección de rodales por todo el territorio. Una vez seleccionados los rodales y recogidas las piñas, el procesado de la semilla se centraliza en una única empresa, hasta 2005 Oihanberri S. A. y posteriormente la Asociación de Viveristas de Planta Forestal del País Vasco. Este centro también se encarga de la importación de semilla de *Pinus radiata* de países como Chile y Nueva Zelanda. Son materiales con origen en programas de mejora genética y el hongo *Diplodia pinea* viene con ellos, como demuestra su detección en los controles de sanidad realizados a la importación de estas semillas. Desde este punto centralizador de la semilla se vuelve a distribuir a todos los viveristas forestales del País Vasco para producir la planta que luego irá a las repoblaciones (García-Serna et al. 1997). En definitiva, la semilla puede ser recogida en cualquier punto del País Vasco donde haya repoblaciones de *Pinus radiata*, o importada de Chile y Nueva Zelanda, y puede ser distribuida a cualquier punto donde se vaya a repoblar con esta especie. Este hecho, perpetuado año tras año, y con el hongo *Diplodia pinea* asociado a la semilla, hace que el movimiento de las cepas de este hongo sea continuo y por todo el territorio. Los grupos de compatibilidad compartidos

con otras regiones lejanas (VCG 1 con Nueva Zelanda, VCG 2 con Chile) sugieren que, o bien se trata de grupos de compatibilidad muy extendidos y dominantes en amplias regiones (como podría ser VCG 1), o bien son grupos que se han introducido vía semillas, lo que podría explicar mejor el grupo VCG 2. Análisis futuros podrían servir para saber si los grupos detectados únicamente en semillas importadas se establecen también en campo.

Normalmente se acepta que la diversidad de una población introducida es más baja que la de poblaciones indígenas (Leslie 1993). La detección de los VCG de diversas poblaciones del hongo *Cryphonectria* se ha utilizado para estimar diversidad genética de las mismas. Así, en las poblaciones introducidas en Europa del hongo *Cryphonectria parasitica* se han estimado índices de diversidad menores que en una población indígena de China (Anagnostakis et al. 1986, Milgroom et al. 1992). Otro caso similar es el de *Cryphonectria cubensis*, cuya diversidad genotípica de poblaciones indígenas de Brasil, Indonesia y Venezuela es mayor que la de una población introducida en Sudáfrica (van Zyl et al. 1998, van Heerden & Wingfield 2001). Sin embargo, cabe esperar también que la diversidad genética en poblaciones de organismos parásitos esté relacionada también al menos con dos factores importantes. Por una parte, la diversidad disponible en la región de organismos hospedadores para el parásito (especies del género *Pinus* u otras coníferas, en el caso de *Diplodia*). Por otra, el número de introducciones del patógeno, y la procedencia de cada una.

Así, en *Diplodia pinea* esta presupuesta relación entre carácter autóctono y mayor diversidad no se manifiesta de forma clara. La asociación entre *Diplodia pinea* y las coníferas, sobre todo del género *Pinus*, sugiere un rango autóctono común, sobre todo en el hemisferio norte. Por contra, en el hemisferio sur, se considera un patógeno introducido (Burgess et al. 2004). Smith et al. (2000) comparan la población sudafricana, considerada introducida, con una población de *Diplodia pinea* en el norte de Sumatra donde se considera autóctona. La población sudafricana se muestra mucho más diversa con valores de $G = 32,6$ y $\hat{G} = 30,5\%$ frente a la $G = 1,2$ y $\hat{G} = 1,5\%$ de la población de Sumatra. Los valores se obtuvieron mediante la detección de VCG en las dos poblaciones.

De forma similar, Burgess et al. (2004) comparan diversidad genotípica de 6 poblaciones de *Diplodia pinea*. Tres de ellas son consideradas autóctonas: Norteamérica (región de los Grandes Lagos entre Estados Unidos y Canadá), Estados Unidos (estado de Michigan) y Europa (zona de los Alpes entre Francia y Suiza). Las otras tres introducidas: Australia (zona oeste), Nueva Zelanda y Sudáfrica. Las poblaciones más diversas resultaron ser las de Estados Unidos, Nueva Zelanda y Sudáfrica con valores de G entre 9,15 y 9,86 seguidas de las poblaciones de Los Grandes Lagos con $G = 7,38$ y de Australia con $G = 5,13$. Finalmente, con una diversidad muy baja se encontraba la población de los Alpes con $G = 1,45$. Este mismo orden se mantiene con los valores de porcentaje máximo de diversidad (\hat{G}) que oscilan entre 5,2% para la población europea y 36,8% para la población sudafricana.

En el caso de las poblaciones autóctonas de Norteamérica la diversidad es mayor y concuerda más con la teoría general de que las poblaciones originarias se muestran más diversas que las introducidas. La mayor diversidad del género *Pinus* en este continente (Farjon 2010), y la presumible evolución paralela de *Diplodia pinea* junto a este género, podría explicar el hecho de que su diversidad sea mayor que en el resto de zonas del hemisferio norte donde también consideraríamos a *Diplodia pinea* autóctona. En el norte de Europa se conoce la presencia de *Diplodia pinea* desde 1823. Las referencias sobre la existencia de esta especie en el País Vasco son mucho más recientes. En este sentido hay que tener en cuenta que la presencia del género *Pinus* en el País Vasco (y en todo el norte de la Península) es y ha sido con anterioridad al siglo XX mucho más puntual, tanto en número de especies como en extensión de cubierta natural. En el caso del País Vasco prácticamente estaría restringido a las masas de *Pinus sylvestris* del sur del territorio. El resto de masas forestales del género *Pinus* podrían considerarse introducidas por lo que no quedaría claro el origen de *Diplodia pinea* en esta región.

Por otra parte, la diversidad de este hongo en Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia se podría explicar por la importación continuada de semilla de especies del género *Pinus* y otras coníferas de diferentes partes del mundo durante décadas (Smith et al. 2000). Además, la importancia forestal de *Pinus radiata* en estos 3 países ha favorecido un gran intercambio de material de reproducción de programas de mejora genética (semillas, estaquillas, injertos) entre ellos y otros países como Chile y Estados Unidos (Burgess & Wingfield 2001). Este hecho, unido a la importación reiterada de semillas durante muchos años, podría explicar esta mayor diversidad.

Los valores de diversidad que hemos obtenido para el País Vasco son muy bajos y coincidentes con los mencionados por otros autores para poblaciones autóctonas de *Diplodia pinea* en el norte de Sumatra y en la zona de los Alpes entre Francia y Suiza. En estas zonas la mayoría de las muestras se encuentran concentradas en muy pocos VCG. En nuestro caso el 70% de las muestras se encuentran en un único grupo de compatibilidad. Este porcentaje se eleva al 80% en la población de los Alpes y al 90% en la de Sumatra. Esta baja diversidad se explicaría por esta dominancia de un único grupo clonal sobre el resto.

Como hemos visto en este trabajo en el País Vasco tenemos cepas chilenas y neozelandesas compartidas con cepas del País Vasco en los VCG 1 y 2. Además, la detección en semilla importada de cepas no encontradas sobre el terreno, nos indica que podríamos estar introduciendo nuevas cepas de este hongo en nuestras masas forestales. Esto nos podría llevar a un incremento en la diversidad de este patógeno, como ya ha ocurrido en Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia. Todas las cepas que hemos detectado procedentes de Nueva Zelanda y Chile han demostrado tener capacidad de infección en los ensayos de patogenicidad y además, una de ellas, como es el caso de la cepa NZ2 (VCG 10), es significativamente la de mayor crecimiento en condiciones saprófitas y también de las más infectivas en el ensayo de patogenicidad. Todo esto nos podría llevar a incrementar los problemas generados por la enfermedad producida por *Diplodia pinea* al ampliarse con nuevas cepas su capacidad de adaptación a condiciones diversas.

4.4.3 Datos comparativos de *Fusarium circinatum*

Iturrirxa et al. (2011), en un trabajo con 58 cepas de *Fusarium circinatum* obtenidas en el País Vasco y mediante comparación de VCG, encuentran una diversidad genotípica muy baja. Tan solo aparecen dos VCG distintos e incluso, en algunos casos que se consideraron distintos, las reacciones entre cepas ni siquiera eran totales y existía cierta compatibilidad. Las cepas se repartieron a nivel de área entre los dos VCG al 44% y 56%. A nivel de plantación, en tres parcelas distintas, todas las cepas pertenecieron a un único VCG. Además, los dos VCG pertenecían al MAT-2 por lo que la posibilidad de reproducción sexual queda excluida entre estas cepas.

Según estos autores la población de *Fusarium circinatum* en el País Vasco es muy homogénea lo que concuerda con el reciente establecimiento de la enfermedad en esta zona. Correll et al. (1992) en California encuentran 5 VCG frente a los 45 que detectan en Florida. Explican esta diferencia por el reciente establecimiento de la enfermedad en California frente a la larga permanencia de la misma en Florida. De forma similar, las diferencias de diversidad entre las dos especies, *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum*, reflejarían la implantación mucho más reciente de la segunda en nuestro territorio.

4.5 Conclusiones

1- Hemos aislado y caracterizado 83 cepas para este estudio. De ellas, 54 provienen de la CAPV, 10 de Navarra, 9 de Chile y 10 de Nueva Zelanda. Todas estas cepas se conservan para futuros estudios en el centro de investigación NEIKER-Tecnalia de Arkaute (Araba).

2- Una de las cepas corresponde a un hongo de la familia Botryosphaeriaceae aislada sobre *Chamaecyparis lawsoniana* que también resulta patógena en pinos.

3- Las 82 cepas restantes han de adscribirse a *Diplodia pinea*, tanto por sus tamaños esporales como por el análisis molecular. No hemos identificado *Diplodia scrobiculata* en este estudio.

4- En lo relativo a la forma y velocidad de crecimiento de las colonias, 4 cepas presentan características que difieren de lo publicado hasta la fecha para *Diplodia pinea*, y representan un morfotipo nuevo.

5- Todas las cepas aisladas han resultado patogénicas sobre *Pinus radiata*.

6- Hemos detectado un total de 20 diferentes grupos de compatibilidad vegetativa, de los que 12 están presentes en la CAPV, junto con otro adicional detectado en Navarra.

7.- Se ha detectado la introducción de grupos nuevos de compatibilidad vegetativa a partir de semilla foránea de Chile y Nueva Zelanda.

8.- Estas nuevas introducciones son también patogénicas, incrementan la diversidad genotípica y la capacidad de colonizar nuevos ecosistemas y especies, incluso en condiciones adversas. Es el caso del VCG 10 con la cepa de Nueva

Zelanda NZ2, que es de muy rápido crecimiento incluso a bajas temperaturas y con una capacidad patogénica de las más altas de las encontradas en este estudio.

9.- La forma de recogida y distribución de la semilla de *Pinus radiata* en el País Vasco y su asociación con *Diplodia pinea* puede explicar que los distintos VCG se encuentren distribuidos con una diversidad parecida en los tres niveles jerárquicos de muestreo considerados (área, plantación y árbol).

10.- La diversidad de *Diplodia pinea* en el País Vasco se considera baja comparada con las poblaciones de este hongo en Norteamérica, en donde se consideran autóctonas. Pero es similar a la de otras zonas como los Alpes europeos y Sumatra, donde *Diplodia pinea* también se considera autóctona.

11.- La diversidad más alta de *Diplodia pinea* se encuentra hasta la fecha, en Sudáfrica y Nueva Zelanda donde se considera una especie introducida. Esto podría explicarse por las continuas introducciones de material de reproducción para repoblaciones forestales. La diversidad de las poblaciones norteamericanas, consideradas autóctonas, también es muy alta y podría explicarse por seguir una evolución paralela al género *Pinus* en esta zona considerada de irradiación de este género en el mundo.

12.- *Diplodia pinea* se considera autóctona en el hemisferio norte pero en el País Vasco no podemos determinar su origen de forma clara. En fechas recientes sí se han producido introducciones debido a la importación de semilla de países como Chile y Nueva Zelanda. Este hecho podría suponer un aumento de la diversidad en el futuro y ampliar los problemas generadas por este hongo.

13.- Estos resultados conforman una base de datos imprescindible para monitorizar la evolución poblacional de *Diplodia pinea* en el futuro.

5. NIVELES DE RESISTENCIA EN CONÍFERAS UTILIZADAS EN PLANTACIONES ESPAÑOLAS FRENTE A LOS PATÓGENOS
Fusarium circinatum y *Diplodia pinea*



Inoculación con micelio de *Diplodia pinea*

5 NIVELES DE RESISTENCIA EN CONÍFERAS UTILIZADAS EN PLANTACIONES ESPAÑOLAS FRENTE A LOS PATÓGENOS *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea*

5.1 Introducción

Los síntomas producidos por *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum*, que pueden llegar a producir la muerte de la planta, ya han sido suficientemente reseñados en apartados anteriores de este mismo trabajo (ver capítulos 2 y 3). Así mismo, ya se ha discutido la trascendencia económica de estas especies, por su capacidad para producir pérdidas considerables en el sector de la producción de madera (ver capítulo 1). En esta parte del trabajo tratamos de analizar la diversidad interespecifica de respuestas a la invasión fúngica, en busca de taxones potencialmente más resistentes.

5.1.1 Mecanismos de resistencia a patógenos

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, interactúan con un gran número de organismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa. De acuerdo con los axiomas de resistencia planteados por Browning (1980), la resistencia y la avirulencia son la regla mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción. Este autor manifiesta que la resistencia y la susceptibilidad son los extremos de un continuo. Los genes que determinan la resistencia y la susceptibilidad en la planta son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno (Browning 1980). Otros autores como Keen (1992) indican que la enfermedad es la excepción y no la regla para las plantas que se desarrollan bajo condiciones naturales, lo cual no siempre es cierto bajo las condiciones que prevalecen en la agricultura y cultivos forestales modernos.

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen resistencia contra patógenos de forma pasiva. Los mecanismos de defensa constitutivos operan en forma constante en la planta y se basan en el uso de herramientas estructurales y químicas (Vand der Plank 1968, Osbourn 1996).

Las herramientas estructurales actúan como barrera física y pueden ser tricomas epidérmicos o cutículas ceras que impiden eficazmente la penetración de determinados patógenos. Estas cutículas están constituidas por cutina (polímero de ácidos grasos hidroxilados de cadena larga), suberina (polímero de ácidos grasos hidroxilados y alcoholes de cadena larga) y ceras (mezcla de lípidos de cadena larga como alcanos y ésteres de ácidos grasos). Estos constituyentes forman una capa hidrofóbica e impermeable sobre la pared de las células de la epidermis (Osbourn 1996, Jankiewicz & Sobiczewski 2003).

Las herramientas estructurales proporcionan a las plantas la capacidad de detener la entrada de la gran mayoría de los agentes patógenos a los que se ven expuestas. Sin embargo, algunos patógenos pueden entrar al organismo por aperturas naturales. También los daños físicos como los producidos por vientos fuertes, granizadas y ataques de insectos entre otros, pueden debilitar o romper estas barreras superficiales, abriendo vías de entrada

para potenciales patógenos, entre los cuales suelen ser mayoritarios los hongos. Las esporas pueden llegar directamente a las zonas dañadas, arrastradas por el viento a partir de focos infecciosos más o menos próximos, o en otros casos asistidas por insectos vectores (Swart et al. 1987a y 1987b, Dallara et al. 1995, Hoover et al. 1995 y 1996, Storer et al. 1995 y 2002, Zwolinski et al. 1995).

Una vez superada esta barrera física las plantas pueden manifestar otras formas de resistirse a la invasión mediante defensas químicas. Dentro de estas armas se pueden citar algunas como la producción de sustancias tóxicas para los patógenos o la creación de condiciones desfavorables para que no se desarrolle el patógeno, como cambiar el pH de los tejidos atacados. Aunque las características estructurales puedan definir en algunos casos la resistencia a la infección, más comúnmente son las sustancias químicas las que determinan la resistencia (Jankiewicz & Sobiczewski 2003). Las herramientas químicas incluyen la producción de una gran diversidad de sustancias tóxicas para los organismos patógenos. Ejemplo de estas sustancias (genéricamente denominados fitoalexinas) son la variedad de alcaloides, fenoles simples o polifenoles (taninos), aceites esenciales y terpenos en general que son capaces de producir y almacenar las células vegetales. Muchos de los alcaloides y fenoles son almacenados en el interior de la vacuola celular, uno de los compartimientos más prominentes de la célula vegetal. Incluso muchos de ellos deben ser previamente modificados, generalmente glicosilados, para hacerlos más hidrosolubles. Los terpenos, en cambio, generalmente se almacenan en estructuras especializadas de las células de la epidermis de las plantas: los tricomas o pelos glandulares (Nicholson & Hammerschmidt 1992, Osbourn 1996, Madriz 2002).

Estas defensas químicas basadas en la síntesis de compuestos como los mencionados en el párrafo anterior se han descrito tanto para angiospermas como gimnospermas (Davis et al. 2002, Nagy et al. 2004). Todas las pináceas producen resina rica en terpenos como defensa frente a organismos patógenos, entre otras funciones diversas. En el género *Pinus*, esta resina funciona principalmente como una defensa constitutiva. Todos ellos almacenan grandes cantidades en un sistema de canales resiníferos interconectado y ramificado por toda la planta (Langenheim 2003). La resina de *Pinus radiata* contiene, entre otros, los monoterpenos aromáticos Δ -3-careno, α -pineno y β -pineno, que se muestran tóxicos frente a la germinación de esporas de *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum*. Estos compuestos se encuentran en las oleorresinas que se generan en las zonas dañadas tras fenómenos meteorológicos adversos o ataques de insectos (Chou & Zabkiewicz 1976, Behrendt et al. 1995, Blodgett & Stanosz 1997 y 1998, Blodgett et al. 2005, Sliniski & Gordon 2009).

5.1.1.1 Resistencia inducida

Los mecanismos constitutivos de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie y generalmente no suponen una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno. A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados resistencia inducida, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Hammerschmidt 1999, Madriz 2002). La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento

específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Gabriel & Rolfe 1990, Hutcheson 1998).

El progreso en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares que controlan los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos y plagas ha permitido comprobar la existencia de analogías entre los mecanismos de defensa vegetales y el sistema de inmunidad innata, no mediado por anticuerpos, de los animales. Ambos sistemas de defensa se basan en el reconocimiento mediante receptores de membrana o intracelulares de moléculas características de los patógenos, lo que determina la activación de barreras de defensa inducibles (Nürnbergger & Brunner 2002). Desde hace más de 50 años se sabe que la mayoría de los mecanismos de defensa inducibles se caracterizan por ser sistémicos, es decir, no sólo se activan en el tejido donde se produce el reconocimiento del patógeno, sino también en el resto de la planta que no ha estado expuesta a la infección. Esta respuesta sistémica protege a la planta frente a posteriores ataques de patógenos (Molina et al. 2007).

Cuando la célula vegetal detecta la presencia de un patógeno, se activa una potente reacción de defensa inducida. Esta reacción es más severa a nivel local, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno, y más suave a nivel sistémico, en los tejidos no infectados de la planta. Básicamente este tipo de reacción permite potenciar las barreras, tanto químicas como estructurales, que los tejidos vegetales mantienen en forma constitutiva (Morris et al. 1998, Molina et al. 2007).

La respuesta local ha sido llamada respuesta de hipersensibilidad puesto que puede llevar, a altas dosis del patógeno, a la necrosis de parte importante del tejido infectado. Esta necrosis se produce fundamentalmente por activación de herramientas químicas: las células infectadas producen altas concentraciones de potentes agentes oxidantes: especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos, como el ácido salicílico. Además, estas células producen altas concentraciones de otras hormonas como etileno, óxido nitroso, ácido jasmónico y sus derivados, y otros antibióticos o fitoalexinas. Es interesante destacar que la reacción local inducida utiliza también herramientas estructurales, fundamentalmente el reforzamiento de la pared celular, para impedir la proliferación y la diseminación del patógeno hacia el resto de la planta. El reforzamiento de la pared celular ocurre fundamentalmente por lignificación y aumento en la producción y entrecruzamiento de glicoproteínas estructurales de la pared. La reacción de hipersensibilidad es entonces un mecanismo muy eficaz para circunscribir al patógeno en el tejido infectado (Ryals et al. 1996).

En los tejidos que rodean al sitio de entrada del patógeno ocurre una reacción denominada de resistencia local adquirida. En estos tejidos se acumulan especies reactivas de oxígeno, ácido salicílico y las otras hormonas, en concentraciones más bajas que en las células infectadas. Estos compuestos provocan la activación de un gran número de genes de defensa. Un grupo de estos genes codifica para enzimas de las rutas de síntesis de fitoalexinas, provocando un aumento sostenido en la producción de estos compuestos antibióticos y de compuestos fenólicos precursores de la lignina. Un segundo grupo de genes de defensa codifica para proteínas estructurales de la pared, contribuyendo a su reforzamiento. Un tercer grupo codifica para enzimas encargadas de detoxificar y proteger al tejido vegetal del daño oxidativo. Un cuarto grupo de genes codifica para enzimas que degradan la pared de hongos y bacterias (Takken & Joosten 2000). En consecuencia, la

reacción de resistencia local adquirida permite proteger al tejido circundante al sitio de infección, potenciando las barreras químicas y estructurales (Molina et al. 2007).

En los tejidos distantes al sitio de infección se produce una reacción denominada de resistencia sistémica adquirida. Esta reacción es similar a la reacción de resistencia local adquirida, sólo que es más atenuada. La reacción de resistencia sistémica adquirida está fundamentalmente destinada a proteger o inmunizar al resto de la planta frente a una potencial segunda infección por el mismo u otro agente patógeno. En conjunto, estas reacciones de defensa inducidas permiten detener la proliferación del patógeno y su diseminación desde el sitio de infección al resto de la planta. Además, permite a la planta desarrollar un estado de resistencia que le proporciona inmunidad para una segunda infección. Para que estas reacciones inducidas ocurran, es imprescindible que la planta detecte la presencia del patógeno (Ryals et al. 1996).

En general, el reconocimiento del patógeno por parte de la planta es específico, vale decir, se produce por la interacción de una proteína receptora de la planta (codificada por un gen de resistencia) con una proteína del patógeno con capacidad inductora (codificada por un gen de avirulencia). Los receptores caracterizados hasta la fecha tienen la capacidad de reconocer sólo una proteína específica de un patógeno en particular. En consecuencia, si la planta es infectada con un patógeno para el cual no posee un receptor que le permita reconocerlo, el patógeno puede proliferar e invadir los tejidos ocasionando una enfermedad (Gabriel & Rolfe 1990, Hammerschmidt 1999). Una vez que el patógeno ha sido reconocido por la célula vegetal se activan los mecanismos de defensa inducidos. El reconocimiento del patógeno por la célula vegetal es una etapa indispensable para que se activen los mecanismos de defensa inducidos (Madriz 2002, Molina et al. 2007).

5.1.2. Factores que afectan a la relación hospedador-patógeno

Aspectos como las distintas cepas de los patógenos, características genéticas de los hospedadores, condiciones medioambientales, estado fenológico, condiciones fisiológicas de las plantas y de los propios organismos patógenos pueden influir en la susceptibilidad (Hepting & Roth 1946, Blakeslee et al. 1980, Chou 1982a y 1982b, Storer et al. 1994a y 1995, Viljoen et al. 1994, Blakeslee & Rockwood 1999, Clark & Gordon 1999, Dwinell 1999, Guerra-Santos 1999, Hodge & Dvorak 2000, Gadgil et al. 2003, Aegerter & Gordon 2006). En el análisis de las relaciones entre hospedadores y patógenos sería necesario distinguir, en la medida de lo posible, entre estos factores con el fin de poder establecer mecanismos efectivos y estrategias claras para el control o potencial eliminación de las enfermedades que estamos tratando.

5.1.2.1 Factores genéticos del hospedador

Las diferencias genéticas entre distintas especies hacen que unas se muestren más resistentes que otras a diferentes enfermedades. Mediante ensayos de resistencia en condiciones controladas se ha demostrado que hay especies más resistentes que otras a *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum*. Sin embargo debemos ser cuidadosos cuando hacemos comparaciones puesto que, a la hora de establecer resistencias, hay que tener en cuenta un gran número de factores que pueden influir en los resultados (Swart et al. 1988, Swart & Wingfield 1991a, Aegerter et al. 2003, Gadgil et al. 2003). Es muy importante definir ensayos en los que aislemos todos estos factores para poder establecer diferencias claras de susceptibilidad a patógenos debido a las características genéticas de las distintas

especies. Estas diferencias genéticas pueden mostrarse a varios niveles taxonómicos, de familia, genérico, específico, hasta el nivel individual. Según nos interese podemos establecer estrategias de control mediante mejora genética seleccionando individuos que muestren resistencias de carácter genético a estas enfermedades (Shelbourne et al. 1986 y 1989).

5.1.2.2 Estado fisiológico (influencia de la edad, situaciones de estrés, etc.)

La edad de los árboles puede influir en la susceptibilidad a diversos patógenos por los cambios físicos que se producen en las plantas a medida que crecen. Esto puede suponer una mayor resistencia en individuos adultos por tener estructuras más lignificadas y cortezas más gruesas, presentando más resistencia a la penetración del patógeno (Chou 1977).

Chou (1977) señala que los árboles adultos de *Pinus radiata* son más resistentes a la infección por *Diplodia pinea*. Indica la posibilidad de que los árboles sufran un cambio de fase y adquieran un estado maduro con cambios en los meristemos apicales de los brotes con una alteración en el balance de nutrientes, lo que aumentaría su tamaño y complejidad. Este cambio se daría alrededor de los 10 años en *P. radiata* y lo haría más resistente a la infección por *Diplodia pinea*. Peterson (1977) supone que, en los árboles adultos de *Pinus nigra*, *P. ponderosa* y *P. sylvestris*, la infección por *Diplodia pinea* se produce de forma más susceptible en las piñas que en los brotes. Esto genera más cantidad de inóculo en árboles adultos (con más piñas) que en jóvenes, lo que supondría una mayor posibilidad de infección.

El incremento de susceptibilidad a *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* puede ocurrir debido a varios factores como la sequía, daños físicos, ataques de insectos y otros estreses de origen medioambiental (Wingfield 1980, Chou 1987, Nicholls & Ostry 1990, Blodgett et al. 1997, Hodge & Dvorak 2000, Paoletti et al. 2001, Storer et al. 2004, Gordon 2006).

Swart et al. (1987a) concluyen que la infección por *Diplodia pinea* es más severa cuando los árboles están estresados y dañados por tormentas de granizo. Aunque demuestran, con inoculaciones en condiciones controladas en plántulas de *Pinus radiata*, que la infección se puede producir en ausencia de daños físicos, contrariamente a lo manifestado por Chou en 1978 que señala que, para que se produzca la infección de los tejidos, debe existir una lesión mecánica previa. Según el mismo autor, *Diplodia pinea* provoca una degradación de la pared celular en una primera fase de la infección, lo que sugiere que la penetración en el hospedador podría ser, en parte, química. Aunque parece que el hongo no es capaz de penetrar a través de aberturas naturales; necesita zonas dañadas para poder penetrar en el hospedador.

5.1.2.3 Factores genéticos del organismo patógeno

La variedad de cepas que puede mostrar *Diplodia pinea* podría implicar diferentes capacidades de infección. Hay que tener en cuenta estas variaciones en la capacidad de virulencia de las cepas a la hora de establecer ensayos de resistencia. Para poder aislar la influencia de este factor es muy importante utilizar siempre las mismas cepas para poder comparar resultados.

5.1.2.4 Factores climáticos

La infección de plántulas de *Pinus radiata* está determinada por las condiciones medioambientales y el estado fenológico. Las condiciones de temperatura y humedad durante los estados iniciales de la infección juegan un papel decisivo en el proceso de infección por *Diplodia pinea* y por *Fusarium circinatum* en *Pinus radiata* (Chou 1982a y 1982b, Swart et al. 1988, Zwolinski et al. 1990, Aegerter et al. 2003, Gadgil et al. 2003). La infección por *Diplodia pinea* se puede producir desde los 5 °C hasta los 35-40 °C, obteniéndose el mayor nivel de infección entre los 10 y 25 °C. Es más determinante la temperatura en el momento inicial de la infección que la que se produzca durante el desarrollo de la enfermedad (Chou 1982a, 1982b). Además hay que tener en cuenta que las condiciones microclimáticas de las masas forestales pueden jugar un papel importante en la evolución de las enfermedades (Zwolinski et al. 1990). Según Chou (1977), las condiciones microclimáticas de la masa forestal harían que las partes más altas de los árboles se vean menos afectadas por la infección al estar más aireadas, menos húmedas y más frías que las partes bajas de la masa forestal. Esto parece entrar en contradicción con el hecho de que la infección por *Diplodia pinea* se suele manifestar en los brotes de la copa del árbol por ser la zona más expuesta del árbol a granizadas y vendavales.

De lo que se trata en este ensayo es de conocer la respuesta asociada únicamente al factor genético del hospedador y de minimizar lo más posible la importancia de los demás factores en el experimento, lo cual puede llevarse a cabo mediante el uso del invernadero en condiciones controladas y utilizando las mismas cepas en todos los casos.

5.1.3 Mecanismos de control

5.1.3.1 Selección de taxones menos susceptibles para sustituir a los actuales

Las inoculaciones en una cámara de crecimiento o invernaderos con condiciones controladas proporcionan un método fiable y efectivo para evaluar la resistencia de las plantas frente a los patógenos. Es el método más frecuentemente utilizado para estudiar la resistencia interespecífica de los pinos a *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* (Swart et al. 1988, Gordon et al. 2006a, Roux et al. 2007). Así se pueden establecer especies forestales que respondan de forma más efectiva ante los ataques de estos patógenos. Se trata de tener en cuenta las producciones madereras de estas especies para no comprometer los rendimientos económicos de las masas forestales. Sin embargo, no sería aceptable este planteamiento en la población originaria de *Pinus radiata*, para la que *Fusarium circinatum* representa un problema ecológico que podría acabar con las poblaciones en su hábitat natural. Teniendo en cuenta este problema, Storer et al. (1999) diseñaron un método de inoculaciones en campo para inducir resistencias y seleccionar genotipos resistentes.

5.1.3.2 Selección clonal de árboles resistentes

Además de la diferente respuesta a los patógenos de distintas especies, existe distinta respuesta frente a los patógenos incluso a nivel individual, por lo que la selección clonal de individuos resistentes podría utilizarse como medida de control en zonas donde estas enfermedades estén instaladas. Esta medida podría ser eficaz en zonas donde no se quiera prescindir del cultivo de determinada especie por su importancia económica (Gadgil et al. 2003, Koltay 2007). De todas maneras, para establecer un programa efectivo de mejora genética, el número de individuos seleccionados debe ser suficiente para no

estrechar la base genética de la población, de manera que no podamos responder de forma eficaz a nuevos problemas sanitarios que pudieran surgir.

5.1.3.3 Resistencias inducidas

Otro método de lucha contra estas enfermedades es la posibilidad de producir resistencias inducidas. Esta propiedad tiene una potencial utilidad agronómica, lo que ha despertado el interés de muchos grupos de investigación por el estudio de las bases moleculares y genéticas de la resistencia inducida. El objetivo último de esta línea de investigación sería la identificación y el desarrollo de productos agroquímicos (inductores) capaces de activar la resistencia a patógenos en especies vegetales de interés agronómico y forestal (Molina et al. 2007).

La inducción de resistencia también se puede conseguir con inoculaciones controladas de estos patógenos sobre plantas sanas (Bonello et al. 2001, Blodgett et al. 2002). Ensayos realizados sobre *Pinus radiata* y *P. nigra* con *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea* indican que estas inoculaciones consiguen producir y activar acumulaciones de proteínas y compuestos fenólicos que se generan en la resina sobre las heridas y las plantas se vuelven más resistentes con el tiempo (Dick & Reglinski 2003, Luchi et al. 2005, Gordon 2006, Wang et al. 2006, Blodgett et al. 2007, Eyles et al. 2007). (Ver apartado 5.1.1.1 Resistencia inducida).

5.1.4 Objetivos

Las medidas más efectivas de control de enfermedades sugieren el sustituir las especies muy susceptibles por otras más resistentes o variedades de la misma menos susceptibles. Obviamente el primer paso para esto es contar con suficiente información sobre la resistencia interespecífica y el grado en que puede estar afectada por las condiciones climáticas y del sitio (Swart et al. 1985).

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

- Conocer especies forestales resistentes que puedan ofrecer alternativas en zonas afectadas por estas enfermedades. Esto es un recurso demandado por las asociaciones de forestalistas (Iturrutxa 2001).
- Conseguir suficiente información sobre resistencias individuales como base para una potencial mejora genética.
- Generar una escala de susceptibilidad a los hongos *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea* con varias especies de coníferas forestales utilizadas en España. Esta información se puede utilizar para obtener predicciones sobre los riesgos de infección de las masas forestales y establecer propuestas de actuación en las áreas de España donde *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea* son un problema real.

5.2 Material y métodos

5.2.1 Preparación del inóculo y métodos de inoculación

Para este estudio se seleccionaron dos cepas representativas de las poblaciones de cultivos aislados de *Fusarium circinatum* (cepa CECT 20759; fig. 5.1-a) y *Diplodia pinea* (cepa PV 23; fig. 5.1-b). Ambas cepas fueron obtenidas a partir de material infectado de plantaciones de *Pinus radiata* del País Vasco.

La cepa CECT 20759 (Colección Española de Cultivos Tipo: www.cect.org) corresponde al grupo de compatibilidad vegetativa A y grupo de apareamiento MAT-2 aislada por Iturrity & Ganley en 2004 y descrita por Iturrity et al. (2005).

La cepa PV 23 se corresponde con el grupo de compatibilidad vegetativa más frecuente de esta comunidad descrito en el estudio presentado anteriormente de caracterización de *Diplodia pinea* (véase capítulo 4, y García-Serna et al. 2008, García-Serna & Iturrity 2008).

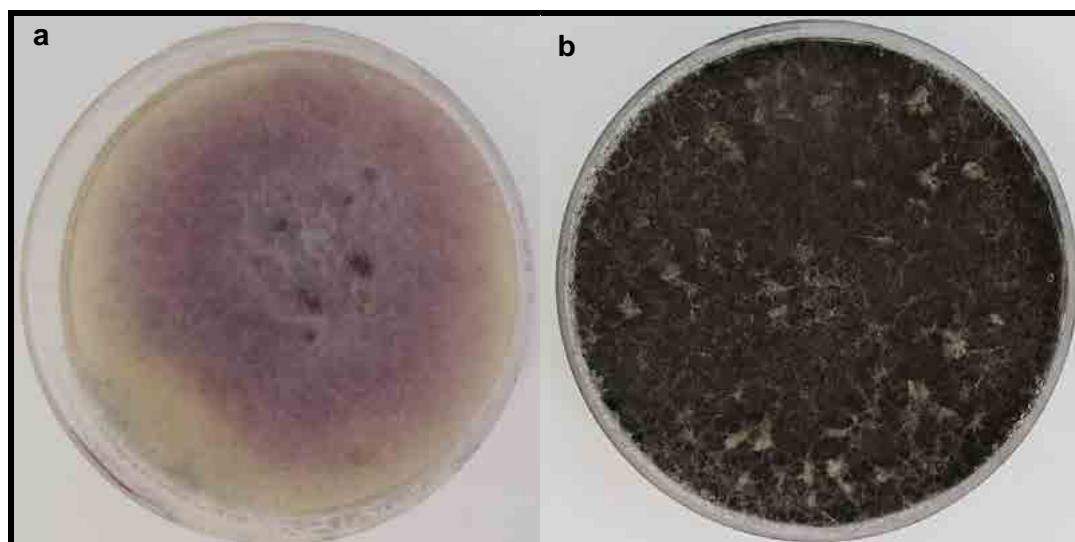


Fig. 5.1. a) Cepa CECT 20759 de *Fusarium circinatum*; b) cepa PV 23 de *Diplodia pinea*.

El inóculo de *Diplodia pinea* consistió en fragmentos de micelio de 4 a 7 días de crecimiento sobre medio MEA (Malt Extract Agar) que se obtuvieron mediante cortes con una pipeta de cristal esterilizada. Para la inoculación, se practicó una ligera incisión en el tallo de la planta hasta la profundidad del cámbium de un tamaño aproximado de 0,2 mm de diámetro. La herida se realizó en tallo de un año. Sobre esta herida se depositó el fragmento de micelio y se recubrió con parafilm para evitar su desprendimiento (Chou 1976b, Swart & Wingfield 1991b, Blodgett & Stanosz 1997, Stanosz et al. 1997).

El inóculo de *Fusarium circinatum* consistió en una suspensión acuosa de esporas preparada el mismo día que se procede a la inoculación. Se obtiene utilizando el método descrito por Schmale & Gordon (2003). El cultivo de *Fusarium circinatum* en PDA, tras una semana de crecimiento, se cubre con una solución acuosa de KCl 0.5 % y el micelio se remueve y presiona con ayuda de un porta de microscopio esterilizado. La suspensión fúngica resultante de este proceso se filtra a través de una doble capa de gasa estéril y se cuantifica su concentración utilizando una cámara Neubauer. La suspensión original se diluye hasta ajustarla a una concentración de 25 esporas/ μ l.

Las heridas de inoculación fueron preparadas siguiendo el procedimiento descrito por Gordon et al. (1998a). Se practicó una incisión con ayuda de una aguja llegando hasta la profundidad del tejido cambial. La herida se realizó en tallo de 2 años, excepto en las plántulas de un año de edad. En cada incisión se depositaron aproximadamente 50 esporas del hongo, 2 μ l de la suspensión de esporas preparada de *Fusarium circinatum*. Aunque en este caso el desprendimiento de la suspensión es menos probable que en el caso del fragmento de micelio utilizado con *Diplodia pinea*, las heridas con la suspensión también fueron selladas con parafilm.

Las inoculaciones se llevaron a cabo en un invernadero de bioseguridad tipo P2. Las temperaturas se mantuvieron en un rango de 18-25 °C, con una humedad relativa de 55% a 65 % y 16 horas de luz diaria (figs. 5.2-a y 5.2-b).

Tras un periodo de 4 semanas, se cortaron las ramas infectadas con una tijera de podar, y se retiró la corteza en el entorno del punto de inoculación con ayuda de un bisturí hasta dejar visible la zona lesionada en el cámbium. Ésta adquiere un tono oscuro perfectamente discernible del tejido sano (figs. 5.3, 5.4-a, 5.4-b, 5.5 y 5.6). La zona oscurecida se midió con ayuda de un calibre de precisión. Los resultados de las medidas se analizaron estadísticamente. Se aplicó un análisis de varianza y un test de Waller-Duncan para el agrupamiento de medias a una $P \leq 0,05\%$ (Gordon et al. 1998a).

Teniendo en cuenta que las plantas utilizadas como testigos, heridas y no inoculadas, llegaron a mostrar lesiones de 4 mm, hemos considerado plantas resistentes (R+) las que poseían lesiones medias ≤ 6 mm. Entre 6 mm y 10 mm se consideran plantas moderadamente resistentes (R-). Por encima de 10 mm y hasta 15 mm se consideran moderadamente susceptibles (S-). Las lesiones por encima de los 15 mm se consideran tan importantes que las catalogamos de altamente susceptibles (S+). Los fragmentos inoculados que no mostraron lesión se cultivaron en PDA y, en caso de que no hubiera crecimiento del hongo sobre este fragmento, se consideraron fallos de inoculación y se desestimaron en el análisis.

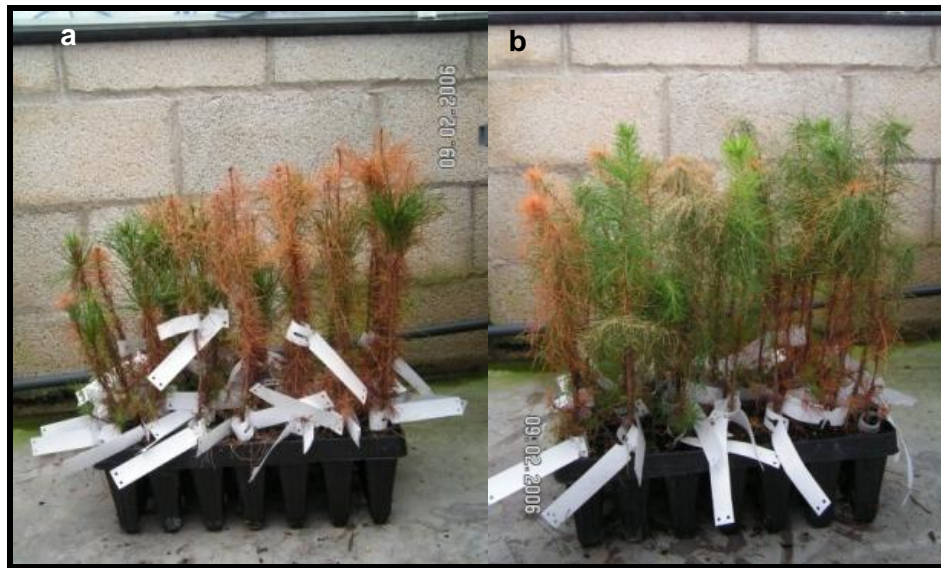


Fig. 5.2. Plántulas de *Pinus radiata* inoculadas: a) con *Fusarium circinatum*; b) con *Diplodia pinea*.



Fig. 5.3. Lesión producida por la inoculación de *Diplodia pinea* sobre una plántula de *Pinus radiata* sobre la corteza.



Fig. 5.4. Lesión producida por la inoculación de *Diplodia pinea* sobre una plántula de *Pinus radiata*: a) sobre la corteza; b) sobre el cámbium.



Fig. 5.5. Lesión producida por la inoculación de *Fusarium circinatum* sobre una plántula de *Pinus radiata* sobre la corteza. Se observa una gota de resina en el punto de inoculación.



Fig. 5.6. Lesión producida por la inoculación de *Fusarium circinatum* sobre una plántula de *Pinus radiata* sobre el cámbium.

5.2.2 Material inoculado

El material vegetal inoculado consistió en plántulas de coníferas de entre uno y tres años. (fig. 5.7). Se realizaron 7 grupos (sets) de inoculación, incluyendo en cada uno el material que se iba recopilando en viveros del País Vasco. Éste comprendía las especies utilizadas en repoblaciones españolas y mayoritariamente cultivadas en vivero y plantaciones forestales. Los árboles fueron trasplantados en turba comercial especial para coníferas en combinación con un 75% de perlita, y se mantuvieron en condiciones de invernadero un periodo mínimo de un mes para su aclimatación. Fueron regados hasta la capacidad de campo durante el periodo de aclimatación y durante el tiempo que duró el experimento de inoculación, para excluir el estrés hídrico como factor potenciador de los daños debidos a la invasión del patógeno inoculado en el experimento (Gordon et al. 1998a y 1998b).

Se inocularon 60 plantas de cada tipo en los diferentes sets de inoculación. Siempre que fue posible se realizó la repetición de especies entre los sets de inoculación para comprobar si el comportamiento se repetía y para afianzar los resultados. Hemos realizado un análisis de varianza para estimar el comportamiento de las diferentes especies a través de los distintos sets donde han sido inoculadas. Para establecer una especie testigo hemos incluido un grupo de *Pinus radiata* de 2 años en todos los sets, testado frente a *Fusarium circinatum*.



Fig. 5.7. Diversas especies de coníferas en invernadero para ensayos de resistencias frente a *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea*.

A continuación se especifican todos los sets de inoculación realizados, la fecha del día de inoculación y la planta utilizada en cada caso. En negrita se muestra la nomenclatura con la que cada tipo de planta aparece en los gráficos y tablas de resultados.

