

# Informe Anual Proyecto I+D y T

## FORPATO13

Análisis de la Sanidad y Desarrollo de Métodos de  
Protección de las Masas Forestales en la C.A.P.V.

**Cliente:** DPTO AGRICULTURA Y PESCA - GV/EJ NEKAZARITZA  
ETA A

Contacto Neiker:	Contacto Cliente:
Eugenia Iturritxa eiturritxa@neiker.net 945 12 13 65	Nombre Apellidos

**Ref. NEIKER:**  
61.0203.0  
Ejercicio: 2013

**Ref. DMAPTAP:**  
Fecha:

**Acrónimo: FORPATO13.**

**Título:** Análisis de la Sanidad y Desarrollo de Métodos de Protección de las Masas Forestales en la C.A.P.V.

**Jefe de proyecto:** Iturritxa Vélez del Burgo Eugenia **email:** eiturritxa@neiker.net

**Palabras clave:** Patología, Resistencia, control, modelización, Fusarium, Armillaria, Heterobasidion, Diplodia, Dothistroma

<b>Clasificación del proyecto:</b>	<b>Unidad de negocio: UNIAGRA</b>	
<b>Departamento: PPV</b>	<b>Campos de aplicación: PVE</b>	
<b>Área estratégica: FORESTAL</b>	<b>Línea: SANIDAD FORESTAL</b>	
<b>Tipo de proyecto: ESTRATÉGICO</b>	<b>Origen:</b> Confederación de forestalistas del País Vasco. Mesa intersectorial de la madera Asociaciones de Forestalistas Asociación de viveristas del País Vasco	
<b>Objeto:</b> forestal, patógenos de riesgo, especies alternativas	<b>Aspecto:</b> taxonomía, prevención, epidemiología,	<b>Finalidad:</b> innovación, modelización, adquisición de conocimientos control

**Objetivo:** Identificar los patógenos de riesgo y daños asociados actualmente presentes en las masas forestales de la CAV y establecer pautas de prevención de las enfermedades

**Objetivos específicos:**

- 1- Identificación de los patógenos nativos e introducidos actualmente presentes en especies las masas forestales de la CAV. Estudio de la epidemiología.
- 2- Establecer los niveles de daño asociados a las enfermedades causadas por estos organismos. Estimación del riesgo e impacto en la rentabilidad de las masas forestales
- 3 - Desarrollar y ensayar las medidas de prevención y control más adecuadas desde una perspectiva de Producción Integrada frente a los principales patógenos detectados

**Duración:** 1

**Fecha de inicio:** 01/01/2013

**Fecha final:** 31/12/2015

## 1. Equipo participante de NEIKER - Tecnalia

2013

Participantes de NEIKER - Tecnalia

+ Jefe de proyecto: Eugenia Iturritxa  
Doctoranda: Nebai Mesanza

+ Otros participantes:  
Auxiliares de campo: Patxi Saenz de Urtuti Y Ander Isasmendi (Dedicación parcial)

Otras entidades participantes o colaboradoras

USDA-UPV-University of Waterloo, Canadá, University of New Brunswick, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro, University of Evora-Portugal, The Swedish University of Agricultural Sciences. Universidad de Davis, California, INIA, FABI, Pretoria, The tree lab Nueva Zelanda, Diputaciones Vascas, Asociaciones de forestalistas, Asociación de Viveristas.

## 2. Informe sobre las actividades más destacadas de la investigación en el proyecto y resultados obtenidos

Incluir en este apartado

+ Actividades más destacadas por objetivo

- Objetivos específicos:
- 1 – Identificación de los patógenos nativos e introducidos actualmente presentes en especies las masas forestales de la CAV.

En el transcurso de este periodo se han prospectado masas forestales específicas para realizar estudios epidemiológicos y de control biológico.

Para ello se seleccionan 12 parcelas sobre las cuales se tiene información inicial sobre el nivel de severidad de las enfermedades de chancro y raíz.

En el transcurso de 2014 se procederá a realizar los estudios epidemiológicos y de evaluación de daños.

En la medida que se detectan plantaciones de Eucalipto con serios problemas de declive, se realizan evaluaciones de daños e identificación de los agentes causales. Se detecta un complejo parasitario constituido por diferentes especies (defoliaciones importantes y chancros en el tronco principal) que derivan en pérdidas de producción y susceptibilidad al derribo por fuertes vientos.

Tras las prospecciones realizadas en estos últimos años en plantaciones de pinos, detectándose defoliadores, hongos de raíz y de chancro, se genera una base de datos con la información sobre severidad, identificación de especies, datos ambientales y climáticos. Tras un análisis de toda la información recopilada se generan mapas de riesgo de las principales enfermedades.

A su vez, en relación al estudio del impacto de enfermedades, se ha iniciado una colaboración con el Departamento de Medio Ambiente del Gobierno Vasco para el estudio de los daños asociados a granizo en conexión con enfermedades forestales

- 3 - Desarrollar y ensayar las medidas de prevención y control más adecuadas desde una perspectiva de Producción Integrada frente a los principales patógenos detectados. Mecanismos de resistencia frente a la enfermedad, sustancias de origen químico y natural, simbioses, antagonistas, etc. Se recopilan, para cada organismo detectado medidas de control y recomendaciones que se transfieren al sector a través de la Asociación de Viveristas, Forestalistas y servicio de semillas y plantas de vivero. Se investiga con sustancias naturales y organismos simbioses métodos de prevención y control. Se realizan ensayos de resistencia/susceptibilidad de especies forestales frente a las diferentes especies de patógenos detectados.

+ Otros resultados obtenidos (si es necesario)

Este periodo se está dirigiendo una tesis doctoral y 1 proyecto final de carrera de ingeniería forestal y se está liderando la acción Marie Curie: Biocontrol and Bioremediation agents and their role in Agriculture and Forest health Entidad financiadora: SEVENTH FRAMEWORK PROGRAMME. MARIE CURIE ACTIONS PEOPLE. International Research Staff Exchange Scheme. Call: FP7-PEOPLE-2009-IRSES

Entidades participantes: Neiker, University of Waterloo, University of New Brunswick, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro, Sveriges Lantbruksuniversitet (The Swedish University of Agricultural Sciences)

Se úcon el liderazgo y participación en la acción de intercambio de personal investigador MARIE CURIE, en la que se colabora con Italia, Suecia, Portugal y Canadá. Este año se han destinado los trabajos de experimentación al estudio del control biológico de enfermedades mediante la aplicación de agentes de Biorremediación y modelización de enfermedades.

Se han obtenido varias cepas de interés, procedentes del País Vasco, con las cuales se ha conseguido un proyecto de colaboración con empresa y universidad canadienses.

Gracias a esta acción un estudiante canadiense, Tyler Dennis, ha visitado nuestro centro para realizar su trabajo de final de carrera sobre la aplicación de agentes biorremediadores en el control de *Fusarium circinatum*

## Informe técnico

### TAREAS ASOCIADAS A ESTE PROYECTO

#### Actividades de laboratorio

- Aislamiento fúngico, obtención de cultivo monospóricos de los hongos defoliadores, de chancro y patógenos radiculares
- Identificación de los patógenos aislados y conservación (creación de una micoteca).
- Caracterización de los aislados: Definición de la agresividad de los aislados, los grupos de compatibilidad vegetativa, morfotipos, estudio molecular de las poblaciones, mediante marcadores moleculares Selección de los aislados más representativos de las áreas estudiadas para el posterior estudio de medida de control.
- Testado de las colecciones de los genotipos disponibles por los participantes y colaboradores internacionales frente a *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum* (4000 individuos), *Heterobasidion*, *Armillaria* y *Neofusicoccum*

Estudio de sustancias de origen natural, sustancias procedentes de síntesis química, organismos antagonistas y agentes de biocontrol y biorremediación frente a los patógenos forestales detectados.

#### Actividades de campo

- Prospección y delimitación de la afección en cada territorio
- Detección de árboles sintomáticos y obtención de muestras.
- Establecimiento y seguimiento de una Red de parcelas permanentes para el estudio de la dinámica del patosistema.
- Caracterización dasométrica, historia del rodal (parcelas sintomáticas y rodales no sintomáticos) y obtención de los factores ambientales.
- Estimación de los daños y del riesgo de impacto futuro.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **1- Trabajos de laboratorio**

#### **1.1 Aislamiento, identificación y creación de una micoteca**

El aislamiento y determinación de los patógenos se realizará a partir de las muestras obtenidas en campo. Tanto el número de aislados como la metodología a aplicar deberá ser definida a posteriori ya que vendrá determinada por los resultados iniciales de identificación de las enfermedades aunque ya a priori podemos establecer un compromiso de número mínimo de 100 aislados por año de diferentes especies de patógenos asociados a especies forestales alternativas a *Pinus radiata*.

Con los aislados obtenidos se generará una micoteca disponible para estudios posteriores (caracterización, control químico y biológico y estudios de niveles de resistencia/susceptibilidad de especies forestales y nativas).

Los trabajos referidos al aislamiento, identificación y elaboración de la micoteca se harán de acuerdo a la metodología óptima publicada o conocida hasta el momento. Debido a que se trata de un establecimiento de primer contacto con nuevas enfermedades la optimización de la metodología será establecida durante los primeros años de estudio.

Disponemos ya de ciertos contactos internacionales que nos pueden suministrar cierto apoyo en este sentido.

#### **1.2 Caracterización de aislados y testado de colecciones de genotipos del género *Pinus* y otras coníferas y frondosas.**

Se realizarán sobre los aislados obtenidos utilizando los métodos más adecuados a cada caso, según la amplia documentación existente y que han sido agrupados como sigue:

##### ***-Biología y capacidad de recombinación genética***

Se utilizarán técnicas de identificación consideradas tradicionales, basadas en la apariencia de los cultivos, morfología de estructuras fúngicas, tasa de crecimiento en medio agarizado, agresividad de los aislados. (Clark & Gordon, 1999; Rishbeth, 1990 o Berube. and Dessureault. 1989, Steenkamp, et al, 1999b)

La agresividad de los aislados se evaluará sobre la especie hospedadora correspondiente, al igual que el apartado anterior la metodología será adaptada a las especies que se identifiquen en el primer apartado.

El estudio de la compatibilidad sexual y asexual entre aislados se realizará mediante el estudio comparativo de la fisiología de los aislados y mediante técnicas de caracterización molecular, utilizándose para ello las técnicas descritas o comunicaciones personales que podamos obtener de los expertos.

##### ***-Uso de marcadores moleculares***

El desarrollo de la técnica de la PCR en 1986 y la adaptación de esta metodología a la caracterización de organismos ha facilitado y completado los trabajos de identificación de especies y el estudio de poblaciones de hongos (Henson y Franch, 1993). Para la caracterización de los aislados de este estudio, se utilizarán los protocolos definidos para cada especie detectada.

### **-Estudio de la patogenicidad y mecanismos de resistencia**

Para la detección de fuentes de resistencia, la diferenciación del material genético por su comportamiento frente a las micosis y definición de la agresividad patogénica de los aislados, se utilizarán métodos de inoculación en condiciones controladas de luz, humedad temperatura, que se llevarán a cabo en un invernadero de alta seguridad tipo P2. -

La metodología y el material evaluado estarán condicionados por los resultados obtenidos en la definición de las enfermedades detectadas en la primera fase del proyecto.

Plántulas de diversas especies del género *Pinus*: *Pinus sylvestris*, *P. nigra*, *P. pinea*, *P. canariensis*, *P. taeda*, y otras especies de coníferas de especial interés como alternativas a la especie *Pinus radiata*, *Sequoia*, *Sequoiadendron*, *Picea*, *Pseudotsuga* (2000 genotipos aproximadamente) *Eucalyptus*, y especies frondosas presentes en los bosques del género *Castanea*, *Quercus*, *Fagus*.

Los métodos de inoculación se adaptan a la naturaleza de los organismos patógenos y de las especies de árboles a testar. Se establecen en base a las revisiones de publicaciones.

Las condiciones de inoculación más generalizadas están definidas entre 20 y 25 grados Centígrados de temperatura, una humedad ambiental del 65 % y 16 horas de luz, en condiciones de Invernadero de alta seguridad tipo P2. Los niveles de resistencia se estimarán en función del patógeno y especie arbórea.