- Primer set de inoculación (17/mayo/2005)

Plántulas de 2 años de *Pinus radiata* de diversos orígenes de semilla:

- Origen Chile, semillas de categoría A **RadChA**
- Origen País Vasco, semillas de categoría B **RadPvB**
- Origen País Vasco, semillas de categoría C **RadPvC**
- Origen Nueva Zelanda, semillas de categoría B **RadNzB**

[Categorías de semillas definidas por la Directiva 1999L0105-ES-15.01.2000-000.001-2 (Consejo de la Unión Europea de 22 de diciembre de 1999)]

● Segundo set de inoculación (25/mayo/2005)

Plántulas de 2 años de *Pinus radiata* de diversos orígenes de semilla:

- Origen Australia, CSIRO Aust 13566 **Rad135**
- Origen Australia, CSIRO Aust 19004 **Rad190**
- Origen Nueva Zelanda, semillas de categoría B **RadNzB**

Plántulas híbridas de 2 años de semillas procedentes de la compañía Proseed:

- *P. radiata* x *P. radiata* de la isla Cedros **RadxCed**
- *P. radiata* x *P. radiata* de la isla Guadalupe **RadxGud**
- *P. radiata* x *P. attenuata* **RadxAtt**

● Tercer set de inoculación (2/mayo/2006)

Plántulas de 2 años de las especies:

- *Larix kaempferi* **Kaem2**
- *Pinus nigra* subsp. *laricio* **Nigr2**
- *P. pinaster* **Pina2**
- *P. radiata* **Radi2**
- *P. taeda* **Taed2**

● Cuarto set de inoculación (15/mayo/2006)

Plántulas de 2 años de las especies:

- *Larix kaempferi* **Kaem2**
- *Pinus pinaster* **Pina2**
- *P. radiata* **Radi2**
- *P. taeda* **Taed2**

● Quinto set de inoculación (8/junio/2006)

Plántulas de 2 años de las especies:

- *Picea glauca* **Glau2**
- *P. jezoensis* **Jezo2**
- *P. sitchensis* **Sitc2**
- *Pinus pinaster* **Pina2**
- *P. radiata* **Radi2**
- *P. sylvestris* **Sylv2**
- *Pseudotsuga menziesii* **Menz2**
- *Sequoia sempervirens* **Semp2**
- *Sequoiadendron giganteum* **Giga2**

● Sexto set de inoculación (20/junio/2006)

Plántulas de entre 1, 2 y 3 años de las especies:

- *Picea sitchensis*, 2 años de edad **Sitc2**
- *Pinus canariensis*, 2 años de edad **Cana2**
- *P. halepensis*, 1 año de edad **Hale1**
- *P. nigra* subsp. *laricio*, 1 año de edad **Nigr1**
- *P. nigra* subsp. *laricio*, 2 años de edad **Nigr2**
- *P. pinaster*, 1 año de edad **Pina1**
- *P. pinaster*, 2 años de edad **Pina2**
- *P. radiata*, 1 año de edad **Radi1**
- *P. radiata*, 2 años de edad **Radi2**
- *P. sylvestris*, 1 año de edad **Sylv1**
- *P. sylvestris*, 2 años de edad **Sylv2**
- *P. sylvestris*, 3 años de edad **Sylv3**
- *Pseudotsuga menziesii*, 1 año de edad **Menz1**
- *Pseudotsuga menziesii*, 2 años de edad **Menz2**
- *Sequoia sempervirens*, 2 años de edad **Semp2**

● Séptimo set de inoculación (4/jul/2006)

Plántulas de entre 1, 2 y 3 años de las especies:

- *Picea sitchensis*, 2 años de edad **Sitc2**
- *Pinus canariensis*, 3 años de edad **Cana3**
- *P. nigra* subsp. *laricio*, 2 años de edad **Nigr2**
- *P. pinea*, 1 año de edad **Pine1**
- *P. pinaster*, 2 años de edad **Pina2**
- *P. radiata*, 1 año de edad **Radi1**
- *P. radiata*, 2 años de edad **Radi2**
- *Pseudotsuga menziesii*, 1 año de edad **Menz1**
- *Sequoia sempervirens*, 1 año de edad **Semp1**
- *Sequoiadendron giganteum*, 1 año de edad **Giga1**

Todos los sets fueron inoculados con ambos patógenos y bajo las mismas condiciones ambientales, excepto el cuarto set, en el cual solo se realizó la inoculación con *Fusarium circinatum* debido a la falta de disponibilidad de material que sólo hizo posible la inoculación con una de las especies.

5.3 Resultados

5.3.1 Resultados de los diferentes sets de inoculación

Los resultados de las inoculaciones aparecen detallados en las tablas 5.1 – 5.7. En estas tablas se muestran los valores medios de las lesiones causadas por las inoculaciones para cada uno de los dos patógenos. Además se muestra la desviación estándar y los

grupos obtenidos al aplicar el test de agrupamiento de medias Waller-Duncan. Los materiales vegetales que aparecen con la misma letra en la tabla pertenecen al mismo grupo en el test de Waller-Duncan ($p < 0,05$).

En las figuras 5.8 (a-b) - 5.14 (a-b) se expresan los resultados en forma de gráficos de cajas y bigotes (box and whiskers). En estos se muestran la mediana, el primer y tercer cuartil y los valores límite inferior y límite superior. Nos dan una idea de la simetría, el sesgo y la dispersión de los datos. El recuadro encierra los datos que se encuentran entre el primer cuartil y tercer cuartil y la línea roja representa la mediana. Los círculos que se salen de la distribución indican valores atípicos y los asteriscos indican valores extremos.

- Primer set de inoculación:

SET	CÓDIGO MATERIAL VEGETAL	NÚMERO DE PLÁNTULAS	LESIÓN MEDIA (mm)	D.E.	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN	HONGO	WALLER-DUNCAN
1	RadPvB	59	30,61	7,1	> 0,05	FUSARIUM CECT 20759	—
1	RadNzB	59	34,31	8			—
1	RadPvC	57	36,74	6,8			—
1	RadChA	58	38,33	9,9			—
1	RadPvC	57	11,48	13,3	< 0,01	DIPLODIA PV23	a
1	RadPvB	59	18,47	18,2			b
1	RadChA	58	19,14	15,6			b
1	RadNzB	59	19,23	19,3			b

Tabla 5.1. Resultados del set 1 donde se muestran los valores medios de la lesión producida por las inoculaciones con *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea* con la desviación estándar y el test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,05$).

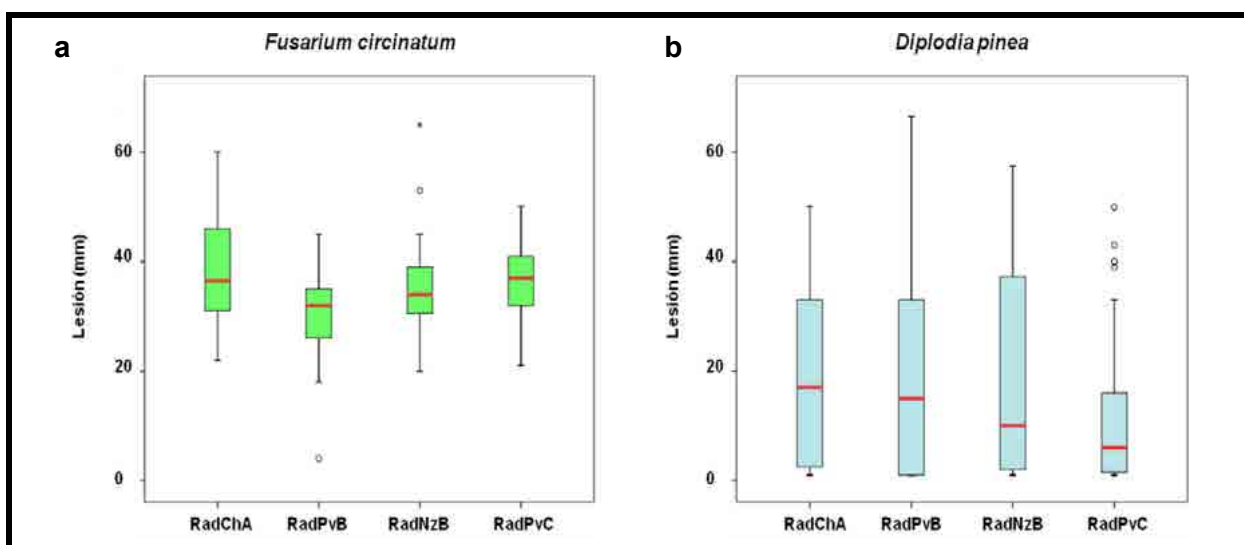


Fig. 5.8. Gráficos de cajas y bigotes del set 1: a) *Fusarium circinatum*; b) *Diplodia pinea*.

No se detectan diferencias significativas en la respuesta frente a la inoculación con *Fusarium circinatum* en el material testado de *Pinus radiata* de diferentes orígenes. Todos los orígenes de *Pinus radiata* testados respondieron de forma muy susceptible, con longitudes medias de lesiones entre 30,61 mm y 38,33 mm. En el grupo de origen de semilla País Vasco de categoría B un individuo apenas muestra lesión lo que indica cierta resistencia individual.

En lo referido a las inoculaciones con *Diplodia pinea*, el material Euskadi C destaca por su respuesta menos susceptible con respecto al resto del material, con medias de las longitudes de lesión de 11,48 mm y difiere significativamente respecto al resto de orígenes. Además la menor dispersión de los datos y su varianza más baja lo hace un grupo más homogéneo en su respuesta. Como se ve en la figura 5.8.b la mitad de los valores del material de Euskadi C se encuentran en valores de resistencia o muy cerca de ella. Esto puede ser un punto de partida para establecer una selección con clones más resistentes dentro de este grupo. El resto de orígenes se muestran bastante susceptibles a la inoculación. Aquí es reseñable el hecho de que los orígenes más susceptibles a *Diplodia pinea* resultan ser las procedencias seleccionadas para obtener un mayor crecimiento (categorías de semilla A y B).

- Segundo set de inoculación:

SET	CÓDIGO MATERIAL VEGETAL	NÚMERO DE PLÁNTULAS	LESIÓN MEDIA (mm)	D.E.	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN	HONGO	WALLER-DUNCAN
2	RadxGud	55	20,38	4,8	> 0,05	FUSARIUM CECT 20759	—
2	RadxCed	60	22,18	6,4			—
2	Rad190	56	22,35	3,4			—
2	RadxAtt	60	22,7	2,6			—
2	RadNzB	60	23,5	5,5			—
2	Rad135	59	24,79	5,1			—
2	RadxCed	60	20,16	14,6	0,034	DIPLODIA PV23	a
2	RadxGud	60	27,74	12,9			ab
2	Rad135	60	31,4	14,5			ab
2	RadNzB	60	36,32	26,2			ab
2	RadxAtt	55	38,11	12,3			b
2	Rad190	58	40,72	20,8			b

Tabla 5.2. Resultados del set 2 donde se muestran los valores medios de la lesión producida por las inoculaciones con *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea* con la desviación estándar y el test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,05$).

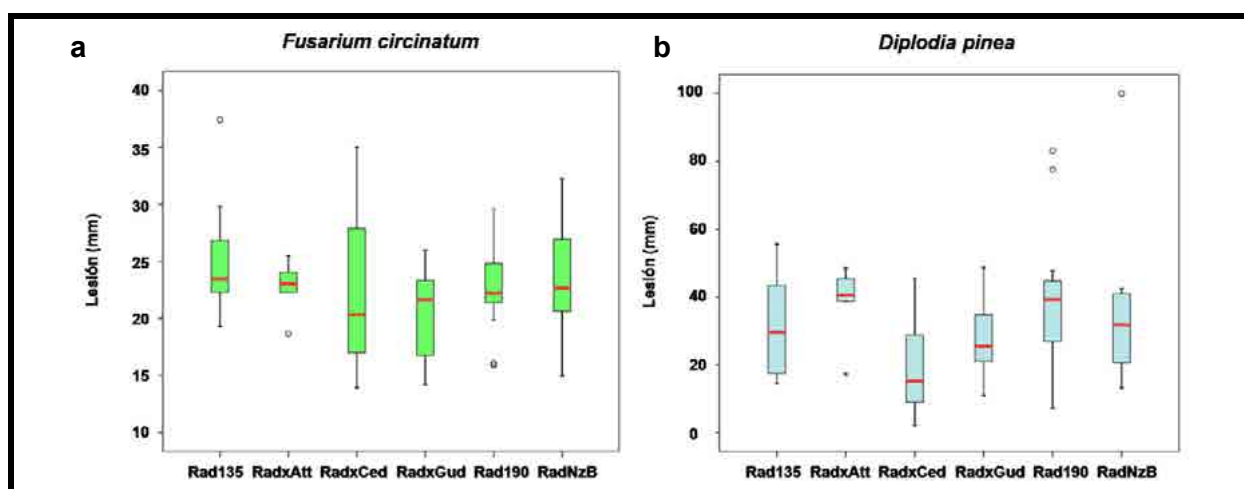


Fig. 5.9. Gráficos de cajas y bigotes del set 2: a) *Fusarium circinatum*; b) *Diplodia pinea*.

Se producen resultados en concordancia con los obtenidos en el set anterior, no se detectan diferencias significativas en la respuesta frente a la inoculación con *Fusarium circinatum* con medias entre 20,38 mm y 24,79 mm. Todos los híbridos y orígenes muestran alta susceptibilidad a *Fusarium circinatum*.

Frente a *Diplodia pinea*, se observan 3 grupos de respuesta aunque todos con bastante susceptibilidad, lo que indican las medias del tamaño de las lesiones altas (20,16 – 40,72 mm).

Los datos de susceptibilidad de los híbridos de Radiata x Attenuata frente a los 2 patógenos muestran una respuesta bastante homogénea, mientras que el resto de híbridos y orígenes se muestran más variables en su respuesta.

- Tercer set de inoculación:

SET	CÓDIGO MATERIAL VEGETAL	NÚMERO DE PLÁNTULAS	LESIÓN MEDIA (mm)	D.E.	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN	HONGO	WALLER-DUNCAN
3	Nigr2	60	5,12	4	< 0,01	FUSARIUM CECT 20759	a
3	Kaem2	60	5,65	5,5			ab
3	Pina2	60	8,28	4			bc
3	Taed2	60	8,46	4,1			bc
3	Radi2	60	18,5	8,5			d
3	Pina2	60	2,74	4,2	< 0,01	DIPLODIA PV23	a
3	Nigr2	60	4,8	10,2			a
3	Taed2	60	6,96	10,7			ab
3	Radi2	60	11,08	11,1			bc
3	Kaem2	60	14,45	13,9			c

Tabla 5.3. Resultados del set 3 donde se muestran los valores medios de la lesión producida por las inoculaciones con *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea* con la desviación estándar y el test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,05$).

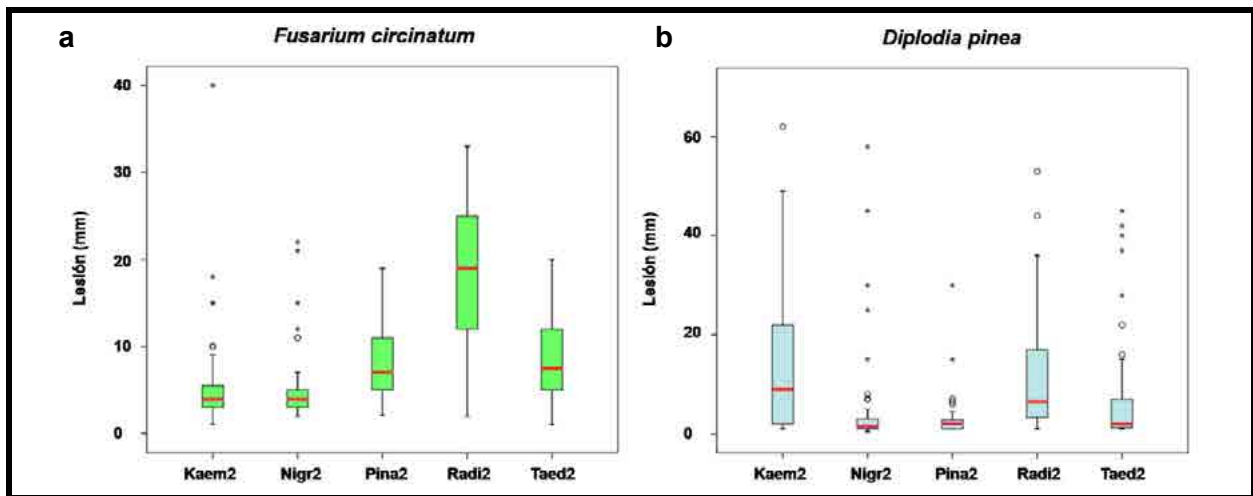


Fig. 5.10. Gráficos de cajas y bigotes del set 3: a) *Fusarium circinatum*; b) *Diplodia pinea*.

En este set, las inoculaciones con *Fusarium circinatum* mostraron una respuesta resistente en *Pinus nigra* subsp. *laricio* y *Larix kaempferi* (lesiones medias de 5,12 mm y 5,65 mm respectivamente) con una respuesta bastante homogénea, aunque algunos individuos se salían de la tónica general mostrándose susceptibles. *Pinus pinaster* y *P. taeda*, con longitudes de lesión media de entre 8,28 mm y 8,46 mm, se mostraron moderadamente resistentes. En el caso de *Pinus radiata*, las longitudes de lesión se duplican llegando a 18,50 mm y mostrándose bastante susceptible.

En relación con *Diplodia pinea*, *Larix kaempferi* manifestó las lesiones mayores de este grupo mostrándose susceptible a la infección (14,45 mm), seguido por *Pinus radiata* (11,06 mm) también susceptible aunque en un grupo aparte. *Pinus taeda* muestra una respuesta moderadamente resistente (6,96 mm). Los más resistentes resultaron *Pinus nigra* subsp. *laricio* y *P. pinaster* con una longitud de lesión media de 4,8 mm y 2,74 mm respectivamente y formando parte del mismo grupo. Estos últimos muestran una respuesta muy homogénea aunque algunos individuos aislados se muestran bastante susceptibles.

- Cuarto set de inoculación:

SET	CÓDIGO MATERIAL VEGETAL	NÚMERO DE PLÁNTULAS	LESIÓN MEDIA (mm)	D.E.	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN	HONGO	WALLER-DUNCAN
4	Taed2	55	8	5,9	< 0,01	FUSARIUM CECT 20759	a
4	Pina2	55	8,24	10,2			a
4	Kaem2	57	8,54	7,2			a
4	Radi2	60	19,78	11,9			b

Tabla 5.4. Resultados del set 4 donde se muestran los valores medios de la lesión producida por las inoculaciones con *Fusarium circinatum*, con la desviación estándar y el test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,05$).

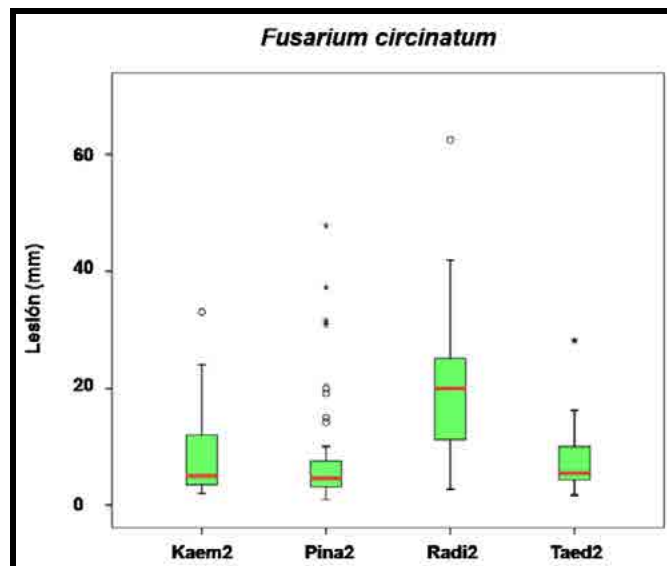


Fig. 5.11. Gráfico de cajas y bigotes del set 4: *Fusarium circinatum*.

En este caso solamente se inoculó planta con *Fusarium circinatum*. *Pinus radiata* muestra el valor más alto de las medias de la longitud de las lesiones (19,78 mm), indicando una alta susceptibilidad.

Pinus taeda (8 mm), *P. pinaster* (8,24 mm) y *Larix kaempferi* (8,54 mm) se muestran moderadamente resistentes frente a *Fusarium circinatum* en este caso. La mayoría de la respuesta de *Pinus pinaster* es muy homogénea aunque varios individuos se muestran bastante susceptibles. En cambio *Pinus taeda* y *Larix kaempferi* muestran un comportamiento menos variable entre individuos.

- Quinto set de inoculación:

SET	CÓDIGO MATERIAL VEGETAL	NÚMERO DE PLÁNTULAS	LESIÓN MEDIA (mm)	D.E.	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN	HONGO	WALLER-DUNCAN
5	Semp2	55	3,78	1,3	< 0,01	FUSARIUM CECT 20759	a
5	Glau2	55	3,91	0,8			a
5	Jezo2	56	4,36	0,9			a
5	Menz2	58	4,46	2,6			a
5	Sylv2	60	4,7	2,3			a
5	Pina2	60	5,96	1,7			a
5	Giga2	60	6,45	7,8			a
5	Sitc2	57	10,9	15,2			a
5	Radi2	55	19,9	22			b
5	Semp2	58	4,72	3,2	< 0,01	DIPLODIA PV23	a
5	Giga2	60	5,11	0,6			a
5	Sitc2	58	8,12	2,4			a
5	Pina2	60	13,13	7,2			ab
5	Jezo2	60	17,3	14,6			ab
5	Menz2	60	25,71	22,5			c
5	Glau2	60	27,37	11,7			c
5	Sylv2	60	48,01	35,7			d

Tabla 5.5. Resultados del set 5 donde se muestran los valores medios de la lesión producida por las inoculaciones con *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea*, con la desviación estándar y el test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,05$).

Sequoia sempervirens, *Picea glauca*, *P. jezoensis*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus sylvestris* y *P. pinaster* muestran medias de la longitud de las lesiones causadas por *Fusarium circinatum* $\leq 5,96$ mm lo que hace que se puedan considerar muy resistentes. *Sequoiadendron giganteum*, con una lesión media de 6,45 mm puede considerarse medianamente resistente aunque el test de Waller-Duncan lo agrupa con el conjunto de especies anterior. Además los datos se muestran con muy poca variabilidad y pertenecientes al mismo grupo. *Picea sitchensis*, aunque pertenece al mismo grupo que las especies anteriores, se encuentra en la frontera de lo que consideramos resistente con una media de lesiones de 10,9 mm y los datos están algo más dispersos. De nuevo *Pinus radiata* vuelve a presentar la mayor susceptibilidad a la infección con valores medios de lesión de 19,78 mm.

Pinus sylvestris resultó fuertemente lesionado al ser inoculado con *Diplodia pinea*. Con su lesión media de 48,01 mm forma un único grupo y es la especie más afectada en este set. En el siguiente grupo encontraríamos a *Pseudotsuga menziesii* y *Picea glauca*, también bastante susceptibles a *Diplodia pinea* en este ensayo, con lesiones medias de 25,71 mm y 27,37 mm respectivamente. *Picea jezoensis* y *Pinus pinaster* se mostraron moderadamente susceptibles formando un nuevo grupo con lesiones medias de 17,3 mm y 13,13 mm respectivamente. Por último *Picea sitchensis*, *Sequoiadendron giganteum* y

Sequoia sempervirens forman un grupo de especies resistentes. Aunque *Picea sitchensis* se considera con resistencia moderada (lesión media 8,12 mm) y las 2 secuoyas se consideran resistentes (lesiones medias de 5,11 mm y 4,72 mm). *Pinus radiata* no se pudo inocular en este ensayo con *Diplodia pinea* por falta de material.

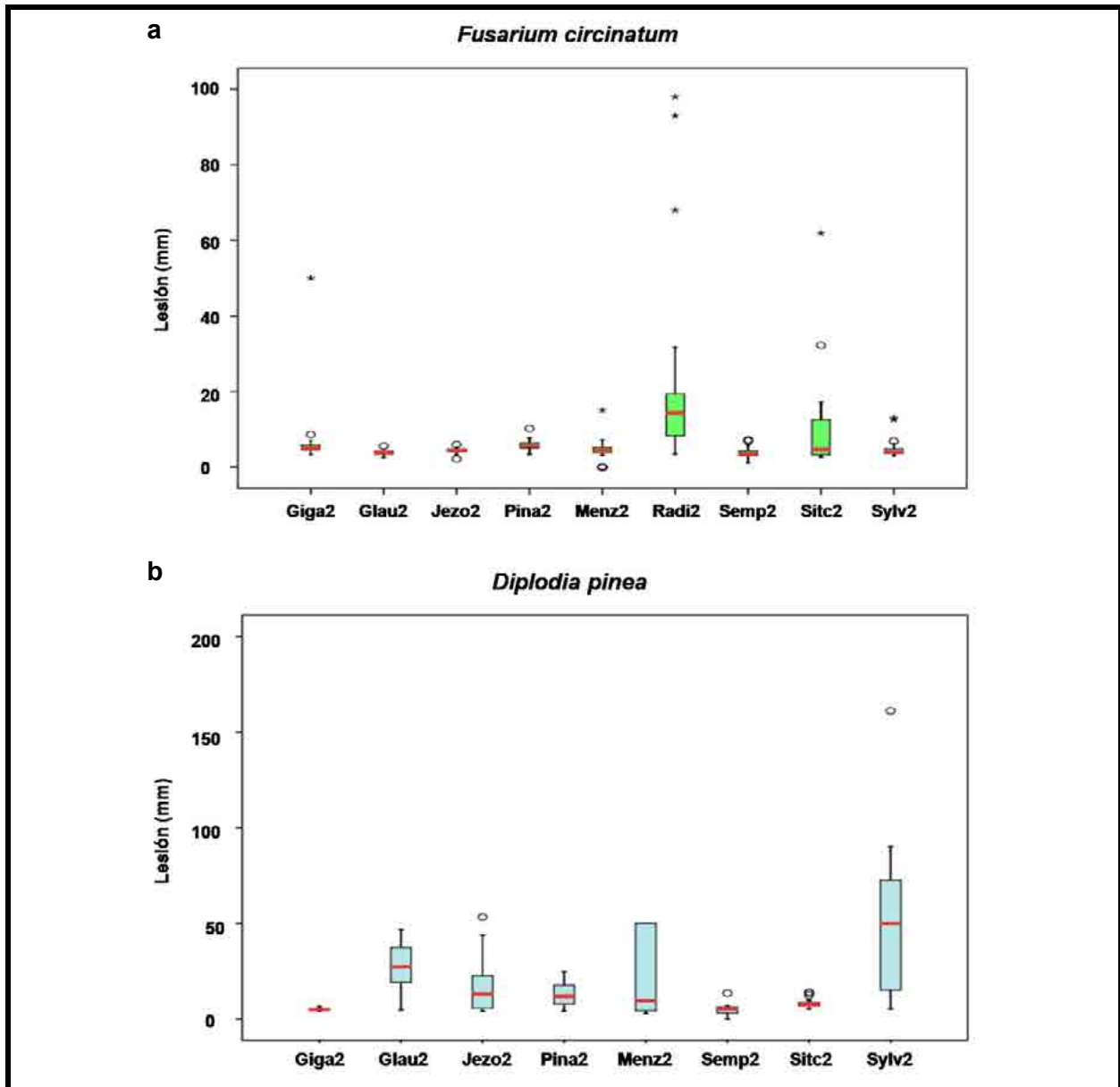


Fig. 5.12. Gráficos de cajas y bigotes del set 5: a) *Fusarium circinatum*; b) *Diplodia pinea*.

- Sexto set de inoculación:

SET	CÓDIGO MATERIAL VEGETAL	NÚMERO DE PLÁNTULAS	LESIÓN MEDIA (mm)	D.E.	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN	HONGO	WALLER-DUNCAN
6	Menz1	60	0,92	0,7	< 0,01	FUSARIUM CECT 20759	a
6	Nigr1	60	1,81	2,5			ab
6	Sitc2	60	3,19	1,6			abc
6	Semp2	60	4,45	1,3			abcd
6	Nigr2	60	4,99	5,8			abcd
6	Menz2	60	5,65	3,5			bcd
6	Sylv1	58	6,32	5,9			cde
6	Sylv2	60	7,38	4,9			bcde
6	Hale1	57	7,71	4,6			cde
6	Cana2	60	8,06	5,4			de
6	Pina1	60	10,58	17,4			f
6	Pina2	60	14,18	8,6			f
6	Sylv3	60	14,35	6,3			f
6	Radi2	60	23,8	6,6			g
6	Radi1	60	30,64	6,7	h		
6	Nigr1	60	6,54	7,6	< 0,01	DIPLODIA PV23	a
6	Cana2	58	12,33	16,2			ab
6	Pina1	60	15,75	15,9			ab
6	Menz2	60	20,5	33			ab
6	Sylv1	60	22,83	10,4			abc
6	Hale1	58	24,09	12,8			bcd
6	Sylv3	60	37,75	32,2			cde
6	Pina2	60	39,46	26,9			de
6	Sylv2	60	42,48	11,5			e
6	Radi2	60	51,35	33,5			ef
6	Nigr2	60	63,97	25,8			f

Tabla 5.6. Resultados del set 6 donde se muestran los valores medios de la lesión producida por las inoculaciones con *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea*, con la desviación estándar y el test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,05$).

Fusarium circinatum produce las mayores lesiones en *Pinus radiata* con valores medios de 30,64 mm y 23,8 mm en plántulas de 1 y 2 años respectivamente. El material más joven reaccionaba de manera más susceptible a la infección. *Pinus sylvestris* de 3 años y *P. pinaster* de 1 y 2 años forman un grupo con lesiones intermedias (14,35 mm, 10,58 mm y 14,18 mm respectivamente) que los convierte en moderadamente susceptibles. En un siguiente grupo encontramos a *Pinus canariensis* de 2 años, *P. halepensis* de 1 año y *P. sylvestris* de 1 y 2 años con lesiones entre 6,32 mm y 8,06 mm con moderada resistencia. En el resto del material testado en este set se produjeron valores medios de lesión $\leq 4,99$ mm mostrando resistencia. En este grupo se incluyen *Pinus nigra* subsp. *laricio* de 1 y 2 años, *Sequoia sempervirens*, *Picea sitchensis* y *Pseudotsuga menziesii* de 1 y 2 años. *Pinus pinaster* muestra una amplia dispersión de los datos, *Pinus radiata*, *P. pinaster* y *P.*

sylvestris muestran datos menos dispersos. El resto de especies muestran los datos muy concentrados.

Pinus radiata y *Pseudotsuga menziesii* de 1 año y *Sequoia sempervirens* y *Picea sitchensis* de 2 años no se inocularon con *Diplodia pinea* por falta de material. *Pinus nigra* subsp. *laricio* de 1 año se mostró moderadamente resistente (lesión media 6,54 mm). En un siguiente grupo aparecen *Pinus canariensis* de 2 años, *P. pinaster* de 1 año y *Pseudotsuga menziesii* de 2 años con lesiones medias entre 12,33 mm y 20,5 mm, aunque sólo a *Pinus canariensis* podríamos considerarla moderadamente susceptible. A partir de aquí las lesiones superan los 22 mm. Este amplio conjunto de especies ya se muestra muy susceptible (*Pinus sylvestris* de 1, 2 y 3 años, *P. halepensis* de 1 año, *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. nigra* subsp. *laricio* de 2 años). En general, la respuesta es mucho más variable frente a *Diplodia pinea* que a *Fusarium circinatum*.

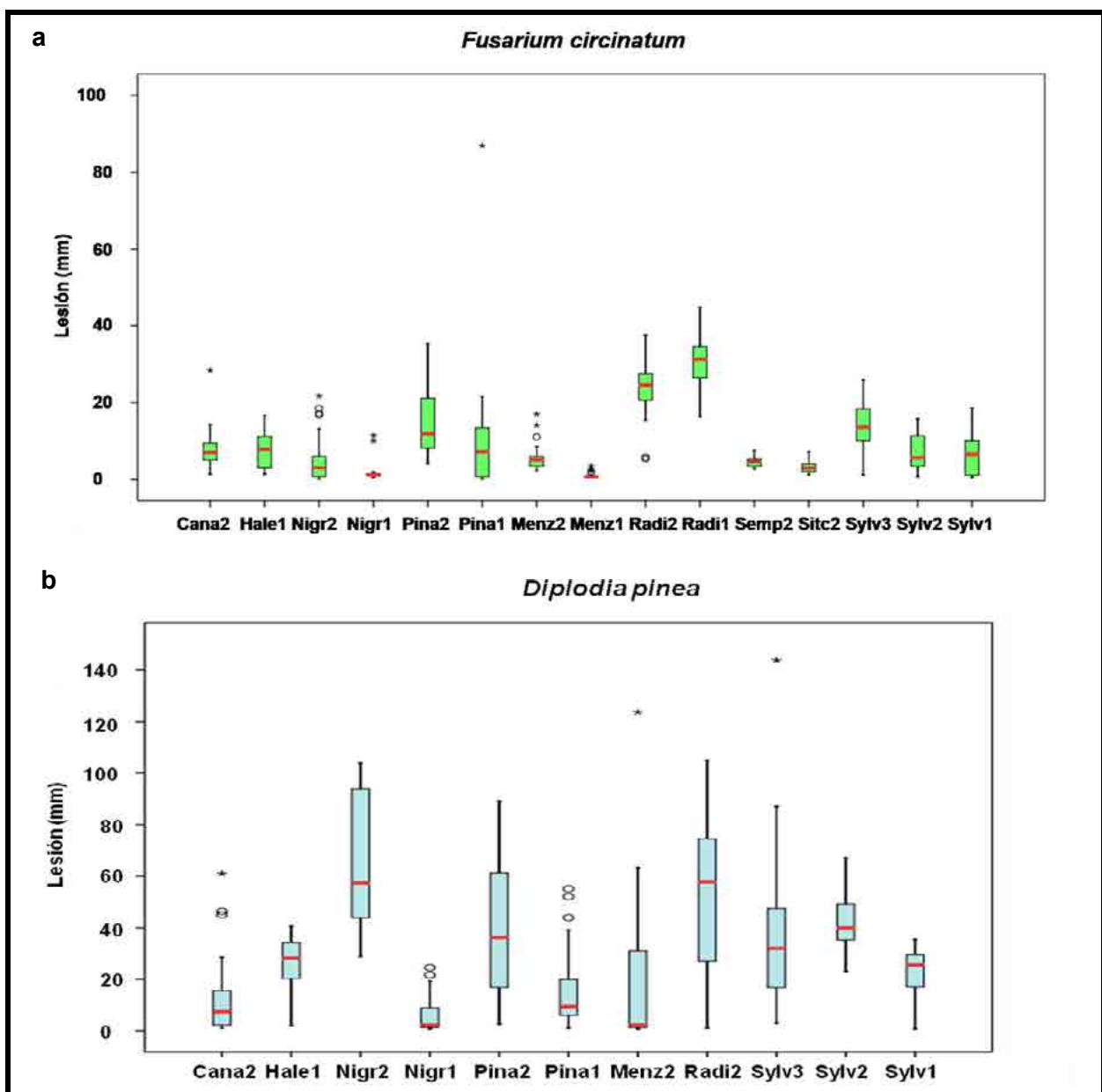


Fig. 5.13. Gráficos de cajas y bigotes del set 6: a) *Fusarium circinatum*; b) *Diplodia pinea*.

- Séptimo set de inoculación:

SET	CÓDIGO MATERIAL VEGETAL	NÚMERO DE PLÁNTULAS	LESIÓN MEDIA (mm)	D.E.	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN	HONGO	WALLER-DUNCAN
7	Sitc2	60	3,1	0,7	< 0,01	FUSARIUM CECT 20759	a
7	Pine1	60	3,14	0,6			a
7	Giga1	60	3,69	0,9			ab
7	Menz1	55	4,07	0,5			ab
7	Semp1	60	4,69	0,9			ab
7	Pina2	60	8,36	5,1			bc
7	Cana3	55	11,66	7,9			bc
7	Nigr2	60	13,73	13,5			cd
7	Radi2	60	20,24	7,7			d
7	Radi1	60	33,42	8,1			e
7	Giga1	60	2,79	0,6			< 0,01
7	Semp1	60	3,19	0,5	a		
7	Pine1	60	12,95	5,6	ab		
7	Cana3	60	12,96	6,2	ab		
7	Nigr2	60	14,57	9,5	ab		
7	Sitc2	60	19,12	11,5	abc		
7	Pina2	60	23,69	14,8	bc		
7	Radi2	60	36,39	27,5	c		
7	Radi1	58	50,81	29,8	ce		
7	Menz1	60	55,93	19,1	ce		

Tabla 5.7. Resultados del set 7 donde se muestran los valores medios de la lesión producida por las inoculaciones con *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea*, con la desviación estándar y el test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,05$).

Pinus radiata destaca, una vez más, por ser la especie más susceptible a la infección por *Fusarium circinatum* con valores de las lesiones medias de 20,24 mm en planta de 2 años y 33,42 mm en planta de 1 año. *Pinus nigra* subsp. *laricio* de 2 años y *P. canariensis* de 3 años se muestran moderadamente susceptibles con lesiones medias de 13,73 mm y 11,66 mm respectivamente. *Pinus pinaster* de 2 años se muestra moderadamente resistente con lesión media de 8,36 mm. El resto de especies muestran una respuesta resistente. Son *Picea sitchensis* de 2 años y *Pinus pinea*, *Sequoiadendron giganteum*, *Pseudotsuga menziesii* y *Sequoia sempervirens* de 1 año con medias de lesión $\leq 4,69$ mm.

Las inoculaciones con *Diplodia pinea* en este set vuelven a confirmar la destacada susceptibilidad de la especie *Pinus radiata*, con lesiones medias de 36,39 mm en planta de 2 años y de 50,81 mm en planta de 1 año. *Pseudotsuga menziesii* de 1 año se muestra muy susceptible con lesión media de 55,93 mm. *Pinus pinaster* y *Picea sitchensis* de 2 años, aunque con menores lesiones (23,69 mm y 19,12 mm respectivamente), muestran también bastante susceptibilidad. *Pinus nigra* subsp. *laricio* de 2 años, *P. canariensis* de 3 años y *P. pinea* de 1 año forman un grupo con moderada susceptibilidad. Destacan por su nula infección las especies *Sequoia sempervirens* y *Sequoiadendron giganteum* de 1 año (lesión media $\leq 3,19$ mm).

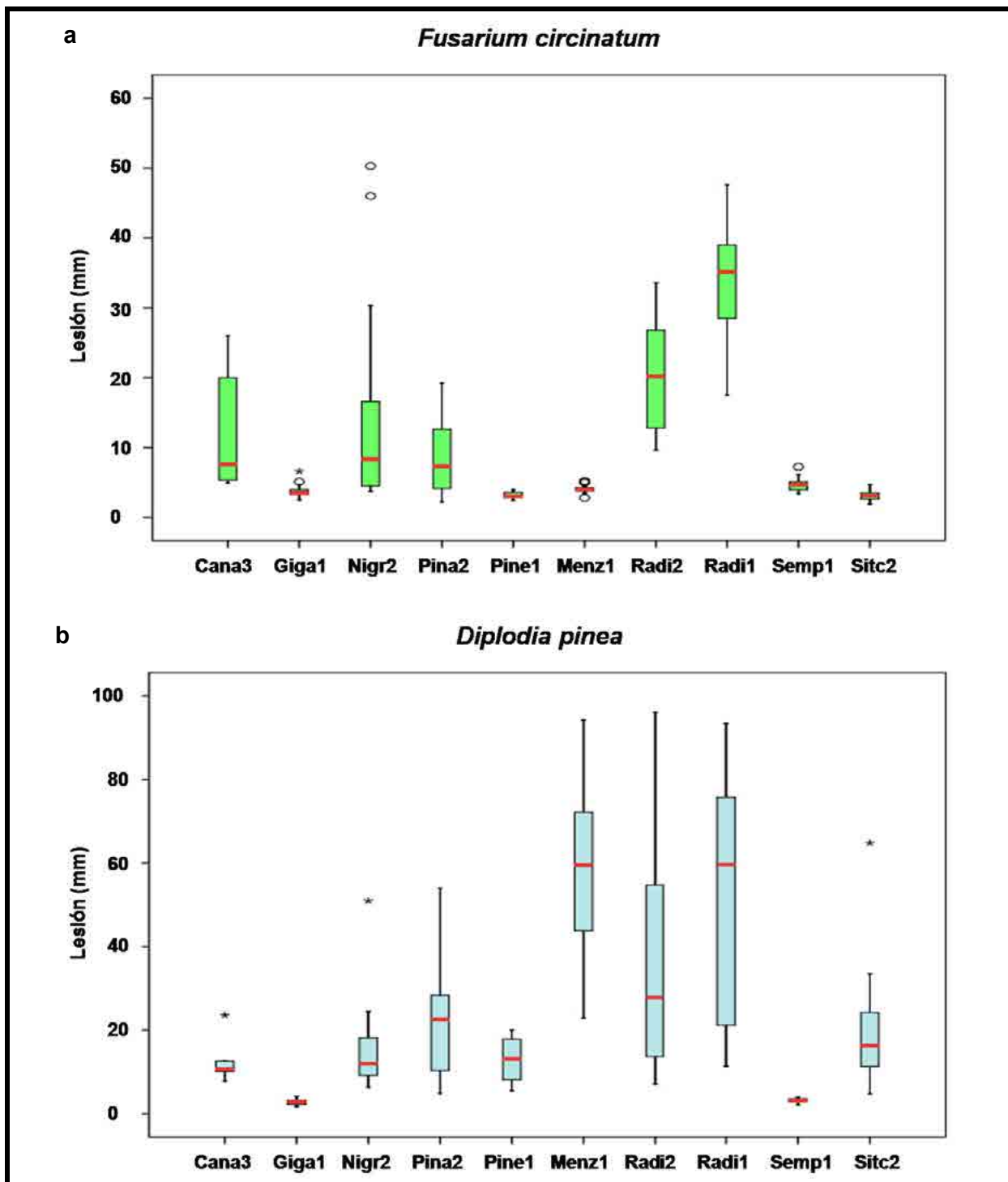


Fig. 5.14. Gráficos de cajas y bigotes del set 7: a) *Fusarium circinatum*; b) *Diplodia pinea*.

En general, la respuesta resistente de las especies en todos los sets, tanto frente a *Fusarium circinatum* como frente a *Diplodia pinea*, se manifiesta de forma muy poco variable, mientras que la respuesta susceptible muestra bastante más variabilidad entre individuos. Hay una variabilidad individual bastante alta sobre todo en la respuesta a las inoculaciones con *Diplodia pinea*. Los casos de resistencia individual podrían ser interesantes para establecer líneas clonales de resistencia, sobre todo en las especies más susceptibles.

5.3.2 Resultados de las diferentes especies según los últimos cinco sets

En las tablas siguientes (tablas 5.8 y 5.9) mostramos los resultados obtenidos en el conjunto de los cinco últimos sets. Los valores son medias de la longitud de las lesiones con su desviación estándar y agrupamiento de medias Waller-Duncan. Se detectan diferencias significativas para las especies analizadas ($p < 0,001$).

<i>Fusarium</i>						
ESPECIE	N	MEDIA	D. E.	MÍNIMO	MÁXIMO	WALLER-DUNCAN
Nigr1	60	1,81	2,5	0,41	11,41	a
Menz1	115	2,22	1,68	0,33	5,2	ab
Pine1	60	3,14	0,61	2,4	3,9	abc
Giga1	60	3,69	0,88	2,5	6,6	abcd
Sitc2	177	3,82	1,9	1,2	12,99	abcd
Glau2	55	3,91	0,77	2,47	5,59	abcd
Semp2	115	3,99	1,31	1,2	7,5	abcd
Jezo2	56	4,36	0,88	2,15	6	abcd
Semp1	60	4,69	0,89	3,4	7,23	abcd
Menz2	118	4,99	3,03	0	17	abcd
Sylv1	58	6,32	5,9	0,49	18,59	abcde
Giga2	60	6,45	7,77	3,33	50	abcde
Nigr2	180	6,64	7,86	0,1	50,3	abcde
Kaem2	117	7,26	6,61	1	40	bcde
Hale1	57	7,71	4,63	1,4	16,7	cde
Cana2	60	8,06	5,36	1,4	28,4	cde
Taed2	115	8,18	5,3	1	28,1	cde
Sylv2	120	8,65	9,92	0,74	61,92	de
Pina2	295	8,99	8,11	0,9	47,8	def
Pina1	60	10,58	17,37	0,1	86,9	ef
Cana3	55	11,66	7,92	4,9	26	ef
Sylv3	60	14,35	6,25	1,2	25,9	f
Radi2	295	20,13	12,6	2	98	g
Radi1	120	32,01	7,5	16,2	47,6	h

Tabla 5.8. Valores de lesiones medias producidas por las inoculaciones con *Fusarium circinatum* en los cinco últimos sets. Test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,001$).

Tenemos dos grandes grupos de especies resistentes en mayor o menor medida a *Fusarium circinatum*. Entre las más resistentes encontramos las especies del género *Picea*, *Pseudotsuga* y *Sequoia*, además de *Pinus pinea*. En el caso de *Sequoiadendron giganteum* y *Pinus nigra* subsp. *laricio* notamos una pequeña diferencia según el grupo de edad. Las plantas de 2 años se muestran algo menos resistentes que las de un año. *Larix kaempferi*, *Pinus halepensis* y *P. taeda* muestran moderada resistencia. *Pinus canariensis* y *P. pinaster* se encuentran entre los grupos de moderada resistencia y moderada susceptibilidad. El caso de *Pinus sylvestris* muestra una variabilidad más amplia según los grupos de edad. Las plantas de un año muestran bastante resistencia, las de dos años resistencia moderada y las de tres años susceptibilidad moderada. *Pinus radiata* se muestra como una especie muy susceptible a *Fusarium circinatum*.

Diplodia						
ESPECIE	N	MEDIA	D. E.	MÍNIMO	MÁXIMO	WALLER-DUNCAN
Giga1	60	2,79	0,64	1,7	4,2	a
Semp1	60	3,19	0,53	2,1	4	a
Semp2	58	4,72	3,20	0	13,45	a
Giga2	60	5,11	0,58	4,29	6,5	a
Nigr1	60	6,54	7,59	0,67	24,57	ab
Taed2	60	6,96	10,68	1	45	abc
Cana2	58	12,33	16,18	0,9	61	abcd
Pine1	60	12,95	5,61	5,6	20	abcde
Cana3	60	12,96	6,19	7,8	23,6	abcde
Kaem2	60	14,46	13,88	1	62	abcde
Pina2	240	15,46	20,46	1	89,2	abcde
Pina1	60	15,75	15,93	1	55,1	abcde
Jezo2	60	17,30	14,60	4,22	53,32	abcdef
Nigr2	180	19,81	28,03	0,5	103,9	abcdef
Sylv1	60	22,83	10,37	0,69	35,55	bcdefg
Menz2	120	23,58	27,09	0,56	123,7	bcdefg
Hale1	58	24,09	12,85	1,94	40,56	cdefg
Radi2	180	26,02	27,97	0,9	105,1	defg
Sylv2	120	26,40	19,30	5,34	67,23	defg
Glau2	60	27,37	11,69	4,69	46,73	defg
Menz1	120	29,54	30,41	0,48	94,2	efg
Sitc2	118	33,56	30,05	4,8	161	fg
Sylv3	60	37,75	32,16	3	143,8	gh
Radi1	58	50,81	29,77	11,4	93,4	h

Tabla 5.9. Valores de lesiones medias producidas por las inoculaciones con *Diplodia pinea* en los cinco últimos sets. Test de agrupamiento de medias Waller-Duncan ($p < 0,001$).