Adicionalmente al estudio de mecanismos de resistencia se realizan ensayos para la detección de Resistencia Inducida, mediante inoculaciones sucesivas espaciadas en el tiempo.

## **2.- Trabajos de campo**

### **2.1 Prospección en masas forestales de diversas especies forestales, nativas y exóticas .**

En el ámbito de estudio se realizará una estratificación previa del territorio según la clasificación Bioclimática Peninsular y Balear (Elena, 1996) que basándose en datos fisiográficos, climáticos y litológicos agrupa al territorio en clases más homogéneas entre si que el resto. En cada una de ellas se realizara una prospección general del territorio, apoyada por la cartografía disponible en cada autonomía, identificando *in situ* las repoblaciones, con objeto de cuantificar con la mayor exactitud posible la extensión de la problemática objeto del estudio.

En las repoblaciones interceptadas mediante un muestreo dirigido, se les asignará mediante prospección visual su grado de afectación, distribución de focos y ejemplares sintomáticos, datos generales de la masa y calidad de la estación, con independencia de la obtención de muestras. En el estudio quedaran definidos 250 puntos cuya distribución será proporcional a la presencia de diversas especies nativas y forestales.

### **2. 2 Detección de árboles sintomáticos y obtención de muestras**

En las masas prospectadas se elegirán y marcarán árboles sintomáticos (muestreo dirigido) tomando muestras en los mismos, para el aislamiento de los posibles patógenos implicados. Unidad muestral: "árbol"

Se recogen muestras de al menos 300 árboles procedentes de repoblaciones y bosques cuya distribución será la del apartado 1.1..

Además se seleccionaran 3 parcelas por patógeno en estudio para definir la epidemiología de las enfermedades.

En ambos casos, una estará localizada en las proximidades de un foco potencial de infección, como papeleras, cargadero, aserraderos, etc., y, la otra, alejada de dichos focos.

Esta estructuración del muestreo nos permitirá realizar un análisis jerarquizado de la diversidad de las poblaciones del hongo en estudio.

Todas las muestras irán perfectamente referenciadas y acompañadas de una ficha de campo prediseñada (Storer et al., 2002), modificada al efecto, que recogerá los datos de identificación, fisiográficos, dasométricos del árbol, descripción de otros daños, datos adicionales sobre la muestra y al entorno del árbol. Posteriormente se añadirán los datos correspondientes al historial de la repoblación donde se ha seleccionado el árbol muestra.

### **3 RESULTADOS 2013.**

*En el transcurso de este año nos hemos dedicado principalmente a poner a punto técnicas moleculares de detección de diversidad en poblaciones de patógenos y su control biológico mediante el uso de organismos beneficiosos autóctonos, los ensayos de invernadero y campo concluirán esta primavera y tendremos los resultados que se presentarán en el próximo informe. A continuación se especifican los resultados divulgados en congresos y revistas científicas durante el año 2013.*

#### **RESULTADOS PRESENTADOS EN EL CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL 2013**



# Biodiversidad fúngica asociada a la enfermedad del chancro en plantaciones de Eucalipto del País Vasco

## Biodiversidad fúngica asociada a la enfermedad del chancro en plantaciones de Eucalipto del País Vasco.

Esther Ortiz de Urbina, Nebai Mesanza, Iratxe Laiseca, Laura Rioja, Eugenia Iturriza  
NEIKER, Granja Modelo – Arkautu, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz, Spain

Colaboradores: Aitor Omar, ingeniero jefe, guardería forestal de Bizkaia, Ander Isasmendi, Francisco Sáenz de Urturi, Neiker.

**INTRODUCCIÓN**

En el País Vasco, las primeras experiencias con especies exóticas, alternativas a *Pinus radiata*, donde se introdujo, entre otras especies forestales, el Eucalipto se establecieron en 1957 en las localidades de Laukiz, Leizor y Añorbe (Muro, 1975). La expansión de plantaciones de rápido crecimiento como las plantaciones de eucalipto se produjo para abastecer las necesidades de la creciente industria de pulpa. El desarrollo de aparentes chancros en tronco, en plantaciones jóvenes y adultas de eucalipto está siendo bastante habitual en estos últimos años. Los chancros son infecciones de la corteza y el cambium, lesiones necróticas hundidas producidas por la desintegración de los tejidos causada por la infección (Federation of British Plant Pathologist, 1973). Entre los hongos descritos como causantes de chancro en eucalipto se encuentran *Erythricium salmonicolor*, *Cryphonectria cubensis*, *Bothryosphaeria* spp. y *Endothia gyrosa* (Old and Davison, 2000). Uno de las especies fúngicas directamente relacionadas con estos síntomas en el País Vasco es *Neofusicoccum parvum* (Iturriza et al., 2011). El objetivo de este estudio es definir el patosistema implicado en el declive de las masas de eucalipto en el País Vasco, comenzando por las especies fúngicas presentes.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

**Muestreo**

En el año 2011 se llevó a cabo una evaluación de daños producidos por la enfermedad del chancro en plantaciones de *Eucalyptus* del País Vasco. Se seleccionaron las 10 plantaciones con una severidad e incidencia de la enfermedad más alta para su muestreo. El muestreo fue dirigido, seleccionándose árboles con severos síntomas de la enfermedad. Se talaron árboles con chancros grandes en su tronco principal y se seccionaron las zonas afectadas, se etiquetaron convenientemente y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento.

**Cultivo y aislamiento de cepas**

Los troncos se seccionan con una sierra de cinta. Las secciones se trasladaron al laboratorio. Se cortaron fragmentos de madera en la zona límite donde se aprecia tejido sano y tejido afectado por la enfermedad. Tras una desinfección superficial previa en una dilución de lejía al 20 % durante un minuto, las muestras se sembraron en placas de Petri con medio agarizado, PDA al que se le añadieron algunos antibióticos. Las placas se cultivan en un incubador a 20°C en condiciones de oscuridad, a la semana de cultivo se procede a la selección de cepas en las placas y a la posterior obtención de cultivos puros para llevar a cabo la identificación de los patógenos mediante métodos morfológicos y moleculares. Para la identificación morfológica se observa la estructura y coloración del micelio, forma y tamaño de las hifas y estructuras de fructificación.