Las dos especies de secuoya son las únicas que se muestran resistentes a *Diplodia pinea*. *Pinus taeda* se muestra moderadamente resistente. *Pinus canariensis*, *P. pinea* y *Larix kaempferi* muestran una susceptibilidad moderada. *Pinus pinaster* se encuentra en este mismo grupo pero con unas medias ligeramente superiores se encuentra justo en la frontera de la susceptibilidad alta. Las tres especies del género *Picea*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus sylvestris*, *P. halepensis* y *P. radiata* se muestran muy susceptibles a *Diplodia pinea*. La respuesta de *Pinus nigra* subsp. *laricio* es muy variable. Las plantas de un año muestran moderada resistencia pero las de dos años alta susceptibilidad. En los dos casos la desviación estándar es bastante alta.

La respuesta de las especies testadas es más variable frente a *Diplodia pinea* que frente a *Fusarium circinatum*. En gran parte de las especies consideradas susceptibles encontramos valores mínimos menores de 6 mm.

5.3.3 Porcentaje de resistencia individual

En la tabla siguiente (tabla 5.10) se muestran los porcentajes de individuos resistentes de cada una de las especies testadas frente a *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea*.

ESPECIE	<i>Fusarium</i>		<i>Diplodia</i>	
	N	% INDIVIDUOS RESISTENTES	N	% INDIVIDUOS RESISTENTES
<i>Pinus radiata</i>	415	7,47	238	28,57
<i>Pinus pinaster</i>	355	52,39	300	46,66
<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>laricio</i>	240	79,17	240	51,25
<i>Pinus sylvestris</i>	238	40,34	240	8,33
<i>Pinus canariensis</i>	115	34,78	118	39,83
<i>Pinus pinea</i>	60	100	60	16,66
<i>Pinus halepensis</i>	57	40,35	58	18,96
<i>Pinus taeda</i>	115	49,56	60	73,33
<i>Picea sitchensis</i>	177	93,22	118	3,39
<i>Picea glauca</i>	55	100	60	5
<i>Picea jezoensis</i>	56	100	60	30
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	233	90,56	240	46,66
<i>Larix kaempferi</i>	117	67,52	60	41,66
<i>Sequoia sempervirens</i>	175	92,57	118	83,05
<i>Sequoiadendron giganteum</i>	120	87,5	120	97,5

Tabla 5.10. Porcentaje de individuos resistentes por cada una de las especies testadas frente a *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea*.

En todas las especies hemos detectado individuos resistentes a las dos enfermedades. Incluso en la más susceptible como es *Pinus radiata* hemos encontrado un porcentaje aceptable de ejemplares resistentes a las dos enfermedades. La respuesta tan variable que hemos detectado en la mayoría de las especies a la inoculación con *Diplodia pinea* se manifiesta con unos porcentajes bastante elevados de ejemplares resistentes a pesar de considerarse la especie susceptible de forma global. Las excepciones son *Pinus sylvestris*, *Picea glauca* y *P. sitchensis*, cuyos porcentajes están por debajo del 10%, y *Pinus pinea* y *P. halepensis*, que se encuentran entre el 10% y 20% de ejemplares resistentes a *Diplodia pinea*. La resistencia individual mostrada frente a *Fusarium circinatum* es bastante alta y se muestra en porcentajes superiores al 34% en todos los casos menos uno. El 7,47% de ejemplares de *Pinus radiata* resistentes a *Fusarium circinatum* es el más bajo de todos los detectados, como es de suponer siendo la especie más susceptible a este patógeno.

5.4 Discusión

Las inoculaciones en condiciones controladas en invernadero son de uso común para evaluar la resistencia de las plantas frente a diferentes patógenos. En la bibliografía encontramos varios casos en los que se utilizan de forma efectiva para establecer resistencia interespecífica, entre pinos y entre otras especies de coníferas, frente a *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* (Swart et al. 1988, Gordon et al. 2006a, Roux et al. 2007).

En la tabla 5.11 se resumen las susceptibilidades a los dos hongos de las especies ensayadas en cada uno de los sets y su comportamiento teniendo en cuenta todos los sets de forma conjunta.

5.4.1 Variabilidad en función del origen y la edad de la planta

En los dos primeros sets de ensayos hemos tratado de analizar la influencia sobre la susceptibilidad a ambos patógenos de los diferentes orígenes del material vegetal de partida. Los 5 sets restantes estaban orientados a estudiar la respuesta interespecífica utilizando *Pinus radiata* (2 años) como control para validar las comparaciones entre ellos. En algunos de ellos también se han ensayado plantas de diferentes edades, lo que nos da pie a hacer algunas observaciones.

Una de las medidas propuestas para el control de *Diplodia pinea* en *Pinus radiata* es la búsqueda de resistencias genéticas seleccionando procedencias que muestren un comportamiento resistente (Zwolinski et al. 1990). En nuestro estudio, la respuesta susceptible del material de *Pinus radiata* a *Diplodia pinea* mostró un paralelismo directo a la tasa de crecimiento de los distintos orígenes de la planta testada. Nueva Zelanda B, Chile A, Euskadi B y Euskadi C aparecen en orden decreciente en cuanto a su tasa de crecimiento. Esto quiere decir que estos orígenes están seleccionados para mejorar el crecimiento de las plantas siendo Nueva Zelanda B el de mejores resultados y Euskadi C el de menor intensidad de selección (Iturrutxa et al. 2006). Aunque entre los 3 primeros no se encuentran diferencias significativas, Euskadi C se muestra menos susceptible frente a *Diplodia pinea*. Esta diferencia en los valores de infección puede explicarse por el comportamiento del tejido invadido por *Diplodia pinea*, más fácil de infectar en material joven, menos lignificado y en periodos de crecimiento, cuando el tejido es más susceptible a la infección (Palmer & Nicholls 1985, Swart et al. 1987a). En cualquier caso, *Pinus radiata* se ha manifestado como muy susceptible en todos los sets de inoculación a la infección por *Diplodia pinea*.

	<i>Fusarium circinatum</i>								<i>Diplodia pinea</i>								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7		
Radi1						S+	S+	S+								S+	S+
Radi2	S+	S+	S+	S+	S+	S+	S+	S+	S-/S+	S+	S-				S+	S+	S+
Pina1						S-		S-							S+		S+
Pina2			R-	R-	R+	S-	R-	R-			R+		S-	S+	S+	S+	S+
Nigr1						R+		R+							R-		R-
Nigr2			R+			R+	S-	R-			R+				S+	S-	S+
Sylv1						R-		R-							S+		S+
Sylv2					R+	R-		R-					S+	S+			S+
Sylv3						S-		S-							S+		S+
Cana2						R-		R-							S-		S-
Cana3							S-	S-								S-	S-
Pine1							R+	R+								S-	S-
Hale1						R-		R-							S+		S+
Taed2			R-	R-				R-			R-						R-
Sitc2					S-	R+	R+	R+					R-			S+	S+
Glau2					R+			R+					S+				S+
Jezo2					R+			R+					S+				S+
Menz1						R+	R+	R+								S+	S+
Menz2					R+	R+		R+					S+	S+			S+
Kaem2			R+	R-				R-			S-						S-
Semp1							R+	R+								R+	R+
Semp2					R+	R+		R+					R+				R+
Giga1							R+	R+								R+	R+
Giga2					R-			R-					R+				R+

Tabla 5.11. Comportamiento de las distintas especies testadas en cada set y teniendo en cuenta los sets de forma conjunta: (S+) muy susceptible, (S-) moderadamente susceptible, (R-) moderadamente resistente, (R+) resistente.

En cuanto a la inoculación con *Fusarium circinatum* no se han detectado diferencias entre los distintos orígenes. En este estudio *Pinus radiata* se ha manifestado como una especie muy susceptible a *Fusarium circinatum*, tanto en plántulas con distintos orígenes de semilla y diferentes edades, como en el caso de distintos híbridos coincidiendo con varios estudios anteriores (Gordon et al. 2001, Aegerter et al. 2003, Gadgil et al. 2003). A pesar de que el híbrido de *Pinus radiata* x *Pinus attenuata* ha sido mencionado como más resistente que *Pinus radiata* a *Fusarium circinatum* (Hodge & Dvorak 2000, Gadgil et al. 2003), en nuestro ensayo no se han encontrado diferencias significativas con el resto de orígenes de *Pinus radiata* respecto a la longitud media de la lesión.

Normalmente la respuesta a la inoculación frente a *Diplodia pinea* es más fuerte cuando el tejido está menos lignificado, las lesiones que se producen son mayores y están relacionadas con el envejecimiento de los tejidos (Chou 1977). Según nuestras observaciones esto resulta cierto para la especie *Pinus radiata*, tanto frente a *Diplodia pinea* como frente a *Fusarium circinatum* ya que la planta de dos años se ha mostrado menos dañada que la de un año. En el resto de especies no hemos detectado este comportamiento sino más bien al contrario. *Pinus sylvestris* muestra más susceptibilidad a los dos patógenos en planta de tres años y decrece con dos años y más todavía con un año. Especies como *Pinus nigra* subsp. *laricio* y *P. canariensis* muestran también más lesión en planta de dos años que en planta de uno frente a los dos patógenos. *Pseudotsuga menziesii* y *Sequoia sempervirens* se comportan de forma distinta frente a *Fusarium circinatum* y *Diplodia pinea*. Esta amplia variedad de comportamientos nos lleva a establecer que la edad no es un factor determinante en la susceptibilidad de la mayoría de especies a estos dos patógenos, por lo menos en edades tan tempranas. Estos factores podrían variar en edades mayores, cuando se produzca el cambio de fase juvenil a plantas adultas con cambios estructurales y fisiológicos más destacables. Este cambio suele darse a partir de los 7-10 años en *Pinus nigra* y *P. radiata*, y a los 10-12 años en *Pseudotsuga menziesii* (Libby et al. 1972, Diego et al. 2004).

5.4.2 Variabilidad interespecífica

En relación a *Fusarium circinatum*, todos los géneros diferentes a *Pinus* ensayados en este estudio se han mostrado resistentes o moderadamente resistentes (*Larix kaempferi*, *Sequoiadendron giganteum*). Hay que señalar que *Pseudotsuga menziesii* es la única especie fuera del género *Pinus* en la que se ha detectado *Fusarium circinatum* y algunos autores lo han considerado moderadamente susceptible a este patógeno, aunque bastante menos sensible que *Pinus radiata* (Storer et al. 1995, Aegerter et al. 2003). Sin embargo, en el marco de nuestras observaciones resulta ser una especie resistente.

Entre los pinos, y en relación al mismo hongo, la especie más susceptible es *Pinus radiata*, como ya hemos comentado repetidamente en este trabajo. En el otro extremo, *Pinus pinea* aparece como la especie más resistente. Tanto esta especie como *Pinus canariensis* han sido consideradas especies resistentes a este hongo (McCain et al. 1987, Gordon et al. 2001, Aegerter et al. 2003), si bien Gadgil et al. (2003) las consideran más bien poco susceptibles. Para *Pinus canariensis* nuestros resultados muestran una ligera susceptibilidad, más coincidente con los datos mostrados por Gadgil et al. (2003), mientras que *Pinus pinea* sí se ha mostrado resistente.

Pinus taeda y *P. halepensis* muestran cierta resistencia frente a *Fusarium circinatum*, lo que resulta interesante en el primer caso, por su moderada resistencia también a *Diplodia pinea*. *Pinus nigra* subsp. *laricio* se ha mostrado también resistente frente a *Fusarium circinatum* pero con una respuesta más variable. *Pinus pinaster* y *P. sylvestris* muestran una respuesta muy variable y se mantienen muy cerca del límite que hemos establecido entre la susceptibilidad y la resistencia. Esto es coincidente con otros estudios (McCain et al. 1987, Gordon et al. 2001, Aegerter et al. 2003, Gadgil et al. 2003, Pérez-Sierra et al. 2007).

Barrows-Broaddus & Dwinell (1983) relacionan la formación de un peridermo en la zona de infección con *Fusarium circinatum* con el intento de la planta por confinar al hongo. En los ensayos de inoculación hemos detectado este peridermo en *Pinus pinea*, *P. sylvestris*, *P. nigra* subsp. *laricio* (fig. 5.15), *Sequoia sempervirens* y *Sequoiadendron giganteum*, pero no se forma en *Pinus radiata*, *P. canariensis*, *P. halepensis* y *P. pinaster*. En el caso de las dos secuoyas y *Pinus pinea* se forma peridermo y las tres especies son resistentes. En *Pinus sylvestris* y *P. nigra* subsp. *laricio* la resistencia no es tan clara. Aparentemente, en algunos casos individuales la infección queda confinada por el peridermo pero en otros sigue su camino superando esa barrera.



Fig. 5.15. Peridermo formado tras la inoculación de *Fusarium circinatum* sobre *Pinus nigra* subsp. *laricio*.

En lo que se refiere a *Diplodia pinea*, sin embargo, la situación es muy diferente. Únicamente las dos cupresáceas (subfamilia Sequoioideae) ensayadas en este estudio, *Sequoia sempervirens* y *Sequoiadendron giganteum*, son plenamente resistentes a este hongo. Estos datos coinciden con los datos de Dallara et al. (1995). Junto con la resistencia a *Fusarium circinatum*, esta característica las hace candidatas idóneas como especies alternativas a *Pinus radiata*.

En el género *Picea*, las tres especies estudiadas (*Picea sitchensis*, *P. glauca* y *P. jezoensis*) son bastante susceptibles a las inoculaciones con *Diplodia pinea*. (Gadgil et al. 2003, Flowers et al. 2006, Iturrity et al. 2006). Blodgett & Stanosz (1999), en ensayos con inoculaciones controladas, encuentran a *Picea pungens*, en una escala similar a la nuestra, moderadamente susceptible a *Diplodia pinea*. También *Larix kaempferi* se ha mostrado moderadamente susceptible, respuesta similar a la que hallaron Stanosz et al. (1997) en *Larix decidua* y *L. laricina*, utilizando diversas cepas de *Diplodia pinea*. Por último, *Pseudotsuga menziesii* se ha mostrado bastante susceptible a este patógeno. Lo mismo hallaron Blodgett & Stanosz (1999), aunque con algunas diferencias de respuesta en función de la cepa fúngica utilizada. Evidentemente, la comparación efectiva entre especies solo puede hacerse utilizando las mismas cepas, pero en la práctica hay que tener en cuenta que, como hemos visto en el capítulo 4, la situación en campo implica la exposición a cepas muy diversas.

En cuanto a las especies del género *Pinus*, este estudio ha confirmado las observaciones previas (Punithalingam & Waterston 1970, Gibson 1979, Louppe et al. 2008) de que *Pinus radiata* es también especialmente sensible a este patógeno.

En nuestros ensayos también *P. sylvestris* y *P. halepensis* muestran una respuesta muy susceptible a la inoculación con *Diplodia pinea*. Menos susceptibles se muestran *Pinus pinea* y *P. canariensis*. En cambio *Pinus taeda* se muestra más resistente a la inoculación con *Diplodia pinea*, resultados confirmados también por otros investigadores (Waterman 1943, Swart et al. 1988, Dick 1999). *Pinus nigra* subsp. *laricio* y *P. pinaster* muestran un comportamiento variable y se muestran susceptibles en algunos casos y resistentes en otros. En Italia *Pinus pinaster*, *P. halepensis* y *P. pinea* se muestran susceptibles frente a *Diplodia pinea* mientras que *Pinus nigra* se muestra muy susceptible (Luchi et al. 2007). Apoyando el caso de la alta susceptibilidad de *Pinus sylvestris* Blodgett & Stanosz (1999) establecen el siguiente orden en resistencia a *Diplodia pinea*: las mayores susceptibilidades corresponderían a *Pinus sylvestris* seguido de *Pinus resinosa*, *Picea pungens*, *Pinus mugo*, *Pseudotsuga menziesii* y *Abies balsamea*. La moderada resistencia manifestada por *Pinus taeda* ya se ha referido en algunos estudios. Swart et al. (1988) lo encuentran más resistente que cualquiera de las siguientes 5 especies (*Pinus radiata*, *P. pinaster*, *P. kesiya*, *P. patula* y *P. elliotii*). Aunque en nuestro caso esto es verdad respecto a *Pinus radiata*, el comportamiento variable de *Pinus pinaster* no confirma del todo estas apreciaciones.

Entre los pinos ensayados en este estudio, solamente *Pinus taeda* se ha mostrado moderadamente resistente a ambos patógenos. Es interesante, sin embargo, reseñar la respuesta resistente de *Pinus pinea*, y la moderadamente resistente de *Pinus nigra* subsp. *laricio* y *P. halepensis*, frente a las inoculaciones con *Fusarium circinatum*. Aunque, por otra parte, todos ellos se muestran susceptibles a la colonización por *Diplodia pinea*, si bien en los tres casos con niveles de infección menores que *Pinus radiata*. Por otra parte, *P. pinaster* y *P. sylvestris* muestran un comportamiento variable frente a *Fusarium circinatum* pero son muy susceptibles a *Diplodia pinea*. *Pinus canariensis* se muestra en la frontera entre la susceptibilidad y la resistencia frente a *Fusarium circinatum* y moderadamente susceptible a *Diplodia pinea* (Peterson 1977, Gadgil et al. 2003, Pérez-Sierra et al. 2007).

Los resultados de este estudio muestran de forma general la capacidad de *Diplodia pinea* para infectar un gran número de especies de coníferas (Blodgett & Stanosz 1999, de Wet et al. 2008). En cambio, la resistencia mostrada por las especies no pertenecientes al género *Pinus* frente a *Fusarium circinatum* concuerdan con la idea de que es un patógeno casi exclusivo de este género (Aegerter et al. 2003, Gadgil et al. 2003).

5.4.3 Variabilidad intraespecífica

Otro aspecto interesante que se desprende de los resultados de este trabajo es el referido a las resistencias individuales. En todas las especies estudiadas hemos encontrado individuos resistentes, tanto a *Diplodia pinea* como a *Fusarium circinatum*, incluso en *Pinus radiata*. Estos individuos pueden ser utilizados como base para una selección genética sobre todo en especies que se consideren importantes por su valor comercial o por la importancia ecológica de sus poblaciones nativas (Gordon et al. 1998a, Storer et al. 1999). En California se ha detectado un 3% de la población nativa de *Pinus radiata* resistente a *Fusarium circinatum*. La importancia ecológica de esta especie en su área natural justifica el inicio de un programa de búsqueda de resistencias para preservar la especie de la extinción. Además se está trabajando en la posibilidad de inducir resistencia en campo mediante inoculaciones controladas (Gordon et al. 1998b y 2001, Bonello et al. 2001). Con la detección de un porcentaje de resistencia a *Fusarium circinatum* de más del doble que en California se podría iniciar un programa de las mismas características para las zonas del País Vasco donde esta enfermedad podría comprometer el cultivo de esta especie.

Aunque nosotros hemos encontrado suficiente resistencia individual para utilizarla como base en programas de mejora genética, hay más factores a tener en cuenta en la selección de individuos. Sería necesario incluir individuos que respondieran de forma adecuada a las dos enfermedades a la vez y, además, que mantengan unos crecimientos que justifiquen su uso como especie cultivada. Sería necesario un estudio económico para justificar esta posible línea de actuación (García-Serna 1996).

Las medidas más efectivas de control de estas enfermedades sugieren el sustituir las especies muy susceptibles por otras más resistentes, o por variedades de la misma menos susceptibles. Aunque esto puede no ser factible debido a que no exista suficiente información sobre la resistencia interespecífica y cómo pueda estar afectada por las condiciones climáticas y de sitio (Swart et al. 1985). En Sudáfrica *Pinus elliottii* está plantándose en sustitución de *Pinus patula* debido a su mejor respuesta a la infección por *Diplodia pinea* (Poynton 1979). Aunque autores como Gibson (1979) comentan que *Pinus patula* podría ser más resistente que *Pinus taeda* y *P. elliottii*.

También encontramos algunas contradicciones en otras recomendaciones de plantación de diversas especies. Poynton (1979) recomienda la plantación de *Pinus kesiya* en Sudáfrica pero Swart et al. (1988) rebaten que *Pinus kesiya* es tan susceptible como *Pinus radiata* y *P. pinaster* a *Diplodia pinea*, mientras que *Pinus patula*, *P. taeda* y *P. elliottii* se muestran más resistentes por lo que serían estas últimas especies las más indicadas en las repoblaciones sudafricanas.

Estas contradicciones que se encuentran en la bibliografía se explican porque las resistencias que se estiman se basan en condiciones de campo y las condiciones ambientales de unas zonas y otras no son comparables. Si las comparaciones se establecen con la observación en campo los resultados sólo serán válidos para la zona estudiada y habrá que ser muy cuidadosos a la hora de hacer recomendaciones para otros lugares con condiciones distintas. Para establecer comparaciones válidas entre unas especies y otras es necesario que los ensayos se realicen en condiciones controladas que se mantengan constantes. Una vez tengamos comparaciones válidas entre resistencias a patógenos de diferentes especies en condiciones controladas será necesario establecer ensayos en campo para comprobar que esas características se mantienen en la zona donde deseemos establecer las repoblaciones.

Los resultados de este estudio indican que varias especies adaptadas a climas templados son alta o moderadamente resistentes a *Fusarium circinatum* (Gordon et al. 1998b) pero en algunos casos, algunas de ellas son alta o moderadamente susceptibles a *Diplodia pinea*, lo que complica el proponer especies alternativas a los cultivos forestales más comunes en el País Vasco. Sin embargo, parece que existe variabilidad genética suficiente para iniciar programas de selección genética que ofrezcan resistencias a ambos patógenos. Para poder cultivar especies con ciertas garantías de resistencia se deberían iniciar estos programas. En el caso de especies muy susceptibles la selección debería encaminarse a la obtención de clones o variedades resistentes. Para aquellas menos susceptibles y de respuesta más variada, la selección podría ser menos estrecha genéticamente y ampliarse a mayor número de individuos manteniendo una mayor diversidad en la población. Por último, tratándose de especies resistentes se debería mantener la vigilancia sobre la población para evitar los posibles problemas que podrían generar nuevas cepas más virulentas o cambios en las condiciones ambientales que pudieran modificar esas respuestas. Además, siempre se debe mostrar cuidado al proponer algunas especies como alternativa para cultivos forestales, puesto que pueden verse afectadas por otras enfermedades a las que se muestren más susceptibles (Worrall et al. 1986, Hodge & Dvorak 2000, Gadgil et al. 2003, Aegerter & Gordon 2006).

5.5 Conclusiones

1.- Hemos utilizado las inoculaciones controladas en invernadero como método más idóneo para determinar niveles de susceptibilidad o resistencia frente a los dos patógenos por parte de las especies forestales más utilizadas en el País Vasco. En base a ello, hemos clasificado las especies ensayadas en cuatro grupos de acuerdo con la susceptibilidad mostrada frente a cada una de las dos especies de hongos patógenos.

2.- *Pinus radiata* ha mantenido niveles altos de susceptibilidad de forma constante y uniforme a lo largo de los siete ensayos realizados, tanto frente a *Diplodia pinea* como frente a *Fusarium circinatum*.

3.- En cuanto a la susceptibilidad a *Diplodia pinea* parece haber una relación directa con la velocidad de crecimiento de las plantas en *Pinus radiata*.

4.- La mayoría de especies cultivadas o autóctonas de pino en España muestran cierta resistencia o moderada susceptibilidad a *Fusarium circinatum* pero moderada o alta susceptibilidad a *Diplodia pinea*. Estas especies son *Pinus pinea*, *P. nigra* subsp. *laricio*, *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. sylvestris* y *P. canariensis*.

5.- Las otras pináceas *Larix kaempferi*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea sitchensis*, *P. glauca* y *P. jezoensis* poseen resistencia a *Fusarium circinatum* pero se ven fuertemente afectadas por *Diplodia pinea*.

6.- Las dos cupresáceas *Sequoia sempervirens* y *Sequoiadendron giganteum* se muestran resistentes a los dos patógenos. En esta misma línea, *Pinus taeda* ha mostrado moderada resistencia a los dos patógenos.

7.- Se ha encontrado variabilidad intraespecífica suficiente como para suponer un buen punto de partida para programas de mejora genética basados en individuos resistentes. En todas las especies testadas hemos encontrado individuos con características resistentes.

8.- La resistencia genética es un componente práctico para el control de estas enfermedades, si bien deben tenerse en cuenta otros factores dentro de una estrategia de control integrado.

9.- Estos resultados pueden ayudar a determinar predicciones de riesgo de infección para propósitos tanto forestales como de preservación, teniendo en cuenta que ninguna de estas especies está exenta de otros problemas sanitarios y otros requerimientos forestales.

6. DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE PREDISPOSICIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE CHANCRO EN EL PAÍS VASCO



Ortofoto de una zona forestal vasca.

6. DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE PREDISPOSICIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE CHANCRO EN EL PAÍS VASCO

6.1 Introducción

La mayoría de estudios biogeográficos se realizan en plantas y animales grandes y, generalmente, en organismos de vida libre (Desprez-Lustou et al. 2007). Pero los organismos parásitos dependen en primer lugar de la presencia y densidad de sus hospedadores, aunque otros factores como los climáticos se deben tener en cuenta para establecer sus patrones de distribución. Esto es válido especialmente para los parásitos fúngicos de plantas, que se encuentran fuertemente afectados por la temperatura para su crecimiento y supervivencia. Las precipitaciones también pueden influir en su dispersión (Agrios 2005). La influencia del clima sobre la enfermedad de una planta es una consecuencia de su acción sobre la planta, sobre el patógeno causante de la enfermedad y sobre la relación entre la planta y el propio patógeno (Coscollá 1980).

En el caso de enfermedades fúngicas la temperatura es un factor limitante pues hay un umbral por debajo del cual no se desarrolla el hongo. Una vez sobrepasado ese umbral la velocidad de desarrollo de la enfermedad es función de la temperatura. Las precipitaciones suelen actuar como factor determinante en la medida en que suelen desencadenar el proceso de desarrollo del hongo. Esto quiere decir que en numerosas enfermedades fúngicas las esporas precisan la presencia de humedad para germinar, pero esta germinación es a su vez función de la temperatura (Coscollá 1980). Aunque la mayoría de hongos patógenos sólo se puedan desarrollar a partir de cierta temperatura, a veces sus esporas pueden permanecer latentes a temperaturas muy bajas, o muy altas, esperando las condiciones adecuadas para la germinación (Cobos-Suárez & Ruiz-Urrestarazu 1990).

Los efectos climáticos no sólo afectan a los patógenos directamente, sino que también inciden en la fisiología de los hospedadores y organismos vectores pudiendo influir en la distribución de estas enfermedades (Coakley et al. 1999). El estudio de la acción de los factores climáticos sobre enfermedades fúngicas a veces se complica a causa de la existencia, para un mismo patógeno, de razas fisiológicas distintas con diferentes exigencias ecológicas (Clerjeau 1976, Stanosz et al. 1999). Existen varios estudios que tratan la relación entre las condiciones meteorológicas y los desarrollos de enfermedades forestales, relacionando variaciones anuales, interanuales y geográficas con la intensidad de los daños (Houston & Valentine 1988, Blodgett & Bonello 2003).

Los modelos de riesgo de aparición de hongos patógenos forestales deben basarse en datos reales de distribución del hongo. Las variables seleccionadas para crear los modelos estadísticos deben tener significado ecológico y servir para explicar la biología de estos organismos. Así mismo, la geografía condiciona el clima de un lugar y se convierte en una característica necesaria para comprender la distribución de un patógeno, de su hospedador y de la relación existente entre ambos (Desprez-Lustou et al. 2007).

Conforme se ha ido avanzando y profundizando en el conocimiento de la biología de patógenos de cultivos, se ha puesto cada vez más de manifiesto la notable acción del clima sobre el ciclo biológico y actuación de los patógenos. Esta relación se ha tratado de concretar a través de funciones matemáticas y en algunos casos se han podido establecer modelos matemáticos complejos que intentan reflejar la biología de los patógenos en función de los factores climáticos y sus hospedadores (Coscollá 1980). Por ejemplo, en Sudáfrica se ha realizado un modelo de distribución del hongo *Cryphonectria cubensis* en función de factores climáticos por el riesgo que supone para las repoblaciones de eucaliptos (Van Staden et al. 2004). En Francia se han realizado modelos similares para los complejos hospedador : patógeno siguientes: *Populus* spp. : *Melampsora allii-populina*; *Castanea sativa* : *Cryphonectria parasitica*; *Castanea sativa* : *Phytophthora cinnamomi*, *Pinus sylvestris/P. pinaster* : *Melampsora pini-torqua*; *Pinus nigra* : *Mycosphaerella pini* (= *Dothistroma septosporum*); *Quercus* spp. : *Biscogniauxia mediterranea*, y *Pinus* spp. : *Diplodia pinea* (Desprez-Lustou et al. 2007).

Los Sistemas de Información Geográfica (SIG) son una tecnología que permite gestionar, analizar y visualizar información espacial compleja, y se han convertido recientemente en una herramienta esencial para el análisis y toma de decisiones en muchos campos (Peña 2006). La presentación gráfica de datos hace posible una profundización en la información que poseen. Mediante las técnicas oportunas pueden desvelarse pautas más generales y esquemáticas de una forma intuitiva y asequible. En geografía, la necesidad de expresar distribuciones de hechos en el espacio ha conducido al uso de un buen número de métodos que facilitan la visualización de aquéllas. Como parte de los SIG, la geoestadística utiliza métodos estadísticos para establecer relaciones espaciales entre datos de muestras y para aplicar este análisis a la predicción de fenómenos espaciales y temporales. Se utiliza para explicar patrones espaciales y poder interpolar valores a localidades no muestreadas. Las técnicas estadísticas combinadas con los sistemas de información geográfica nos pueden ayudar a generar modelos de distribución de hábitat de hospedadores y sus patógenos. Esto permite crear modelos útiles en áreas tan diversas como la biogeografía, biología de conservación, manejo de especies o hábitats e investigaciones de cambio climático (Guisan & Zimmermann 2000).

Para que los modelos predictivos sean eficaces y fieles a la realidad deben estar basados en estudios completos del comportamiento de los parásitos y sus hospedadores, relacionados con las características medioambientales (Desprez-Lustou et al. 2007).

Las especies seleccionadas por su resistencia a patógenos en un sitio pueden ser susceptibles a los mismos en otro lugar desfavorable. Las especies de pino en lugares como Sudáfrica, Estados Unidos, Chile y País Vasco están distribuidas por varias regiones climáticas, mientras que la distribución e infectividad de *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* está afectada por parámetros climáticos que varían de unas a otras. Por eso los estudios climáticos pueden ampliar nuestro conocimiento del por qué hay especies limitadas a regiones específicas. Si la distribución espacial de una planta no está bien definida, los análisis bioclimáticos nos pueden permitir la predicción de límites teóricos de su distribución (Lindenmayer et al. 1991, Ganley et al. 2009). Esto podría tener importantes implicaciones para el desarrollo de estrategias de

manejo apropiadas para reducir el impacto o incidencia de los daños (Van Staden et al. 2004).

Así, *Diplodia pinea*, ampliamente distribuida por países como Sudáfrica, se ha citado sobre todo en zonas donde son frecuentes las tormentas de granizo en verano (Swart et al. 1987a). Los daños se dan en árboles afectados por granizo, insectos u otros agentes, o físicamente estresados por sequía o deficiencias nutricionales, todos ellos factores que promueven su paso de saprófito a parásito. La humedad relativa, temperaturas óptimas, la ocurrencia de tormentas, condiciones microclimáticas y las estaciones pueden influir en la dispersión de conidios, germinación de esporas y penetración en el hospedador (Swart et al. 1987b, Swart & Wingfield 1991b).

Por su parte, *Fusarium circinatum* se ha extendido a varios países en los últimos 30 años. La alta susceptibilidad de *Pinus radiata*, ampliamente extendida en repoblaciones comerciales, está preocupando a la industria maderera de todo el mundo. Usando un proceso basado en el programa CLIMEX, Ganley et al. (2009) han establecido el riesgo de establecimiento del chancro resinoso basado en un número de variables climáticas a escala mundial. Para enfermedades forestales el programa CLIMEX calcula un índice de crecimiento anual que describe el potencial para el crecimiento de la población del hongo como una función de humedad de suelo y temperatura durante las condiciones favorables. Para los periodos no favorables de crecimiento se estima un índice de estrés, que indica el grado en el que el clima es demasiado húmedo, seco, caluroso o frío para el desarrollo. El programa establece una función que relaciona estos dos índices y estima el riesgo a nivel mundial con una resolución de 25 x 25 Km de aparición de la enfermedad.

En el futuro, un manejo adecuado de los daños en las plantaciones forestales dependerá cada vez más de la cooperación entre diferentes disciplinas de investigación como la patología, entomología, genética, ciencias del suelo y silvicultura. Un sistema de modelización que englobe y relacione estos factores puede ayudar en la selección de especies para determinados sitios y podría generar un impacto positivo en el manejo de daños forestales (Van Staden et al. 2004).

6.1.1 Condiciones geográficas del País Vasco

El País Vasco se sitúa en el norte de la Península Ibérica en el tramo central del eje que, orientado en sentido de los paralelos, forman los sistemas cantábrico y pirenaico donde los relieves de estos sistemas montañosos se suavizan. Limita al norte con el mar Cantábrico y al sur con el valle del Ebro. Dispone de dos cuencas hidrogeográficas, la cantábrica en su posición septentrional, y la mediterránea que recoge las aguas de la mitad sur a través de la cuenca del Ebro (Loidi 1987, Edeso 2006).

A grandes rasgos, la geografía del País Vasco está ordenada por tres cadenas montañosas principales, abriéndose entre ellas los correspondientes valles o depresiones. La alineación más septentrional, con orientación general NW-SE, ejerce de divisoria de aguas y es donde se alcanzan las mayores altitudes, alrededor de los 1.500 m. Aquí se encuentran sierras como las de Ordunte, Gorbea, Urkiola y Aralar. Otras cadenas menores, con orientación similar, se localizan al norte de ésta,

delimitando una serie de valles cortos por los que discurren ríos de aguas rápidas debido a la fuerte pendiente. En general, el relieve es mucho más accidentado en la parte oriental de este territorio (fig. 6.2). Al sur de la divisoria se encuentra otra alineación, con orientación general W-E, formada por sierras como las de Cuartango, Montes de Vitoria y Urbasa, de menor altitud que las anteriores. Entre estas dos cadenas montañosas se extiende la Llanada Alavesa. El tercer alineamiento lo forma la sierra de Toloño. Al sur de esta sierra se encuentra la Rioja Alavesa cuyo límite es el río Ebro (fig. 6.2).

Las rocas ricas en carbonatos (calizas, margas, etc.) son la litología más frecuente y cubren la mayoría de la superficie mientras que los materiales pobres en bases como areniscas, esquistos, granitos, etc., aunque importantes, ocupan una superficie menor (fig. 6.1). Aún así, la elevada pluviosidad, sobre todo en la vertiente cantábrica, ocasiona un intenso lavado en los suelos, que sufren por ello una fuerte acidificación, aun cuando la roca madre sea caliza o de tipo flysch (Loidi 1987). En la vertiente cantábrica, las laderas de fuertes pendientes (fig. 6.2) suelen presentar unos suelos caracterizados por su acidez (pH en torno a 4,5-5) y altos porcentajes de materia orgánica y de hierro. Únicamente los suelos aluviales de fondo de valle, profundos y fértiles, y los litosuelos propios de las zonas montañosas calizas, suelen ser diferentes. Los macizos calizos karstificados son los que dan lugar a las cotas más altas y conforman relieves abruptos y suelos de escaso desarrollo. Las principales altitudes se sitúan en sierras calizas de la divisoria de aguas cantábrico-mediterránea (IKT 1999).

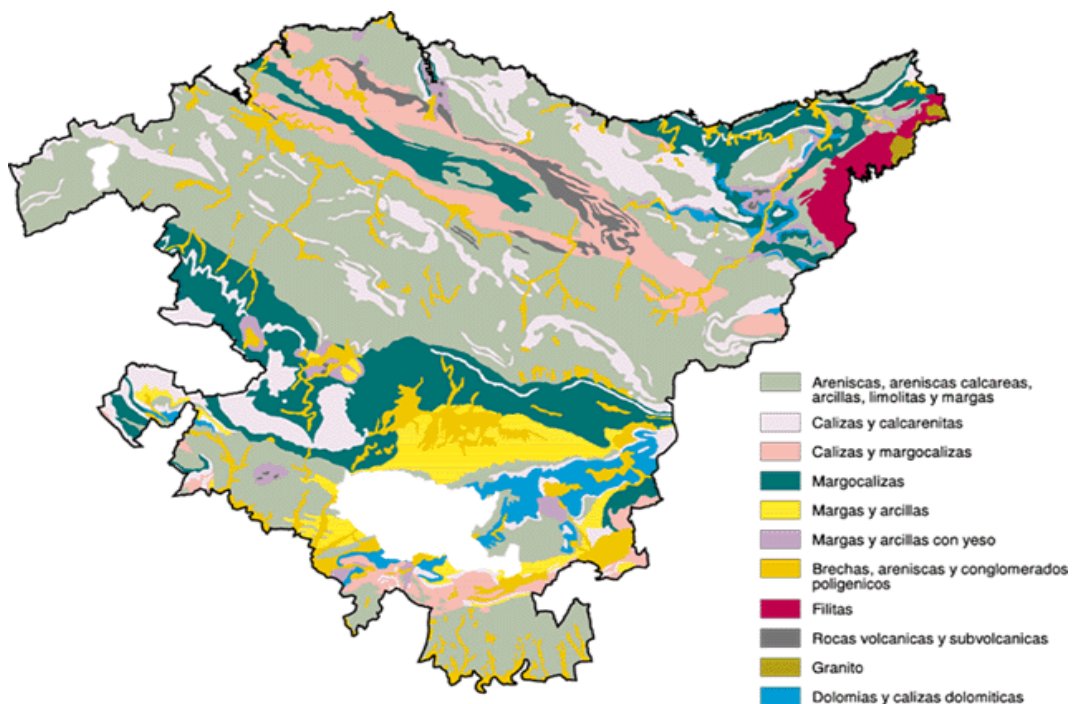


Fig. 6.1. Mapa litológico del País Vasco.
Fuente: IKT 1999

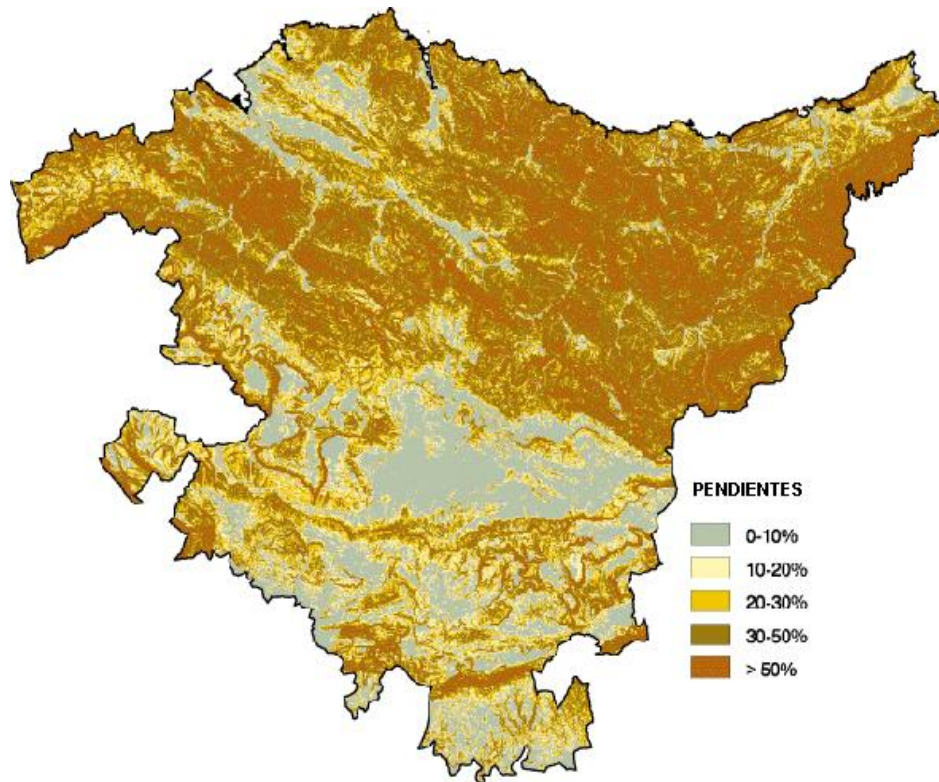


Fig. 6.2. Mapa de pendientes del País Vasco.

Fuente: IKT 1999

6.1.2 Bioclimatología del País Vasco

La climatología en el País Vasco está condicionada por la latitud, la influencia oceánica y el relieve. La latitud determina la cantidad de energía solar incidente y sus variaciones estacionales a lo largo del año. Y en segundo lugar, determina la dirección general y más frecuente de los vientos. La latitud del País Vasco se encuentra entre los 42° y los 43,5° al norte del Ecuador y sitúa al país dentro de lo que se ha llamado zona templada (Euskalmet 2009).

Las costas europeas disfrutan de un invierno más suave que el que les correspondería por su latitud debido a la corriente templada del Golfo, que discurre por el océano Atlántico y baña sus costas. Si no fuese por el sistema de corrientes marinas del Atlántico el clima invernal del País Vasco sería distinto, más frío y con precipitaciones más escasas (Loidi 1987, Euskalmet 2009).

El País Vasco no forma una región climática homogénea ya que las condiciones geográficas y topográficas hacen que se produzca un mosaico de climas locales y comarcales. Los vientos dominantes del NW, de origen atlántico, sobre todo en primavera y otoño, arrastran masas de aire muy húmedas rápidamente hacia el mar Mediterráneo. Los montes vascos actúan a modo de rampa ascendente y provocan la condensación de las nubes generando abundantes precipitaciones de manera que al llegar al siguiente valle el aire está más seco. Este fenómeno confiere al País Vasco un clima húmedo y progresivamente más seco cuanto más al sur nos encontremos (Aseginolaza et al. 1989).

De acuerdo con las clasificaciones bioclimáticas desarrolladas más recientemente para este territorio, el País Vasco participa de dos macrobioclimas, templado y mediterráneo, que se diferencian porque el segundo de ellos presenta siempre un periodo de al menos dos meses de sequía estival, en el que las precipitaciones son inferiores al doble de las temperaturas ($p < 2t$). En cambio, en el macrobioclima templado los veranos siguen siendo húmedos. Se pueden distinguir tres zonas bioclimáticas: la mayor parte del territorio pertenece al clima templado oceánico. En algunos puntos cercanos a la costa el clima se convierte en templado hiperoceánico. Tanto uno como el otro se dan en dos variantes, la típica y la submediterránea. En la zona sur nos encontramos con el bioclima mediterráneo pluviestacional oceánico (fig. 6.3; Campos 2010).

El bioclima templado oceánico se encuentra en la mayor parte del territorio. Al norte de la divisoria (Valles Atlánticos) aparece con sus características típicas: temperaturas moderadas y pluviosidad elevada a lo largo del año. Sin embargo, la disminución de las precipitaciones hacia el sur condiciona la aparición, en la parte sudoccidental del territorio, de una variante submediterránea, en la que las precipitaciones son inferiores al doble de las temperaturas al menos durante un mes en verano. Esta zona, que se corresponde aproximadamente con la parte media o de transición, se caracteriza por una vegetación natural dominada por bosques de fagáceas marcescentes (quejigos, melojos). El sur del territorio ya se halla sometido al bioclima mediterráneo, en una variante también oceánica (fig. 6.3).

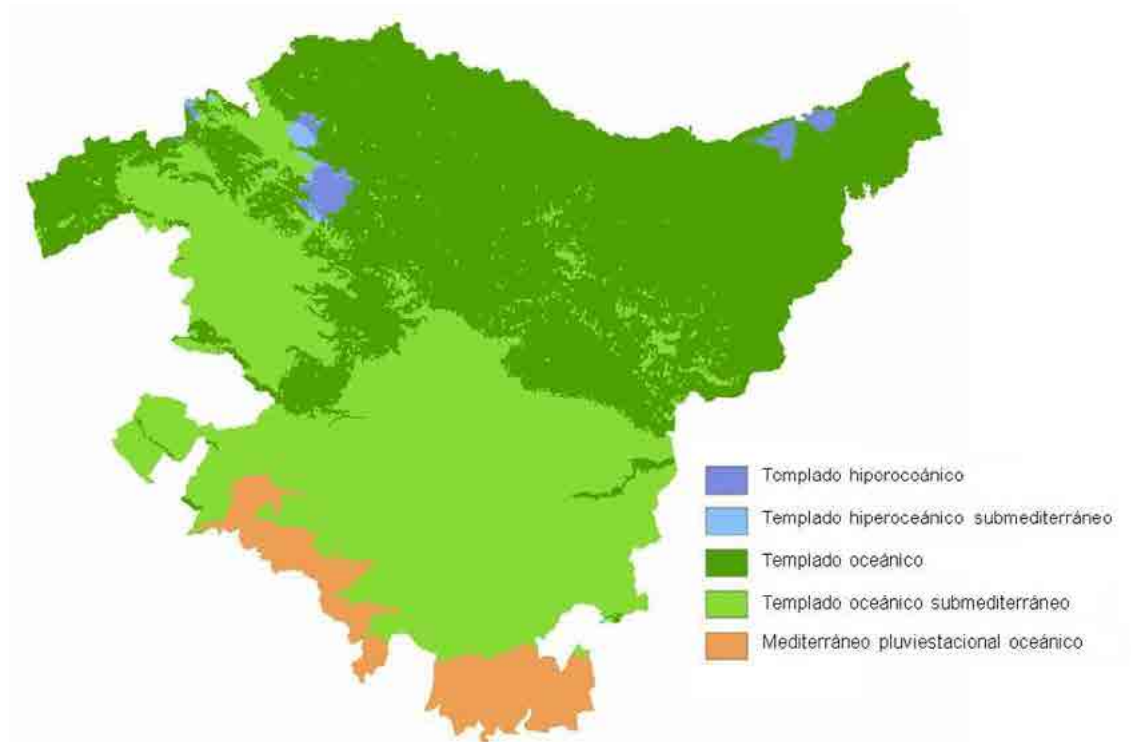


Fig. 6.3. Bioclimas del País Vasco.