**Análisis molecular**

La extracción de ADN de las cepas se realizó a partir de cultivos puros mediante el kit de extracción Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). Se amplificó la región ITS del ADN, mediante los cebadores ITS1-F e ITS4 (White et al., 1990; Kasuga and Mitchelson, 1993; Dart et al., 2006; Worral et al., 2010). Los productos de PCR fueron purificados utilizando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc.) y fueron secuenciados por BASECLEAR, Netherlands. Las secuencias se alinearon con otras utilizando el algoritmo de ClustalW y posteriormente, manualmente con Mega software versión 4.0 (Tamura et al. 2007). Las secuencias relacionadas se obtuvieron de la base de datos de NCBI aplicando nucleótido BLAST (Altschul et al. 1997).

**RESULTADOS**


Hasta el momento se han observado chancros en eucaliptos en diversas plantaciones de la provincia de Bizkaia y Gipuzkoa con una larga tradición en el cultivo de esta especie forestal. El tamaño de chancros observados oscila desde 1,3 cm a más de 2 metros de longitud (219,2 cm) con un tamaño medio de 41,8 cm. Los daños en la madera son bastante superficiales pero en un 58,8 % de los casos se ha observado decoloración y degeneración en el interior del tronco y del 100 % para el caso de los árboles seleccionados para el estudio de biodiversidad fúngica en los chancros de eucalipto. Se detecta una alta diversidad de especies de hongos creciendo en las lesiones producidas por el chancro resinoso, entre las más frecuentes están las siguientes especies: *Penicillium glabrum* (Weinert) Westling 1991, *Penicillium erythromellis* A.D. Hocking 1990, *Penicillium spinulosum* Thom 1910, *Aspergillus niger* Tiegh. 1867, *Epicoecum nigrum* Link 1816, *Postlethopis matildae* (Richatt) S.J. Lee & Crous 2006, *Trichoderma koningi* Qudert, 1902, *Fusarium oxysporum* Schldt. 1824, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 1912, y *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips 2006. Las seis primeras especies mencionadas son hongos asociados comúnmente a material en proceso de degradación con un papel esencialmente saprófito. Entre lo más frecuentemente aislados destaca el género *Penicillium*. En relación a los patógenos *Neofusicoccum parvum* fue el más común. Se detecta la presencia de especies consideradas patógenas como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* si bien la producción de chancros se puede asociar directamente con la presencia de diferentes especies de *Bothryosphaeria*.

**DISCUSIÓN**

En relación al resto de los bosques de eucaliptos en el mundo, las plantaciones en el País Vasco son relativamente recientes (Muro, 1975), una de las grandes amenazas a las que se enfrentan este tipo de plantaciones son las plagas y enfermedades tanto nativas como introducidas a través de la semilla y otro material de propagación (Wingfield, 2003; Old et al., 2003). Uno de los problemas detectados inicialmente por este grupo de investigación, en las plantaciones de la comunidad autónoma, han sido las defoliaciones causadas por la enfermedad de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* (De Blas et al., 2009). A este problema se le añade ahora la aparición de chancros en el tronco principal de los árboles que en muchos casos se deriva del estrés generado inicialmente por la defoliación causada por este grupo (Iturriza et al., 2011). La aparición de los chancros junto al tamaño que llegan a alcanzar algunos de ellos, son indicadores de las condiciones de estrés en las que se encuentran las plantaciones. La débil respuesta de los árboles al avance de la enfermedad provoca su aparición y su considerable tamaño. El estrés en las masas forestales puede deberse a la susceptibilidad de la planta a la enfermedad, deficiencias nutricionales, estrés hídrico o al ataque previo de hongos defoliadores como las *Mycosphaerellas* que provocan una caída de la hoja que desencadena una serie de deficiencias en la actividad fotosintética y las deficiencias nutricionales asociadas e incrementa la susceptibilidad de los árboles. A parte de las especies mencionadas en este estudio cuya identificación ha concluido, se han detectado otras cepas en proceso de identificación por requerir adicionales ensayos para concluir este apartado, con lo que esta diversidad descrita aumentará considerablemente. En una primera etapa resulta de especial trascendencia conocer el patosistema asociado a las plantaciones de eucaliptos y su impacto, para, en base a esta información poder desarrollar estrategias de prevención y control acordes al contexto económico y ambiental actual. Es posible realizar una apuesta por otras especies alternativas o una selección de genotipos resistentes a las enfermedades de manera que se puedan establecer plantaciones con una base genética que reduzca su vulnerabilidad frente a los patógenos de este tipo.

**CONCLUSIONES**

La expansión de las plantaciones de eucaliptos y la asociación del aumento de las enfermedades con las condiciones de estrés de las plantaciones hace que se cuestione la sostenibilidad de las masas en condiciones óptimas de desarrollo. A los brotes de enfermedades relacionadas con defoliadores del género *Mycosphaerella* se unen la aparición de enfermedades de chancro en progresiva dispersión. La diversidad de hongos que se encuentran creciendo en tejido con esta sintomatología es bastante amplia. Se precisa establecer estrategias de control frente al desarrollo de esta enfermedad teniendo en cuenta que su incidencia y severidad previsiblemente, irá creciendo en base a lo que se está observando estos últimos años y a la tendencia de ir a su vez en aumento los factores de predisposición asociados a las condiciones de estrés derivadas de la sobre-explotación y condiciones climáticas óptimas para el desarrollo de enfermedades.



## Resumen

En relación al resto de los bosques de *Eucalyptus* en el mundo, las plantaciones en el País Vasco son relativamente recientes. Una de las grandes amenazas a las que se enfrentan este tipo de plantaciones son las plagas y enfermedades tanto nativas como introducidas a través de la semilla y otro material de propagación.

Recientemente, además de los daños asociados a hongos defoliadores, principalmente los causados por el género *Mycosphaerella*, se observan frecuentes chancros en el tronco principal de los árboles. La aparición de estos chancros junto al tamaño que llegan a alcanzar algunos de ellos, son indicadores de las condiciones de estrés, debilidad, en las que se encuentran las plantaciones. La débil respuesta de los árboles al avance de la enfermedad provoca su aparición y su considerable tamaño. El principal objetivo de este trabajo es conocer algunos de los hongos causantes de declive de las plantaciones de *Eucalyptus* previo al estudio de las potenciales medidas de prevención y control.