Fuente: Campos 2010

6.1.2.1 Precipitaciones

El País Vasco participa de los mundos atlántico y mediterráneo. La vertiente atlántica y la zona media son de importante pluviosidad y esta intensidad de las precipitaciones se explica fundamentalmente por el factor orográfico. La orientación de las sierras y el hecho de que las montañas vascas sean más bajas que las montañas de la Cordillera Cantábrica al oeste y las de los Pirineos al este, unido al efecto de succión de aire producido por la región del Mediterráneo, es causa de que el flujo general del oeste se desvíe hacia la cuenca mediterránea a través de todo el País Vasco. La zona sur queda al resguardo de estas corrientes y se muestra bastante más seca. Un dato de cierta importancia es la mayor pluviosidad de la zona oriental del territorio en la franja atlántica (Loidi 1987, Euskalmet 2006; figs. 6.4 y 6.7).

El granizo es un fenómeno más frecuente en la costa que en el interior. En la costa se suelen superar los 5 días de granizo al año, pero en el interior apenas se supera una media anual de 3 días. En la costa el granizo es más frecuente en invierno mientras que en el interior es más frecuente en verano. Esto es debido a que las ascensiones bruscas que producen el granizo se disparan en la costa debido al relieve y a la inestabilidad que adquieren las masas de aire cuando sus capas más superficiales, en contacto con el agua, se calientan al atravesar el Cantábrico. Por el contrario, en el sur, las ascensiones que producen el granizo suelen ser debidas más a la inestabilidad térmica producida en verano por el agudo calentamiento del suelo y de la capa de aire en contacto con él (Euskalmet 2006).

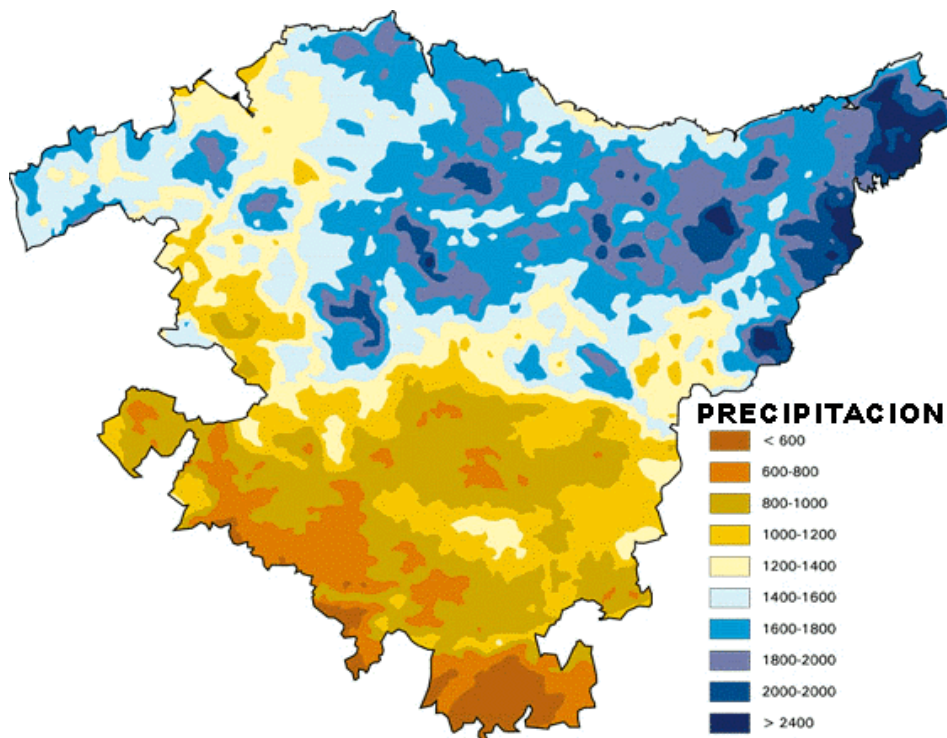


Fig. 6.4. Mapa de precipitaciones del País Vasco.

Fuente: IKT 1999

6.1.2.2 Temperaturas

Las medias anuales más cálidas se dan en las zonas de costa y en las del sur del País Vasco por distintos motivos. En la costa las temperaturas son más homogéneas a lo largo del año que en el interior, donde las temperaturas se van hacia los extremos, tanto las más frías como las más cálidas. Pero las medias anuales permanecen similares. Las medias anuales más frías se dan en la zona media y en las zonas con mayor altitud (Aseginolaza et al. 1989; fig. 6.5).

En la zona climática atlántica las diferencias entre los meses más cálidos y los más fríos son de unos 11°C o 12°C aproximadamente, mientras que en el interior aumentan sensiblemente hasta llegar a ser de unos 17°C o 18°C. En la zona atlántica las temperaturas medias más altas se suelen dar en el mes de agosto mientras que avanzando hacia el sur, suele ser el mes de julio el más cálido. El mes de septiembre conserva bastante el nivel de calor veraniego pero hay un bajón térmico bastante brusco al pasar a octubre, que se hace aún más agudo al pasar a noviembre. Por el contrario el ascenso de la transición primaveral desde marzo hasta junio es bastante más regular. Las temperaturas medias mensuales más bajas se registran en diciembre en las tres zonas climáticas. En la costa suelen superar los 8°C mientras que en el interior oscilan entre los 4°C y 6°C (Euskalmet 2005 y 2006).

El número de días de heladas, es decir, aquellos en los que las temperaturas descienden en algún momento por debajo de los 0°C, es un parámetro climatológico de gran interés, ya que esa temperatura de congelación del agua es un umbral crítico en la vida de muchas especies. Las especies de hongos se pueden ver afectadas en su desarrollo por temperaturas bajas (Coscollá 1980, Cobos-Suárez & Ruiz-Urrestarazu 1990).

El número medio de días con heladas muestra diferencias territoriales considerables. En la costa no se alcanzan los 20 días, pero las cifras aumentan rápidamente hacia el interior de Bizkaia y de Gipuzkoa. Al otro lado de la divisoria, en la Llanada Alavesa se superan con facilidad los 40 días. Las fechas de las primeras y de las últimas heladas, las cuales tienen también una repercusión agrícola importante, varían también bastante a lo largo del territorio vasco. En cuanto a las fechas extremas de heladas, éstas pueden prolongarse hasta bien entrado mayo en la Llanada Alavesa e incluso los primeros días de junio (Euskalmet 2005 y 2006).

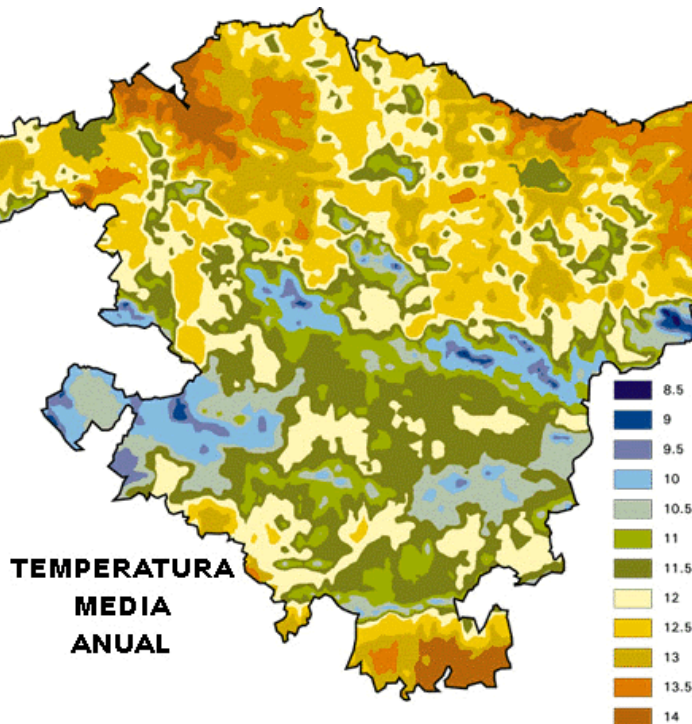


Fig. 6.5. Mapa de temperaturas medias anuales del País Vasco.
Fuente: IKT 1999

6.1.3 Pisos bioclimáticos

Tiene interés para nuestros propósitos tratar de afinar un poco más la somera descripción climatológica que hemos presentado, haciendo uso de los pisos bioclimáticos tal y como han ido delimitándose en los últimos años a partir de los estudios de la vegetación (Loidi et al. 2009). La caracterización de los pisos bioclimáticos se hace mediante parámetros termométricos (termotipos, fig. 6.6) o pluviométricos (ombrotipos, fig. 6.7), determinando arbitrariamente los valores que marcan los límites entre unos y otros, de modo que expresen adecuadamente la distribución de las formaciones vegetales características. En este territorio se han delimitado tres pisos correspondientes al bioclima templado: termotemplado, mesotemplado y supratemplado, y dos para el mediterráneo: mesomediterráneo y supramediterráneo (fig. 6.6).

Como puede verse en la fig. 6.6, el piso termotemplado ocupa una estrecha banda costera, que va estrechándose aún más hacia el este, hasta prácticamente desaparecer en la costa guipuzcoana. La superficie es, pues, escasa, y estaría ocupada por las formaciones y especies más termófilas (encinares cantábricos y plantas como el acebuche o el lentisco). En los lugares en los que se han desarrollado plantaciones forestales en este piso, las especies predominantes son el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y algunos pinos (*Pinus pinaster* y *P. radiata*).

El piso mesotemplado es el más importante en extensión. A partir del anterior, llega hasta una cota de 550-650 msm. La vegetación dominante estaría formada por bosques caducifolios (robleales y bosques mixtos), pero se trata lógicamente del área más transformada por la acción y los asentamientos humanos. La mayor parte de las plantaciones forestales de *Pinus radiata* se encuentran en este piso, en el que son

claramente dominantes, acompañadas en las cotas más bajas por plantaciones de eucalipto.

Por encima del anterior se sitúa el piso supratemplado, más frío y lluvioso. Sus formaciones naturales predominantes son los hayedos y algunos robledales de roble albar (*Quercus petraea*), mucho mejor conservados que los anteriores, pues el uso predominante de estos terrenos es el forestal y ganadero. Las plantaciones forestales aquí incluyen alerces (*Larix kaempferi*), abetos (*Picea* y *Pseudotsuga*), ciprés de Lawson (*Chamaecyparis lawsoniana*), o pino albar (*Pinus sylvestris*) en las zonas más continentales. En éstas, que se encuentran hacia la parte suroeste de los dos últimos pisos mencionados, aparecen algunas formaciones de *P. sylvestris* de origen probablemente natural, aunque muy favorecidos frente a otros bosques por la acción humana.

De manera similar, en el bioclima mediterráneo se pueden definir una serie de pisos que, como hemos indicado, en este territorio son dos. El piso supramediterráneo, en contacto con la parte meridional de los dos anteriores, ocupa en el País Vasco una banda bastante estrecha, en la que las formaciones principales son quejigares o carrascales, aunque todavía hay hayedos en las umbrías (dependientes de nieblas frecuentes). En las plantaciones forestales predominan *Pinus sylvestris* y *P. nigra* (pino laricio).

Por último, al sur de la Sierra de Toloño (Rioja Alavesa), aproximadamente desde los 600 msm, se encuentra el piso mesomediterráneo, más cálido, con un paisaje eminentemente mediterráneo formado por un mosaico de viñedos, cultivos cerealistas y olivares hacia el sur. No hay plantaciones de coníferas de importancia en esta región, aunque sí algunas formaciones naturales de pino carrasco (*Pinus halepensis*), las últimas hacia occidente a esta latitud.

Esta definición climática del territorio en base a una tipología que se ajusta a los umbrales observables en la variabilidad territorial de la vegetación es un objetivo netamente bioclimático y proporciona un instrumento descriptivo idóneo para la explicación de las relaciones clima-vegetación. En este sentido, se han ensayado numerosas clasificaciones de alcance y precisión diversos, pero en su mayoría muestran una resolución muy baja para una relación entre el tipo de clima y tipo de vegetación que tenga la suficiente precisión y carácter explicativo. La tipología climática ha sido tradicionalmente muy grosera y no ha sido posible establecer una relación satisfactoria con una tipología de la vegetación climatófila (Loidi et al. 2009).

Cada vez más, estas tipologías climáticas son más ajustadas y algunos parámetros termométricos se conjugan con los pluviométricos para producir una clasificación ombrotérmica que se adapte a la topografía y condiciones de cada territorio. Fruto de ello surgen índices como los térmicos y ombrotérmicos que relacionan características térmicas y/o pluviométricas como son el índice de termicidad (I_t) y el índice ombrotérmico del bimestre más cálido del año (I_{os_2}) entre otros. El I_{os_2} ha mostrado ser un índice que se ajusta bien en algunos modelos de distribución de vegetación (Salcedo, comunicación personal). El índice de termicidad, que pondera la intensidad del frío, puede ser un factor limitante para muchas plantas y comunidades vegetales (Loidi et al. 2009).

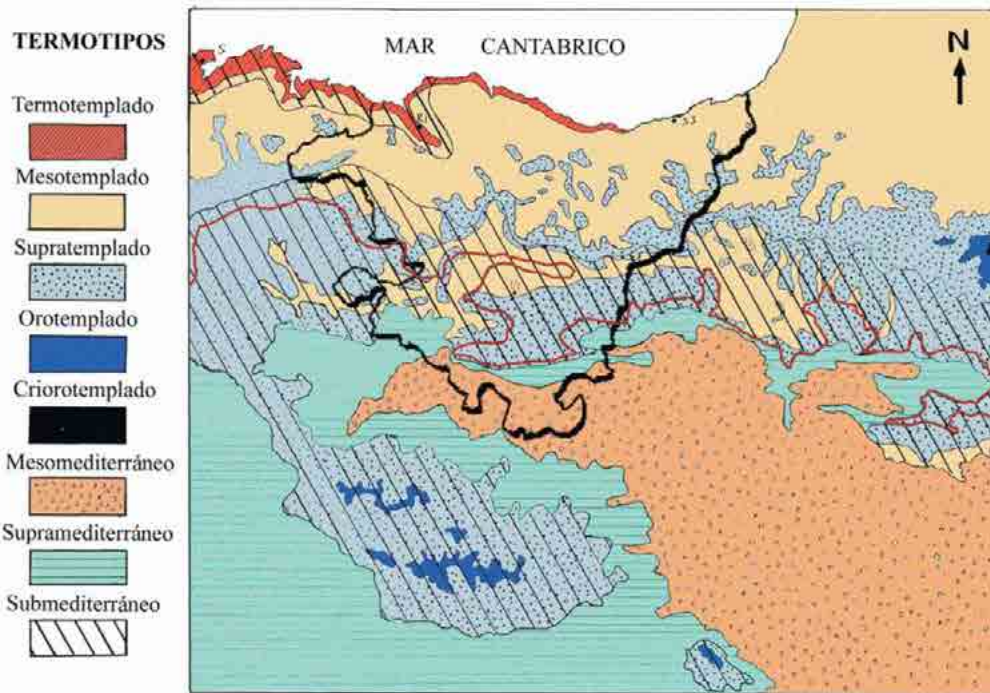


Fig. 6.6. Mapa de termotipos del País Vasco y zonas aledañas.

Fuente: Loidi et al. 2009

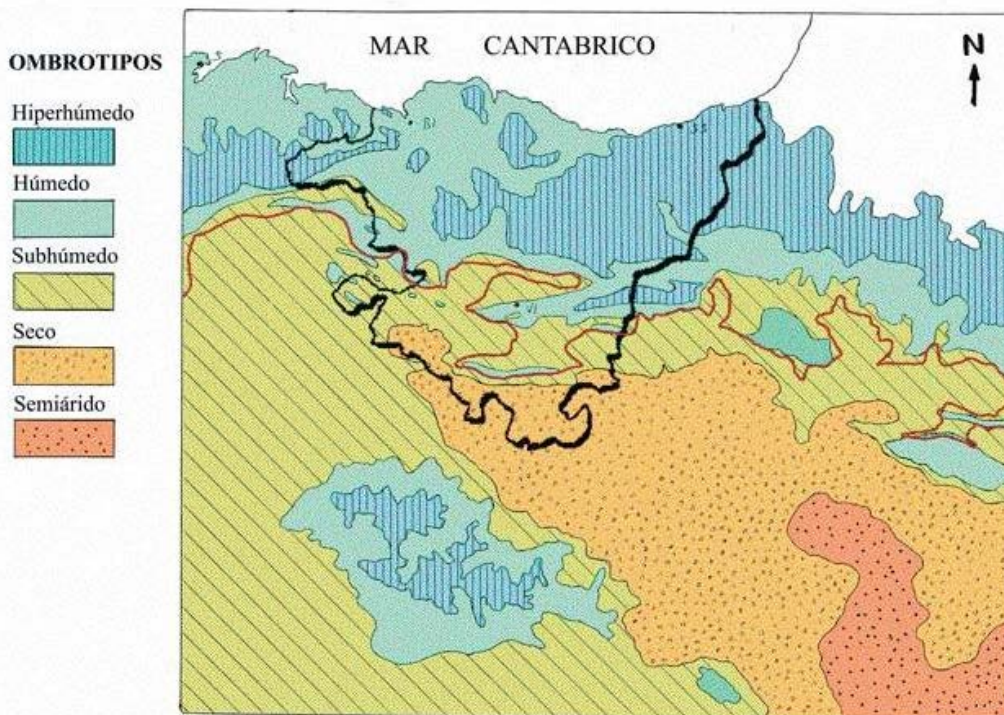


Fig. 6.7. Mapa de ombrotipos del País Vasco y zonas aledañas.

Fuente: Loidi et al. 2009

6.1.4 Objetivos

El conocimiento de la distribución de un patógeno es esencial para poder establecer estrategias de control de la enfermedad que produce (Desprez-Lustou et al. 2007). El propósito de este estudio es explorar el uso de la modelización bioclimática para predecir la distribución de estos patógenos en el País Vasco. Para ello podemos dividir este objetivo global en los siguientes:

- Conocer la distribución de *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* en el País Vasco.
- Establecer la severidad de los daños que causan estas especies a las masas de coníferas.
- Obtener una base de datos de distribución que permita generar modelos matemáticos para estimar los factores de predisposición hacia estas dos enfermedades.
- Definir el conjunto de condiciones climáticas y edafológicas que puedan establecer la presencia de estas enfermedades en un área determinada.
- En función de esas condiciones climáticas y edafológicas pretendemos generar un modelo que permita determinar el riesgo de existencia, para un área determinada, de las enfermedades producidas por *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* en el País Vasco.
- Finalmente, pretendemos establecer una zonificación del País Vasco según los niveles de riesgo de aparición de estas dos enfermedades.

6.2 Material y métodos

6.2.1 Distribución

Teniendo en cuenta que *Diplodia pinea* es un patógeno de coníferas y *Fusarium circinatum* lo es del género *Pinus* y de la especie *Pseudotsuga menziesii*, es necesario establecer las zonas donde estos posibles hospedadores se distribuyen en el País Vasco. En el mapa siguiente (fig. 6.8) se puede ver la distribución de las especies de coníferas en el País Vasco.

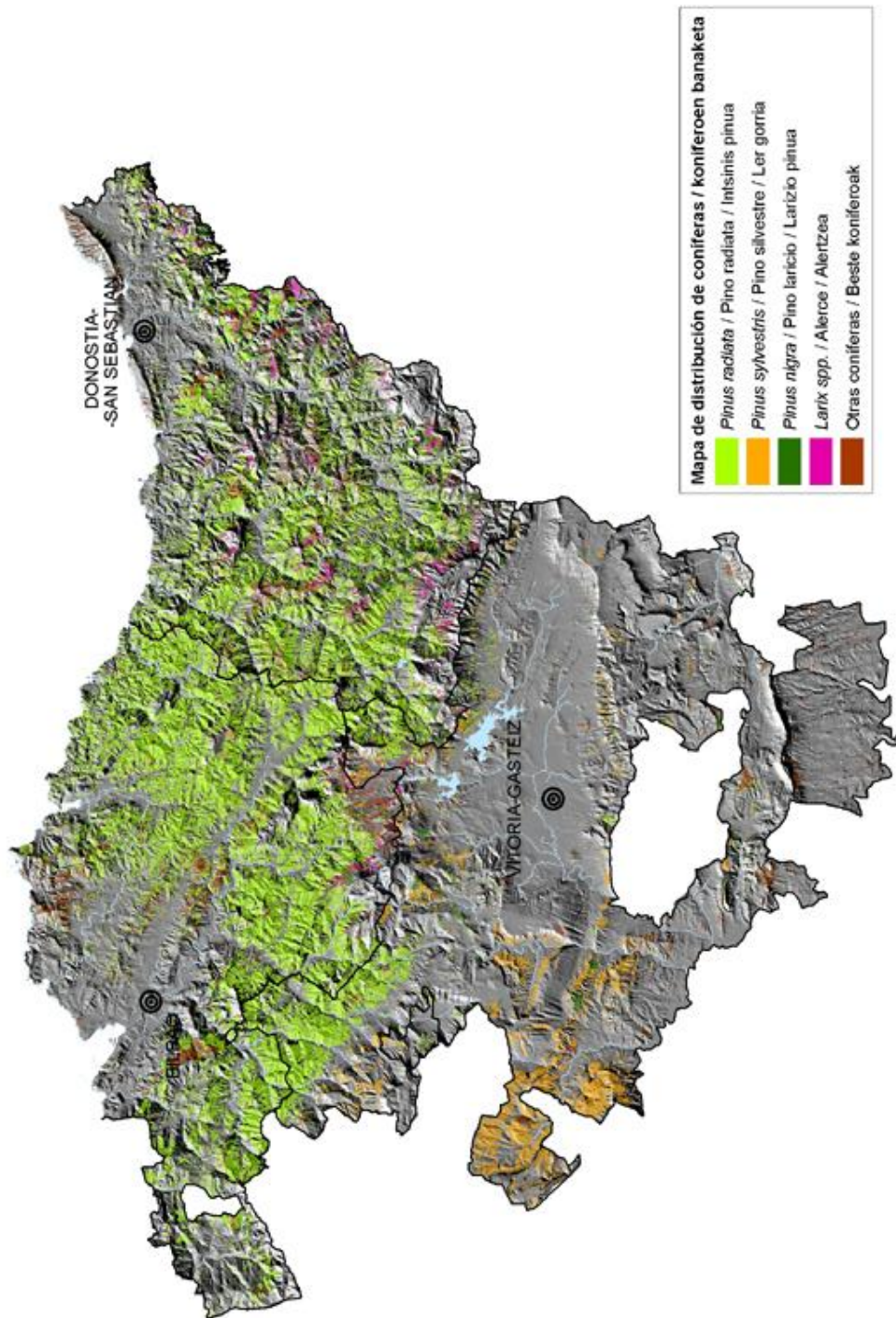


Fig. 6.8. Mapa de distribución de coníferas en el País Vasco.
Fuente: IKT 2005

Pinus radiata se cultiva principalmente en el piso mesotemplado, donde es la principal especie forestal. La siguiente especie de conífera en superficie es *Pinus sylvestris*, que encontramos en la zona más continentalizada, ocupando los pisos supra-, mesotemplado (submediterráneos) y supramediterráneo. El resto de especies se distribuyen en diferentes áreas del bioclima templado y preferentemente en el piso supratemplado, con la excepción de una pequeña masa forestal de *Pinus halepensis* en la zona mediterránea (IKT 2005; fig. 6.8).

En la siguiente tabla podemos ver la superficie forestal ocupada por las diferentes especies de coníferas en el País Vasco (tabla 6.1). Como ya se comentó en el capítulo 1 *Pinus radiata* es la que ocupa más superficie con gran diferencia.

ESPECIE	SUPERFICIE (Hectáreas)			
	ARABA	BIZKAIA	GIPUZKOA	PAÍS VASCO
<i>Pinus radiata</i>	14.819	72.674	49.973	137.466
<i>Pinus sylvestris</i>	16.604	490	140	17.234
<i>Pinus nigra</i>	3.523	3.096	6.941	13.560
<i>Larix</i> spp.	618	1.017	6.502	8.137
<i>Pinus pinaster</i>	848	5.311	1.103	7.262
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	679	1.043	3.995	5.717
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	697	1.868	760	3.325
<i>Picea</i> spp.	241	138	155	534
<i>Pinus halepensis</i>	394	-	-	394
TOTAL CONÍFERAS	38.423	85.637	69.569	193.629

Tabla 6.1. Superficie ocupada por las principales especies de coníferas en el País Vasco.

Fuente: IKT 2005

El muestreo de *Diplodia* ha sido ya descrito en el capítulo 4 (ver apartado 4.2.1 y anexo 1). En lo referente a *Fusarium circinatum* este muestreo se llevó a cabo en colaboración con las tres diputaciones forales vascas y asociaciones de propietarios forestales y los datos se encuentran publicados en Gobierno Vasco (2007, ver anexo 5).

En las fichas de campo se estableció la especie sobre la que se recoge la muestra y se determinó su posición mediante coordenadas UTM obtenidas con GPS (ver anexo 6).

En relación con las infecciones fúngicas, se estableció una escala de severidad de los síntomas en el área muestreada según los siguientes niveles (Wikler et al. 2003, Iturritxa et al. 2005):

- Nivel 0: Área sin daños aparentes
- Nivel 1: < 10% de los árboles afectados pero con daños aparentes
- Nivel 2: 10% – 30% de los árboles afectados
- Nivel 3: > 30% de los árboles afectados

En todas las zonas donde se detectaron daños se recogieron muestras de árboles dañados para confirmar la observación de los síntomas en campo con su análisis en laboratorio.

Todos los puntos de muestreo se extrapolan a una malla de 500 x 500 m mediante el programa ArcGIS 9.2. Para ello se sigue el método de interpolación de capas ráster mediante ponderación inversa de la distancia. De esta manera conseguimos presentar los datos del muestreo de manera que son utilizables para todo tipo de análisis estadístico con el programa ArcGIS 9.2 (Field 2009).

En una primera fase hemos sometido los datos de distribución a un análisis de correlación espacial para determinar si la distribución de los niveles de afección provocada por las dos especies de hongo siguen un patrón al azar o un patrón condicionado por algún factor que implique agrupamiento.

En definitiva, se trata de determinar si la presencia de un valor concreto de la variable 'severidad de síntomas' en un lugar del espacio hace más verosímil (o menos) la presencia de ese valor o valores semejantes en un entorno geográfico cercano. Cuando la presencia de un valor en una zona facilita que ese valor ocurra en lugares próximos tendremos correlación espacial positiva. De otra manera, si la presencia de un valor en una zona del espacio hace menos verosímil que valores semejantes ocurran en su entorno, tendremos correlación espacial negativa. Y si no existe esta relación en ninguno de los sentidos (positivo o negativo) supondremos independencia o autocorrelación espacial nula (Mitchell 2009).

Para establecer la presencia de autocorrelación espacial hemos utilizado el índice I de Moran. El estadístico I de Moran sigue la siguiente fórmula:

$$I = \frac{N \sum_i \sum_j w_{ij} (Y_i - Y_m) (Y_j - Y_m)}{W \sum_i (Y_i - Y_m)^2}$$

N : número de puntos muestreados

Y_m : media general

Y_i : valor de la variable en el punto i

Y_j : valor de la variable en el punto j

w_{ij} : valor de conexión entre dos puntos

W : suma de todos los valores de conexión

Los valores w_{ij} varían en función de la distancia y la posición de los puntos i y j en la red diseñada por el programa (en nuestro caso 500 x 500 m). Se sigue el modelo del movimiento del rey en el juego del ajedrez (king's pattern definition), así cada punto tiene 8 puntos vecinos. Dos puntos están conectados con $w_{ij} = 1$ cuando son vecinos de fila o de columna en esa red, con $w_{ij} = 0,7071$ si solo están unidos en diagonal. Si no están conectados el valor de $w_{ij} = 0$ (Sokal & Oden 1978, Field 2009, Mitchell 2009).

El valor del índice I varía entre -1 y 1, aproximándose a cero cuando no hay una tendencia en el modelo de distribución espacial. Este hecho señala la ausencia de correlación y sugiere por lo tanto una distribución al azar. Un valor positivo de I significa que la variable medida en i y en j varía en la misma dirección, indicando que valores similares tienden a ocurrir juntos (distribución agregada o agrupada). Un valor negativo de I apunta que la variable medida en dos puntos vecinos i y j varía en direcciones opuestas (distribución dispersa). El valor cero significa, como ya hemos dicho anteriormente, distribución al azar (Fortin & Dale 2005).

Además del índice de Moran, la correlación espacial nos muestra otras dos pruebas estadísticas, la puntuación Z y los valores de probabilidad o significación (p). La puntuación Z es un valor que se calcula como:

$$Z = \frac{(I - \mu)}{\sigma}$$

I : índice de Moran

μ : media de la población (en este caso igual a Y_m de la fórmula anterior)

σ : desviación estándar de la población (a la que se aplica el índice I)

El valor de probabilidad o significación (p) lo establecemos en función del nivel de confianza que queremos para el análisis del índice de Moran.

Estas dos pruebas nos dicen si podemos rechazar la hipótesis nula que supone que la distribución de la población es al azar. Hemos determinado un nivel de confianza del 99% para rechazar la hipótesis nula ($p < 0,01$). En este caso es necesario que la puntuación Z supere el valor 2,58 en el sentido positivo o negativo y que $p < 0,01$. Si los valores nos permiten rechazar esta hipótesis nula entonces nos encontraremos ante un patrón de agrupamiento ($I > 0$), o un patrón de dispersión ($I < 0$) (Mitchel 2009). Todos los cálculos han sido realizados con el paquete estadístico del programa ArcGIS 9.2.

El índice de Moran nos da una idea de cómo se distribuyen estas enfermedades, pero no nos permite su visualización. En particular, nos interesa reflejar la distribución de densidades de las variables presencia/ausencia del patógeno y desarrollo de la enfermedad (nivel de infección de daños) (Moreno 1991).

Para representar en un mapa la distribución de estas dos enfermedades según los niveles encontrados en campo hemos recurrido a la densidad de Kernel. Los estimadores Kernel nos permiten obtener, a partir de una nube de puntos localizados, el esquema de densidad que conforman. Se trata por tanto de representar la pauta global de su distribución o lo que es lo mismo, dónde existe más concentración, dónde

menos y con qué gradiente se produce la variación espacial. Este gradiente se establece en función del nivel de afección (Moreno 1991, Fortin & Dale 2005).

La estimación de la densidad de Kernel permite una distribución no paramétrica de los datos a utilizar. Calcula una magnitud por unidad de área utilizando una función de Kernel para adjudicar una superficie suavizada gradualmente a cada punto. Esta función responde a la fórmula:

$$\hat{f}(x) = \frac{1}{nh} \sum_{i=1}^n K \left[\frac{x-x_i}{h} \right]$$

x: punto donde se trata de estimar la densidad

x_i: valor de la variable en el caso i = 0, 1, 2, 3, 4

K: símbolo de Kernel

h: anchura de la ventana o parámetro de suavizado

Existen varios tipos de K según la función que utilicemos. En este caso la función Kernel calculada es la presente en el programa ArcGIS 9.2 que se establece según Silverman (1986) donde

$$K = \frac{3}{\pi} (1-u^2)^2$$

K es una variable que se define en función de u siendo $u = (x/h) - 1$

La elección de h es una decisión a tomar en función de lo que se pretenda representar en el mapa. Es un parámetro de suavizado que, a medida que aumenta, provoca un suavizado creciente en el mapa resultante. Valores pequeños del mismo parámetro hacen aflorar paulatinamente la rugosidad de los datos originales (Moreno 1991). En nuestro caso hemos utilizado una h = 4.000 m tanto para la distribución de *Diplodia pinea* como para la de *Fusarium circinatum*. Hemos probado valores de h menores de 4.000 m y la distribución se mostraba muy puntual perdiendo la capacidad de suavizado que se pretende dar con esta aplicación. También hemos probado valores de h mayores de 4.000 m y la representación de la distribución se extendía hacia lugares donde la influencia de la enfermedad no es tan grande. El valor de 4.000 m es el que mejor refleja la distribución de la enfermedad según nuestros muestreos.

6.2.2 Definición de zonas de riesgo. Modelización

La regresión logística es un método comúnmente utilizado en modelización de eventos y ha sido ampliamente utilizado en factores que afectan al riesgo de daños forestales (Jalkanen & Mantilla 2000, Morrison et al. 2000). Esta técnica nos permite describir y cuantificar las relaciones entre una variable dependiente ordinal o nominal y un conjunto de variables independientes continuas o categóricas. Para ello hemos utilizado la cuadrícula 500 x 500 m descrita anteriormente. La regresión logística resulta útil para los casos en los que se desea predecir la presencia o ausencia de una característica o resultado según los valores de un conjunto de variables predictivas.

Nos permite analizar conjuntamente varios factores o variables para ver cómo afectan a la variable dependiente (Norušis 2002, Pérez 2003, Vilar del Hoyo et al. 2008).

Los modelos de regresión logística pueden ser de dos tipos. Los modelos estadísticos en los que la variable dependiente es cualitativa y dicotómica se basan en la regresión logística binaria o binomial. Si la variable dependiente tiene más de dos valores la regresión logística se denomina multinomial (Visauta 1998, Field 2009).

En un principio utilizamos la regresión logística multinomial con los 4 niveles definidos para los daños causados por las enfermedades de chancro en masas de coníferas, especialmente de *Pinus radiata*. Los resultados preliminares no mostraron una significación adecuada para alguno de los niveles considerados, por lo que optamos por dicotomizar las variables dependientes y utilizar una regresión logística binomial.

Para ello se aplica el modelo de regresión logística que se define por las siguientes ecuaciones:

$$P_i = 1/(1 + e^{-z})$$

$$Z = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n$$

Donde P_i es la probabilidad de colonización por parte de *Diplodia pinea* o *Fusarium circinatum*, Z es la combinación de variables independientes con sus coeficientes de regresión (β), X es el valor de cada variable independiente y “e” la base de los logaritmos naturales (Hosmer & Lemeshow 1989, Collet 1991).

Para testar el modelo se utilizan diferentes estadísticos. La R^2 de Cox y Snell es un coeficiente que se utiliza para estimar la proporción de varianza de la variable dependiente explicada por las variables predictoras y sus valores varían de 0 a 1. La R^2 de Nagelkerke es una versión corregida de la R^2 de Cox y Snell, debido a que esta última tiene un valor máximo inferior a 1, incluso para un modelo perfecto. La R^2 de Nagelkerke corrige la escala del estadístico para cubrir el rango completo de 0 a 1 (Visauta 1998, Vilar del Hoyo et al. 2008).

La tabla de clasificación es una prueba diagnóstica que permite evaluar el ajuste del modelo de regresión comparando los valores predichos con los observados. Como la variable dependiente es dicotómica se establece un valor de corte de 0,5. Es decir, los valores para los que la ecuación calcula una probabilidad $< 0,5$ se clasifican como **0**, mientras que si la probabilidad resultante es $\geq 0,5$ se clasifican como **1** (Visauta 1998).

Una vez testada la fuerza del modelo hay que analizar la significación de los coeficientes, sus errores estándar y estadísticos de prueba (Wald). El estadístico de Wald contrasta la hipótesis de que un coeficiente aislado es distinto de 0, y sigue una distribución normal de media 0 y varianza 1. Su valor para un coeficiente concreto viene dado por el cociente entre el valor del coeficiente y su correspondiente error estándar. La obtención de significación indica que dicho coeficiente es diferente de 0 y merece la pena su conservación en el modelo. En modelos con errores estándar grandes, el estadístico de Wald puede proporcionar falsas ausencias de significación

(Visauta 1998, Field 2009). Todos los cálculos relativos a la regresión logística han sido llevados a cabo con el programa SPSS 15.0.

6.2.2.1 Variable dependiente

Teniendo en cuenta que *Diplodia pinea* es un organismo saprófito que en determinadas circunstancias puede mostrarse patogénico (Stanosz et al. 2001) y que su distribución está generalizada por las masas de pinos del País Vasco apareciendo en casi todas ellas, hemos agrupado la variable “niveles de infección detectados en campo” de la siguiente manera:

- Nivel 0 (área sin daños aparentes) y nivel 1 (< del 10% de los árboles afectados): **(0)**
- Nivel 2 (del 10% al 30% de los árboles afectados) y nivel 3 (> del 30% de los árboles afectados): **(1)**

De esta manera obtenemos una variable dependiente dicotómica donde tenemos en cuenta, por un lado, zonas con la presencia del hongo sin daños o con escaso impacto y por otro, zonas donde la enfermedad se manifiesta con virulencia.

El caso de *Fusarium circinatum* es distinto puesto que su distribución es más puntual y hay muchos lugares donde no está presente. Por otra parte, su carácter parásito hace que allá donde se presenta genere la enfermedad. Por esto hemos agrupado la variable “niveles de infección en campo” de la siguiente manera:

- Nivel 0: ausencia **(0)**
- Niveles 1, 2 y 3: presencia **(1)**

Así conseguimos una variable dependiente dicotómica basada en la presencia/ausencia del patógeno.

6.2.2.2 Variables independientes

Para la determinación de las variables independientes hemos tenido en cuenta factores climáticos y fenómenos meteorológicos de las zonas de alto riesgo de infección de las dos enfermedades según Desprez-Loustau et al. (2007) para *Diplodia pinea* y según Ganley et al. (2009) para *Fusarium circinatum*. Para el caso de *Diplodia pinea* además se genera una capa de datos basada en áreas afectadas por granizadas y vendavales en el País Vasco. También hemos tenido en cuenta los tipos de suelo, por si tuvieran influencia en la distribución de los hospedadores de la enfermedad.

La temperatura media anual (TEMPERATURA) es una de las variables independientes que hemos tenido en cuenta para generar el modelo de riesgo, dado que es un factor importante en la manifestación de estas dos enfermedades (Desprez-Loustau et al. 2007, Ganley et al. 2009). Esta variable se ha dividido en los siguientes intervalos:

- 1: 10 - 10,5 °C
- 2: 10,5 - 11 °C
- 3: 11 - 11,5 °C
- 4: 11,5 - 12 °C
- 5: 12 - 12,5 °C
- 6: 12,5 - 13 °C
- 7: > 13 °C

Otra variable relacionada con la temperatura que hemos utilizado para el análisis de regresión logística es la de los diferentes termotipos (TERMOTIPO) del País Vasco. Los termotipos se han tomado de Campos (2010). Están basados en los valores umbrales de los índices It, Itc y Tp. It es el índice de termicidad, Itc es el índice de termicidad compensado y Tp es la temperatura positiva anual.

La temperatura positiva anual (Tp) es la suma, en décimas de grado, de las temperaturas medias de los meses de media superior a 0 grados.

El índice de termicidad (It) responde a la siguiente fórmula:

$$It = (T + M + m) \times 10$$

Es la suma, en décimas de grado, de la temperatura media anual (T), la media de las mínimas del mes más frío (m) y la de las máximas del mismo mes (M).

El índice de termicidad compensado (Itc) es el índice de termicidad con la adición de un valor de compensación C que se utiliza para los casos de zonas con muy alta o baja continentalidad. Estos casos se detectan por el valor del índice de continentalidad (Ic) que responde a la fórmula:

$$Ic = tmax - tmin$$

Donde tmax es la temperatura media del mes más cálido y tmin es la temperatura media del mes más frío. La compensación se produce para valores de Ic < 9 correspondiendo a zonas muy oceánicas y para valores de Ic > 18 correspondiendo a las muy continentales.

Los diferentes termotipos para el País Vasco según Campos (2010) son:

- 1: Termotemplado superior. It, Itc (290 – 350) Tp (2000 – 2175)
- 2: Mesotemplado inferior. It, Itc (240 – 290) Tp (1700 – 2000)
- 3: Mesotemplado superior. It, Itc (190 – 240) Tp (1400 – 1700)
- 4: Supratemplado inferior. It, Itc (120 – 190) Tp (1100 – 1400)
- 5: Supratemplado superior. It, Itc (–) Tp (800 – 1100)
- 6: Mesomediterráneo superior. It, Itc (220 – 285) Tp (1500 – 1825)
- 7: Supramediterráneo inferior. It, Itc (150 – 220) Tp (1200 – 1500)

Al igual que la temperatura, la precipitación (PRECIPITACIÓN) también es un factor que influye en la manifestación de estas dos enfermedades de chancro (Desprez-Loustau et al. 2007, Ganley et al. 2009). La precipitación media anual se ha dividido en los siguientes intervalos:

- 1: < 1000 mm
- 2: 1000 - 1200 mm
- 3: 1200 - 1400 mm
- 4: 1400 - 1600 mm
- 5: 1600 - 1800 mm
- 6: 1800 - 2000 mm
- 7: > 2000 mm

El índice ombrotérmico (Io) relaciona precipitaciones y temperatura mediante la siguiente fórmula:

$$Io = 10 \times Pp/Tp$$

Es el cociente, expresado en décimas de grado, entre la suma de las precipitaciones medias de los meses en los que su temperatura media es superior a 0 grados (Pp o precipitación positiva) y la suma de las temperaturas medias de los mismos meses (Tp o temperatura positiva). Si se abarca el año entero, obtendremos el índice ombrotérmico anual Io, si se aplica a uno cualquiera de los meses del verano, obtendremos el índice ombrotérmico de cualquier mes del trimestre estival –Iosi–, si lo hacemos para los dos meses cálidos del verano obtenemos el índice ombrotérmico del bimestre más cálido del verano –Ios2–. Ios3 corresponde al trimestre completo (junio, julio y agosto) y por último, Ios4 será el correspondiente a los meses de mayo, junio, julio y agosto (Loidi et al. 2009).

Para este estudio hemos seleccionado el índice ombrotérmico del bimestre más cálido del verano, en este caso julio y agosto (Ios2) y lo hemos distribuido en los siguientes intervalos para el País Vasco según Campos (2010):

- 1: < 1,7
- 2: 1,7 - 2
- 3: 2 - 2,5
- 4: 2,5 - 3,6
- 5: 3,6 - 4,8
- 6: 4,8 - 6
- 7: 6 - 9
- 8: > 9

Para el caso de *Diplodia pinea* hemos creado una variable basada en las áreas afectadas por granizadas y vendavales (GRANIZO) registradas durante los años 2001 al 2009 en el País Vasco (Euskalmet 2010). La variable queda de la siguiente manera:

- 1: Zona afectada por tormentas de granizo o fuertes vendavales durante los últimos 10 años (2001-09)
- 2: Zona no afectada por vendavales o tormentas de granizo durante los últimos 10 años (2001-09)

Los tipos de suelo (TIPO DE SUELO) del País Vasco se han obtenido de Geo-Euskadi (2010) y se han clasificado como sigue:

- 1: Luvisol
- 2: Regosol
- 3: Fluvisol
- 4: Litosol
- 5: Acrisol
- 6: Cambisol

La base de datos que hemos utilizado incluye varias capas de información habilitadas para ser utilizadas con el programa ArcGIS 9.2. Algunas han sido proporcionadas por la empresa IKT, S.A. como el contorno de la CAPV, parte de las condiciones climáticas y el inventario forestal. Las capas de termotipos y del índice los_2 han sido tomadas de Campos (2010). Y el resto han sido elaboradas partiendo de información recogida de archivo y campo, perfilando las zonas forestales en las que se han producido daños severos por efecto de granizadas y vendavales en los últimos 10 años. La espacialización de las variables de temperatura y precipitación se ha realizado refiriendo a la superficie de cada cuadrícula (500 x 500 m) un cociente entre el valor del área de la variable en cuestión y el área de la cuadrícula. De esta manera se origina una capa de datos con un valor determinado para cada cuadrícula que permite realizar operaciones estadísticas entre ellas (Vilar del Hoyo et al. 2008).

Se explora el grado de correlación entre las variables mediante coeficientes de correlación no paramétricos de Spearman. Si hay variables correlacionadas entre sí con un coeficiente superior a 0,7 se debe excluir una de ellas del modelo por no poder discriminar cuál es la que ejerce la influencia (Pérez 2003, Vilar del Hoyo et al. 2008). Además, algunas de las variables no se pueden utilizar en el análisis de regresión logística de forma conjunta porque son dependientes unas de otras.

Con estas seis variables hemos realizado los cálculos de la regresión logística probando diversas combinaciones para determinar si explican la distribución de los puntos muestreados para las dos enfermedades. Una vez realizados los cálculos se determina la bondad del método y si todas o algunas de las variables explican significativamente esta distribución. Las variables que no son significativas se eliminan del modelo y se establece una ecuación que determina la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad en un punto dado según el valor de las variables predictivas en ese punto. Se generan los mapas de riesgo aplicando la ecuación a los puntos muestreados y extrapolando los valores al resto del mapa mediante el inverso de la distancia.

Para la generación final del modelo se completa la información anterior con los resultados obtenidos de los estudios sobre los niveles de susceptibilidad de las especies de coníferas presentes en la zona de estudio (ver capítulo 5). Para ello incorporamos al modelo una nueva variable mediante el programa ArcGIS 9.2 (Rodríguez-Pérez et al. 2008). Esta variable combina los datos del Inventario Forestal con los niveles de resistencia detectados para estas especies en el capítulo 5. A cada especie se le asocia un valor según la siguiente lista:

- Código 1: No hospedador
- Código 2: Resistente
- Código 3: Moderadamente resistente
- Código 4: Moderadamente susceptible
- Código 5: Altamente susceptible

Los mapas de riesgo han sido obtenidos por la combinación de las capas anteriormente generadas y luego estableciendo una reclasificación utilizando una escala de 5 valores con las categorías que se indican a continuación:

- Código 1: Área sin riesgo de enfermedad
- Código 2: Área con riesgo muy bajo de desarrollo de enfermedad
- Código 3: Área con riesgo medio de desarrollo de la enfermedad
- Código 4: Área con riesgo alto de desarrollo de enfermedad
- Código 5: Área con riesgo muy alto de desarrollo de enfermedad

Consideramos que los factores de predisposición a la enfermedad tienen un efecto aditivo en los posibles daños causados por los patógenos para la estimación del riesgo de desarrollo de la enfermedad e incluimos a su vez las zonas actualmente infectadas.

6.3 Resultados

6.3.1 Muestreo

Se han muestreado un total de 958 puntos (fig. 6.9). En la tabla 6.2 podemos ver los resultados por especies y los muestreos positivos para los dos hongos de chancro en cada caso. El mayor número de muestras se ha tomado en *Pinus radiata* y es donde hemos encontrado el mayor número de focos de infección. El resto de especies muestran un número mucho menor de focos infectados, pero también es cierto que ocupan mucha menos superficie.

Diplodia pinea ha aparecido en todas las especies de pinos y en un caso sobre *Picea abies*. En todas las muestras de *Pinus radiata* se encontró *Diplodia pinea*. *Fusarium circinatum* apareció en 130 muestras de *Pinus radiata* y en un caso en *P. pinaster*. En todos estos casos apareció también *Diplodia pinea*. En el anexo 5 se pueden ver los 131 puntos donde se ha detectado *Fusarium circinatum*.

ESPECIE	MUESTRAS	DIPLODIA	FUSARIUM
<i>Larix sp.</i>	6	0	0
<i>Picea abies</i>	3	1	0
<i>Pinus nigra</i>	39	6	0
<i>Pinus pinaster</i>	67	15	1
<i>Pinus pinea</i>	4	4	0
<i>Pinus radiata</i>	772	772	130
<i>Pinus sylvestris</i>	29	19	0
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	38	0	0
TOTAL	958	817	131

Tabla. 6.2. Especies muestreadas.

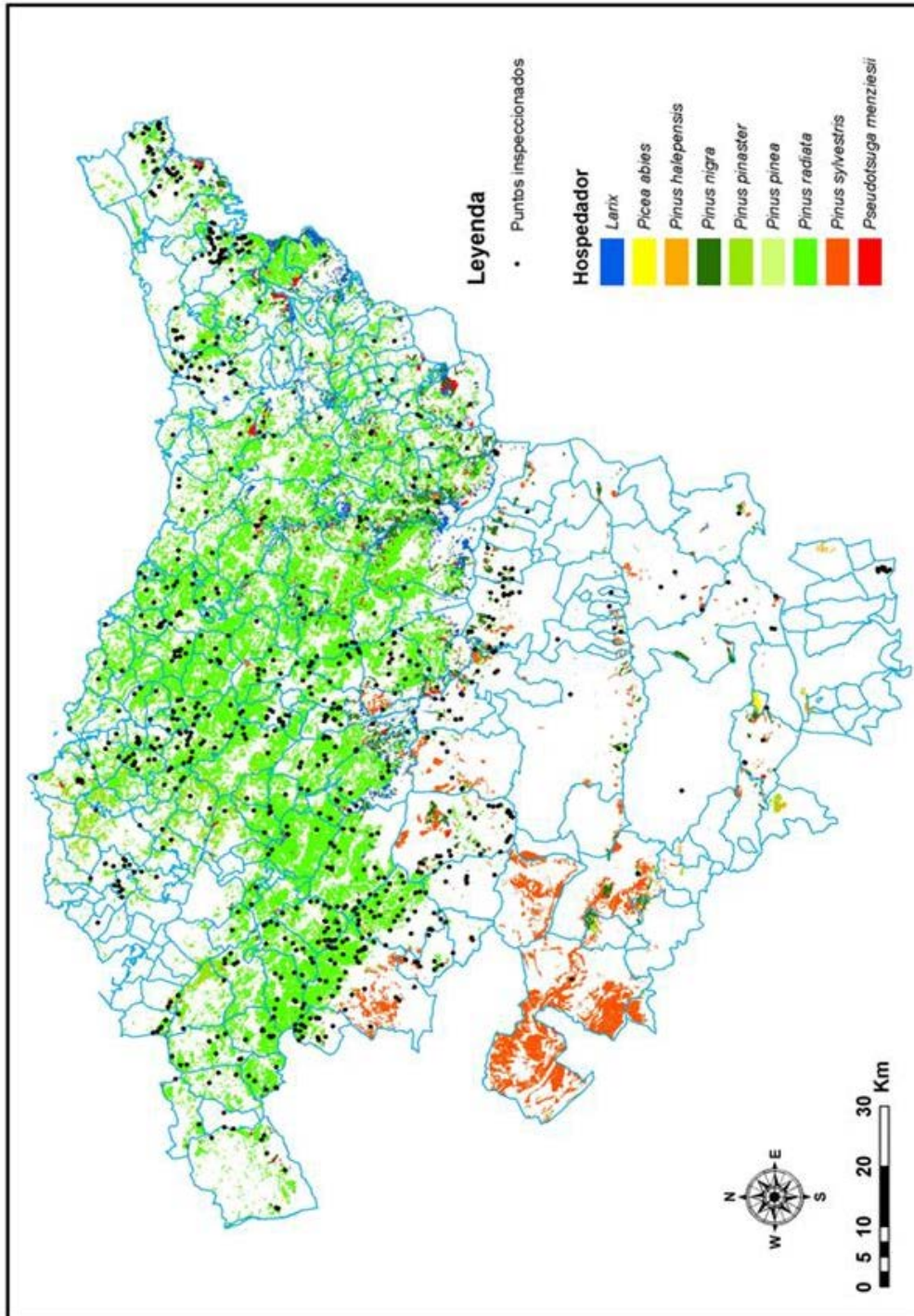


Fig. 6.9. Mapa de puntos de muestreo.

6.3.2 Distribución de *Diplodia pinea*

El índice de Moran obtenido para el conjunto de puntos de *Diplodia pinea* es 0,08 con una puntuación Z de 0,43 y sin significación estadística. En la fig. 6.10 podemos ver la representación gráfica que nos da el programa ArcGIS 9.2 para la aplicación del índice de Moran con las muestras de *Diplodia pinea*. En la fig. 6.11 se ha representado la distribución de *Diplodia pinea* en el País Vasco basada en la función de Kernel.

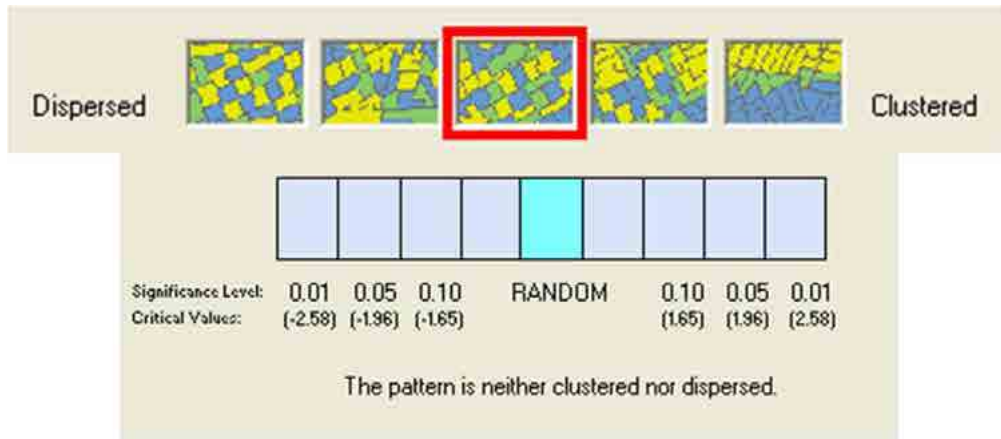


Fig. 6.10. Datos del índice de Moran generados por el programa ArcGIS 9.2 para las muestras de *Diplodia pinea* en el País Vasco.

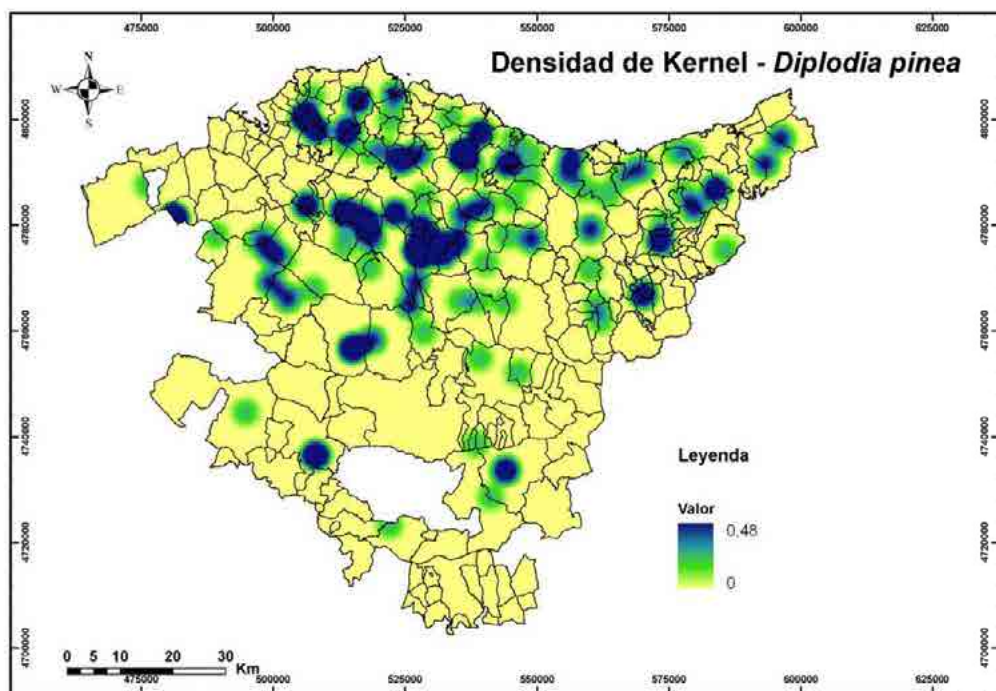


Fig. 6.11. Mapa de densidad de Kernel para *Diplodia pinea* en el País Vasco.

El índice I es cercano a cero y de carácter positivo por lo que la distribución de *Diplodia pinea* en el área estudiada obedece a un patrón al azar aunque con una ligera tendencia al agrupamiento.

6.3.3 Distribución de *Fusarium circinatum*

El índice de Moran obtenido para el conjunto de puntos de *Fusarium circinatum* es 0,22 con una puntuación Z de 6 y significación estadística con $p < 0,01$. En la fig. 6.12 podemos ver la representación gráfica que nos da el programa ArcGIS 9.2 para la aplicación del índice de Moran con las muestras de *Fusarium circinatum*. En la fig. 6.13 se ha representado la distribución de *Fusarium circinatum* en el País Vasco basada en la función de Kernel.

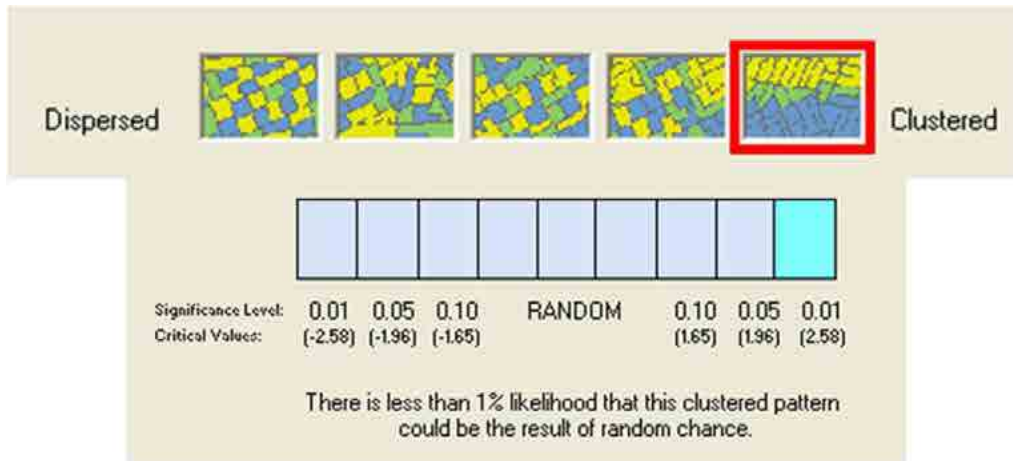


Fig. 6.12. Datos del índice de Moran generados por el programa ArcGIS 9.2 para las muestras de *Fusarium circinatum* en el País Vasco.

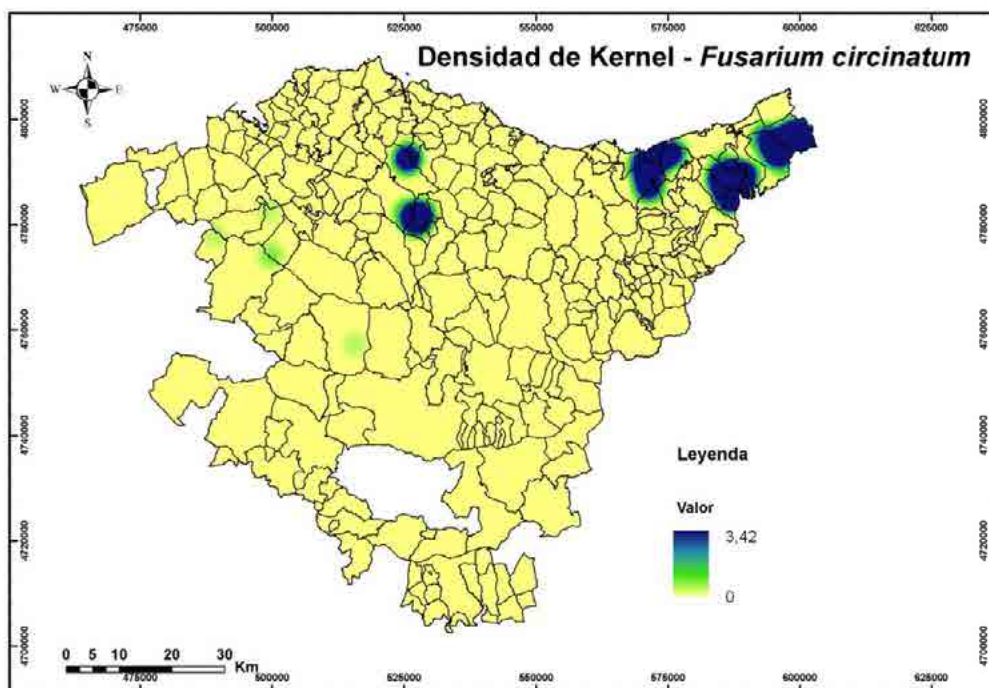


Fig. 6.13. Mapa de densidad de Kernel para *Fusarium circinatum* en el País Vasco.

El índice I es distinto a cero y de carácter positivo por lo que la distribución de *Fusarium circinatum* en el área estudiada obedece a un patrón con tendencia a un agrupamiento bastante notable.

6.3.4 Definición de zonas de riesgo. Modelización

6.3.4.1 Multicolinealidad

En la tabla 6.3 mostramos los valores del coeficiente de correlación de Spearman para las variables que se quieren utilizar en la regresión logística.

	GRANIZO	PRECIPITACIÓN	TEMPERATURA	TIPO DE SUELO	los2	TERMOTIPO
GRANIZO	1					
PRECIPITACIÓN	0,297	1				
TEMPERATURA	0,175	0,186	1			
TIPO DE SUELO	0,081 (*)	0,175	0,236	1		
los2	0,267	0,740	0,257	0,166	1	
TERMOTIPO	-0,163	-0,271	-0,601	-0,145	-0,333	1

(*) La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
En el resto la correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla. 6.3. Coeficiente de correlación de Spearman para las variables independientes.

Las variables los₂ y PRECIPITACIÓN muestran una correlación de 0,74 por lo que no se pueden utilizar de forma conjunta en la regresión logística. Las variables TEMPERATURA y TERMOTIPO también muestran una correlación bastante alta (0,601). La variable TERMOTIPO es función de la variable TEMPERATURA por lo que no pueden utilizarse de forma conjunta en el análisis. Lo mismo sucede para la variable los₂ que es dependiente de TEMPERATURA y PRECIPITACIÓN. Y por lo tanto tampoco pueden utilizarse conjuntamente las variables los₂ y TERMOTIPO.

6.3.4.2 *Diplodia pinea*

Hemos realizado varias combinaciones de variables en el análisis de regresión logística teniendo en cuenta las limitaciones que nos impone la multicolinealidad de alguna de las variables. De entre todos los modelos generados mediante la regresión logística para explicar la distribución de *Diplodia pinea* solo dos han mostrado cierta significación en la explicación de los datos. Un modelo basado únicamente en el índice los₂ explicaba el 20% de los datos con una regresión significativa al 95%. Pero este número tan bajo de casos explicados nos hace rechazar el modelo.

A continuación mostramos los datos del segundo modelo que explica un alto porcentaje de los datos de distribución de *Diplodia pinea* en el País Vasco (tablas 6.4.a-c).

a

R ² de Cox y Snell	R ² de Nagelkerke
0,576	0,944

b

TABLA DE CLASIFICACIÓN (a)				
Observado		Pronosticado		
		DIPLODIA		Porcentaje correcto
		0	1	0
DIPLODIA	0	774	12	98,5
	1	0	172	100
Porcentaje global				98,7

(a) El valor de corte es 0,5

c

VARIABLES EN LA ECUACIÓN				
	β	E.T.	Wald	Sig.
GRANIZO	37,650	1875,064	0,0	0,984
PRECIPITACIÓN	0,237	0,242	0,958	0,328
TEMPERATURA	0,165	0,213	0,604	0,437
TIPO DE SUELO			1,77	0,778
SUELO (1)	16,069	1608,754	0,0	0,992
SUELO (2)	-1,727	1,298	1,77	0,183
SUELO (3)	15,8	3073,197	0,0	0,996
SUELO (4)	15,616	1871,395	0,0	0,993
CONSTANTE	-37,241	1875,065	0,0	0,984

Tabla. 6.4. Valores de la regresión logística para *Diplodia pinea*: a) R² de Cox y Snell y R² de Nagelkerke; b) tabla de clasificación; c) variables de la ecuación.

Los índices de ajuste del modelo generado por la regresión logística son muy altos. La R² de Nagelkerke nos dice que se clasifican correctamente el 94,4% de los casos. En la tabla de clasificación podemos ver que se clasifican bien el 98,7% de los casos siendo muy altos los valores de clasificación tanto del valor 0 como del valor 1.

Pero cuando vamos a la tabla de las variables contempladas en la ecuación se pierde la significación de todas las variables. Para testar esta aparente incongruencia hemos realizado un test de correlación de Spearman entre estas variables y *Diplodia pinea* para ver posibles dependencias. Los resultados se muestran en la tabla siguiente (tabla 6.5).

	GRANIZO	PRECIPITACIÓN	TEMPERATURA	TIPO DE SUELO
DIPLODIA	0,959	0,289	0,167	0,023

Tabla. 6.5. Valores del coeficiente de correlación de Spearman para las variables tenidas en cuenta para estimar la regresión logística con *Diplodia pinea*.

Los resultados indican que la correlación que muestra la variable GRANIZO con la distribución de *Diplodia pinea* es muy grande y por eso los valores de clasificación de la regresión logística son tan altos. En los casos en los que la variable dependiente puede ser predicha por una única variable con un porcentaje muy alto de probabilidad el problema que se genera es un gran error estándar (Field 2009). Este hecho invalida el análisis de regresión logística, por lo que no puede establecerse una fórmula que nos indique la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad en ningún punto. Si retiramos esta variable del modelo y lo generamos solo con las variables TEMPERATURA, PRECIPITACIÓN y TIPO DE SUELO se pierde la significación y el modelo no mejora en su predicción.

Debido a esto, para la creación del mapa de riesgo de aparición de la enfermedad generada por *Diplodia pinea*, hemos partido de las capas de datos disponibles para las variables de granizo y niveles de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad por parte de las diferentes especies de coníferas presentes en el País Vasco. La variable GRANIZO se codifica con los valores 0 y 1. La variable de resistencia/susceptibilidad se codifica de 0 a 4 siendo 0 especies no hospedadoras y 4 las de máxima susceptibilidad. Mediante el programa ArcGIS 9.2 procedemos a la adición de valores para cada variable por cada cuadrícula 500 x 500 m. De esta manera obtenemos un valor determinado para cada tesela que clasificamos en cinco valores de riesgo de manifestación de la enfermedad, dando como resultado el mapa de la fig. 6.14 que mostramos a continuación.

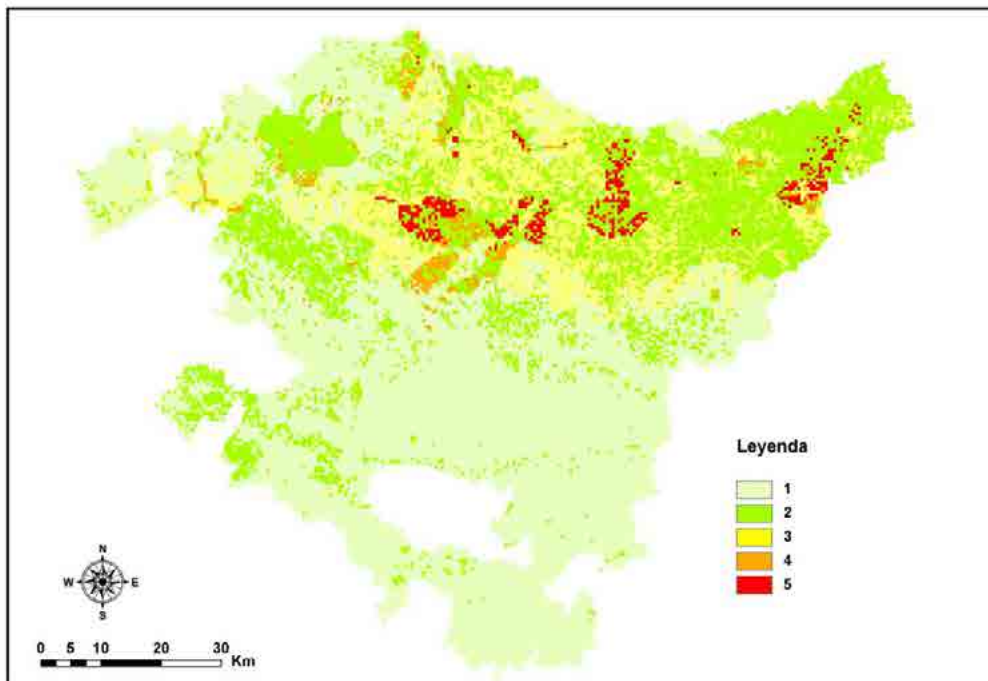


Fig. 6.14. Mapa de niveles de riesgo de *Diplodia pinea* en el País Vasco.

6.3.4.3 *Fusarium circinatum*

En una primera fase se introdujeron las variables GRANIZO, PRECIPITACIÓN, TEMPERATURA y TIPO DE SUELO en la generación del modelo. Las tres primeras variables dieron valores significativos de correlación con la presencia de *Fusarium circinatum* pero TIPO DE SUELO no mostró correlación. Se retiró esa variable del modelo y se obtuvieron los datos que se muestran a continuación (tablas 6.6.a-c).

a

R ² de Cox y Snell	R ² de Nagelkerke
0,315	0,572

b

TABLA DE CLASIFICACIÓN (a)				
Observado		Pronosticado		
		FUSARIUM		Porcentaje correcto
		0	1	0
FUSARIUM	0	798	29	96,5
	1	47	84	64,1
Porcentaje global				92,1
(a) El valor de corte es 0,5				

c

VARIABLES EN LA ECUACIÓN				
	β	E.T.	Wald	Sig.
GRANIZO	0,569	0,27	4,438	0,035
PRECIPITACIÓN	1,659	0,152	119,291	0,0
TEMPERATURA	1,059	0,134	62,313	0,0
CONSTANTE	-16,247	1,337	147,758	0,0

Tabla. 6.6. Valores de la regresión logística para *Fusarium circinatum* con las variables GRANIZO, PRECIPITACIÓN y TEMPERATURA: a) R² de Cox y Snell y R² de Nagelkerke; b) tabla de clasificación; c) variables de la ecuación.

En este caso vemos que la R² de Nagelkerke nos indica una clasificación buena del 57,2% de los valores. En la tabla de clasificación vemos que se clasifican adecuadamente el 96,5% de los valores de ausencia y el 64,1% de los de presencia. El valor total de valores bien clasificados es del 92,1%.

En el primer modelo generado vimos que la variable TIPOS DE SUELO no tenía correlación significativa con la presencia de *Fusarium circinatum*. Retirada esta variable, se ha obtenido el modelo de la tabla 6.6-c, que muestra cómo las variables de PRECIPITACIÓN y TEMPERATURA influyen en el modelo de forma significativa al 99% y la variable GRANIZO al 95%.

Mostramos a continuación la fórmula y mapas obtenidos según las variables de PRECIPITACIÓN, TEMPERATURA y GRANIZO. Con este modelo obtenemos los valores de los coeficientes β para cada variable que nos explican la fórmula de probabilidad de ocurrencia de *Fusarium circinatum*:

$$P(Y) = \frac{1}{1 + e^{-(-16,247 + 0,569 \times \text{GRANIZO} + 1,659 \times \text{PRECIPITACIÓN} + 1,059 \times \text{TEMPERATURA})}}$$

Donde P(Y) es la probabilidad de que el valor de la variable dependiente (*Fusarium circinatum*) sea igual a 1 (presencia de la enfermedad) y e es la base del logaritmo neperiano.

De acuerdo con esta fórmula, y teniendo en cuenta el inverso de la distancia a los puntos en los que se estima la enfermedad, se genera el siguiente mapa de riesgo de aparición de la enfermedad de acuerdo a los valores de las variables de TEMPERATURA, PRECIPITACIÓN y GRANIZO en cada punto (ver fig. 6.15).

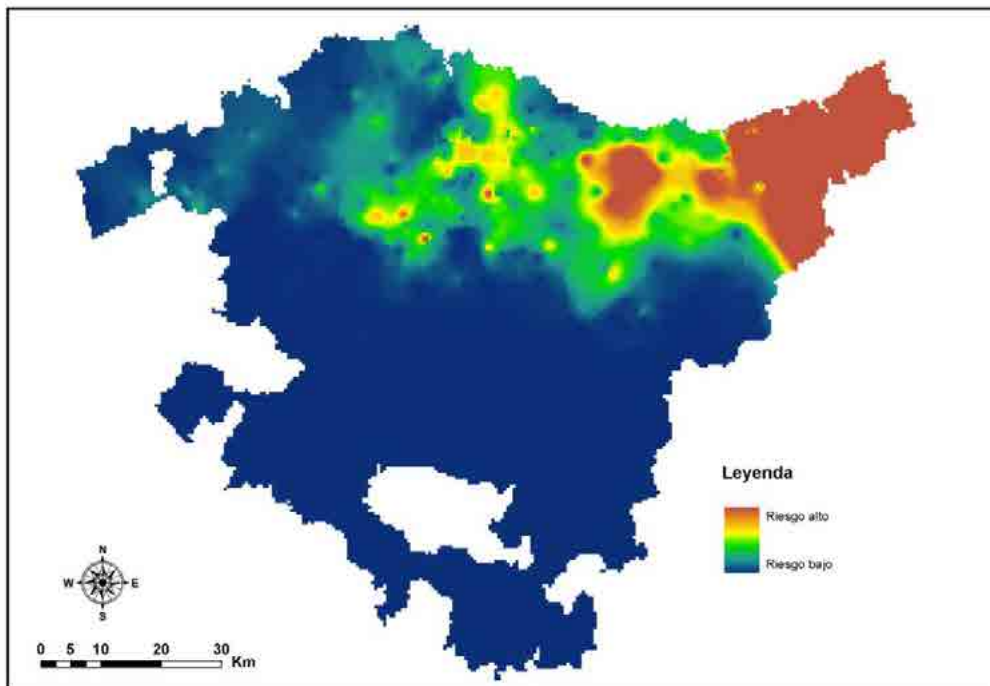


Fig. 6.15. Mapa de riesgo de *Fusarium circinatum* en el País Vasco en función de las variables TEMPERATURA, PRECIPITACIÓN y GRANIZO.

Una vez generado el mapa de riesgo según las variables ambientales que nos determina los lugares donde potencialmente se puede dar la enfermedad, generamos un nuevo mapa añadiendo los valores de resistencia o susceptibilidad de las especies de coníferas presentes en el País Vasco para completar el modelo. De esta manera obtenemos el mapa de la fig. 6.16 que podemos ver a continuación. En él se muestra la probabilidad de aparición de la enfermedad generada por *Fusarium circinatum* en el País Vasco y se indican 5 niveles según el riesgo de aparición.

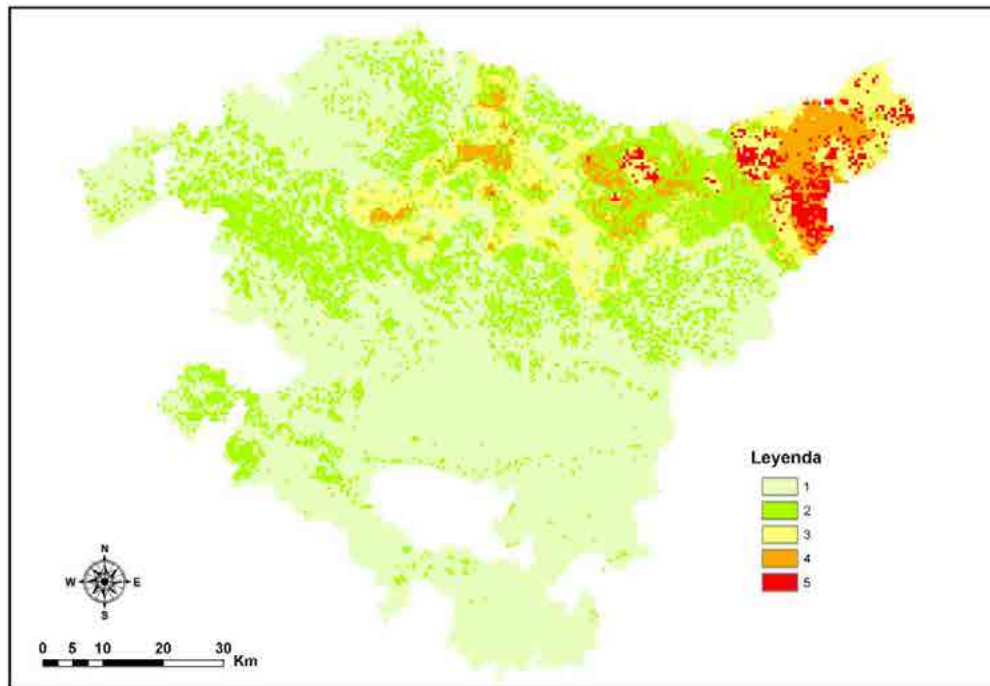


Fig. 6.16. Mapa de niveles de riesgo de *Fusarium circinatum* en el País Vasco según las variables TEMPERATURA, PRECIPITACIÓN y GRANIZO.

En una segunda fase incorporamos las variables los_2 y TERMOTIPO a nuevos modelos evitando las variables que generan multicolinealidad. Todos los modelos se muestran con menor significación excepto el generado exclusivamente con la variable los_2 cuyos datos se muestran a continuación (tablas 6.7.a-c):

a

R^2 de Cox y Snell	R^2 de Nagelkerke
0,288	0,525

b

TABLA DE CLASIFICACIÓN (a)				
Observado		Pronosticado		
		FUSARIUM		Porcentaje correcto
		0	1	0
FUSARIUM	0	817	14	98,3
	1	46	85	64,9
Porcentaje global				93,8

(a) El valor de corte es 0,5

c

VARIABLES EN LA ECUACIÓN				
	β	E.T.	Wald	Sig.
los_2	1,927	0,147	171,699	0,0
CONSTANTE	-11,446	0,77	221,062	0,0

Tabla. 6.7. Valores de la regresión logística para *Fusarium circinatum* con la variable los_2 : a) R^2 de Cox y Snell y R^2 de Nagelkerke; b) tabla de clasificación; c) variables de la ecuación.

En este caso vemos que la R^2 de Nagelkerke nos indica una clasificación buena del 52,5% de los valores, algo menor que en caso anterior. En la tabla de clasificación vemos que se clasifican adecuadamente el 98,3% de los valores de ausencia y el 64,9% de los de presencia. El valor total de valores bien clasificados es del 93,8%. Este modelo mejora ligeramente el anterior y es más simple por depender de una única variable ($\ln S_2$) por lo que lo tomamos como generador de la fórmula de probabilidad de ocurrencia de *Fusarium circinatum* que mostramos a continuación:

$$P(Y) = \frac{1}{1 + e^{-(-11,446 + 1,927 \times \ln S_2)}}$$

Donde $P(Y)$ es la probabilidad de que el valor de la variable dependiente (*Fusarium circinatum*) sea igual a 1 (presencia de la enfermedad) y e es la base del logaritmo neperiano.

De acuerdo con esta fórmula, y teniendo en cuenta el inverso de la distancia a los puntos en los que se estima la enfermedad, se genera el siguiente mapa de riesgo de aparición de la enfermedad de acuerdo al valor de la variable $\ln S_2$ en cada punto (ver fig. 6.17).

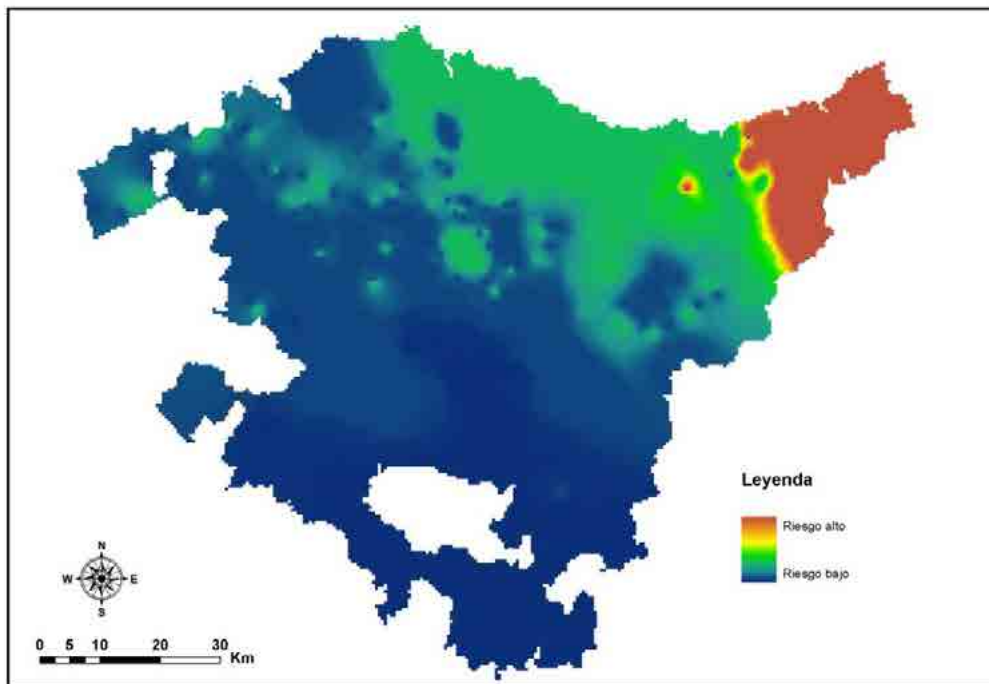


Fig. 6.17. Mapa de riesgo de *Fusarium circinatum* en el País Vasco en función del índice $\ln S_2$.

Una vez generado el mapa de riesgo según la variable los_2 que nos determina los lugares donde potencialmente se puede dar la enfermedad, generamos un nuevo mapa añadiendo los valores de resistencia o susceptibilidad a *Fusarium circinatum* de las especies de coníferas presentes en el País Vasco para completar el modelo. De esta manera obtenemos el mapa de la fig. 6.18 que podemos ver a continuación. En él se muestra la probabilidad de aparición de la enfermedad generada por *Fusarium circinatum* en el País Vasco y se indican 5 niveles según el riesgo de aparición.

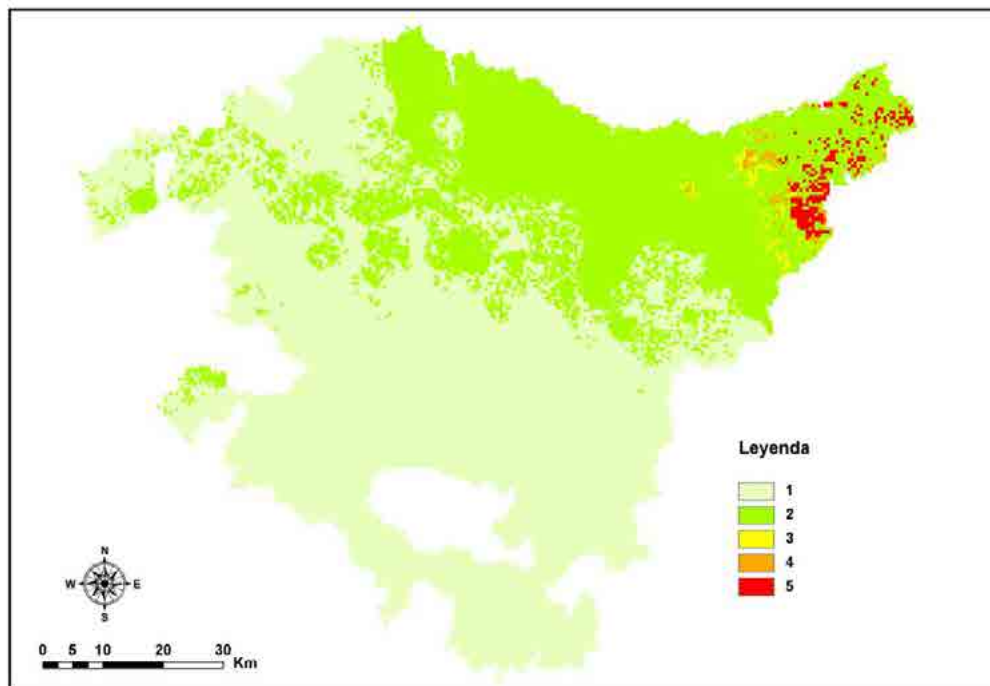


Fig. 6.18. Mapa de niveles de riesgo de *Fusarium circinatum* en el País Vasco utilizando la variable los_2 .

6.4 Discusión

En el País Vasco, *Diplodia pinea* está ampliamente distribuida por las masas de especies como *Pinus sylvestris*, *P. pinaster*, *P. nigra* y especialmente en *P. radiata*, donde resulta difícil encontrar plantaciones en las que no esté presente. Los niveles mayores de infección aparecen en las masas de *Pinus radiata*, coincidiendo con los resultados del capítulo 5 donde se determina que *Pinus radiata* es muy sensible a esta enfermedad. En el mapa de la fig. 6.11 podemos ver que la influencia de la enfermedad se manifiesta por todo el territorio ocupado por las especies del género *Pinus*. Esta presencia tan común se corresponde con lo comentado en el capítulo 2 sobre la distribución de esta especie a nivel mundial (Chou & MacKenzie 1988, Swart & Wingfield 1991b, Paoletti et al. 2001).

La distribución de *Diplodia pinea* en el País Vasco parece ser al azar, aunque un ligero valor positivo del índice de Moran indica una pequeña tendencia al agrupamiento de los datos en algunas zonas. Para poder confirmar esta posible tendencia a un pequeño agrupamiento hay que estudiar los factores que influyen en la distribución de este organismo. La amplia distribución de *Diplodia pinea* puede verse incrementada por su capacidad de dispersarse con la semilla. Ya se ha comentado el sistema de recogida, extracción y distribución de la semilla de pino radiata en el País Vasco, que permite que pueda ser recogida en cualquier pinar y distribuirse a cualquier nuevo lugar de plantación (ver capítulo 4).

El caso de *Fusarium circinatum* es diferente al encontrado para *Diplodia pinea*. Su distribución obedece a un patrón de agrupamiento y se detecta casi exclusivamente en plantaciones de *Pinus radiata*. Esto también es coincidente con los datos del capítulo 5 donde se muestra la alta susceptibilidad de *Pinus radiata* frente a *Fusarium circinatum*. El carácter más puntual de esta enfermedad puede deberse, en parte, a ser un organismo de reciente introducción. Comparando los mapas de las figs. 6.3 (bioclimas del País Vasco) y 6.15 y 6.17 (riesgo de aparición de *Fusarium circinatum*), podríamos concluir que, con los datos actuales, *Fusarium circinatum* parece tener su óptimo en el bioclima descrito como templado oceánico y sobre todo en las áreas con mayores precipitaciones en julio y agosto. Aunque es necesario estudiar también los factores que influyen en su biología para determinar su posible expansión (Iturrutxa et al. 2011). La posibilidad de que se disperse con la semilla es más remota que en *Diplodia pinea*, porque es un hongo que se trata de detectar específicamente en los análisis obligatorios de los lotes de semilla de acuerdo al Real Decreto 637/2006 (ver capítulo 3). En el caso de aparecer en alguna muestra, todo el lote debe ser destruido por lo que no puede ser comercializado.

De manera anecdótica también se ha detectado en una plantación de *Pinus pinaster* colindante con plantaciones de *Pinus radiata* afectadas fuertemente por la enfermedad. Los síntomas de la enfermedad prácticamente eran inapreciables en *Pinus pinaster*, en comparación con los síntomas tan evidentes de *Pinus radiata*, especie más sensible como hemos visto en el capítulo 5.

La amplia presencia de *Diplodia pinea* en las repoblaciones de pino radiata no parece ejercer influencia antagónica respecto a la presencia de *Fusarium circinatum*. En todos los casos donde hemos detectado la presencia de *Fusarium circinatum* también ha aparecido *Diplodia pinea*, haciéndose difícil establecer qué proporción de los daños se debe a un hongo o al otro.

En el mapa de la fig. 6.13 podemos ver que *Fusarium circinatum* aparece sobre todo en la zona noreste del País Vasco en Gipuzkoa y en dos zonas más reducidas del interior de Bizkaia. Al igual que en el caso de *Diplodia pinea* hay que estudiar los factores que influyen en esta distribución para poder establecer la posibilidad de que se extienda a otras zonas del País Vasco. El índice de Moran nos muestra cómo es la distribución de una nube de puntos pero no explica los factores que influyen en ella (Mitchell 2009). Los datos sobre la distribución de estas dos enfermedades y sus niveles de infección estudiados en este apartado se han utilizado en el análisis de regresión logística para determinar los factores que influyen o no en esa distribución.

La regresión logística es un buen método para la generación de modelos predictivos pero hay que tener en cuenta que las relaciones matemáticas constituyen una representación abstracta e imperfecta del mundo real por lo que se muestran con ciertas limitaciones. Los procesos biológicos considerados son muy complejos debido al gran número de factores que en ellos intervienen. Sin embargo, todos estos conocimientos, aun con limitaciones, pueden ser de gran ayuda a la hora de tomar decisiones sobre las posibilidades de establecer cultivos forestales en ciertas zonas (Coscollá 1980).

Los mapas de riesgo de una enfermedad basados en la regresión logística son muy precisos si elegimos de forma adecuada las variables predictoras. El mapa se obtiene dando a cada variable independiente el valor proporcional que le asigna la regresión. De esta manera se da más valor a las variables que más influyen en la variable dependiente (Vilar del Hoyo et al. 2008). En nuestro caso el mapa obtenido para estimar el riesgo de presencia de la enfermedad generada por *Fusarium circinatum* está basado en esta técnica y explica el 93,8% de los casos. Según nuestros datos, la variable que mejor explica esta distribución es el índice los_2 , relación entre precipitaciones medias y temperaturas medias de los dos meses más cálidos del verano. De aquí concluimos que la distribución de *Fusarium circinatum* se ve favorecida por un periodo cálido con precipitaciones altas. Un segundo modelo compuesto por variables como las temperaturas medias anuales, precipitaciones medias anuales y zonas afectadas por granizo y vendavales también explica un número bastante alto de casos (92,1%). En los dos modelos la relación de temperaturas y precipitaciones altas explica la distribución de *Fusarium circinatum* en el País Vasco. La similitud de los modelos se puede deber a que ambos incorporan la relación entre temperaturas y precipitaciones altas. Pero el comportamiento ligeramente mejor del modelo basado en el índice los_2 y su simpleza al basarse en una única variable lo hacen más recomendable.

Un modelo de predicción basado en la regresión logística empieza a ser una buena aproximación a partir del 60% de casos explicados (Vilar del Hoyo et al. 2008). Los dos modelos que hemos elaborado con distintas variables explican más del 90% de los casos aunque, si sólo tenemos en cuenta los puntos positivos de aparición del hongo, los modelos bajan su predicción al 64,9% y 64,1%. El resto de casos que no se explican adecuadamente por factores climáticos puede explicarse porque estos modelos están basados en la distribución actual de *Fusarium circinatum* que, a su vez, está condicionada por una o varias introducciones recientes del hongo en esta región. Este factor es imposible de modelizar y puede generar incertidumbre sobre la aparición del patógeno en algunas zonas no contempladas como de riesgo en nuestro modelo.