## 1. Introducción

En el País Vasco, las primeras experiencias con especies exóticas, alternativas a *Pinus radiata*, donde se introdujo, entre otras especies forestales, el Eucalipto se establecieron en 1957 en las localidades de Laukiz, Lezama y Alonsotegui (Muro, 1975). La expansión de plantaciones de rápido crecimiento como las de eucalipto se produjo para abastecer las necesidades de la creciente industria de pulpa.

Las plagas y enfermedades emergen como una de las principales amenazas de las plantaciones basadas en especies no nativas (Wingfield, 2003; Old et al., 2003). El desarrollo de aparentes chancros en tronco, en plantaciones jóvenes y adultas de eucalipto está siendo bastante habitual en estos últimos años. Los chancros son consecuencia de infecciones de la corteza y el cambium, lesiones necróticas hundidas producidas por la desintegración de los tejidos causada por la infección (Federation of British Plant Pathologist, 1973). En casos severos producen la muerte de las ramas e incluso de la copa y la distorsión del tronco. Los daños a nivel del cambium en eucaliptos, a menudo resultan en la formación de venas de kino, un exudado rico en un amplio rango de compuestos polifenólicos con actividad fungiestática (Boyce, 1961).

Entre los hongos descritos como causantes de chancro en eucalipto se encuentran *Erythricium salmonicolor*, *Cryphonectria cubensis*, *Bothryosphaeria* spp. y *Endothia gyrosa* (Old and Davison, 2000). Uno de las especies fungicas directamente relacionadas con estos síntomas en el País Vasco es *Neofusicoccum parvum* (Iturrirxa et al., 2011)

## 2. Objetivos

El objetivo de este estudio es definir el patosistema implicado en el declive de las masas de eucaliptos en el País Vasco, comenzando por las especies fúngicas presentes.

## 3. Metodología

### Muestreo

En el año 2011 se llevó a cabo una evaluación de daños producidos por la enfermedad del chancro en plantaciones de *Eucalyptus* del País Vasco. Se seleccionan las 10 plantaciones con una severidad e incidencia de la enfermedad más alta para su muestreo.

El muestreo se llevó a cabo supervisando las plantaciones de eucaliptos y seleccionando en dichas plantaciones árboles con severos síntomas de la enfermedad. Se talaron árboles con chancros grandes en su tronco principal y se seccionaron las zonas afectadas, se etiquetaron convenientemente y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento.

### **Cultivo y aislamiento de cepas**

Los troncos se seccionan con una sierra de cinta. Las secciones se trasladaron al laboratorio. Se cortaron fragmentos de madera en la zona límite donde se aprecia tejido sano y tejido afectado por la enfermedad. Tras una desinfección superficial previa en una dilución de lejía al 20 % durante un minuto, las muestras se sembraron en placas de Petri con medio agarizado, PDA al que se le añaden metionina (100mg/l) y biotina (1mg/l)

Las placas se cultivan en un incubador a 20°C en condiciones de oscuridad, a la semana de cultivo se procede a la selección de cepas en las placas y a la posterior obtención de cultivos puros para llevar a cabo la identificación de los patógenos mediante métodos morfológicos y moleculares.

Para la identificación morfológica se observa la estructura y coloración del micelio, forma y tamaño de las hifas y estructuras de fructificación.

### **Análisis molecular**

La extracción de ADN de las cepas se realizó a partir de cultivos puros mediante el kit de extracción Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). Se amplificó la región ITS del ADNr, mediante los cebadores ITS1-F e ITS4 (White et al., 1990; Kasuga and Mitchelson, 1993; Dart et al., 2006; Worral et al., 2010). Los productos de PCR fueron purificados utilizando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc.) y secuenciados por BASECLEAR, The Netherlands.

Las secuencias se alinearon con otras utilizando el algoritmo de ClustalW y posteriormente, manualmente con Mega software versión 4.0 (Tamura et al., 2007). Las secuencias relacionadas se obtuvieron de la base de datos de NCBI aplicando nucleotide BLAST (Altschul et al., 1997).

## **4. Resultados**

Hasta el momento se han observado chancros en eucaliptos en diversas plantaciones de la provincia de Bizkaia y Gipuzkoa con una larga tradición en el cultivo de esta especie forestal.

El tamaño de chancros observados oscila desde 1,3 cm a más de 2 metros de longitud (219,2 cm) con un tamaño medio de 41,8 cm. Los daños en la madera son bastante superficiales pero en un 58,8 % de los casos se ha observado decoloración y degeneración en el interior del tronco y del 100 % para el caso de los árboles seleccionados para el estudio de biodiversidad fúngica en los chancros de eucalipto.



Se detecta una alta diversidad de especies de hongos creciendo en las lesiones producidas por el chancro resinoso, entre las más frecuentes están las siguientes especies: *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling 1991, *Penicillium erythromellis* A.D. Hocking 1980, *Penicillium spinulosum* Thom 1910, *Aspergillus niger* Thiegl. 1867, *Epicoccum nigrum* Link 1816, *Pestalotiopsis matildae* (Richatt) S.J. Lee & Crous 2006, *Trichoderma koningii* Oudem. 1902, *Fusarium oxysporum* Schltdl. 1824, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissi. 1912, y *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips 2006.

Las seis primeras especies mencionadas son hongos comúnmente asociados a material en proceso de degradación con un papel esencialmente saprófito. Entre los más frecuentemente aislados destaca el género *Penicillium*. En relación a los patógenos, *Neofusicoccum parvum* fue el más común. Se detecta la presencia de otras especies consideradas patógenas como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*

## 5. Discusión

En relación al resto de los bosques de eucaliptos en el mundo, las plantaciones en el País Vasco son relativamente recientes (Muro, 1975). Una de las grandes amenazas a las que se enfrentan este tipo de plantaciones son las plagas y enfermedades tanto nativas como introducidas a través de la semilla y otro material de propagación (Wingfield, 2003; Old et al., 2003). Uno de los problemas detectados inicialmente por el presente grupo de investigación en las plantaciones de la comunidad autónoma ha sido las defoliaciones causadas por la enfermedad de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* (De Blas et al., 2009). A este problema se le añade ahora la aparición de chancros en el tronco principal de los árboles que en muchos casos se deriva del estrés generado inicialmente por la defoliación causada por este grupo de hongos

El estrés en las masas forestales puede deberse a la susceptibilidad intrínseca de la planta a la enfermedad, deficiencias nutricionales, estrés hídrico o al ataque previo de hongos defoliadores como *Mycosphaerella* spp. que provocan una caída de hojas que desencadena una serie de deficiencias en la actividad fotosintética y las deficiencias nutricionales asociadas e incrementa la susceptibilidad de los árboles al ataque de hongos de chancro (Shearer et al, 1987).