Ganley et al. (2009) establecen un modelo de predicción de establecimiento de *Fusarium circinatum* a nivel mundial basándose en datos climáticos de carácter general (programa CLIMEX). Esta predicción coincide bien con regiones que se sabe que tienen el daño, como el sudeste de EEUU y norte de España. A la inversa, el modelo predice que el clima en California no es el óptimo para el chancro resinoso y lo explican por la observación de la baja frecuencia de infecciones naturales y la fuerte asociación con insectos en esta región. De la misma manera, en Chile, donde se sabe que *Fusarium circinatum* aparece en viveros pero no en repoblaciones forestales,

también el modelo predice que es un lugar marginal en condiciones climáticas para el establecimiento del chancro resinoso. Sin embargo, en California se menciona a *Fusarium circinatum* como una amenaza real a las poblaciones originales de *Pinus radiata* (Gordon 2006, Farjon 2010). El cálculo del riesgo de presencia de la enfermedad mediante el programa CLIMEX se hace a escala mundial con una precisión muy somera a escala local. La amplia variedad de climas en regiones como California y Chile puede no estar bien reflejada por un programa de estas características.

En cambio, algunas regiones de China, Brasil, Australia y Nueva Zelanda tienen condiciones climáticas óptimas para el establecimiento de la enfermedad. En estos países recomiendan medidas estrictas de regulación para prevenir el establecimiento y desarrollo del patógeno (Ganley et al. 2009). Esta predicción de la posibilidad de que *Fusarium circinatum* se desarrolle en una zona determinada está basada en condiciones climáticas a nivel mundial. Para establecer zonas más concretas hay que ajustar los modelos a datos climáticos más precisos a menor escala. Como hemos mostrado la presencia de *Fusarium circinatum* en el País Vasco está relacionada, sobre todo, con zonas de alta pluviosidad y veranos cálidos.

En la elaboración del mapa de riesgo de enfermedad producida por *Diplodia pinea* no hemos podido aplicar el método de la regresión logística. La alta correlación de una de las variables con la existencia de niveles más altos de la enfermedad genera un error estándar muy alto e invalida el cálculo (Norušis 2002, Field 2009). Pero nos da una pista muy importante sobre un factor que desencadena la enfermedad. En este caso la alta correlación con la variable GRANIZO es muy alta y además, según la tabla de clasificación de la fig. 6.4-b, se explican el 98,7% de los casos. La relación de la variable GRANIZO con la de *Diplodia pinea* según la correlación de Spearman es muy alta (0,959). Teniendo en cuenta esta alta correlación, y que esta variable explica un porcentaje muy alto de los casos, la hemos utilizado para la generación del mapa de riesgo.

La explicación más probable es que, a pesar de que *Diplodia pinea* se encuentra distribuida por casi todas las masas forestales de coníferas en el País Vasco, la enfermedad no se manifiesta de forma agresiva en muchos de estos casos. El carácter saprófito de este hongo, y una alta capacidad para permanecer de forma asintomática en los árboles, le permite sobrevivir en condiciones muy variables (Smith et al. 2000). Hemos encontrado una alta correlación entre niveles altos de infección con los daños en las masas forestales en zonas afectadas por fuertes vendavales o granizadas. Las tormentas de granizo o fuertes vientos generan numerosas heridas en los árboles. El pino radiata se cultiva preferentemente en el piso mesotemplado con ombrotipos húmedo e hiperhúmedo. En estas localidades son frecuentes los momentos con temperaturas moderadas y alta humedad que, tras los vendavales o granizadas, propician el desarrollo del hongo y la manifestación de la enfermedad. La capacidad de mantenerse como saprófito en condiciones ambientales muy variadas, su amplio rango de hospedadores y su probable antigüedad en las masas de coníferas explicaría una distribución al azar. Pero el desarrollo del carácter parásito se produce en condiciones más específicas; en nuestro caso muy ligado a la presencia de fuertes tormentas, vendavales y granizadas durante los últimos 10 años (2001-09).

En Francia, *Diplodia pinea* se considera un hongo ampliamente distribuido por las masas de coníferas de todo el país. Desprez-Loustou et al. (2006) generan un modelo de riesgo de la enfermedad que establece la zona sur del país como la de más alto riesgo de padecer la enfermedad. Esto es debido a la debilidad de los posibles hospedadores que pueden encontrarse estresados en época de sequía. En cambio, en la zona norte, donde se encuentra distribuida de manera muy amplia, se mantiene en la mayoría de los casos de forma saprófita sin causar graves daños. Pero sí encuentran zonas afectadas por fuertes vendavales donde la enfermedad se manifiesta con cierta virulencia. En el País Vasco, donde el clima es predominantemente húmedo, el estrés por sequía no parece un factor importante en el desarrollo de la enfermedad.

Van Staden et al. (2004) generan un modelo de riesgo de ocurrencia de *Diplodia pinea* en Sudáfrica basándose en datos climáticos y demuestran que la manifestación de la enfermedad está muy relacionada con las zonas de fuertes tormentas de granizo aunque la presencia del hongo es común por todas las repoblaciones de coníferas. Zwolinski et al. (1990 y 1995) identifican, mediante el uso de técnicas estadísticas, una región de riesgo para *Diplodia pinea* con una alta probabilidad de que la enfermedad ocurra en Sudáfrica. Estos mismos autores mencionan varios casos de zonas con grandes pérdidas debidas a *Diplodia pinea* que han seguido a una sola tormenta de granizo y una infección de insectos xilófagos. Sin embargo la zona más amplia con daños de *Diplodia pinea*, que se producen de forma continua, se encuentra en un lugar con fenómenos regulares de tormentas y granizo (Van Staden et al. 2004).

La capacidad de *Diplodia pinea* de persistir de forma asintomática con el hospedador y su alto nivel de diversidad genotípica en países como Sudáfrica complican las estrategias de manejo de la enfermedad (Smith et al. 2000, Stanosz et al. 2005). En Sudáfrica, Van Staden et al. (2004) han aplicado un modelo bioclimático para predecir la distribución de *Diplodia pinea*. Esto ha proporcionado información valiosa a la industria forestal sudafricana. En lugares donde se dan tormentas de granizo recomiendan plantar especies de *Pinus* resistentes o utilizar especies alternativas. Cuando la esperada tormenta de granizo se produce y siempre va seguida de la infección por *Diplodia pinea*, es claro que en esta zona no se deberían plantar especies de coníferas sensibles a la enfermedad.

Los resultados de nuestro trabajo muestran que el clima afecta directamente a la distribución de ambos patógenos y que podría afectar al sector forestal. Un manejo exitoso de estas enfermedades requiere estrategias de control integrado basadas en un amplio conocimiento de los patógenos. La investigación para evaluar y mitigar los riesgos de daño a la industria forestal y optimizar estrategias de producción debería incluir la identificación de organismos patógenos, estudiar su abundancia e impacto y una mejor comprensión de los efectos medioambientales de temperatura y humedad en su biología (Ayres & Lombardero 2000, Van Staden et al. 2004).

Con los datos obtenidos hemos generado un modelo de predicción de la posibilidad de aparición de estas enfermedades en las masas de coníferas del País Vasco. En la medida que se conozcan aspectos más concretos de la distribución y de la relación con otros parámetros medioambientales los modelos podrán hacerse más precisos. Aunque todos los modelos tienen ciertos límites metodológicos y de precisión, teóricamente la técnica de modelización podría hacerse más efectiva con el uso de datos climáticos más precisos y una precisión mayor a escala local de la distribución de los patógenos a lo largo del año. Sin embargo las series de datos climáticos anuales pueden ser tan variables que no alcancen la robustez necesaria para análisis estadísticos fiables. Eventos extremos a una escala temporal pequeña podrían generar un error importante en los modelos de predicción. Por eso es muy importante ser lo más preciso posible en el conocimiento de la distribución de los patógenos y de los factores que les influyen (Easterling et al. 2000, Stenseth et al. 2002).

Los resultados de este trabajo pueden ser integrados en otros existentes para tomar decisiones que solucionen las demandas del manejo forestal y control integrado de patógenos bajo inciertas condiciones medioambientales futuras. Posteriores refinamientos de los modelos y el uso de datos más detallados y sistemáticamente recolectados sobre enfermedades proporcionarán herramientas de decisión sobre manejo forestal y análisis de riesgo más precisos.

Las decisiones de manejo forestal están basadas en información relacionada con condiciones presentes y futuras y algunos modelos de simulación forestal están siendo ampliamente usados para llevar a cabo las actuaciones. Diferentes aplicaciones requieren diferentes tipos de modelos y enfoques (Peng 2000). Un caso insuficientemente conocido y en el que los modelos de predicción podrían ayudar es el del cambio climático. El incremento en la atmósfera de gases de efecto invernadero generará impactos significativos en el clima mundial futuro. Hay evidencias de que anomalías climáticas en el siglo pasado han afectado a la fisiología, distribución y fenología de algunas especies en consonancia con algunas predicciones teóricas (Hughes 2000). El cambio climático previsto podría también generar un gran impacto en el crecimiento y composición de los bosques (Lindner 2000). Los cambios climáticos podrían generar grandes pérdidas de producción en los cultivos forestales. Y también podría afectar indirectamente en los bosques y repoblaciones forestales alterando los comportamientos de los patógenos (Loehle & LeBlanc 1996, Ayres & Lombardero 2000). El conocimiento de las condiciones en que estos dos hongos se vuelven más agresivos con sus hospedadores se vuelve imprescindible ante la posibilidad de la evolución del clima hacia otras condiciones. La posibilidad de predecir posibles daños futuros nos puede ayudar en la gestión presente de nuestras masas forestales.

6.5 Conclusiones

1.- Se han muestreado 958 puntos en el País Vasco tratando de detectar *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum*. Los datos de estos muestreos pueden servir de base para el seguimiento de estas dos enfermedades en nuevos estudios. La relación completa de localidades se encuentra disponible en el centro de investigación NEIKER-Tecnalia de Arkaute (Araba).

2.- Los mayores niveles de infección, tanto para *Diplodia pinea* como para *Fusarium circinatum*, se dan en las masas de *Pinus radiata*.

3.- *Diplodia pinea* se encuentra distribuida por casi todas las plantaciones forestales del género *Pinus* en el País Vasco. Su distribución obedece a un patrón al azar con un ligero agrupamiento.

4.- Los niveles más altos de infección y daños en las masas forestales producidos por *Diplodia pinea* se dan en zonas afectadas por granizadas o fuertes vendavales durante los últimos 10 años (2001-09). El índice los_2 muestra cierta relación con la manifestación de la enfermedad pero su efecto se diluye cuando se contempla la alta correlación de *Diplodia pinea* con las granizadas y vendavales.

5.- Debido a esta alta correlación no ha podido establecerse una regresión. Sin embargo, se ha elaborado un mapa de riesgos basándonos en los valores de resistencia o susceptibilidad de las especies de coníferas presentes en el País Vasco y la presencia de vendavales o granizadas durante los últimos 10 años (2001-09).

6.- *Fusarium circinatum* se distribuye casi exclusivamente en masas de *Pinus radiata* en la zona noreste de Gipuzkoa y dos zonas del centro de Bizkaia. También ha aparecido en un único caso sobre *Pinus pinaster*. Su distribución responde a un patrón de agrupamiento. Según nuestros datos actuales, esta especie parece tener su óptimo en el piso bioclimático templado oceánico.

7.- La distribución actual de *Fusarium circinatum* puede explicarse con un modelo matemático que explica el 92,1% de los casos a partir de los datos de Temperatura media anual, Precipitación y Granizadas. Sin embargo, puede lograrse un modelo matemático de distribución un poco más exacto en base al índice los_2 (93,8%). Los niveles altos de precipitación en épocas cálidas del año parecen ser los factores más determinantes.

8.- Hemos elaborado un mapa de riesgos para *Fusarium circinatum*, basado en una regresión logística en la que interviene este índice y la resistencia o susceptibilidad de las especies de coníferas presentes en el País Vasco.

7. RECOMENDACIONES DE GESTIÓN



Plantación de pino radiata talada debido a infección por *Fusarium circinatum*

7. RECOMENDACIONES DE GESTIÓN

7.1 Introducción

Como ya se ha comentado en el capítulo 1 el pino radiata es la especie más abundante en las repoblaciones forestales del País Vasco. En la baja montaña de la vertiente cantábrica es la especie dominante y en muchas zonas adquiere carácter de monocultivo (fig. 1.7). En ese mismo capítulo ya se mencionan la importancia económica y los principales problemas derivados de este contexto. Las pérdidas económicas asociadas a los daños que causan estos dos hongos de chancro ya las hemos reflejado en los capítulos 2 y 3 (apartados 2.6 y 3.6).

Aunque los dos hongos generan enfermedades de chancro con síntomas similares, son varias las diferencias entre ellos que implican diferentes formas de afrontar la gestión. *Diplodia pinea* es un hongo de carácter saprófito que se comporta como parásito en determinadas condiciones mientras que *Fusarium circinatum* es un parásito primario. La amplia distribución por las masas de coníferas de *Diplodia pinea* contrasta con la distribución más restringida de *Fusarium circinatum* y prácticamente circunscrita a repoblaciones de pino radiata.

Es difícil determinar el momento del establecimiento de *Diplodia pinea* en las masas forestales del País Vasco pero su amplia distribución parece indicar un establecimiento bastante antiguo, mientras que *Fusarium circinatum* es un hongo de introducción reciente. Este contexto implica distintos objetivos de gestión para las dos especies. La gestión de *Diplodia pinea* debería ir encaminada a controlar el patógeno para minimizar los daños que causa. En cambio, *Fusarium circinatum* ha sido declarado un patógeno de cuarentena en Europa y este hecho implica la adopción de una serie de medidas obligatorias para tratar de erradicarlo de este territorio.

Un plan de gestión adecuado para minimizar el impacto de estas dos enfermedades necesitaría dotarse de recursos económicos para poder llevarse a cabo. Sería necesario establecer previsiones de gasto, dedicación de personal cualificado y establecimiento de un calendario para llevar a cabo las distintas etapas. Además se debería de buscar el consenso entre las administraciones, centros de investigación y asociaciones de forestalistas para poder aplicarlo de manera eficaz. La propuesta de un plan de gestión de estas características excede las pretensiones de este trabajo pero sí podemos hacer una revisión de propuestas de actuación publicadas y unas recomendaciones basadas en los resultados de este estudio.

7.2 Propuestas de actuación: *Fusarium circinatum*

En cuanto a la infección por *Fusarium circinatum*, países como Nueva Zelanda y Australia, con grandes extensiones de plantaciones de *Pinus radiata*, han elaborado un exhaustivo plan de manejo de la enfermedad para el caso de que ésta se detecte dentro de sus fronteras. Suponen que las pérdidas generadas en la producción se mantendrían durante un periodo de 20 años en los que estiman posible poder controlar la enfermedad mediante programas de erradicación y mejora genética. Por eso proponen medidas de control muy estrictas para evitar la entrada de *Fusarium circinatum* en ambos países (Gadgil et al. 2003, MAF 2010).

De manera similar, desde 2002 *Fusarium circinatum* está considerado como patógeno de cuarentena en Europa por la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), lo que supone su regulación fitosanitaria por parte de los estados miembros. En este sentido, y tras la detección en España, a nivel comunitario se publica la Decisión 2007/433/CE que estipula en su artículo 5, que los “Estados miembros llevarán a cabo inspecciones anuales oficiales para detectar la presencia del organismo o pruebas de la infestación por él en el territorio nacional”. Desde 2006, año en que se publicó el Real Decreto 637/2006 por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg et O'Donnell (BOE 2006), se están realizando diversas actuaciones de prospección en todas las comunidades autónomas, así como de control y prevención en las zonas afectadas (Dirección General de Gestión Forestal 2009).

En este contexto normativo proponemos las siguientes medidas de actuación:

En monte las actuaciones implican medidas de control cuyo objetivo principal es la detección y eliminación de los focos afectados. Estas medidas suponen inspecciones periódicas de las masas forestales. En caso de presencia de árboles afectados, se deben eliminar mediante tala y deben ser destruidos en el lugar. El material infectado no debe ser movido más que lo imprescindible y las herramientas utilizadas deben ser desinfectadas. En el lugar afectado no se deben volver a plantar especies del género *Pinus*, sobre todo *Pinus radiata* y *P. pinaster*, por lo menos durante un periodo mínimo de dos años, aunque una decisión más efectiva sería no repoblar con estas especies mientras exista cierta duda sobre la presencia del hongo.

Teniendo en cuenta el mapa de distribución de la figura 6.13 se deberían revisar periódicamente cada 3 años las zonas de distribución del hongo. De esta manera se puede comprobar la evolución de los focos y si la superficie de la enfermedad se reduce. Esto es primordial en la lucha frente a un patógeno del que se pretende su erradicación. Además es recomendable establecer revisiones periódicas de todas las masas forestales de pinos para detectar brotes de esta enfermedad de manera temprana. De esta manera se pueden controlar estos focos de infección antes de que se propaguen mediante la tala y eliminación del material infectado.

La comercialización de semilla de coníferas forestales debe realizarse con totales garantías sanitarias. En el caso de *Fusarium circinatum* los controles son obligatorios por ley. Esto es esencial para evitar nuevas introducciones de *Fusarium circinatum*. La detección de este patógeno en los controles sanitarios de semilla supone la inmovilización del lote afectado y su posterior destrucción, con el perjuicio económico que esto conlleva (Enciso 2005, BOE 2006). Por eso es imprescindible evitar la recogida y transporte de semillas de zonas infectadas a otras libres del patógeno, aun cuando éstas hayan sido recogidas en árboles aparentemente sanos. Todas estas precauciones, sumadas a los controles sanitarios de la semilla, no garantizan al 100 % que no exista contaminación por *Fusarium circinatum*; por tanto, antes de la siembra, la semilla deberá ser preparada adecuadamente, ya que es la última fase en la que se podrá actuar sobre ella. Actualmente, el tratamiento térmico parece ser uno de los métodos más apropiados para el control de este punto (Álvarez 2005).

Según el Real Decreto 637/2006 la detección de plántulas infectadas en vivero implica la destrucción de todo el lote; por eso es necesario tomar precauciones para evitar pérdidas económicas cuantiosas (fig. 3.8). Medidas como higiene escrupulosa del vivero y utilización de sustratos de cultivo esterilizados reducirán la posibilidad de infección. Estas medidas son más difíciles de aplicar en viveros de planta forestal a raíz desnuda. En estos casos los viveros nunca se deberán establecer en zonas cercanas a repoblaciones forestales afectadas por la enfermedad (Iturrutxa et al. 2001, Álvarez 2005).

Una vez realizada la siembra con las precauciones comentadas, tendremos que centrarnos en aplicar medidas fitosanitarias para mantener el cultivo en condiciones adecuadas. Otros aspectos a controlar serían el agua de riego y las operaciones de cultivo (Álvarez 2005, Pintos et al. 2005).

En las plantaciones forestales de zonas con bajo o medio riesgo de sufrir la enfermedad (zonas 1, 2 y 3 de los mapas de las figuras 6.16 y 6.18) también es necesario mantener un buen estado vegetativo de los árboles, eliminando los pies debilitados si fuera necesario, así como los restos de poda que pueden ser foco de atracción de insectos vectores (Pintos et al. 2005, BOE 2006). Esta medida es adecuada, tanto para prevenir problemas sanitarios, como para favorecer buenos crecimientos y mejorar la productividad.

En las zonas de nivel 4 y 5 de los mapas de la figuras 6.16 y 6.18 se recomienda no repoblar con especies sensibles a *Fusarium circinatum*. En estos casos, la utilización de especies alternativas resistentes a la enfermedad se muestra como una medida casi imprescindible. La aparición conjunta de este hongo junto a *Diplodia pinea* hace necesario establecer especies alternativas resistentes a las dos enfermedades en estas zonas. Dentro de las coníferas, las dos especies de secuoya (*Sequoia sempervirens* y *Sequoiadendron giganteum*) representan una buena alternativa de cultivo forestal por su resistencia a los dos patógenos. *Pinus taeda* podría considerarse como una especie alternativa basándonos en su resistencia moderada. Podría ser una alternativa como cultivo forestal con un programa de mejora de amplia base genética y controlando bien su origen.

Como hemos visto en el capítulo 5 existen especies del género *Pinus* como *P. pinea*, *P. halepensis* y *P. nigra* con buenos niveles de resistencia frente a *Fusarium circinatum* por lo que podrían suponer alternativas de cultivo en las zonas afectadas por la enfermedad. Pero en el caso del País Vasco, solo *P. nigra* sería una especie a tener en cuenta debido a que las otras dos son especies de carácter mediterráneo y poco aptas para el cultivo en las zonas atlánticas donde se ha detectado *Fusarium circinatum*. Además, otras especies como *Pseudotsuga menziesii*, *Larix kaempferi*, *Picea sitchensis*, *P. glauca* y *P. jezoensis* se muestran resistentes a *Fusarium circinatum* y serían válidas como alternativa, aunque hay que tener presente que son bastante susceptibles a *Diplodia pinea*.

Otras especies de frondosas, no hospedadoras de estos hongos, supondrían una buena alternativa en estas zonas, donde romper las características de monocultivo podría ayudar a evitar problemas sanitarios asociados a amplias superficies.

7.3 Propuestas de actuación: *Diplodia pinea*

Diplodia pinea puede infectar pinos y otras coníferas bajo una amplia variedad de condiciones debido a su naturaleza oportunista, por lo tanto es difícil establecer medidas de control efectivas. Su amplia presencia en el País Vasco hace impracticable la posibilidad de erradicar la enfermedad.

Las revisiones periódicas de las masas forestales de coníferas son una medida necesaria para estimar la evolución de la enfermedad y determinar si el plan de control del hongo se muestra efectivo. En un periodo de 10 años sería recomendable volver a realizar un muestreo como el realizado en este trabajo para comprobar la evolución de los grupos de compatibilidad vegetativa. De esta manera se podría determinar si la diversidad de este hongo aumenta con introducciones y establecimiento de nuevos VCG. El aumento de diversidad del hongo podría suponer una mayor capacidad de infección por parte de estas nuevas cepas y provocar daños en zonas en las que actualmente apenas supera el carácter saprófito.

La detección de *Diplodia pinea* en semillas forestales de coníferas no supone el rechazo de los lotes afectados. Al ser un hongo de distribución tan amplia y tan extendido en nuestras masas de coníferas no están establecidas medidas legales obligatorias a este respecto. Pero en el caso de semilla de importación se debería actuar de manera más estricta. Ya hemos visto en este trabajo (capítulo 4) que la introducción de nuevos VCG es posible, con los problemas asociados que esto genera. Creemos conveniente establecer la exigencia de que las semillas de importación deban estar libres de este hongo.

En cuanto al cultivo de las plántulas en vivero es necesario mantener condiciones estrictas de limpieza y retirar las plantas dañadas cuanto antes para evitar la presencia de inóculo. Estas medidas culturales se pueden complementar con control químico (Stanosz & Smith 1996). En algunos viveros se están empezando a conseguir buenos resultados aplicando control biológico con especies de hongos del género *Trichoderma* (Swart et al. 1985, Swart & Wingfield 1991a, Behrendt et al. 1995, Iturritxa 1999 y 2001).

Aunque la aplicación de control químico se muestra efectiva en vivero, esta medida es inviable en plantaciones por motivos económicos y medioambientales (Wingfield et al. 2001). Las prácticas silvícolas deberían realizarse con especial cuidado. Hay que poner especial atención en las entresacas para no dañar los árboles que se quedan en pie. Las podas de formación se deben adecuar a las épocas frías, cuando la esporulación del hongo sea menor. Se debe reducir la intensidad de poda para hacer menos heridas a los árboles y estresarlos menos por la pérdida de ramas. La poda debe realizarse con herramientas adecuadas. No se debe podar con hacha ni con sierra por las heridas que producen que dificultan una adecuada cicatrización. Lo más efectivo es utilizar tijerones de poda y dejar las heridas al ras del tronco para favorecer una cicatrización limpia y lo más rápida posible. También es recomendable la aplicación de productos protectores y cicatrizantes en las heridas (Swart et al. 1985, Swart & Wingfield 1991a, Iturritxa 1999 y 2001).

Suplementar con fertilizantes las plantaciones puede reducir el estrés nutricional de las plantas y hacerlas menos susceptibles al hongo (Swart & Wingfield 1991a). Sin embargo, otros autores desaconsejan la fertilización porque puede reducir la resistencia a *Diplodia pinea* y pueden agravar problemas de eutrofización en zonas acuáticas (Blodgett et al. 2005). Otra manera de evitar las pérdidas por *Diplodia pinea* es tratar de reducir el estrés hídrico de los pinos en campo, aunque esta medida es difícil de aplicar en repoblaciones (Blodgett et al. 1997) y en el País Vasco no se ha detectado como un problema esencial.

El método más práctico de control de este hongo es la búsqueda de resistencias en las especies cultivadas y la sustitución de especies susceptibles por otras más resistentes. Para ello se necesita información sobre el comportamiento de estas especies y sobre cómo responderán a las condiciones ambientales. Las variaciones en las condiciones climáticas y de sitio hacen que se requieran diferentes especies y procedencias para ser efectivos con este método (Gibson 1979, Swart et al. 1985, Swart & Wingfield 1991a). Al igual que para el caso de *Fusarium circinatum*, las secuoyas (*Sequoia sempervirens* y *Sequoiadendron giganteum*) representan una buena alternativa de cultivo forestal por su resistencia. Lo comentado para las especies frondosas en el apartado de *Fusarium circinatum* también es válido aquí.

Las zonas proclives a las tormentas de granizo o fuertes vendavales en ningún caso se deberían repoblar con especies de coníferas sensibles a *Diplodia pinea* (zonas con niveles 4 y 5 del mapa de la fig. 6.14).

7.4 Mejora genética

En este trabajo ya hemos visto que existen ciertos porcentajes de resistencia individual en *Pinus radiata* frente a las dos enfermedades (tabla 5.10) Si se considera necesario mantener el cultivo de esta especie en el País Vasco, sobre todo en las zonas de riesgo de enfermedades de chancro marcadas en los mapas de las figuras 6.14, 6.16 y 6.18, se debe iniciar un programa de mejora genética basado en criterios de resistencia a *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* de forma conjunta.

Además, dentro de los criterios de selección de individuos, se deberían contemplar aspectos como el rápido crecimiento, buenas características de forma como fustes rectos y ramas finas de inserción perpendicular al tronco, buena producción de madera de calidad y buena respuesta a prácticas silvícolas. La selección de individuos debería ser amplia y continua en el tiempo para no estrechar la base genética de la población y poder prevenir problemas futuros con más garantías.

Junto con las líneas de selección de este programa de mejora genética deberían contemplarse las posibilidades que ofrecen las técnicas de generación de resistencias inducidas. Ésta es una técnica muy prometedora para poder controlar infecciones por parte de *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* (Gordon et al. 1998b, Bonello et al. 2001, Blodgett et al. 2002).

Estas recomendaciones se han realizado para el contexto actual de repoblaciones forestales en el País Vasco. La importancia económica de este sector no debería ocultar el hecho de que un tipo de explotación tan intensivo como el que se realiza con *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus* en el País Vasco puede verse comprometido en un futuro. La proliferación de insectos y enfermedades favorecida por la estructura de monocultivos, las talas a matarrasa, la proliferación de pistas de saca, las pérdidas de suelo en pendientes pronunciadas como se dan en gran parte de las zonas donde se cultivan estas especies, son problemas que no deberían ser obviados en una política forestal que pretenda mantenerse sostenible. Una planificación a largo plazo debería ir encaminada a un cambio de las formas de explotación forestal que favorezca la ruptura de los monocultivos con más diversidad de especies cultivadas y sea menos agresiva con el entorno. En definitiva, una explotación más racional de los recursos de nuestras masas de árboles sin poner en peligro el carácter forestal del País Vasco.

8. CONCLUSIONES



Parque de madera de pino radiata

8. CONCLUSIONES

1.- Las enfermedades “marchitez de los brotes” y “chancro resinoso del pino”, causadas por los hongos *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* respectivamente, son una seria amenaza para los cultivos forestales del País Vasco, sobre todo para la especie *Pinus radiata*, dominante en el piso bioclimático templado de este territorio.

2.- Se ha caracterizado el agente causante de la enfermedad llamada “marchitez de los brotes” en las masas de coníferas, incidiendo sobre todo en las repoblaciones de la especie *Pinus radiata*. Para ello se ha realizado un muestreo de cepas de este hongo. Hemos aislado y caracterizado 83 cepas para este estudio. De ellas, 54 provienen de la CAPV, 10 de Navarra, 9 de Chile y 10 de Nueva Zelanda. Todas estas cepas se conservan para futuros estudios en el centro de investigación NEIKER-Tecnalia de Arkaute (Álava).

3.- Todas las cepas, a excepción de una, pertenecen a la especie *Diplodia pinea*, tanto por sus características morfológicas como por el análisis molecular. No hemos identificado *Diplodia scrobiculata* en este estudio. Todas las cepas aisladas han resultado patogénicas sobre *Pinus radiata*. La única cepa no perteneciente a *Diplodia pinea* se aisló sobre *Chamaecyparis lawsoniana* y también resultó patogénica en *Pinus radiata*.

4.- Hemos detectado un total de 20 grupos de compatibilidad vegetativa diferentes, de los que 12 están presentes en la CAPV, junto con otro adicional detectado en Navarra. Se han detectado nuevos grupos de compatibilidad vegetativa en semilla foránea de Chile y Nueva Zelanda. Estas nuevas introducciones son también patogénicas, incrementan la diversidad genotípica y la capacidad de colonizar nuevos ecosistemas y especies, incluso en condiciones adversas.

5.- La población aparece con un VCG ampliamente extendido y otros muy pequeños que aparecen cuando el muestreo se intensifica a los niveles de plantación y árbol. Posteriores muestreos deberían respetar este tipo de muestreo jerárquico para poder comprobar la evolución de estos VCG.

6.- La diversidad de *Diplodia pinea* en el País Vasco se considera baja comparada con las poblaciones de este hongo en Norteamérica, en donde se consideran autóctonas. Pero es similar a la de otras zonas como los Alpes europeos y Sumatra, donde *Diplodia pinea* también se considera autóctona. La introducción de nuevas cepas podría suponer un aumento de la diversidad en el futuro y ampliar los problemas generados por este hongo.

7.- Hemos utilizado las inoculaciones controladas en invernadero como método más idóneo para determinar niveles de susceptibilidad o resistencia frente a los dos patógenos por parte de las especies forestales más utilizadas en el País Vasco. *Pinus radiata* ha mostrado niveles altos de susceptibilidad, tanto frente a *Diplodia pinea* como frente a *Fusarium circinatum*.

8.- La mayoría de especies cultivadas o autóctonas de pino en España muestran cierta resistencia o moderada susceptibilidad a *Fusarium circinatum* pero moderada o alta susceptibilidad a *Diplodia pinea*. Estas especies son *Pinus pinea*, *P. nigra* subsp. *laricio*, *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. sylvestris* y *P. canariensis*. Este caso se repite en otras especies como *Larix kaempferi*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea sitchensis*, *P. jezoensis* y *P. glauca*.

9.- Las dos cupresáceas *Sequoia sempervirens* y *Sequoiadendron giganteum* se muestran resistentes a los dos patógenos. En esta misma línea, *Pinus taeda* ha mostrado resistencia moderada a los dos hongos.

10.- La variabilidad intraespecífica encontrada en cuanto a resistencia a los patógenos puede suponer un buen punto de partida para programas de mejora genética basados en individuos resistentes. En todas las especies testadas hemos encontrado individuos con características resistentes. La resistencia genética es un componente práctico para el control de estas enfermedades, si bien deben tenerse en cuenta otros factores dentro de una estrategia de control integrado.

11.- Hemos realizado un amplio muestreo (958 puntos) para la detección de estas dos enfermedades y establecer su distribución de manera adecuada. Estos datos forman una sólida base para futuros trabajos que pretendan estudiar la evolución de estos dos patógenos en el País Vasco.

12.- *Diplodia pinea* se encuentra distribuida por casi todas las plantaciones forestales del género *Pinus* en el País Vasco. Los niveles más altos de infección y daños en las masas forestales producidos por *Diplodia pinea* se dan en zonas afectadas por granizadas o fuertes vendavales durante los últimos 10 años (2001-09).

13.- Debido a esta alta correlación no ha podido establecerse una regresión. Sin embargo, se ha elaborado un mapa de riesgos basándonos en los valores de resistencia o susceptibilidad de las especies de coníferas presentes en el País Vasco y la presencia de vendavales o granizadas durante los últimos 10 años (2001-09).

14.- *Fusarium circinatum* se distribuye casi exclusivamente en masas de *Pinus radiata* en la zona noreste de Gipuzkoa y dos zonas del centro de Bizkaia. Su distribución responde a un patrón de agrupamiento. Según nuestros datos actuales, esta especie parece tener su óptimo en el piso bioclimático templado oceánico.

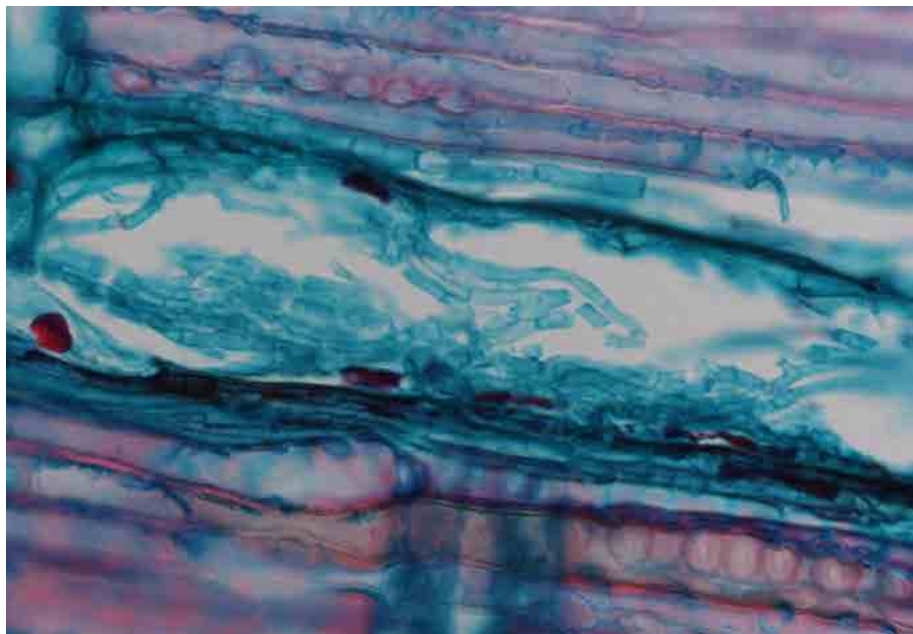
15.- La distribución actual de *Fusarium circinatum* puede explicarse con un modelo matemático que explica el 92,1% de los casos a partir de los datos de Temperatura media anual, Precipitación y Granizadas. Sin embargo, puede lograrse un modelo matemático de distribución un poco más exacto en base al índice los₂ (93,8%). Los niveles altos de precipitación en épocas cálidas del año parecen ser los factores más determinantes.

16.- Hemos elaborado un mapa de riesgos para *Fusarium circinatum*, basado en una regresión logística en la que interviene este índice y la resistencia o susceptibilidad de las especies de coníferas presentes en el País Vasco.

17.- Basándonos en los resultados de este estudio presentamos unas recomendaciones de gestión para estas dos enfermedades basadas en tres aspectos: control de semilla, prácticas culturales en vivero y prácticas silvícolas en plantaciones. La amplia presencia de *Diplodia pinea* en el País Vasco hace recomendable establecer medidas de control que eviten que se manifieste como parásito. En el caso de *Fusarium circinatum*, su distribución más restringida y el cumplimiento de normativas comunitarias y nacionales, determinan que el cometido de las medidas propuestas sea la erradicación del patógeno.

18.- La mejora genética y las posibilidades que ofrece la inducción de resistencias son herramientas importantes a tener en cuenta en una gestión forestal que pretenda mantener unas repoblaciones forestales productivas y sanas.

9. BIBLIOGRAFÍA



Hifas de *Fusarium circinatum* invadiendo un canal resinifero de pino radiata

9. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, D. 1989. *Incidence of pine pitch canker in California 1988-1989*. 25 pp. Sacramento. California Department of Forestry and Fire Protection.
- ADAMS, G., S. HAMMAR & T. PROFFER 1990. Vegetative compatibility in *Leucostoma personii*. *Phytopathology* **80**: 287-291.
- AEGERTER, B. J. & T. R. GORDON 2006. Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecology and Management* **235**: 14-17.
- AEGERTER, B. J., T. R. GORDON, A. J. STORER & D. L. WOOD 2003. *Pitch canker: A technical review*. 13 pp. University of California. Publication 21616.
- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant pathology*. 922 pp. 5th edition. New York. Academic Press.
- AIZPURU, I., P. CATALÁN & F. GARÍN 1996. *Guía de los árboles y arbustos de Euskal Herria*. 477 pp. Vitoria-Gasteiz. Servicio de Publicaciones del Gobierno Vasco.
- ÁLVAREZ, E. 2005. *Fusarium circinatum* en los viveros forestales. *Foresta* **31**: 14-16.
- AMMON, V. & V. P. MUKUND 2000. Pitch canker on Southern Yellow pines. *Ornamental and Tree Diseases. Plant Disease Dispatch Sheets*. Abril, 2000.
- ANAGNOSTAKIS S. L., B. HAU & J. KRANZ 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease* **70**: 536-538.
- ANDERSON, R. L., E. BELCHER & T. MILLER 1984. Occurrence of seed fungi inside slash pine seeds produced in seed orchards in the United States. *Seed Science and Technology* **12**: 795-799.
- ARBOFUX – DIAGNOSEDATEN BANK FÜR GEHÖLZE 2010. Disponible en <http://www.arbofux.de/diplodia-triebsterben-an-kiefer.html> (verificado 19 diciembre 2010). Deutschland.
- ASEGINOLAZA, C., D. GÓMEZ, X. LIZUR, G. MONTSERRAT, G. MORANTE, M. R. SALAVERRIA & P. M. URIBE-ECHEBARRIA 1989. *Vegetación de la Comunidad Autónoma del País Vasco*. 361 pp. Vitoria-Gasteiz. Servicio de Publicaciones del Gobierno Vasco.
- ASOCIACIÓN DE PROPIETARIOS FORESTALES DE GUIPÚZCOA (EDS.) 2003. *Repoblación y manejo forestal*. 122 pp. San Sebastián. D. F. G.
- AYRES, M. P. & M. J. LOMBARDEO 2000. Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens. *Science of the Total Environment* **262**: 263-286.
- BARROWS-BROADBENT, J. B. & L. D. DWINELL 1983. Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in four species of southern pines. *Phytopathology* **73**: 882-889.

- BEGA, R. J., R. S. SMITH, A. P. MARTINEZ & C. J. DAVIS 1978. Severe damage to *Pinus radiata* and *Pinus pinaster* by *Diplodia pinea* and *Lophodermium* spp. on Molakai and Lunai in Hawaii. *Plant Disease Reporter* **62**: 311–329.
- BEHRENDT, C. J., R. A. BLANCHETTE & R. L. FARRELL 1995. Biological control of blue-stain fungi in wood. *Phytopathology* **85**: 92-97.
- BERRY, C. R. & G. H. HEPTING 1959. Pitch canker of southern pines. *Forest Pest Leaflet* **35**: 30.
- BIHON, W., B. SLIPPERS, T. BURGESS, M. J. WINGFIELD & B. D. WINGFIELD 2010. *Diplodia scrobiculata* found in the southern hemisphere. *Forest Pathology* on line. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0329.2010.00649.x/abstract> (verificado 9 octubre 2010).
- BLAKESLEE, G. M. & D. L. ROCKWOOD 1999. Variation in resistance to pitch canker in slash and loblolly pines. En M. E. Devey, A. C. Matheson & T. R. Gordon (Eds.) *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California, USA, 30 nov - 3 dic 1998*: pp. 70-75. Kingston ACT: CSIRO Australia.
- BLAKESLEE, G. M. & D. L. ROCKWOOD 1978. Variations in resistance of slash pine to pitch canker caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Phytopathology News* **12**: 207-208.
- BLAKESLEE, G. M., L. D. DWINELL & R. L. ANDERSON 1980. *Pitch canker of southern pines: identification and management considerations*. 15 pp. USA. USDA Forest Service.
- BLAKESLEE, G. M., S. H. KRATKA, R. A. SCHMIDT & C. S. MOSES 1978a. Sporodochia of the pitch canker fungus (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) as found in diseased slash pine in Florida. *Plant Disease Reporter* **62**: 656-657.
- BLAKESLEE, G. M. & S. W. OAK 1979. Significant mortality associated with pitch canker infection of slash pine in Florida. *Plant Disease Reporter* **63**: 1023-1025.
- BLAKESLEE, G. M., S. W. OAK, W. GREGORY & C. S. MOSES 1978b. Natural associations of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* with *Pissodes nemorensis*. *Phytopathology News* **12**: 207-208.
- BLODGETT, J. T., M. BELLIZZI & P. BONELLO 2002. Induction of systemic resistance/susceptibility in *Pinus nigra* inoculated with *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology* **92**: 27-31.
- BLODGETT, J. T. & P. BONELLO 2003. The aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* on Austrian pine varies with isolate group and site of infection. *Forest Pathology* **33**: 15-19.
- BLODGETT, J. T., P. BONELLO & G. R. STANOSZ 2003. An effective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea* from asymptomatic pines. *Forest Pathology* **33** (6): 395-404.
- BLODGETT, J. T., A. EYLES & P. BONELLO 2007. Organ-dependent induction of systemic resistance and systemic susceptibility in *Pinus nigra* inoculated with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Tree Physiology* **27**: 511-517.

- BLODGETT, J. T., D. A. HERMS & P. BONELLO 2005. Effects of fertilization on red pine defense chemistry and resistance to *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Ecology and Management* **208**: 373-382.
- BLODGETT, J. T., E. L. KRUGER & G. R. STANOSZ 1997. *Sphaeropsis sapinea* and water stress in a red pine plantation in Central Wisconsin. *Phytopathology* **87**: 429-434.
- BLODGETT, J. T. & G. R. STANOSZ 1997. Differential inhibition of *Sphaeropsis sapinea* morphotypes by a phenolic compound and several monoterpenes of red pine. *Phytopathology* **87**: 606-609.
- BLODGETT, J. T. & G. R. STANOSZ 1998. Monoterpene and phenolic compound concentrations in water-stressed red pine inoculated with *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology* **88**: 245-251.
- BLODGETT, J. T. & G. R. STANOSZ 1999. Differences in aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* RAPD marker group isolates on several conifers. *Plant Disease* **83**: 853-856.
- BOE núm. 137 viernes 9 junio 2006 22069 MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN **10287 REAL DECRETO 637/2006**, de 26 de mayo, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg et O'Donnell.
- BONELLO, P., T. R. GORDON & A. J. STORER 2001. Systemic induced resistance in Monterey pine. *Forest Pathology* **31**: 99-106.
- BRAGANÇA, H., E. DIOGO, F. MONIZ & P. AMARO 2009. First report of pitch canker on pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease* **93**: 1079.
- BRITZ, H., T. A. COUTINHO, T. R. GORDON & M. J. WINGFIELD 2001. Characterization of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Mexico. *South African Journal of Botany* **67**: 609-614.
- BRITZ, H., T. A. COUTINHO, M. J. WINGFIELD & W. F. O. MARASAS 2002. Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Sydowia* **54**: 9-22.
- BRITZ, H., T. A. COUTINHO, M. J. WINGFIELD, W. F. O. MARASAS, T. R. GORDON & J. F. LESLIE 1999. *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1198-1201.
- BRITZ, H., T. A. COUTINHO, B. D. WINGFIELD, W. F. O. MARASAS & M. J. WINGFIELD 2005. Diversity and differentiation in two populations of *Gibberella circinata* in South Africa. *Plant Pathology* **54**: 46-52.
- BRITZ, H., M. J. WINGFIELD, T. A. COUTINHO, W. F. O. MARASAS & J. F. LESLIE 1998. Female fertility and mating type distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2094-2095.

- BROWN, B. N., D. I. BEVEGE & R. E. STEVENS 1981. Site stress and *Diplodia*-induced die-back and death of hail damaged slash pine. En: *Proceedings 17th International IUFRO Congress. Methodology for determining the impact of destructive agents and their interactions with site factors*. Kyoto, Japan, september 1981.
- BROWN, I. 1998. The Last Refuge: California's radiate pines. Part I: the natural populations. *New Zealand Tree Grower* **19** (5): 13-17.
- BROWN, I. 1999a. The Last Refuge: California's radiate pines. Part II: the human impact. *New Zealand Tree Grower* **20** (3): 27-30.
- BROWN, I. 1999b. The Last Refuge: California's radiate pines. Part III: conclusion. *New Zealand Tree Grower* **20** (4): 22-23.
- BROWNING, J. 1980. Genetic protective mechanism of plantpathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance. En M. K. Harris (Eds.) *Biology and Breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants*: pp. 52-75. Texas Agricultural College Station.
- BURGESS, T. I., B. D. WINGFIELD & M. J. WINGFIELD 2001. Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*. *Mycological Research* **105**: 1331-1339.
- BURGESS, T. I. & M. J. WINGFIELD 2001. Exotic pine forestry in the southern hemisphere: a brief history of establishment and quarantine practices. *South African Forestry Journal* **192**: 79-84.
- BURGESS, T. I., M. J. WINGFIELD & B. D. WINGFIELD 2004. Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using simple sequence repeat (SSR) markers. *Australasian Plant Pathology* **33**: 513-519.
- CAMPOS, J. A. 2010. *Flora alóctona del País Vasco y su influencia en la vegetación*. 484 pp. Tesis doctoral. Leioa. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
- CARLILE, M. J., S. C. WATKINSON & G. W. GOODAY 2001. *The Fungi*. 588 pp. Elsevier (2^a ed.).
- CARLUCCI, A., L. COLATRUGLIO & S. FRISULLO 2007. First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (southern Italy). *Plant Disease* **91**: 1683.
- CAVANILLES, A. 1858. *Lequeitio en 1857*. 151 pp. Madrid. Imprenta de J. Martín Alegría.
- CEDEÑO, L., C. CARRERO, W. FRANCO & A. TORRES 2001. *Sphaeropsis sapinea* asociado con quema del cogollo, muerte regresiva y cáncer en troncos, ramas y raíces del pino Caribe en Venezuela. *Interciencia* **26** (5): 210-215
- CHOU, C. K. S. 1976a. A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*: I. Symptoms, disease, development, and isolation of pathogen. *New Zealand Journal of Forestry Science* **6** (1): 72-79.
- CHOU, C. K. S. 1976b. A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*: II. Inoculation studies. *New Zealand Journal of Forestry Science* **6** (3): 409-420.