Aparte de las especies mencionadas en este estudio cuya identificación ha concluido existen otras cepas en proceso de identificación por requerir adicionales ensayos para concluir este apartado, con lo que esta diversidad descrita aumentará considerablemente, si bien la producción de chancros se puede asociar directamente con la presencia de diferentes especies de *Bothryosphaeria*.

En una primera etapa resulta de especial trascendencia conocer el patosistema asociado a las plantaciones de eucaliptos y su impacto, para, en base a esta información poder desarrollar estrategias de prevención y control acordes al contexto económico y ambiental actual. Es posible realizar una apuesta por otras especies alternativas o una selección de genotipos resistentes a las enfermedades de manera que se puedan establecer plantaciones con una base genética que reduzca su vulnerabilidad frente a los patógenos de este tipo.

## 6. Conclusiones

La expansión de las plantaciones de eucaliptos y la asociación del aumento de las enfermedades con las condiciones de estrés de las plantaciones hace que se cuestione la sostenibilidad de las masas en condiciones óptimas de desarrollo. A los brotes de enfermedades relacionadas con defoliadores del género *Mycosphaerella* se unen la aparición de enfermedades de chancro en progresiva dispersión.

La diversidad de hongos que se encuentran asociados a estos síntomas de chancro es bastante amplia.

Se precisa establecer estrategias de control frente al desarrollo de esta enfermedad. Ha de tenerse en cuenta que su incidencia y severidad previsiblemente, irá creciendo en base a lo que se está observando estos últimos años. A esto se une el aumento los factores de predisposición asociados a las condiciones de estrés derivadas de la sobre-explotación y condicione climáticas óptimas para el desarrollo de enfermedades.

# Distribución e intensidad de *Fusarium circinatum*, agente causal del chancro resinoso, en especies de *Pinus* y *Pseudotsuga menziesii* en el País Vasco

## Distribución e intensidad de *Fusarium circinatum*, agente causal del chancro resinoso, en especies de *Pinus* y *Pseudotsuga menziesii* en el País Vasco

GARCÍA-SERNA I., ELVIRA-RECUENCO M.<sup>2</sup>, MESANZA N.<sup>1</sup>, RAPOSO R.<sup>2</sup>, ITURRITXA E.

Colaboradores: ANDER ISASMENDI & FRANCISCO SÁENZ DE URTURI<sup>1</sup>

NEIKER, Granja Modelo – Arkautu, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz.

<sup>2</sup> INIA-CIFOR, Ctra. La Coruña Km 7,5, 28040 Madrid.



### INTRODUCCIÓN

La emergencia del patógeno *Fusarium circinatum* (Nirenberg and O'Donnell) supone una seria amenaza para los bosques y plantaciones de pino en España. Desde que se detectó oficialmente en Asturias en 2005, se han venido observando síntomas en plantaciones de *P. pinaster* y *P. radiata* en las CC.AA. de Galicia, Asturias, Cantabria, Navarra, Castilla y León y País Vasco. También se ha detectado en viveros, donde afecta a todas las especies de *Pinus* (EPP0, 2011). Actualmente este patógeno está incluido en el programa nacional de erradicación y control según R.D. 637/2006, que se adoptó en su día cuando la enfermedad no se conocía en el territorio de la UE. A fecha de hoy se han detectado focos puntuales en Portugal, Francia e Italia, que han sido erradicados. Este patógeno está incluido en la lista A2 de la EPP0 (patógenos de cuarentena localmente presentes en países de la EPP0) desde 2002 (EPP0, 2011).

Todas las especies de *Pinus* son susceptibles de ser atacadas por *F. circinatum* (Hodge and Dvorak 2000). En el País Vasco, la superficie ocupada por coníferas es de 193.629 has, de las cuales el 71 % corresponde a *P. radiata*; el 9 % a *P. sylvestris*; 7 % a *P. nigra*; 4 % a *P. pinaster* y 0,2 % a *P. halepensis*. *Pseudotsuga menziesii* ocupa una superficie del 3% (IKT, 2005). En ensayos de invernadero, inoculaciones artificiales en plantas de estas especies, de procedencias de diferentes regiones de España, desarrollaron lesiones de mayor o menor longitud de acuerdo con su grado de susceptibilidad, pero mostrando que todas pueden desarrollar la enfermedad (Iturriza et al. 2012). Concretamente, algunas procedencias de *P. pinaster* mostraron un grado de susceptibilidad similar a *P. nigra* y *P. sylvestris* (Iturriza et al. 2012), especies de relativa abundancia en el País Vasco. La distribución geográfica de las especies varía ya que *P. radiata* se cultiva principalmente en el piso mesotemplado donde es la principal especie forestal (137.000 ha), mientras que *P. sylvestris* se encuentra en zonas más continentales, en pisos supra-mesotemplado y supramediterráneo. El resto de las especies se distribuyen principalmente en el piso supratemplado, con la excepción de *P. halepensis* en la zona mediterránea. Por tanto, *F. circinatum* supone una seria amenaza, especialmente para *P. radiata*, y por lo tanto para la industria forestal de la región, que se dedica tanto a la madera como a la pasta de papel.