- CHOU, C. K. S. 1977. Effect of tree age on *Diplodia pinea* infection of *Pinus radiata*. *Plant Disease Reporter* **61**: 101-105.
- CHOU, C. K. S. 1987. Crown wilt of *Pinus radiata* associated with *Diplodia pinea* infection of woody stems. *European Journal of Forest Pathology* **17**: 398-411.
- CHOU, C. K. S. 1978. Penetration of young stems of *Pinus radiata* by *Diplodia pinea*. *Physiological Plant Pathology* **12**: 189-192.
- CHOU, C. K. S. 2007. Perspectives of disease threat in large-scale *Pinus radiata* monoculture - the New Zealand experience. *European Journal of Forest Pathology* **21**: 71-81.
- CHOU, C. K. S. 1982a. *Diplodia pinea*. Infection of *Pinus radiata* seedlings: Effect of temperature and shoot wetness duration. *New Zealand Journal of Forestry Science* **12** (3): 425-437.
- CHOU, C. K. S. 1982b. Susceptibility of *Pinus radiata* seedlings to infection by *Diplodia pinea* as affected by pre-inoculation conditions. *New Zealand Journal of Forestry Science* **12** (3): 438-441.
- CHOU, C. K. S. & M. MACKENZIE 1988. Effect of pruning intensity and season on *Diplodia pinea* infection of *Pinus radiata* stem through pruning wounds. *European Journal of Forest Pathology* **18**: 437-444.
- CHOU, C. K. S. & J. A. ZABKIEWICZ 1976. Toxicity of monoterpenes from *Pinus radiata* cortical oleoresin to *Diplodia pinea* spores. *European Journal of Forest Pathology* **6**: 354-359.
- CLARK, S. & T. R. GORDON 1999. Susceptibility of eleven Californian conifers to pitch canker caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. En M. E. Devey, A. C. Matheson & T. R. Gordon (Eds.) *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California, USA, 30 nov - 3 dic 1998*: p. 76. Kingston ACT: CSIRO Australia.
- CLERJEAU, M. 1976. Exigences thermiques de croissance et d'agressivité de divers isolats de *Pyrenochaeta lycopersici* Schn et Ger. *Annual Review of Phytopathology* **8**: 9-15.
- COAKLEY, S. M., H. SCHERM & S. CHAKRABORTY 1999. Climate change and plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 399-426.
- COBOS-SUÁREZ, J. M. & M. M. RUIZ-URRESTARAZU 1990. Problemas fitosanitarios de la especie *Pinus radiata* D. Don en España, con especial referencia al País Vasco. *Boletín Sanidad Vegetal y Plagas* **16**: 37-53.
- COLLAR-URQUIJO, J. 1995. *Informe de la reunión del grupo de trabajo de laboratorios de diagnóstico y prospecciones fitosanitarias*. Almería, 28 de noviembre-1 de diciembre 1995. Pg: 7.
- COLLET, D. 1991. *Modelling binary data*. 369 pp. London. Chapman and Hall.
- COOK, D. C. & A. C. MATHESON 2008. An estimate of the potential economic impact of pine pitch canker in Australia. *Australian Forestry* **71**: 107-112.

- COPPIN, E., R. DEBUCHY, S. ARNAISE & M. PICARD 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Review* **61** (4): 411-428.
- CORRELL, J. C., T. R. GORDON & A. H. MC CAIN 1992. Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans*. *Phytopathology* **82**: 415-420.
- CORRELL, J. C., T. R. GORDON, A. H. MC CAIN, J. W. FOX, C. S. KOEHLER, D. L. WOOD & M. E. SCHULTZ 1991. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution and canker development on Monterey pine. *Plant Disease* **75**: 676-682.
- CORTESI, P., M. G. MILGROOM & M. BISIACH 1996. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycological Research* **100**: 1087-1093.
- COSCOLLÁ, R. 1980. Incidencia de los factores climatológicos en la evolución de las plagas y enfermedades de las plantas. *Boletín Sanidad Vegetal y Plagas* **6**: 123-139.
- COUTINHO, T. A., E. T. STEENKAMP, K. MONGWAKETSI, M. WILMOT & M. J. WINGFIELD 2007. First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. *Australasian Plant Pathology* **36**: 256-261.
- COVERT, S. F., A. BRILEY, M. M. WALLACE & V. T. MCKINNEY 1999. Partial MAT-2 gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. *Fungal Genetics and Biology* **28**: 43-54.
- CROUS, P. W., B. SLIPPERS, M. J. WINGFIELD, J. RHEEDER, W. F. O. MARASAS, A. J. L. PHILIPS, A. ALVES, T. BURGESS, P. BARBER & J. Z. GROENEWALD 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* **55**: 235-253.
- DA COSTA, E. B. 1955. Effect of blue stain on the strength of *Pinus radiata*. *Forest Products News Letter* **209**: 1-2.
- DAJOZ, R. 2001. *Entomología Forestal. Los insectos y el bosque*. 548 pp. Madrid-Barcelona-México. Ediciones Mundi-Prensa
- DALLARA, P. L., A. J. STORER, T. R. GORDON & D. L. WOOD 1995. *Current status of pitch canker disease in California*. 4 pp. California Department of Forestry and Fire Protection. Jesse Rios Editor.
- DARVAS, J. M., D. B. SCOTT & J. M. KOTZÉ 1978. Fungi associated with damping off in coniferous seedbeds. *South African Forestry Journal* **104**: 15-19.
- DAVIS, J. M., H. WU, J. E. K. COOKE, J. M. REED, K. S. LUCE & C. H. MICHLER 2002. Pathogen challenge, salicylic acid and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in Pine. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 380-387.

- DE WET, J., T. BURGESS, B. SLIPPERS, O. PREISIG, B. D. WINGFIELD & M. J. WINGFIELD 2003. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research* **107**: 557–566.
- DE WET, J., B. SLIPPERS, O. PREISIG, B. D. WINGFIELD & M. J. WINGFIELD 2008. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**: 116-126.
- DE WET, J., M. J. WINGFIELD, T. A. COUTINHO & B. D. WINGFIELD 2000. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico and Indonesia. *Plant Disease* **84**: 151–156.
- DE WET, J., M. J. WINGFIELD, T. A. COUTINHO & B. D. WINGFIELD 2002. Characterisation of the “C” morphotype of the pine pathogen *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Ecology and Management* **161**: 181-188.
- DEACON, J. W. 1997. *Modern Mycology*. 303 pp. Blackwell (3^a ed.).
- DECISIÓN DE LA COMISIÓN DE 18 DE JUNIO DE 2007 (2007/433/CE) sobre medidas provisionales de emergencia para prevenir la introducción y propagación en la Comunidad de *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell. *Diario Oficial de la Unión Europea* 22.6.2007 L **161**: 66-69.
- DEGHI, G. S., T. HUFFMAN & J. W. CULVER 1995. California's native Monterey pine populations: potential for sustainability. *Fremontia* **23**: 14-23.
- DENMAN S., P. W. CROUS, J. W. TAYLOR, J. KANG, I. PASCOE & M. J. WINGFIELD 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* **45**: 129–140.
- DESPREZ-LOUSTAU, M. L., B. MARÇAIS, L. M. LAGENEISEN, D. PIAU & A. VANNINI 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science* **63**: 597-612.
- DESPREZ-LOUSTAU, M. L., C. ROBIN, G. REYNAUD, M. DÉQUÉ, V. BADEAU, D. PIAU, C. HUSSON & B. MARÇAIS 2007. Simulating the effects of a climate-change scenario on the geographical range and activity of forest-pathogenic fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology* **29**: 101-120.
- DICK, M. A. 1999. *Sphaeropsis sapinea*. Diseases of Pines. A Review from a New Zealand Perspective. *New Zealand Forest Health Research* **89** (5): 30-43.
- DICK M. A. & T. REGLINSKI 2003. Induced resistance in *Pinus radiata* seedlings to pine pitch canker. Disponible en: http://www.fhrc.org.nz/documents/NZFHRC_2002-02.pdf (verificado 11 setiembre 2010). New Zealand Forest Health Research Collaborative. New Zealand.

- DIEGO, L. B., M. BERDASCO, M. F. FRAGA, M. J. CAÑAL, R. RODRÍQUEZ & C. CASTRESANA 2004. *Pinus radiata* AAA-ATPase, the expression of which increase with tree ageing. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1597–1599.
- DIRECCIÓN GENERAL DE GESTIÓN FORESTAL. SERVICIO DE PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN FORESTAL 2009. Chancro resinoso del pino. Disponible en: http://portal.aragon.es/portal/page/portal/MEDIOAMBIENTE/MEDIONATURAL/SANIDAD_FORESTAL/BOLETINES/IT_09_Fusarium.pdf (verificado 4 enero 2011). Gobierno de Aragón. Departamento de Medio Ambiente. Zaragoza
- DWINELL, L. D. 2001. *Contamination of Pinus radiata seeds in California by Fusarium circinatum*. 15 pp. USA. USDA Forest Service.
- DWINELL, L. D. 2004. Contamination of *Pinus radiata* seeds in California by *Fusarium circinatum*. Disponible en: <http://mbao.org/1999airc/84dwinel.pdf>. (verificado 4 enero 2011) USDA Forest Service, Southern Research Station. University of Florida.
- DWINELL, L. D. 1999. Global distribution of the pitch canker fungus: En M. E. Devey, A. C. Matheson & T. R. Gordon (Eds.) *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California, USA, 30 nov - 3 dic 1998*: 54-57. Kingston ACT: CSIRO Australia.
- DWINELL, L. D. 1978. Susceptibility of southern pines to infection by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Plant Disease* **62**: 108-111.
- DWINELL, L. D., D. ADAMS, J. J. GUERRA-SANTOS & J. R. M. AGUIRRE 1998. Pitch canker disease of *Pinus radiata*. Paper 3.7.30. *Proceedings of 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh*: 5.2.38.
- DWINELL, L. D., J. BARROWS-BROADBENT & E. G. KUHLMAN 1985. Pitch canker: a disease complex of southern pines. *Plant Disease* **69**: 270-276.
- DWINELL, L. D. & W. R. PHELPS 1977. Pitch canker of slash pine in Florida. *Journal of Forestry* **75** (8): 488-489.
- EASTERLING, D. R., G. A. MEEHL, C. PARMESAN, S. A. CHANGNON, T. R. KARL & L. O. MEARNES 2000. Climate extremes: observations, modelling and impacts. *Science* **289**: 2068-2074.
- EDESIO, J. M. 2006. El Relieve del País Vasco. Euskal Herriko Geografi Goi Ikastaroa/Curso Superior de Geografía. Disponible en: <http://www.ingeba.org/liburua/cursosup/edesio/csgedesio.htm> (verificado 12 junio 2010). Instituto Geográfico Vasco. Euskal Geografi Elkargoa (INGEBA).
- ELDRIDGE, K. G. 1997. Genetic resources of Radiata Pine in New Zealand and Australia. En R. D. Burdon & J. M. Moore (Eds.). *Proceedings of IUFRO'97 genetics of radiata pine: Forest Research Institute Bulletin* **203**: 26-41. Rotorua, Nueva Zelanda.
- ENCISO, E. 2005. *Fusarium circinatum* desde el sector de las empresas de semillas forestales. *Foresta* **31**: 12-13.

- EUSKALMET 2005. Clasificación de territorios climáticos. Disponible en http://www.euskalmet.euskadi.net/s07-5921/es/contenidos/informacion/cla_clasificacion/es_7264/es_clasificacion.html (verificado 14 diciembre 2010). Euskalmet Agencia Vasca de Meteorología. Gobierno Vasco.
- EUSKALMET 2006. Análisis de los elementos climáticos. Disponible en http://www.euskalmet.euskadi.net/s07-5921/es/contenidos/informacion/ana_insolacion/es_7268/es_insolacion.html (verificado 14 diciembre 2010). Euskalmet Agencia Vasca de Meteorología. Gobierno Vasco.
- EUSKALMET 2009. Características geográficas que condicionan la climatología. Disponible en http://www.euskalmet.euskadi.net/s07-5921/es/contenidos/informacion/car_latitud/es_7257/es_latitud.html (verificado 14 diciembre 2010). Euskalmet Agencia Vasca de Meteorología. Gobierno Vasco.
- EUSKALMET 2010. Climatología del País Vasco. Disponible en http://www.euskalmet.euskadi.net/s075921/es/contenidos/informacion/clima_euskadi/es_9759/es_clima_euskadi.html (verificado 22 febrero 2010). Euskalmet Agencia Vasca de Meteorología. Gobierno Vasco.
- EYLES, A., R. CHORBADJIAN, C. WALLIS, R. HANSEN, D. CIPOLLINI, D. HERMS & P. BONELLO 2007. Cross-induction of systemic induced resistance between an insect and a fungal pathogen in Austrian pine over a fertility gradient. *Oecologia* **153** (2): 365-374.
- FARJON, A. 2001. *World Checklist and Bibliography of Conifers. Second Edition*. 309 pp. United Kingdom. The Royal Botanic Gardens, Kew.
- FARJON, A. 2010. *A Handbook of the World's Conifers (Volume II)*. 1112 pp. Leiden-Boston. Brill Academic Publishers.
- FARREL, R. L., S. M. DUNCAN, A. P. RAM, S. J. KAY, E. HADAR, Y. HADAR, R. A. BLANCHETTE, T. C. HARRINGTON & D. MCNEW 1997. Causes of sapstain in New Zealand. En B. Kreber (Ed.). Proceedings of IUFRO'97 strategies for improving protection of logs and lumber: *Forest Research Institute Bulletin* **204**: 25-29. Rotorua, New Zealand.
- FERNÁNDEZ-GOLFÍN, J. I. 1996. *Manual de usuario. Pino insignis del País Vasco*. 79 pp. Vitoria-Gasteiz. Centro Técnico de la Madera del País Vasco.
- FIELD, A. 2009. *Discovering Statistics using SPSS (Third Edition)*. 821 pp. London. SAGE Publications.
- FISHER N. L., L. W. BURGESS, T. A. TOUSSOUN & P. E. NELSON 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology* **72**: 151-153.
- FLOWERS, J. L., J. R. HARTMAN & L. J. VAILLANCOURT 2006. Histology of *Diplodia pinea* in diseased and latently infected *Pinus nigra* shoots. *Forest Pathology* **36**: 447-459.
- FORTIN, M. J. & M. DALE 2005. *Spatial Analysis. A guide for ecologists*. 365 pp. United Kingdom. Cambridge University Press.

- FOSTER, R. C. & G. C. MARKS 1968. Fine structure of the host-parasite relationship of *Diplodia pinea* on *Pinus radiata*. *Australian Forestry* **32**: 211-225.
- FOX, J. W., D. L. WOOD, C. S. KOEHLER & S. T. O'KEEFE 1990. Distribution and abundance engraver beetles (Scolytidae: *Ips* spp.) on Monterey pines infected with pitch canker. *Canadian Entomologist* **122**: 1157-1166.
- FOX, J. W., D. L. WOOD, C. S. KOEHLER & S. T. O'KEEFE 1991. Engraver beetles (Scolytidae: *Ips* species) as vectors of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans*. *Canadian Entomologist* **123**: 1355-1367.
- FRAEDRICH, S. W., T. MILLER & S. J. ZARNOCH 1994. Factors affecting the incidence of black seed rot in slash pine. *Canadian Journal of Forest Research* **24**: 1717-1725.
- GABRIEL, D. W. & B. G. ROLFE 1990. Working models of specific recognition in Plant-Microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology* **28**: 365-391.
- GADGIL, P. D., L. S. BULMAN, R. CRABTREE, R. N. WATSON, J. C. O'NEIL & K. L. GLASSEY 2000. Significance to New Zealand forestry of contamination on the external surfaces of shipping containers. *New Zealand Journal of Forestry Science* **30**: 341-358.
- GADGIL, P. D., M. DICK, J. SIMPSON, D. BEJAKOVICH, M. ROSS, J. BAIN, G. HORGAN & R. WYLIE 2003. *Management plan response to an incursion of pine pitch canker in Australia or New Zealand*. 99 pp. Australia. Forestry and Forest Products Committee.
- GADGIL, P. D. & T. N. FLINT 1983. Assessment of the risk of introduction of exotic forest insects and diseases with imported tents. *New Zealand Journal of Forestry* **28**: 58-67.
- GALSKY, A. G., H. L. MONOSON, F. J. PIKUL JR. & J. S. THOMPSON 1973. Promotion of perithecial initials in *Monacrosporium doedycoides* by 6-methyl purine. *American Journal of Botany* **60**: 300-303.
- GANLEY, R. J., M. S. WATT, L. MANNING & E. ITURRITXA 2009. A global climatic risk assessment of pitch canker disease. *Canadian Journal of Forest Research* **39** (11): 2246-2256.
- GARAYO, J. M. 1991. Las explotaciones forestales privadas de pino insignis en el País Vasco. *Sustrai* **22**: 65-67.
- GARCÍA-SERNA, I. 1996. Estaquillado de pino insignis: Aplicaciones a la mejora forestal. *Sustrai* **42**: 72-74.
- GARCÍA-SERNA, I. & E. ITURRITXA 2008. Diversidad de los aislados de *Diplodia pinea* procedentes de Chile, Nueva Zelanda y las comunidades autónomas del País Vasco y Navarra. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* **26**: 161-164.
- GARCÍA-SERNA, I., N. MESANZA & E. ITURRITXA 2008. *Diplodia pinea* in forest plantations of *Pinus radiata* in northern Spain: Diversity and origin of the Spanish population. *Journal of Plant Pathology* **90** (2): 366.

- GARCÍA-SERNA, I., M. T. PASCUAL & B. SAMANIEGO 1997. Recogida de semilla mejorada mediante determinación de rodales de *Pinus radiata* en el País Vasco. *Actas del I Congreso Forestal Hispano Luso y II Congreso Forestal Español*. Vol. II: 243-248.
- GEO-EUSKADI 2010. Directorio/Cartografía/Geocientífica/ de FTP. Disponible en ftp://ftp.geo.euskadi.net/cartografía/Geocientífica/Geología/ (ftp.geo.euskadi.net).
- GIBSON, I. A. S. 1979. *Diseases of forest trees widely planted as exotics in the tropics and Southern Hemisphere. Part II. The genus Pinus*. 135 pp. Londres. Commonwealth Mycological Institute.
- GILMOUR, J. W. 1964. Survey of *Diplodia* whorl canker in *Pinus radiata*. *New Zealand Forest Service* **5**: 4.
- GOBIERNO VASCO-EUSKO JAURLARITZA 2007. Respuesta a la solicitud de información documentada presentada por D. Leopoldo Barreda de los Ríos, parlamentario del Grupo Popular Vasco-Euskal Talde Popularra, al consejero de agricultura, pesca y alimentación, relativa a actuaciones del departamento en relación con el chancro del pino. *Publicación del Parlamento Vasco* **08/10/05/03/1322-8582**.
- GORDON, T. R. 1999. Discussion. En M. E. Devey, A. C. Matheson & T. R. Gordon (Eds.) *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California, USA, 30 nov - 3 dic 1998*: p. 69. Kingston ACT: CSIRO Australia.
- GORDON, T. R. 2006. Pitch canker disease of pines. *Phytopathology* **96**: 657-659.
- GORDON, T. R., S. C. KIRKPATRICK, B. J. AEGERTER, D. L. WOOD & A. J. STORER 2006a. Susceptibility of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) to pitch canker, caused by *Gibberella circinata* (anamorph = *Fusarium circinatum*). *Plant Pathology* **55**: 231-237.
- GORDON, T. R., S. C. KIRKPATRICK, J. C. PETERSEN & C. J. FRIEL 2006b. Potential diversity in vegetative compatibility groupings in the California population of *Gibberella circinata*. *Mycological Research* **110**: 936-940.
- GORDON, T. R., D. OKAMOTO, A. J. STORER & D. L. WOOD 1998a. Susceptibility of five landscape pines to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Horticultural Science* **33**: 868-871.
- GORDON, T. R., A. J. STORER & D. OKAMOTO 1996. Population structure of the pitch canker pathogen, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, in California. *Mycological Research* **100**: 850-854.
- GORDON, T. R., A. J. STORER & D. L. WOOD 2001. The pitch canker epidemic in California. *Plant Disease* **85**: 1128-1139.
- GORDON, T. R., K. R. WIKLER, S. L. CLARK, D. OKAMOTO, A. J. STORER & P. BONELLO 1998b. Resistance to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, in Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Pathology* **47**: 706-711.

- GUERRA-SANTOS, J. J. 1999. Pitch canker in Monterey pine in Mexico. En M. E. Devey, A. C. Matheson & T. R. Gordon (Eds.) *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California, USA, 30 nov - 3 dic 1998*: 58-61. Kingston ACT: CSIRO Australia.
- GUERRA-SANTOS, J. J. & D. C. TOVAR 1991. Algunos aspectos sobre el cancro resinoso de los pinos. VI Simposio Nacional Sobre Parasitología Forestal, octubre 1991. Unidad de Congresos del Colegio de Poatradados, Montecillos, Edo, México.
- GUISAN, A. & N. E. ZIMMERMANN 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling* **135**: 147-186.
- HADDOW, W. R. & F. S. NEWMAN 1942. A disease of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) caused by the fungus *Diplodia pinea* Kicks associated with the pine spittlebug (*Aphrophora parallela* Say.) *Royal Canadian Institute Transcripts* **24**: 1-18.
- HAMMERSCHMIDT, R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 77-84.
- HAWKSWORTH, D. L., P. M. KIRK, B. C. SUTTON & D. N. PEGLER 1995. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8ª ed. 616 pp. Wallingford, United Kingdom. CAB International.
- HEPTING, G. H. & E. R. ROTH 1946. Pitch canker, a new disease of some southern pines. *Journal of Forestry* **44**: 742-744.
- HEPTING, G. H. & E. R. ROTH 1953. Host relations and spread of the pine pitch canker disease. *Phytopathology* **43**: 475.
- HERRERA, T. & M. ULLOA 1990. *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. 552 pp. México. Universidad Nacional Autónoma de México & Fondo de Cultura Económica.
- HIBBETT, D. S., M. BINDER, J. F. BISCHOFF, M. BLACKWELL, P. F. CANNON, O. E. ERIKSSON, S. HUHNENDORF, T. JAMES, P. M. KIRK, R. LÜCKING, H. THORSTEN LUMBSCH, F. LUTZONI, P. B. MATHENY, D. J. MC LAUGHLIN, M. J. POWELL, S. REDHEAD, C. L. SCHOCH, J. W. SPATAFORA, J. A. STALPERS, R. VILGALYS, M. C. AIME, A. APTROOT, R. BAUER, D. BEGEROW, G. L. BENNY, L. A. CASTLEBURY, P. W. CROUS, Y. DAI, W. GAMS, D. M. GEISER, G. W. GRIFFITH, C. GUEIDAN, D. L. HAWKSWORTH, G. HESTMARK, K. HOSAKA, R. A. HUMBER, K. D. HYDE, J. E. IRONSIDE, U. KÖLJALG, C. P. KURTZMAN, K. LARSSON, R. LICHTWARDT, J. LONGCORE, J. MIADLIKOWSKA, A. MILLER, J. MONCALVO, S. MOZLEY-STANDRIDGE, F. OBERWINKLER, E. PARMASO, V. REEB, J. D. ROGERS, C. ROUX, L. RYVARDEN, J. P. SAMPAIO, A. SCHÜBLER, J. SUGIYAMA, R. G. THORN, L. TIBELL, W. A. UNTEREINER, C. WALKER, Z. WANG, A. WEIR, M. WEISS, M. M. WHITE, K. WINKA, Y. YAO & N. ZHANG 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**: 509-547.
- HILDEBRAND, D. M. 2005. *Diplodia pinea*. Disponible en <http://spfnic.fs.fed.us/exfor/data/pestreports.cfm?pestidval=91&langdisplay=english> (verificado 12 junio 2010). USDA Forest Service. USA.

- HODGE, G. R. & W. S. DVORAK 2000. Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. *New Forests* **19**: 241-258.
- HOOVER, K., D. L. WOOD, J. W. FOX & W. E. BROS 1995. Quantitative and seasonal association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, with *Conophthorus radiatae* (Coleoptera: Scolytidae) and *Ernobius punctulatus* Coleoptera: Anobiidae) which infest *Pinus radiata*. *Canadian Entomologist* **127**: 79-91.
- HOOVER, K., D. L. WOOD, A. J. STORER, J. W. FOX & W. E. BROS 1996. Transmission of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, to Monterey pine, *Pinus radiata*, by cone and twig infesting beetles. *Canadian Entomologist* **128**: 981-994.
- HOSMER, D. W. & S. LEMESHOW 1989. *Applied logistic regression*. 307 pp. New York. Wiley.
- HOUSTON, D. R. & H. T. VALENTINE 1988. Beech bark disease: the temporal pattern of cankering in aftermath forests of Maine. *Canadian Journal of Forest Research* **18**: 38-42.
- HUGHES, L. 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Tree* **15**: 56-61.
- HUTCHESON, S. W. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 59-90.
- INDEX FUNGORUM 2008. Disponible en <http://www.indexfungorum.org> (verificado 12 junio 2010). CABI. United Kingdom.
- IKT 1999. El marco natural y social del País Vasco. Disponible en <http://www.nekanet.net/Naturaleza/marco/frameprincipal.htm> (verificado 18 diciembre 2010). Gobierno Vasco. Vitoria.
- IKT 2005. Inventario Forestal CAE 2005. Disponible en <http://www.nasdap.ejgv.euskadi.net> (verificado 12 junio 2010). Gobierno Vasco. Vitoria.
- ITURRITXA, E. 1999. *Distribución del hongo patógeno forestal Sphaeropsis sapinea. Ensayos de patogenicidad y resistencia*. 124 pp. Informe técnico monográfico. Vitoria. Gobierno Vasco.
- ITURRITXA, E. 2001. *Evaluación del estado de las masas forestales de Pinus radiata en las provincias de Bizkaia y Araba*. 190 pp. Informe técnico del Proyecto de Sanidad Forestal 2001. Neiker-Tecnalia. Vitoria. Gobierno Vasco.
- ITURRITXA, E. 2007. *Armillaria, una enfermedad de raíz*. 4 pp. Vitoria. Neiker-Tecnalia.
- ITURRITXA, E., J. AZPITARTE, I. GARCÍA-SERNA & A. TELLERÍA 2001. Micoflora asociada a piñas de *Pinus radiata* susceptible de inhibir la germinación. *Departamento de producción y protección vegetal (Neiker)*. *Informe técnico* **96**: 209-210.
- ITURRITXA, E. & R. GANLEY 2007. Dispersión por vía aérea de esporas de *Diplodia pinea* en tres localidades de la cornisa cantábrica. *Boletín Sanidad Vegetal y Plagas* **33**: 383-390.

- ITURRITXA, E., R. J. GANLEY, J. WRIGHT, E. HEPPE, E. T. STEENKAMP, T. R. GORDON & M. J. WINGFIELD 2011. A genetically homogenous population of *Fusarium circinatum* causes pitch canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain. *Fungal Biology* **115**: 288-295.
- ITURRITXA, E., R. J. GANLEY, J. WRIGHT, E. STEENKAMP, T. R. GORDON & M. J. WINGFIELD 2005. Characterisation of a population of *Fusarium circinatum* from Spain. *Publicación del Parlamento Vasco* **08/10/05/03/1251-8093**: 64-81.
- ITURRITXA, E., G. RENOBALLES, N. MESANZA, E. HEPPE, R. J. GANLEY & M. DICK 2006. Niveles de resistencia a *Fusarium circinatum* y *Sphaeropsis sapinea* en coníferas. En Consejería de Agricultura y Agua (Ed.) *Actas del XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Murcia*: p. 242.
- JALKANEN, A. & U. MANTILLA 2000. Logistic regression models for wind and snow damage in northern Finland based on the National Forest Inventory Data. *Forest Ecology and Management* **135**: 315-330.
- JANKIEWICZ, L. S. & P. SOBICZEWSKY 2003. LAS fitoalexinas y otras sustancias relacionadas con la resistencia de las plantas a los patógenos. En Jankiewicz, L. S. (Coordinador) *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas*: 427-453. México. Mundiprensa.
- JOHNSON, H. 1994. *La Madera. Origen, explotación y aplicaciones del más antiguo recurso natural*. 271 pp. Barcelona. Editorial Blume.
- KAY, S. J., A. AH CHEE, P. O. SALE, J. T. TAYLOR, E. HADAR, Y. HADAR & R. L. FARRELL 2002. Variation among New Zealand isolates of *Sphaeropsis sapinea*. *Forest Pathology* **32**: 109-121.
- KEEN, N. 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Molecular Biology* **19**: 109-122.
- KERÉNYI, Z., K. ZELLER, L. HORNOK & J. F. LESLIE 1999. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4071-4076.
- KIERLE, R. 1978. Effect of storage in different season on sapstain and decay of *Pinus radiata* D. Don in New South Wales. *Australian Forestry* **41** (1): 29-36.
- KOBAYASHI, T. & M. MURAMOTO 1989. Pitch canker of *Pinus luchuensis*, a new disease in Japanese forest. *Forest Pests* **38**: 169-173.
- KOLTAY, A. 2007. Susceptibility of Different Clone Groups of Austrian Pine to *Mycosphaerella pini* E. Rostrup and *Sphaeropsis sapinea* Dyko & Sutton. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica Special Edition 2007*: 47-51.
- KRAUS, H. & W. WITCHER 1977. Survey of pine pitch canker in South-Carolina. *Plant Disease Reporter* **61**: 976-978.
- KRONSTAD, J. W. & C. STABEN 1997. Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics* **31**: 245-276.

- KUHLMAN, E. G. 1982. Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* **74**: 759-768.
- KUHLMAN, E. G., S. D. DIANIS & T. K. SMITH 1982. Epidemiology of pitch canker disease in a loblolly pine seed orchard in North Carolina. *Phytopathology* **72**: 1212-1216.
- KUHLMAN, E. G., L. D. DWINELL, P. E. NELSON & C. BOOTH 1978. Characterization of the *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. *Mycologia* **70**: 1131-1143.
- LANDERAS E., P. GARCÍA, Y. FERNÁNDEZ, M. BRAÑA, O. FERNÁNDEZ-ALONSO, S. MÉNDEZ-LODOS, A. PÉREZ-SIERRA, M. LEÓN, P. ABAD-CAMPOS, M. BERBEGAL, R. BELTRÁN, J. GARCÍA-JIMÉNEZ & J. ARMENGOL 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. *Plant Disease* **89**: 1015.
- LANGENHEIM, J. H. 2003. *Plant resins: Chemistry, evolution, ecology, ethnobotany*. 586 pp. Timber Press.
- LAVERY, P. B. & D. J. MEAD 1998. *Pinus radiata*: a narrow endemic from North America takes the world. En D. M. Richardson (Ed.) *Ecology and Biogeography of Pinus*: 452-449. Cambridge. Cambridge University Press.
- LEE, J. K., S. H. LEE, S. I. YANG & Y. W. LEE 2000. First report of pitch canker disease on *Pinus rigida* in Korea. *Plant Pathology Journal* **16**: 52-54.
- LESLIE, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 127-150.
- LESLIE, J. F. & B. A. SUMMERELL 2006. *The Fusarium Laboratory manual*. 388 pp. Oxford. Blackwell Publishing.
- LIBBY, W. J. 1997. Native Origins of Domesticated Radiata Pine, En R. D. Burdon & J. M. Moore (Eds.) Proceedings of IUFRO'97 genetics of radiata pine: *Forest Research Institute Bulletin* **203**: 9-21. Rotorua, New Zealand.
- LIBBY, W. J., A. BROWN & J. FIELDING 1972. Effects of hedging of radiata pine on production, rooting and early growth of cuttings. *New Zealand Journal of Forest Science* **2**: 263-283.
- LINDENMAYER, D. B., H. A. NIX, J. P. MCMAHON, M. F. HUTCHINSON & M. T. TANTON 1991. The conservation of Leadbeater's possum, *Gymnobelideus leadbeateri* (McCoy): a case study of the use of bioclimatic modelling. *Journal of Biogeography* **18**: 371-383.
- LINDNER, M. 2000. Developing adaptive forest management strategies to cope with climate. *Tree Physiology* **20**: 299-307.
- LOEHLE, C. & D. LEBLANC 1996. Model-based assessment of climate change effects on forests: a critical review. *Ecological Modelling* **90**: 1-31.
- LOIDI, J. 1987. El País Vasco. En Peinado, M. & S. Rivas-Martínez (Eds.) *La Vegetación de España*: 47-75. Alcalá de Henares. Servicio de Publicaciones Universidad de Alcalá de Henares.

- LOIDI, J., I. BIURRUN, J. A. CAMPOS, I. GARCÍA-MIJANGOS & M. HERRERA 2009. La vegetación de la CAPV. Leyenda del mapa de series de vegetación a escala 1:50.000, Eusko Jaurlaritz - Gobierno Vasco. Disponible en: <http://www.ingurumena.ejgv.euskadi.net/r49u95/es/u95aWar/consultaSistemaClasificacionHabitatJSP/U95aSubmitSistemaClasificacionHabitat.do?pkSistemaClasificacion=6&tipoEntidad=2&bloque=303&u95aMigasPan=EN,3,6,2,302> (verificado 10 enero 2011).
- LÓPEZ, A. & J. M. SÁNCHEZ DE LORENZO 2004. *Árboles en España. Manual de Identificación*. 654 pp. Madrid. Mundiprensa.
- LÓPEZ, G. 2001. *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Tomo I. 861 pp. Madrid. Mundiprensa.
- LOUPPE, D., A. A. OTENG-AMOAKO & M. BRINK 2008. *Plant Resources of Tropical Africa 7 (1). Timbers 1. PROTA Foundation*. 704 pp. Netherlands. Netherlands/Backhuys Publishers.
- LUCHI, N., P. CAPRETTI, G. MARESI & M. FEDUCCI 2007. Detection of *Diplodia pinea* in asymptomatic pine shoots. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica Special Edition 2007*: 111-114.
- LUCHI, N., R. MA, P. CAPRETTI & P. BONELLO 2005. Systemic induction of traumatic resin ducts and resin flow in Austrian pine by wounding and inoculation with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Planta* **221**: 75-84.
- MADDEN, L. V., J. K. KNOKE & R. LOUIE 1982. Considerations for the use of multiple comparison procedures in phytopathological investigations. *Phytopathology* **72**: 1015-1017.
- MADRIZ, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* **63**: 22-32.
- MAF 2010. New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry. Biosecurity New Zealand. Disponible en: <http://www.biosecurity.govt.nz/pests/pine-pitch-canker> (verificado 29 abril 2010). New Zealand Government.
- MARKS, G. C. & G. MINKO 1969. The pathogenicity of *Diplodia pinea* to *Pinus radiata* D. Don. *Australian Journal of Botany* **17**: 1-12.
- MATTHEWS, F. R. 1962. Pitch canker-tip moth association on slash pine seedlings. *Journal of Forestry* **60**: 825-826.
- MC CAIN, A. H., C. S. KOEHLER & S. A. TJOSVOLD 1987. Pitch canker threatens California pines. *California Agriculture* **41**: 22-23.
- MC DONALD, B. A. 1997. The population genetics of fungi: Tools and techniques. *Phytopathology* **87**: 448-453.
- MC DONALD, P. M. & R. J. LAACKE 1995. *Pinus radiata* D. Don. Monterrey Pine. Disponible en: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Pinus+radiata> (verificado 10 setiembre 2010). United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service.

- MEIJER, G., B. MEGNEGNEAU & E. A. G. LINDEN 1994. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. *Mycological Research* **98**: 267-276.
- MESANZA, N. & E. ITURRITXA. Los géneros *Heterobasidion* Bref. 1888 y *Armillaria* (Fr.) Staude en el País Vasco. Pendiente de publicación.
- MICHEL, M. 2004. *El pino radiata (Pinus radiata D. Don) en la historia de la Comunidad Autónoma de Euskadi. Análisis de un proceso de forestalismo intensivo*. 395 pp. Tesis doctoral nº 53. Vitoria-Gasteiz. Gobierno Vasco.
- MILGROOM, M. G., S. E. LIPARI & W. A. POWELL 1992. Comparison of genetic diversity in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria (Endothia) parasitica* from China and the US. *Mycological Research* **96**: 1114-1121.
- MILIJAJŠEVIC, T. & V. LAZAREV 2007. *Sphaeropsis* Blight of *Pines* in Serbia and Montenegro: Plant Hosts, Epidemiology, Importance. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica Special Edition 2007*: 278.
- MITCHELL, A. 2009. *The ESRI guide to GIS analysis. Volume 2: Spatial measurements & Statistics*. 238 pp. California (USA). ESRI Press.
- MOHALI, S. 1997. Primer reporte en Venezuela de *Sphaeropsis sapinea*, agente causal del manchado azul en pino caribe. *Fitopatología Venezolana* **10**: 23.
- MOLINA, A., A. SÁNCHEZ-VALLET, C. SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ 2007. Inmunidad innata en plantas y resistencia a patógenos: nuevos conceptos y potenciales aplicaciones en protección vegetal. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal* **192**: 43-46.
- MONTOYA, J. M. & M. MESÓN 2004. *Selvicultura. Tomo I*. 566 pp. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Madrid. Coedición: Fundación Conde del Valle de Salazar-Ediciones Mundi-Prensa.
- MORELET, P. M. & P. CHANDELIER 1993. A case for variability in *Sphaeropsis sapinea*. *European Journal of Forest Pathology* **23**: 317-320.
- MORENO, A. 1991. Modelización cartográfica de densidades mediante estimadores Kernel. *Treballs de la Societat Catalana de Geografia*. Número especial dedicado a la memoria del doctor Salvador Llobet i Reverter (I): 155-170.
- MORRIS, S. W., B. VERNOOIJ, S. TITATARN, M. STARRETT, S. THOMAS, C. C. WILTSE, R. A. FREDERIKSEN, A. BHANHUFALCK, S. JULBERT & S. UKNES 1998. Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 643-658.
- MORRISON, D. J., K. W. PELLOW, D. J. NORRIS & A. F. NEMEC 2000. Visible versus actual incidence of *Armillaria* root disease in juvenile coniferous stands in the southern interior of British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research* **30**: 405-414.
- MULÉ, G., A. LOGRIECO, G. STEA & A. BOTTALICO 1997. Clustering of trichothecene-producing *Fusarium* strains determined from 28S ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1843-1846.

- MUÑOZ, C., V. PÉREZ, P. COBOS, R. HERNÁNDEZ & G. SÁNCHEZ 2003. *Sanidad forestal. Guía en imágenes de plagas, enfermedades y otros agentes presentes en los montes*. 575 pp. Madrid. Mundi-Prensa.
- MURAMOTO, M., H. MINAMISHASHI & T. KOBAYASHI 1988. Occurrence of resiniferous damage on *Pinus luchuensis* Mayr.: Symptoms and analysis of the damage. *Transactions of the 99th Annual Meeting Japanese Forestry Society*: 513-514.
- MURAMOTO, M. & L. D. DWINELL 1990. Pitch canker of *Pinus luchuensis* in Japan. *Plant Disease* **74**: 530.
- NAGY, N. E., C. G. FOSSDAL, P. KROKENE, T. KREKLING, A. LÖNNEBORG & H. SOLHEIM 2004. Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiology* **24**: 505-515.
- NEF, L. & R. PERRIN 1999. *Damaging agents in European forest nurseries. Practical handbook*. 352 pp. Luxembourg. Office for Official Publications of the European Communities.
- NELSON, P. E., T. A. TOUSSOUN & W. F. O. MARASAS 1983. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. 203 pp. University Park. Pennsylvania State University Press.
- NICHOLLS, T. H. 1981. *Diplodia pinea* in nursery beds. *United States Department of Agriculture. Forest Service Progress Report* n° 3.
- NICHOLLS, T. H. & M. E. OSTRY 1990. *Sphaeropsis sapinea* cankers on stressed red and jack pines in Minnesota and Wisconsin. *Plant Disease* **74**: 54-56.
- NICHOLSON, R. L. & R. HAMMERSCHMIDT 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 369-389.
- NIRENBERG, H. I. & K. O'DONNELL 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 434-458.
- NORUŠIS, M. J. 2002. *SPSS 11.0 Guide to Data Analysis*. 637 pp. New Jersey. Prentice Hall.
- NOWAK, D. J. 1993. Historical vegetation change in Oakland and its implications for urban forest management. *Journal of Arboriculture* **19** (5): 313-319.
- NÜRNBERGER, T. & F. BRUNNER 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 318-324.
- O'DONNELL, K., E. CIGELNIK & H. I. NIRENBERG 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 465-493.
- O'DONNELL, K. & L. E. GRAY 1995. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 709-716.

- O'DONNELL, K., H. I. NIRENBERG, T. AOKI & E. CIGELNIK 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Detection of additionally phylogenetically distinct species. *Mycoscience* **41**: 61-78.
- OEPP/EPPO 2005. *Gibberella circinata*. *Bulletin OEPP/EPPO* **35**: 383-386.
- OSBOURN, A. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* **8**: 1821-1831.
- OWEN, D. & D. ADAMS 1999. Overview of pitch canker in California. En M. E. Devey, A. C. Matheson & T. R. Gordon (Eds.) *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California, USA, 30 nov - 3 dic 1998*: 21-23. Kingston ACT: CSIRO Australia.
- PALMER, M. A., E. L. STEWART & M. J. WINGFIELD 1987. Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States. *Phytopathology* **77**: 944-948.
- PALMER, M. A. & T. H. NICHOLLS 1983. *How to identify and control Diplodia shoot blight, collar rot, and cancer of conifers*. 8 pp. St. Paul MN. United States Department of Agriculture, Forest Service.
- PALMER, M. A. & T. H. NICHOLLS 1985. Shoot blight and collar rot of *Pinus resinosa* caused by *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries. *Plant Disease* **69**: 739-740.
- PAOLETTI, E., R. DANTI & S. STRATI 2001. Pre- and post-inoculation water stress affects *Sphaeropsis sapinea* canker length in *Pinus halepensis* seedlings. *Forest Pathology* **31**: 209-218.
- PATTON, R. E. 2003. Marchitez de la mancha parda de las acículas (Brown Spot Needle Blight). En Hansen, E. M. & K. J. Lewis. *Plagas y enfermedades de las coníferas*. 101 pp. Madrid. Mundiprensa.
- PENG, C. 2000. Understanding the role of forest simulation models in sustainable forest management. *Environmental Impact Assessment Review* **20**: 481-501.
- PEÑA, J. 2006. *Sistemas de Información Geográfica aplicados a la gestión del territorio*. 310 pp. Alicante. Editorial Club Universitario.
- PÉREZ, C. 2003. *Técnicas estadísticas con SPSS*. 571 pp. Madrid. Prentice Hall.
- PÉREZ-SIERRA, A., E. LANDERAS, M. LEÓN, M. BERBEGAL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ & J. ARMENGOL 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research* **111**: 832-839.
- PETERSON, G. W. 1977. Infection, epidemiology and control of *Diplodia* blight of Austrian, Ponderosa and Scots pines. *Phytopathology* **67**: 511-514.
- PETERSON, G. W. 1978. Effective and economical methods for controlling *Diplodia* tip blight. *American Nurseryman* **147**: 13-72.
- PETERSON, G. W. 1981. Control of *Diplodia* and *Dothistroma* blights in the urban environment. *Journal of Arboriculture* **7**: 1-5.

- PHILLIPS, A. J. L., A. ALVES, S. R. PENNYCOOK, P. R. JOHNSTON, A. RAMALEY, A. AKULOV & P. W. CROUS 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* **21**: 29–55.
- PINTOS, C., B. GONZÁLEZ, J. P. MANSILLA, O. AGUÍN & M. C. SALINERO. 2005. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donell: Teleomorfo *Gibberella circinata*. *Foresta* **31**: 9-11.
- PORTER, B., M. J. WINGFIELD & T. A. COUTINHO 2009. Susceptibility of South African native conifers to the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *South African Journal of Botany* **75** (2): 380-382.
- POYNTON, R. J. 1979. *Tree planting in Southern Africa. Vol. 1: The Pines*. 576 pp. Republic of South Africa. Department of Forestry.
- PROFFER, T. J. & J. H. HART 1988. Vegetative compatibility groups in *Leucocytophora kunzei*. *Phytopathology* **78**: 256-260.
- PUNITHALINGAM, E. & J. M. WATERSTON 1970. *Diplodia pinea*. *Commonwealth Mycological Institute Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* N° 273.
- RAPOSO, R. 2006. La enfermedad del chancro resinoso de los pinos. *Aitim: Boletín de Información Técnica* **242**: 38-39.
- REES, A. A. & J. F. WEBBER 1988. Pathogenicity of *Sphaeropsis sapinea* to seed, seedlings and saplings of some central American pines. *Transactions of the British Mycological Society* **91** (2): 273-277.
- RIDLEY, G. S. & M. A. DICK 2000. Pine pitch canker disease: the name of the causal fungus and its distribution. *Australasian Plant Pathology* **29**: 263-266.
- ROBIN, C., C. ANZIANI & P. CORTESI 2000. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* **90**: 730-737.
- RODRIGUEZ, R. G. 1989. Pitch canker on *Pinus douglasiana*, pines indigenous to San Andres Milpillas, Municipal of Huajicori, Nayarit (México). Summary 28. Forest Parasitology Symposium V. City of Juarez, Chihuahua. México.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. R., C. ACEDO, M. MARABEL & M. F. ÁLVAREZ 2008. Localización mediante SIG de zonas potencialmente trufas en la provincia de León. *Uned. Espacio, Tiempo y Forma. Serie VI. Nueva Época. Geografía* **1**: 83-91.
- ROGERS, D. L. 2002. *In situ genetic conservation of Monterey pine (Pinus radiata D. Don): Information and recommendations*. 80 pp. Genetic resources Conservation Program, Report n° 26. Davis. University of California.
- ROMÓN, P., J. C. ITURRONDOBEITIA, K. GIBSON, B. S. LINDGREN & A. GOLDARAZENA 2007. Quantitative association of bark beetles with pitch canker fungus and effects of verbenone on their semiochemical communication in monterey pine forests in Northern Spain. *Environmental Entomology* **36**: 743-750.