### MATERIA Y MÉTODOS

#### Muestreo durante 2004-2009

##### En 141 localidades

- Medio de 4-8 árboles/municipio
- Entre 100 y 200 ejemplares
- Especies de *Pinus* y *Abies Douglasii*

##### Se evaluó la severidad de la enfermedad

- En 2007, usando la escala:
- 0: Sin síntomas
- 1: Baja severidad
- 2: Moderada severidad
- 3: Alta severidad

##### Se confirmó la presencia de *F. circinatum*

- En muestras de tejidos con síntomas
- Detección específica y directa
- Se cultivó en medio de cultivo de PCA y PDA
- Se incubó 10 días a 20°C
- Identificación molecular y morfológica

### RESULTADOS

Se examinaron visualmente 958 árboles de las especies *Pinus halepensis*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. radiata*, *P. sylvestris* y *Pseudotsuga menziesii*, distribuidos según se representa en la Figura 1. El patógeno *Fusarium circinatum* tan solo fue encontrado en dos especies forestales, *P. pinaster* y *P. radiata*, en un total de 1 y 130 árboles respectivamente, lo que supone respectivamente una incidencia de 1,5 y 16,8% sobre el total de árboles muestreados por especie. El árbol de *P. pinaster* presentaba una severidad baja, mientras que en *P. radiata* la mayoría de ellos mostraban una severidad media (43,1%) y alta (53,1%) (Tabla 1).

El índice de Moran de autocorrelación espacial fue de 0,22 (con valor de probabilidad < 0,01) para el conjunto de puntos muestreados con presencia de *Fusarium circinatum*, lo que indica que el patrón de distribución de la enfermedad es agrupado, no aleatorio. En la figura 2 se ha representado la distribución de *Fusarium circinatum* en el País Vasco basada en la función de Kernel, que muestra las 9 áreas donde se localizó la enfermedad. De ellas, hay 4 áreas con menor intensidad de enfermedad, situadas al Oeste y más al interior del País Vasco. Las otras 5 áreas son más extensas, presentan un gradiente de intensidad más amplio con un nivel máximo de enfermedad mayor.

Los resultados de los aislamientos de *F. circinatum* a partir del cultivo de madera infectada confirmaron la presencia del patógeno como causante de los síntomas de cada árbol considerado afectado por el chancro resinoso. La patogenicidad de dichos aislados fue confirmada en condiciones de invernadero tras su inoculación en plantulas de *Pinus radiata* de dos savias.

Figura 1: Distribución de la enfermedad del chancro en el País Vasco, antes de la aplicación de las medidas de erradicación

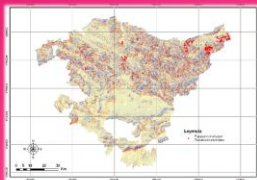


Figura 2: Mapa de densidad de Kernel para *Fusarium circinatum*



	Árboles totales	Nº árboles enfermos	Incidencia (%)	Severidad (%)		
				Baja	Media	Alta
<i>Pinus halepensis</i>	9	0	0	0	0	0
<i>Pinus nigra</i>	29	0	0	0	0	0
<i>Pinus pinaster</i>	47	1	1,5	1	0	0
<i>Pinus pinea</i>	4	0	0	0	0	0
<i>Pinus radiata</i>	772	130	16,8	5	54	49
<i>Pinus sylvestris</i>	29	0	0	0	0	0
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	38	0	0	0	0	0

Tabla 1: Incidencia y severidad del chancro resinoso en plantaciones de coníferas del País Vasco según hospedador

### CONCLUSIONES

Se detectaron focos de *Fusarium circinatum*, agente causal del chancro resinoso del pino, en las especies de *P. radiata* y *P. pinaster* del País Vasco, con una incidencia del 16,8 y 1,5% del total de los árboles muestreados por especie (772 y 67 árboles, respectivamente). Ninguna de las otras especies de *Pinus* examinadas presentes en el País Vasco mostraron síntomas de la enfermedad.

La distribución espacial de la enfermedad muestra una distribución en focos o áreas localizadas, que es compatible con la reciente introducción del patógeno. Los focos donde la intensidad es mayor estaban localizados en Gipuzkoa. Sobre todos ellos, siguiendo las directivas europeas, se han aplicado medidas de erradicación.

## Resumen

En los años 2004-2009, se realizó una prospección de las especies de coníferas del País Vasco que son potencialmente susceptibles de ser atacadas por el patógeno *Fusarium circinatum*. Se

ha confirmado que esta enfermedad solo está presente en las especies de *P. radiata* y *P. pinaster*, resultando mucho más afectada la especie *P. radiata*. En ésta se detectó la enfermedad en el 16,8% de los árboles examinados, con una severidad de nivel medio en 56 árboles del total de los 130 enfermos y severidad alta en 69 de ellos. La enfermedad se localizó en varios focos definidos y que quedan representados en el mapa geográfico según el parámetro de la densidad de Kernel, utilizando el programa ArcGis.

## 1. Introducción

La emergencia del patógeno *Fusarium circinatum* (Nirenberg and O'Donnell) supone una seria amenaza para los bosques y plantaciones de pino en España. Desde que se detectó oficialmente en Asturias en 2005, se han venido observando síntomas en plantaciones de *P. pinaster* y *P. radiata* en las CC.AA. de Galicia, Asturias, Cantabria, Navarra, Castilla y León y País Vasco. También se ha detectado en viveros, donde afecta a todas las especies de *Pinus* (EPPO, 2011). Actualmente este patógeno está incluido en el programa nacional de erradicación y control según R.D. 637/2006, que se adoptó en su día cuando la enfermedad no se conocía en el territorio de la UE. A fecha de hoy se han detectado focos puntuales en Portugal, Francia e Italia, que han sido erradicados. Este patógeno está incluido en la lista A2 de la EPPO (patógenos de cuarentena localmente presentes en países de la EPPO) desde 2002 (EPPO, 2011).

*F. circinatum* causa la enfermedad del chancro resinoso en árboles adultos de las especies de *Pinus*. Produce puntisecado regresivo de ramas, siendo su síntoma más característico la aparición de chancros con resinaciones abundantes en el tronco y ramas. En viveros, produce damping-off de pre y postemergencia. La expresión de los síntomas del chancro resinoso va siempre asociado con importantes pérdidas económicas. En viveros, la enfermedad está asociada a la mortalidad extensa de las plántulas, especialmente de las especies más susceptibles como son *P. radiata* y *P. patula*. En árboles adultos causa reducción en el volumen total de la madera, atribuible a la pérdida de acículas. Las infecciones múltiples de las ramas del árbol pueden ocasionar una defoliación importante de la copa que, junto con los chancros del tronco, terminan causando la muerte del árbol.