- ROUX, J., B. EISENBERG, A. KANZLER, A. NEL, V. COETZEE, E. KIETZKA & M. J. WINGFIELD 2007. Testing of selected South African pinus hybrids and families for tolerance to the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *New Forests* **33** (2): 109-123.
- RUIZ, M. M., A. AUNOS, A. CANTERO, J. A. GUTIÉRREZ, M. HERRERA, A. MADRIGAL & D. SÁENZ 1992. *Análisis y diagnóstico de los sistemas forestales de la Comunidad Autónoma del País Vasco*. 369 pp. Vitoria-Gasteiz. Gobierno Vasco.
- RUIZ DE LA TORRE, J. 2006. *Flora Mayor*. 1759 pp. Madrid. Ministerio de Medio Ambiente. Organismo Autónomo Parques Nacionales.
- RYALS, J. A., U. H. NEUENSCHWANDER, M. G. WILLITS, A. MOLINA, H. Y. STEINER & M. D. HUNT 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **8**: 1809-1819.
- SCHMALE, D. G. & T. R. GORDON 2003. Variation in susceptibility to pitch canker disease, caused by *Fusarium circinatum*, in native stands of *Pinus muricata*. *Plant Pathology* **52** (6): 720-725.
- SCHWEIGKOFER, W., K. O'DONNELL & M. GARBELOTTO 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3512-3520.
- SECALL, J. 1896. El "pinus insignis", Dougl. de la Escuela de Montes. *Revista de Montes*, 15 febrero 1896, **458**: 73-76.
- SHELBOURNE, C. J. A., R. D. BURDON, S. D. CARSON, A. FIRTH & T. G. VINCENT 1986. *Development plan for radiata pine breeding*. 142 pp. Rotorua. New Zealand. Forest Research Institute.
- SHELBOURNE, C. J. A., M. J. CARSON & M. D. WILCOX 1989. New techniques in the genetic improvement of radiata pine. *Commonwealth Forest Review* **68**: 191-201.
- SILVERMAN, B. W. 1986. *Density estimation for statistics and data analysis*. 175 pp. London. Ed. Chapman and Hall.
- SINCLAIR, W. A., H. H. LYON & W. T. JOHNSON 1987. *Diseases of trees and shrubs*. 575 pp. Ithaca and London. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press.
- SITTE, P., H. ZIEGLER, F. EHRENDORFER & A. BRESINSKY 1994. *Tratado de Botánica*. 8ª edición castellana. 1068 pp. Barcelona. Ed. Omega.
- SLAGG, C. W. & E. WRIGHT 1943. *Diplodia* blight in coniferous seed beds. *Phytopathology* **33**: 390-393.
- SLINSKI, S. L. & T. R. GORDON 2009. The influence of resin components on virulent and avirulent strain of *Fusarium circinatum*. *Phytopathology* **99**: S212.

- SLIPPERS, B., P. W. CROUS, S. DENMAN, T. A. COUTINHO, B. D. WINGFIELD & M. J. WINGFIELD 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* **96**: 83-101.
- SLIPPERS, B. & M. J. WINGFIELD 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* **21**: 90-106.
- SMITH, D. R. & G. R. STANOSZ 1995. Confirmation of two distinct populations of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States using RAPDs. *Phytopathology* **85**: 699-704.
- SMITH, D. R. & G. R. STANOSZ 2001. Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs. *Mycologia* **93** (3): 505-515.
- SMITH, D. R. & G. R. STANOSZ 2006. A species-specific PCR assay for detection of *Diplodia pinea* and *D. scrobiculata* in dead red and jack pines with collar root symptoms. *Plant Disease* **90**: 307-313.
- SMITH, H., M. J. WINGFIELD, J. DE WET & T. A. COUTINHO 2000. Genotypic diversity of *Sphaeropsis sapinea* from South Africa and Northern Sumatra. *Plant Disease* **84**: 139-142.
- SOKAL, R. R. & N. L. ODEN 1978. Spatial autocorrelation in biology. 1. Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society* **10**: 199-228.
- SNYDER, C. W., E. R. TOOLE & G. H. HEPTING 1949. *Fusaria* associated with mimosa, sumac wilt and pine pitch canker. *Journal of Agricultural Research* **78**: 365-382.
- STANOSZ, G. R. 2003. Marchitez de los brotes y chancro por *Sphaeropsis* (*Sphaeropsis* Shoot Blight and Canker). En Hansen, E. M. & K. J. Lewis. *Plagas y enfermedades de las coníferas*. 101 pp. Madrid. Mundiprensa.
- STANOSZ, G. R., J. T. BLODGETT, D. R. SMITH & E. L. KRUGER 2001. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytologist* **149**: 531-538.
- STANOSZ, G. R. & D. R. SMITH 1996. Evaluation of fungicides for control of *Sphaeropsis sapinea* shoot blight of red pine nursery seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* **26**: 492-497.
- STANOSZ, G. R., D. R. SMITH & J. S. ALBERS 2005. Surveys for asymptomatic persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in stems of red pine seedlings from seven Great Lakes region nurseries. *Forest Pathology* **35** (4): 233-244.
- STANOSZ, G. R., D. R. SMITH & M. A. GUTHMILLER 1997. Pathogenicity of A and B morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* confirmed on american larch (tamarack) and european larch. *European Journal of Forest Pathology* **27**: 301-307.

- STANOSZ, G. R., D. R. SMITH & A. MARK 1996. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* from the West Central United States by means of random amplified polymorphic DNA marker analysis. *Plant Disease* **80**: 1175-1178.
- STANOSZ, G. R., W. J. SWART & D. R. SMITH 1999. RAPD marker and isozyme characterization of *Sphaeropsis sapinea* from diverse coniferous hosts and locations. *Mycological Research* **103** (9): 1193-1202.
- STEENKAMP, E. T., B. D. WINGFIELD, T. A. COUTINHO, M. J. WINGFIELD & W. F. O. MARASAS 1999. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3401-3406.
- STEENKAMP, E. T., B. D. WINGFIELD, T. A. COUTINHO, K. A. ZELLER, M. J. WINGFIELD, W. F. O. MARASAS & J. F. LESLIE 2000. PCR-based identification of *MAT-1* and *MAT-2* in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4378-4382.
- STENSETH, N., A. MYSTERUD, G. OTTERSEN, J. W. HURREL, K. S. CHAN & M. LIMA 2002. Ecological effects of climate fluctuations. *Science* **297**: 1292-1296.
- STODDART, J. A. 1983. A genotypic diversity measure. *Journal of Heredity* **74**: 489-490.
- STODDART, J. A. & J. F. TAYLOR 1988. Genotypic Diversity: Estimation and Prediction in Samples. *Genetics* **118**: 705-711.
- STORER, A. J., P. BONELLO, T. R. GORDON & D. L. WOOD 1999. Evidence of resistance to the pitch canker pathogen (*Fusarium circinatum*) in native stands of Monterey pine (*Pinus radiata*). *Forest Science* **45**: 500-505.
- STORER, A. J., T. R. GORDON & S. L. CLARK 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* with Monterey pine seeds and seedlings in California. *Plant Pathology* **47**: 649-656.
- STORER, A. J., T. R. GORDON, P. L. DALLARA & D. L. WOOD 1994a. Pitch canker kills pines, spreads to new species and regions. *California Agriculture* **48**: 9-13.
- STORER, A. J., T. R. GORDON & D. L. WOOD 2004. Twig beetles, *Pityophthorus* spp. (Coleoptera: Scolytidae), as vectors of the pitch canker pathogen in California. *Canadian Entomologist* **136**: 685-693.
- STORER, A. J., T. R. GORDON, D. L. WOOD & P. BONELLO 1997. Pitch canker disease of pines: Current and future impacts. *Journal of Forestry* **95** (12): 21-26.
- STORER, A. J., T. R. GORDON, D. L. WOOD & P. L. DALLARA 1994b. Entomological and pathological aspects of pitch canker disease in California. Proceedings of the international union of forestry research organization: 573-586.
- STORER, A. J., T. R. GORDON, D. L. WOOD & P. L. DALLARA 1995. *Pitch canker in California*. 14 pp. Sacramento. California Forestry Note n° 110.

- STORER, A. J., D. L. WOOD & T. R. GORDON 2002. Effects of pitch canker pathogen on gallery excavation and oviposition by *Ips paraconfusus* (Coleoptera: Scolytidae). *Canadian Entomologist* **134**: 519-528.
- SUTTON, B. C. 1980. *The Coelomycetes*. 696 pp. Kew. Commonwealth Mycological Institute.
- SWART, W. J., P. S. KNOX-DAVIES & M. J. WINGFIELD 1985. *Sphaeropsis sapinea*, with special reference to its occurrence on *Pinus* spp. in South Africa. *South African Forestry Journal* **135**: 1-8.
- SWART, W. J. & M. J. WINGFIELD 1991a. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease* **75** (8): 761-766.
- SWART, W. J. & M. J. WINGFIELD 1991b. Seasonal response of *Pinus radiata* in South Africa to artificial inoculation with *Sphaeropsis sapinea*. *Plant Disease* **75** (10): 1031-1033.
- SWART, W. J., M. J. WINGFIELD & P. S. KNOX-DAVIES 1987a. Factors associated with *Sphaeropsis sapinea* of pine trees in South Africa. *Phytophylactica* **19**: 505-510.
- SWART, W. J., M. J. WINGFIELD & P. S. KNOX-DAVIES 1987b. Conidial dispersal of *Sphaeropsis sapinea* in three climatic regions of South Africa. *Plant Disease* **71**: 1038-1040.
- SWART, W. J., M. J. WINGFIELD & P. S. KNOX-DAVIES 1988. Relative susceptibilities to *Sphaeropsis sapinea* of six *Pinus* spp. cultivated in South Africa. *European Journal of Forest Pathology* **18**: 184-189.
- SWART, W. J., M. J. WINGFIELD, M. A. PALMER & R. A. BLANCHETTE 1991. Variation among South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology* **81**: 489-493.
- TAKKEN, F. L. W. & M. H. A. JOOSTEN 2000. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 699-713.
- TORRES, J. 1993. *Patología Forestal*. 270 pp. Madrid. Mundiprensa.
- UZUNOVIĆ A., J. F. WEBBER, A. J. PEACE & D. J. DICKINSON 1999. The role of mechanized harvesting in the development of bluestain in pine. *Canadian Journal of Forest Research* **29**: 242-251.
- VAN DER PLANK, J. E. 1968. *Disease resistance in plants*. 206 pp. New York. Academic Press.
- VAN HEERDEN, S. W. & M. J. WINGFIELD 2001. Genetic diversity of *Cryphonectria cubensis* isolates in South Africa. *Mycological Research* **105**: 94-99.
- VAN STADEN, V., B. F. N. ERASMUS, J. ROUX, M. J. WINGFIELD & A. S. VAN JAARVELD 2004. Modelling the spatial distribution of two important South African plantation forestry pathogens. *Forest Ecology and Management* **187**: 61-73.
- VAN ZYL, L. M., M. J. WINGFIELD, A. C. ALFENAS & P. W. CROUS 1998. Population diversity amongst isolates of *Cryphonectria cubensis*. *Forest Ecology and Management* **112**: 41-47.

- VILAR DEL HOYO, L., M. P. MARTÍN & J. MARTÍNEZ 2008. Empleo de técnicas de regresión logística para la obtención de modelos de riesgo humano de incendio forestal a escala regional. *Boletín de la Asociación de Geógrafos Españoles* **47**: 5-29.
- VILJOEN, A., W. F. O. MARASAS, M. J. WINGFIELD & C. D. VILJOEN 1997a. Characterization of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. *Mycological Research* **101**: 437-445.
- VILJOEN, A., M. J. WINGFIELD, T. R. GORDON & W. F. O. MARASAS 1997b. Genotypic diversity in a South African population of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Plant Pathology* **46**: 590-593.
- VILJOEN, A., M. J. WINGFIELD, G. H. J. KEMP & W. F. O. MARASAS 1995. Susceptibility of pines in South Africa to the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Plant Pathology* **44**: 877-882.
- VILJOEN, A., M. J. WINGFIELD & W. F. O. MARASAS 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* **78**: 309-312.
- VISAUTA, B. 1998. *Análisis estadístico con SPSS para Windows. Volumen II: Estadística multivariante*. 358 pp. Madrid. McGraw-Hill.
- VOGLER, D. R., T. R. GORDON, B. J. AEGERTER & S. C. KIRKPATRICK 2004. First report of the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*) in the Sierra Nevada of California. *Plant Disease* **88**: 772.
- WANG, C. J., R. A. BLANCHETTE, W. A. JACKSON & M. A. PALMER 1985. Differences in conidial morphology among isolates of *Sphaeropsis sapinea*. *Plant Disease* **69** (10): 838-841.
- WANG, C. J., R. A. BLANCHETTE & M. A. PALMER 1986. Ultrastructural aspects of the conidium cell wall of *Sphaeropsis sapinea*. *Mycologia* **78** (6): 960-963.
- WANG, D., A. EYLES, D. MANDICH & P. BONELLO 2006. Systemic aspects of host-pathogen interactions in Austrian pine (*Pinus nigra*): A proteomics approach. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 149-157.
- WATERMAN, A. M. 1943. *Diplodia pinea*, the cause of a disease of hard pines. *Phytopathology* **33**: 1018-1031.
- WIKLER, K. R., A. J. STORER, W. NEWMAN, T. R. GORDON & D. L. WOOD 2003. The dynamics of an introduced pathogen in a native Monterey pine (*Pinus radiata*) forest. *Forest ecology and Management* **179**: 209-221.
- WIKLER, K. R., T. R. GORDON, S. L. CLARK, M. J. WINGFIELD & H. BRITZ 2000. Potential for outcrossing in an apparently asexual population of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker disease. *Mycologia* **92**: 1085-1090.
- WINGFIELD, M. J. 1980. Association of *Diplodia pinea* with a root disease of pines in South Africa. *Plant Disease* **64**: 221-223.

- WINGFIELD, M. J., A. HAMMERBACHER, R. J. GANLEY, E. T. STEENKAMP, T. R. GORDON, B. D. WINGFIELD & T. A. COUTINHO 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*: a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* **37**: 319-334.
- WINGFIELD, M. J., A. JACOBS, T. A. COUTINHO, R. AHUMADA & B. D. WINGFIELD 2002. First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant Pathology* **51**: 397.
- WINGFIELD, M. J. & P. S. KNOX-DAVIES 1980a. Observations of diseases in pine and *Eucalyptus* in South Africa. *Phytophylactica* **12**: 57-63.
- WINGFIELD, M. J. & P. S. KNOX-DAVIES 1980b. Association of *Diplodia pinea* with a root disease of pines in South Africa. *Plant Disease* **64**: 221-223.
- WINGFIELD, M. J. & M. A. PALMER 1983. *Diplodia pinea* associated with insect damage on pines in Minnesota and Wisconsin. *Proceedings 4th International Congress of Plant Pathology, Univ. of Melbourne*: 249.
- WINGFIELD, M. J., J. ROUX, T. A. COUTINHO, P. GOVENDER & B. D. WINGFIELD 2001. Plantation disease and pest management in the next century. *South African Forestry Journal* **190**: 67-72.
- WINGFIELD, M. J., B. D. WINGFIELD, T. A. COUTINHO, A. VILJOEN, H. BRITZ & E. T. STEENKAMP 1999. Pitch canker: A South African perspective. En M. E. Devey, A. C. Matheson & T. R. Gordon (Eds.) *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California, USA, 30 nov - 3 dic 1998*: 62-69. Kingston ACT: CSIRO Australia.
- WORRALL, J. J., J. C. CORRELL & A. H. MCCAIN 1986. Pathogenicity and teleomorph-anamorph connection of *Botryosphaeria dothidea* on *Sequoiadendron giganteum* and *Sequoia sempervirens*. *Plant Disease* **70**: 757-759.
- WRIGHT, J. P. & G. C. MARKS 1970. Loss of merchantable wood in Radiata pine associated with infection by *Diplodia pinea*. *Australian Forestry* **34**: 107-119.
- ZHOU, S. & G. R. STANOSZ 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia* **93**: 516-527.
- ZWOLINSKI, J. B., W. J. SWART & M. J. WINGFIELD 1990. Intensity of dieback by *Sphaeropsis sapinea* in relation to site conditions. *European Journal of Forest Pathology* **20**: 167-174.
- ZWOLINSKI, J. B., W. J. SWART & M. J. WINGFIELD 1995. Association of *Sphaeropsis sapinea* with insect infestation following hail damage of *Pinus radiata*. *Forest Ecology and Management* **72**: 293-298.

ANEXOS



Micelios de *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* en diferentes medios de cultivo

ANEXO 1

Listado de localidades muestreadas en el País Vasco para la obtención de cepas de *Diplodia pinea* para este estudio.

Nº	LOCALIDAD	CEPA	UTM X	UTM Y	FECHA	ESPECIE
1	Barrundia	PV22	539172	4754693	03/05/2005	<i>Pinus radiata</i>
2	San Millán	PV23	546489	4751840	03/05/2005	<i>Pinus radiata</i>
3	Balmaseda	PV24	481311	4781124	11/05/2005	<i>Pinus radiata</i>
4	Alkiza		574115	4780349	22/06/2006	<i>Pinus radiata</i>
5	Berastegi		585849	4775059	22/06/2006	<i>Pinus radiata</i>
6	Gaintza		570240	4766667	22/06/2006	<i>Pinus radiata</i>
7	Ezkio-Itsaso		560220	4771419	26/06/2006	<i>Pinus radiata</i>
8	Ormaiztegi		561397	4764719	26/06/2006	<i>Pinus radiata</i>
9	Amurrio		502828	4766020	16/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
10	Ayala		499577	4768983	16/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
11	Llodio		502012	4773440	16/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
12	Okondo		498716	4777709	16/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
13	Okondo		496957	4776537	16/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
14	Arrigorriaga		506430	4783525	18/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
15	Bedia		513334	4782545	18/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
16	Igorre		516583	4781877	18/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
17	Orozko		507655	4767692	18/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
18	Zeberio		514102	4779758	18/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
19	Abadiño		530709	4776681	25/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
20	Dima		526967	4769162	25/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
21	Iurreta		528000	4779466	25/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
22	Mañaria		527370	4775101	25/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
23	Ubide		525976	4764796	25/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
24	Amorebieta		523306	4782111	26/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
25	Dima		518661	4777156	26/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
26	Zeanuri		518257	4771847	26/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
27	Zeberio		513698	4776069	26/04/2007	<i>Pinus radiata</i>
28	Aretxabaleta		544025	4765230	03/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
29	Atxondo		532244	4774434	03/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
30	Bergara		548983	4777204	03/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
31	Elgeta		544245	4777782	03/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
32	Elorrio		534815	4776686	03/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
33	Eskoriatza		538836	4765581	03/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
34	Berriz		536211	4781772	04/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
35	Elgoibar		545504	4784667	04/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
36	Iurreta		528584	4785224	04/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
37	Mallabia		539866	4783487	04/05/2007	<i>Pinus radiata</i>

Nº	LOCALIDAD	CEPA	UTM X	UTM Y	FECHA	ESPECIE
38	Aulesti		536026	4793603	16/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
39	Markina-Xemein		544510	4791413	16/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
40	Ziortza-Bolibar		538058	4790367	16/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
41	Mendaro		548435	4788989	18/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
42	Mutriku		548751	4793173	18/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
43	Ondarroa		545726	4795822	18/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
44	Mendata		527543	4793275	22/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
45	Mundaka		523160	4804469	22/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
46	Muxika		524295	4792054	22/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
47	Errigoiti		522260	4799835	23/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
48	Gamiz-Fika		513735	4795188	23/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
49	Laukiz		506197	4800124	23/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
50	Lemoiz		507549	4804039	23/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
51	Loiu		508409	4797742	23/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
52	Morga		518834	4793531	23/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
53	Mungia		514230	4797932	23/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
54	Mungia		516168	4803379	23/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
55	Amoroto		539318	4797252	28/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
56	Deba		556017	4789766	28/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
57	Ispaster		533631	4800123	28/05/2007	<i>Pinus radiata</i>
58	Aia		566079	4788793	12/06/2007	<i>Pinus radiata</i>
59	Andoain		577993	4785798	12/06/2007	<i>Pinus radiata</i>
60	Donostia		579163	4793447	12/06/2007	<i>Pinus radiata</i>
61	Urnieta		583994	4786616	12/06/2007	<i>Pinus radiata</i>
62	Villabona		579980	4783057	12/06/2007	<i>Pinus radiata</i>
63	Zestoa		563374	4785549	12/06/2007	<i>Pinus radiata</i>
64	Tolosa		573395	4776794	14/06/2007	<i>Pinus radiata</i>
65	Azpeitia		560218	4779067	21/06/2007	<i>Pinus radiata</i>
66	Laukiz	PV1	505897	4800417	11/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
67	Irún	PV2	596261	4796174	14/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
68	Usurbil	PV3	576418	4793768	14/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
69	Artziniega	PV4	489192	4777964	15/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
70	Llodio	PV6	499721	4774252	15/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
71	Llodio	PV5	499735	4775022	15/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
72	Zigoitia	PV7	518738	4758070	15/02/2008	<i>Pinus sylvestris</i>
73	Zigoitia	PV8	518761	4758051	15/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
74	Aia	PV10	568602	4790195	18/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
75	Deba	PV9	556801	4793103	18/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
76	Aia	PV29	570254	4790608	29/02/2008	<i>Pinus radiata</i>

Nº	LOCALIDAD	CEPA	UTM X	UTM Y	FECHA	ESPECIE
77	Renteria	PV28	593343	4791520	29/02/2008	<i>Pinus radiata</i>
78	Balmaseda		481218	4781008	03/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
79	Igorre	PV13	518065	4779920	03/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
80	Karrantza	PV11	476268	4787472	03/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
81	Muxika	PV12	521422	4794054	03/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
82	Aulesti	PV17	536370	4792846	06/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
83	Elorrio	PV14	540377	4772661	06/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
84	Idiazabal	PV15	562127	4761822	06/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
85	Zestoa	PV16	558958	4786699	06/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
86	Aramaio	PV26	535532	4765441	11/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
87	Legutiano	PV27	528613	4759672	11/03/2008	<i>Pinus nigra</i>
88	Mañaria		527948	4774933	11/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
89	Mañaria		528852	4774103	11/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
90	Zuia		515118	4756515	11/03/2008	<i>Pinus sylvestris</i>
91	Zuia		515196	4756515	11/03/2008	<i>Pinus pinaster</i>
92	Zuia	PV25	515189	4756497	11/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
93	Arraia-Maeztu	PV20	544160	4733429	12/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
94	Arraia-Maeztu	PV19	541342	4728396	12/03/2008	<i>Pinus sylvestris</i>
95	Iruraiz-Gauna	PV21	538525	4738416	12/03/2008	<i>Pinus sylvestris</i>
96	Peñacerrada	PV18	522143	4723115	12/03/2008	<i>Pinus nigra</i>
97	Ribera Alta		508132	4736212	12/03/2008	<i>Pinus sylvestris</i>
98	Ribera Alta		508160	4736320	12/03/2008	<i>Pinus pinaster</i>
99	Ribera Alta		508130	4736319	12/03/2008	<i>Pinus radiata</i>
100	Valdegovía		494835	4744453	18/04/2008	<i>Pinus pinaster</i>

ANEXO 2

Listado de las 83 cepas de *Diplodia pinea* utilizadas en este estudio con sus características.

CEPA	VCG	ESPECIE	MATERIAL	EDAD (años)	UTM X	UTM Y	ALTITUD (m)	LOCALIDAD
PV1	17	<i>Pinus radiata</i>	Piña	6-8	505897	4800417	51	Laukiz
PV2	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	20-22	596261	4796174	186	Irún
PV3	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	15	576418	4793768	290	Usurbil
PV4	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	15	489192	4777964	406	Artziniega
PV5	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	28-30	499735	4775022	619	Llodio
PV6	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	15	499721	4774252	439	Llodio
PV7	1	<i>Pinus sylvestris</i>	Piña	60	518738	4758070	661	Zigoitia
PV8	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	518761	4758051	661	Zigoitia
PV9	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	6	556801	4793103	160	Deba
PV10	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	12	568602	4790195	129	Aia
PV11	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	15	476268	4787472	431	Karrantza
PV12	18	<i>Pinus radiata</i>	Piña	12	521422	4794054	202	Muxika
PV13	4	<i>Pinus radiata</i>	Piña	25	518065	4779920	111	Igorre
PV14	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	25	540377	4772661	520	Elorrio
PV15	2	<i>Pinus radiata</i>	Piña	35	562127	4761822	304	Idiazabal
PV16	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	15-17	558958	4786699	267	Zestoa
PV17	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	20	536370	4792846	127	Aulesti
PV18	1	<i>Pinus nigra</i>	Piña	15	522143	4723115	794	Peñacerrada
PV19	1	<i>Pinus sylvestris</i>	Piña	20	541342	4728396	738	Arraia-Maeztu
PV20	4	<i>Pinus radiata</i>	Piña	30	544160	4733429	701	Arraia-Maeztu
PV21	1	<i>Pinus sylvestris</i>	Piña	40	538525	4738416	772	Iruraiz-Gauna
PV22	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	25	539172	4754693	683	Barrundia
PV23	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	30	546489	4751840	583	San Millán
PV24	3	<i>Pinus radiata</i>	Piña		481311	4781124		Balmaseda
PV25	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña		515189	4756497	694	Zuia
PV26	19	<i>Pinus radiata</i>	Piña	30	535532	4765441	439	Aramaio
PV27	3	<i>Pinus nigra</i>	Piña	28-30	528613	4759672	404	Legutiano
PV28	1	<i>Pinus radiata</i>	Piña	12	593343	4791520	332	Renteria
PV29	20	<i>Pinus radiata</i>	Piña	25	570254	4790608	21	Aia
SO1	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487663	4781759	402	Zalla
SO2	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487679	4781747	404	Zalla
SO3	16	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487649	4781722	404	Zalla
SO4	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487660	4781920	401	Zalla
SO5	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487685	4781689	403	Zalla
SO6	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487691	4781668	403	Zalla
SO7	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487674	4781880	400	Zalla
SO8	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487663	4781829	402	Zalla
SO9	2	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487657	4781647	406	Zalla
SO10	5	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487677	4781932	399	Zalla

CEPA	VCG	ESPECIE	MATERIAL	EDAD (años)	UTM X	UTM Y	ALTITUD (m)	LOCALIDAD
D1	14	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D2	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D3	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D4	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D5	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D6	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D7	2	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D8	15	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D9	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D10	5	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D11	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D12	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D13	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
D14	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	7	487752	4781442	408	Zalla
NA1	3	<i>Pinus radiata</i>	Rama	18-20				Sunbilla
NA2	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	18-20				Sunbilla
NA3	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	18-20				Sunbilla
NA4	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	20-22				Doneztebe
NA5	13	<i>Pinus radiata</i>	Rama	18-20				Lesaka
NA6	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	22-24				Etxalar
NA7	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	18-20				Lesaka
NA8	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	18-20				Amair
NA9	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	18-20				Amair
NA10	1	<i>Pinus radiata</i>	Rama	16-18				Saldias
CH1	7	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
CH2	2	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
CH3	6	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
CH4	6	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
CH5	8	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
CH6	6	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
CH7	6	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
CH8	6	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
CH9	6	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ1	9	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ2	10	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ3	1	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ4	1	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ5	1	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ6	1	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ7	11	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ8	12	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ9	1	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
NZ10	1	<i>Pinus radiata</i>	Semilla					
WP74	21	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	Rama	30	538502	4738530		Iruraiz-Gauna

ANEXO 3

Listado de los datos de las inoculaciones para determinar la patogenicidad de todas las cepas de *Diplodia pinea* agrupadas por VCG. Se dan los datos de medidas a la primera semana, segunda semana y tercera semana.

LECTURA	VCG	N	MEDIA (mm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	ERROR TÍPICO	MÍNIMO	MÁXIMO
PRIMERA SEMANA	1	153	24,75	20,18	1,63	1	93
	2	12	17,92	19,79	5,71	1	72
	3	9	21,56	22,27	7,42	2	73
	4	6	8,83	7,36	3,01	2	21
	5	6	16,5	18,52	7,56	1	42
	6	18	28,89	26,10	6,15	2	114
	7	3	41,33	38,55	22,26	4	81
	8	3	27,33	16,56	9,56	10	43
	9	3	33,33	23,18	13,38	18	60
	10	3	44,67	30,44	17,57	21	79
	11	3	19,67	13,05	7,54	6	32
	12	3	16,67	7,57	4,37	8	22
	13	3	12	4,58	2,65	7	16
	14	3	11,67	8,08	4,67	7	21
	15	3	26	16,52	9,54	10	43
	16	3	13,33	5,86	3,38	9	20
	17	3	12	11,14	6,43	2	24
	18	3	22	23,39	13,50	8	49
	19	3	18	5,29	3,06	12	22
	20	3	14,67	16,77	9,68	4	34
	21	3	9,67	4,04	2,33	6	14
	Total	249	23,43	20,23	1,28	1	114

LECTURA	VCG	N	MEDIA (mm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	ERROR TÍPICO	MÍNIMO	MÁXIMO
SEGUNDA SEMANA	1	153	34,61	27,55	2,23	2	140
	2	12	27,33	25,44	7,34	8	99
	3	9	30,44	29,48	9,83	3	96
	4	6	14,5	10,95	4,47	4	29
	5	6	22	23,81	9,72	3	53
	6	18	40,78	31,56	7,44	5	143
	7	3	49	47,89	27,65	5	100
	8	3	45,33	15,04	8,69	31	61
	9	3	35,33	22,28	12,86	21	61
	10	3	56,33	5,03	2,91	51	61
	11	3	39	25,94	14,98	10	60
	12	3	31,67	4,73	2,73	28	37
	13	3	19	10,58	6,11	7	27
	14	3	21	7,55	4,36	13	28
	15	3	37,33	22,19	12,81	17	61
	16	3	24,33	7,23	4,18	16	29
	17	3	15,67	13,01	7,51	3	29
	18	3	49,33	62,96	36,35	11	122
	19	3	25,33	10,50	6,06	15	36
	20	3	25,67	28,01	16,17	9	58
	21	3	13	9,00	5,20	4	22
	Total	249	33,39	27,03	1,71	2	143
TERCERA SEMANA	1	153	42,38	33,34	2,70	4	163
	2	12	33,33	29,74	8,58	11	115
	3	9	36,89	38,63	12,88	4	124
	4	6	19,67	14,39	5,88	4	42
	5	6	26,17	22,87	9,34	6	56
	6	17	47,88	34,63	8,40	10	146
	7	3	49,67	44,19	25,51	8	96
	8	3	59,33	21,01	12,13	38	80
	9	3	47,67	40,20	23,21	22	94
	10	3	63	9,85	5,69	52	71
	11	3	42,33	28,89	16,68	9	60
	12	3	34,33	3,06	1,76	31	37
	13	3	21,33	10,26	5,93	10	30
	14	3	26,33	14,64	8,45	13	42
	15	3	43,67	26,95	15,56	20	73
	16	3	19	12,12	7,00	12	33
	17	3	17,33	13,20	7,62	3	29
	18	3	58,67	73,17	42,25	12	143
	19	3	33,67	23,71	13,69	14	60
	20	3	37	37,24	21,50	15	80
	21	3	12	10,15	5,86	3	23
	Total	248	40,33	32,35	2,05	3	163

ANEXO 4

Listado de los datos de las inoculaciones para determinar la patogenicidad en este estudio. Se dan los datos de medidas por cada cepa de *Diplodia pinea* en la tercera semana.

VCG	CEPA	MEDIA (mm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	ERROR TÍPICO	MÍNIMO	MÁXIMO
1	PV2	22	19,08	11,02	10	44
1	PV3	66	49,11	28,35	12	108
1	PV4	72	60,02	34,66	13	133
1	PV5	41,67	27,01	15,59	15	69
1	PV6	31,33	16,01	9,24	15	47
1	PV7	34,67	25,70	14,84	11	62
1	PV8	34,33	23,71	13,69	9	56
1	PV9	42,67	23,50	13,57	19	66
1	PV10	22,33	9,50	5,49	13	32
1	PV11	14	8,89	5,13	7	24
1	PV14	24	15,62	9,02	6	34
1	PV16	29,33	10,97	6,33	23	42
1	PV17	25,33	11,37	6,57	16	38
1	PV18	20,33	13,58	7,84	6	33
1	PV19	27,67	23,12	13,35	6	52
1	PV21	61	73,70	42,55	15	146
1	PV22	70,33	48,58	28,05	15	106
1	PV23	23,67	11,85	6,84	10	31
1	PV25	40	15,13	8,74	28	57
1	PV28	19,33	21,57	12,45	4	44
1	SO 1	25,33	10,50	6,06	15	36
1	SO 2	14,67	4,04	2,33	11	19
1	SO 4	53	12,53	7,23	41	66
1	SO 5	32	26,85	15,50	16	63
1	SO 6	23	10	5,77	13	33
1	SO 7	45,67	60,05	34,67	10	115
1	SO 8	54	58,21	33,61	10	120
1	D 2	30	20,30	11,72	12	52
1	D 3	40,67	15,70	9,06	23	53
1	D 4	81,67	54,86	31,67	49	145
1	D 5	99,33	47,25	27,28	64	153
1	D 6	37	27,07	15,63	18	68
1	D 9	28	30,32	17,50	10	63
1	D 11	37,67	35,23	20,34	5	75
1	D 12	65	76,63	44,24	13	153
1	D 13	71,33	47,60	27,48	20	114
1	D 14	46,33	27,02	15,60	26	77
1	NA 2	82,33	70,04	40,44	37	163
1	NA 3	52,67	9,81	5,67	47	64
1	NA 4	48	19,97	11,53	35	71
1	NA 6	31	17,58	10,15	18	51
1	NA 7	43,67	15,50	8,95	28	59

VCG	CEPA	MEDIA (mm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	ERROR TÍPICO	MÍNIMO	MÁXIMO
1	NA 8	24,67	22,94	13,25	9	51
1	NA 9	20	20,81	12,01	7	44
1	NA 10	78,67	37,82	21,84	44	119
1	NZ 3	42	7,94	4,58	36	51
1	NZ 4	36,67	21,96	12,68	23	62
1	NZ 5	63,67	7,23	4,18	59	72
1	NZ 6	39,67	24,66	14,24	23	68
1	NZ 9	44,33	13,05	7,54	34	59
1	NZ 10	47,33	17,47	10,09	28	62
2	PV15	24	7,21	4,16	18	32
2	SO 9	13,33	2,31	1,33	12	16
2	D 7	34	23,52	13,58	11	58
2	CH 2	62	47,84	27,62	22	115
3	PV24	26,67	11,93	6,89	17	40
3	PV27	17	12,53	7,23	4	29
3	NA 1	67	59,66	34,44	5	124
4	PV13	19,33	11,37	6,57	10	32
4	PV20	20	19,70	11,37	4	42
5	SO 10	13,67	6,11	3,53	7	19
5	D 10	38,67	28,31	16,34	6	56
6	CH 3	33	32,91	19	14	71
6	CH 4	51	34,39	19,86	20	88
6	CH 6	39,33	34,95	20,18	10	78
6	CH 7	39	17,06	9,85	20	53
6	CH 8	32,5	12,02	8,5	24	41
6	CH9	87,33	50,96	29,42	54	146
7	CH 1	49,67	44,19	25,51	8	96
8	CH 5	59,33	21,01	12,13	38	80
9	NZ 1	47,67	40,20	23,21	22	94
10	NZ 2	63	9,85	5,69	52	71
11	NZ 7	42,33	28,88	16,68	9	60
12	NZ 8	34,33	3,06	1,76	31	37
13	NA 5	21,33	10,26	5,93	10	30
14	D 1	26,33	14,64	8,45	13	42
15	D 8	43,67	26,95	15,56	20	73
16	SO 3	19	12,12	7	12	33
17	PV1	17,33	13,20	7,62	3	29
18	PV12	58,67	73,17	42,25	12	143
19	PV26	33,67	23,71	13,69	14	60
20	PV29	37	37,24	21,50	15	80
21	WP 74	12	10,15	5,86	3	23
TOTAL		40,33	32,35	2,05	3	163

ANEXO 5

Listado de localidades con puntos muestreados frente a *Fusarium circinatum* con resultado positivo en el País Vasco. Los datos se han obtenido de las publicaciones oficiales de las tres diputaciones forales vascas (Gobierno Vasco 2007).

Nº	LOCALIDAD	UTM X	UTM Y	ESPECIE	NIVEL
1	Artziniega	489182	4777952	Pinus radiata	1
2	Okondo	499309	4782345	Pinus radiata	1
3	Llodio	499774	4774218	Pinus radiata	1
4	Llodio	499820	4773723	Pinus radiata	1
5	Zuia	515741	4757189	Pinus radiata	1
6	Muxika	525331	4791791	Pinus radiata	1
7	Amorebieta	525465	4782269	Pinus radiata	3
8	Muxika	525710	4792908	Pinus radiata	3
9	Muxika	525845	4791580	Pinus radiata	3
10	Muxika	525950	4793083	Pinus radiata	3
11	Muxika	525958	4792185	Pinus radiata	3
12	Amorebieta	526122	4781225	Pinus radiata	3
13	Iurreta	526755	4780228	Pinus radiata	3
14	Iurreta	527170	4780240	Pinus radiata	3
15	Iurreta	527345	4780653	Pinus radiata	3
16	Iurreta	527610	4780677	Pinus radiata	3
17	Iurreta	527639	4782265	Pinus radiata	3
18	Iurreta	527868	4782212	Pinus radiata	3
19	Iurreta	528047	4779852	Pinus radiata	3
20	Iurreta	528521	4781483	Pinus radiata	3
21	Iurreta	528731	4781853	Pinus radiata	3
22	Aia	570116	4790731	Pinus radiata	3
23	Aia	570134	4789047	Pinus radiata	2
24	Aia	570195	4790550	Pinus radiata	3
25	Aia	570480	4791961	Pinus radiata	2
26	Aia	570483	4791161	Pinus radiata	3
27	Aia	570993	4786851	Pinus radiata	3
28	Aia	571151	4786636	Pinus radiata	3
29	Orio	571277	4793462	Pinus radiata	2
30	Aia	571317	4788421	Pinus radiata	3
31	Aia	571423	4786152	Pinus radiata	2
32	Usurbil	571604	4790428	Pinus radiata	2
33	Orio	571656	4792822	Pinus radiata	3
34	Orio	571816	4792874	Pinus radiata	3
35	Aia	571829	4789263	Pinus radiata	3
36	Aia	571955	4791573	Pinus radiata	2
37	Aia	572197	4787546	Pinus radiata	2

Nº	LOCALIDAD	UTM X	UTM Y	ESPECIE	NIVEL
38	Aia	572363	4786674	Pinus radiata	2
39	Orio	572527	4792189	Pinus radiata	3
40	Aia	573000	4791000	Pinus radiata	2
41	Orio	573042	4792605	Pinus radiata	3
42	Orio	573255	4792749	Pinus radiata	3
43	Aia	573492	4790446	Pinus radiata	2
44	Usurbil	573601	4793724	Pinus radiata	2
45	Usurbil	574088	4797281	Pinus radiata	2
46	Usurbil	575274	4793413	Pinus radiata	3
47	Usurbil	575433	4793407	Pinus radiata	3
48	Usurbil	575471	4792683	Pinus radiata	2
49	Usurbil	575562	4792878	Pinus radiata	3
50	Usurbil	576415	4793736	Pinus pinaster	3
51	Hernani	584844	4788129	Pinus radiata	2
52	Hernani	584956	4788789	Pinus radiata	2
53	Hernani	585041	4788301	Pinus radiata	2
54	Hernani	585054	4789151	Pinus radiata	2
55	Hernani	585279	4788167	Pinus radiata	2
56	Hernani	585439	4787821	Pinus radiata	2
57	Hernani	585439	4791222	Pinus radiata	3
58	Hernani	585535	4787441	Pinus radiata	2
59	Hernani	585817	4790272	Pinus radiata	2
60	Hernani	585820	4788078	Pinus radiata	2
61	Hernani	586016	4787901	Pinus radiata	2
62	Hernani	586069	4789287	Pinus radiata	3
63	Hernani	586234	4784430	Pinus radiata	3
64	Hernani	586267	4785681	Pinus radiata	3
65	Hernani	586286	4787674	Pinus radiata	2
66	Hernani	586323	4785793	Pinus radiata	3
67	Hernani	586515	4787827	Pinus radiata	2
68	Hernani	586524	4785260	Pinus radiata	3
69	Hernani	586556	4787363	Pinus radiata	2
70	Hernani	586573	4788729	Pinus radiata	3
71	Hernani	586849	4788722	Pinus radiata	2
72	Hernani	587219	4784677	Pinus radiata	3
73	Hernani	587240	4786100	Pinus radiata	3
74	Hernani	587328	4789040	Pinus radiata	3
75	Hernani	587472	4784279	Pinus radiata	2
76	Hernani	587817	4789131	Pinus radiata	3
77	Hernani	587929	4785359	Pinus radiata	3
78	Hernani	587966	4785787	Pinus radiata	3
79	Hernani	587990	4787999	Pinus radiata	3


Nº	LOCALIDAD	UTM X	UTM Y	ESPECIE	NIVEL
80	Hernani	588001	4788312	Pinus radiata	2
81	Hernani	588028	4789454	Pinus radiata	3
82	Hernani	588072	4789374	Pinus radiata	3
83	Hernani	588082	4785292	Pinus radiata	3
84	Hernani	588100	4784937	Pinus radiata	3
85	Hernani	588112	4789407	Pinus radiata	3
86	Hernani	588182	4784970	Pinus radiata	2
87	Hernani	588382	4787310	Pinus radiata	3
88	Hernani	588664	4788917	Pinus radiata	3
89	Hernani	588814	4789202	Pinus radiata	2
90	Hernani	588916	4789277	Pinus radiata	2
91	Hernani	589178	4789259	Pinus radiata	3
92	Hernani	589856	4788752	Pinus radiata	3
93	Hernani	589897	4788906	Pinus radiata	3
94	Hernani	589942	4789055	Pinus radiata	2
95	Oiartzun	593320	4796097	Pinus radiata	2
96	Oiartzun	593532	4796333	Pinus radiata	3
97	Oiartzun	593574	4793456	Pinus radiata	2
98	Oiartzun	593839	4796619	Pinus radiata	3
99	Oiartzun	594515	4795532	Pinus radiata	2
100	Oiartzun	595137	4793331	Pinus radiata	2
101	Oiartzun	595596	4792830	Pinus radiata	3
102	Oiartzun	595917	4793905	Pinus radiata	2
103	Oiartzun	595933	4793561	Pinus radiata	3
104	Oiartzun	596198	4794236	Pinus radiata	2
105	Oiartzun	596227	4793273	Pinus radiata	3
106	Oiartzun	596360	4794459	Pinus radiata	2
107	Irún	596363	4796184	Pinus radiata	2
108	Oiartzun	596660	4794586	Pinus radiata	2
109	Irún	596691	4795793	Pinus radiata	2
110	Oiartzun	596785	4793852	Pinus radiata	2
111	Oiartzun	596995	4791027	Pinus radiata	3
112	Irún	597610	4797441	Pinus radiata	3
113	Irún	597716	4796242	Pinus radiata	2
114	Irún	598543	4796324	Pinus radiata	2
115	Irún	598795	4796984	Pinus radiata	2
116	Irún	598819	4796908	Pinus radiata	2
117	Irún	599056	4796694	Pinus radiata	3
118	Irún	599137	4796533	Pinus radiata	2
119	Irún	599439	4796870	Pinus radiata	2
120	Irún	600398	4795120	Pinus radiata	2
121	Irún	600736	4798737	Pinus radiata	2

Nº	LOCALIDAD	UTM X	UTM Y	ESPECIE	NIVEL
122	Irún	600933	4799003	Pinus radiata	2
123	Irún	601125	4797489	Pinus radiata	2
124	Irún	601211	4795014	Pinus radiata	2
125	Irún	601705	4796868	Pinus radiata	2
126	Irún	601737	4795549	Pinus radiata	3
127	Irún	601877	4797261	Pinus radiata	3
128	Irún	602163	4795680	Pinus radiata	3
129	Irún	602311	4795473	Pinus radiata	3
130	Irún	602402	4795484	Pinus radiata	3
131	Irún	602423	4795645	Pinus radiata	3

ANEXO 6

Ficha de campo para la recogida de muestras de enfermedades forestales.

Nº DE MUESTRA:	
FECHA:	
ESPECIE:	
EDAD:	
COORDENADAS:	X:
	Y:
ALTITUD:	
NIVEL AFECCIÓN:	



ZONA DE MUESTREO EN EL ÁRBOL

OBSERVACIONES