Todas las especies de *Pinus* son susceptibles de ser atacadas por *F. circinatum* (Hodge and Dvorak 2000). También la especie *Pseudotsuga menziesii* (Vogler *et al.*, 2004). En el País Vasco, la superficie ocupada por coníferas es de 193.629 has, de las cuales el 71 % corresponde a *P. radiata*; el 9 % a *P. sylvestris*; 7% a *P. nigra*; 4% a *P. pinaster* y 0,2 % a *P. halepensis*. *Pseudotsuga menziesii* ocupa una superficie del 3% (IKT, 2005). En ensayos de invernadero, inoculaciones artificiales en plantas de estas especies, de procedencias de diferentes regiones de España, desarrollaron lesiones de mayor o menor longitud de acuerdo con su grado de susceptibilidad, pero mostrando que todas pueden desarrollar la enfermedad (Iturrutxa *et al.* 2012). Concretamente, algunas procedencias de *P. pinaster* mostraron un grado de susceptibilidad similar a *P. nigra* y *P. sylvestris* (Iturrutxa *et al.* 2012), especies de relativa abundancia en el País Vasco. La distribución geográfica de las especies varía ya que *P. radiata* se cultiva principalmente en el piso mesotemplado donde es la principal especie forestal (137.000 ha), mientras que *P. sylvestris* se encuentra en zonas más continentales, en pisos supra-mesotemplado y supramediterráneo. El resto de las especies se distribuyen principalmente en el piso supratemplado, con la excepción de *P. halepensis* en la zona mediterránea. Por tanto, *F. circinatum* supone una seria amenaza, especialmente para *P.*



*radiata*, y en último término para la industria forestal de la región, que se dedica tanto a la madera como a la pasta de papel.

## 2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes: (1) Determinar las especies de *Pinus* afectadas por *F. circinatum*, causante del chancro resinoso, en el País Vasco; (2) Conocer la distribución del patógeno; y (3) Cuantificar la intensidad de la enfermedad midiendo la incidencia y severidad de la enfermedad.

## 3. Metodología

Con objeto de estimar la distribución de la enfermedad, durante los años 2004 a 2009 se visitaron 141 localidades y se examinaron 6,8 árboles de media en cada municipio. El número de árboles registrados fue proporcional a la abundancia relativa de cada especie en el área muestreada, de forma que se incluyeron en el estudio un total de 958 pinos de 6 especies y abetos Douglas de plantaciones y de bosques naturales.

La severidad de la enfermedad causada por *F. circinatum* se evaluó en la primavera de 2009 aplicando a cada árbol la siguiente escala modificada a partir de las usadas por Juhászová *et al.* (2005) y Gordon *et al.* (2001):

- Sana: Árboles sin síntomas visible de chancro resinoso y ausencia del patógeno.
- Baja: Árboles con hojas afectadas (amarillentas o rojizas), brotes marchitos, presencia de gotas de resina en las ramas, *F. circinatum* aislado de tejido sintomático.
- Media: Árboles con hojas afectadas (amarillentas o rojizas), brotes marchitos, presencia de gotas de resina en las ramas y algunos chancros en ramas y tronco principal, ramas muertas por encima de los 2/3 de la copa, *F. circinatum* aislado de tejido sintomático.
- Alta: Árboles con ramas muertas por encima de los 2/3 de la copa chancros en ramas y tronco principal, *F. circinatum* aislado de tejido sintomático.

La distribución espacial de los puntos que mostraban enfermedad se estudió según el estadístico de Moran para el análisis de autocorrelación espacial (Sokal & Oden 1978; Mitchell 2009). La representación de los puntos del muestreo se hizo usando el programa ArcGis 9.2, siguiendo el método de interpolación de capas ráster mediante ponderación inversa de la distancia (Field 2009). Para representar en el mapa la distribución de la enfermedad según los niveles encontrados en campo se recurrió a la densidad de Kernel (Silverman 1986).

Para confirmar la causa de la enfermedad, se recogió material vegetal de árboles con síntomas de la enfermedad. Las muestras se cortaron de los márgenes de chancros de árboles sintomáticos, se realizó una desinfección superficial en lejía al 30 % (1,6% de hipoclorito de sodio) durante un minuto seguido de 2 lavados con agua estéril y se colocaron en placas de PDA y FSM (Correll *et al.*, 1991), que se incubaron durante un periodo de 10 días a 20°C. La identificación morfológica de *F. circinatum* fue llevada a cabo utilizando medio CLA. La identificación molecular se realizó mediante PCR usando los cebadores específicos CIRC1A y CIRC4A (Schweigkofler *et al.*, 2004).

## 4. Resultados



Se examinaron visualmente 958 árboles de las especies *Pinus halepensis*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. radiata*, *P. sylvestris* y *Pseudotsuga menziesii*, distribuidos según se representa en la Figura 1. El patógeno *Fusarium circinatum* tan solo fue encontrado en dos especies forestales, *P. pinaster* y *P. radiata*, en un total de 1 y 130 árboles respectivamente, lo que supone respectivamente una incidencia de 1,5 y 16,8% sobre el total de árboles muestreados por especie. El árbol de *P. pinaster* presentaba una severidad baja, mientras que en *P. radiata* la mayoría de ellos mostraban una severidad media (43,1%) y alta (53,1%) (Tabla 1).

El índice de Moran de autocorrelación espacial fue de 0,22 (con valor de probabilidad < 0,01) para el conjunto de puntos muestreados con presencia de *Fusarium circinatum*, lo que indica que el patrón de distribución de la enfermedad es agrupado, no aleatorio. En la figura 2 se ha representado la distribución de *Fusarium circinatum* en el País Vasco basada en la función de Kernel, que muestra las 9 áreas donde se localizó la enfermedad. De ellas, hay 4 áreas con menor intensidad de enfermedad, situadas al Oeste y más al interior del País Vasco. Las otras 5 áreas son más extensas, presentan un gradiente de intensidad más amplio con un nivel máximo de enfermedad mayor.

Los resultados de los aislamientos de *F. circinatum* a partir del cultivo de madera infectada confirmaron la presencia del patógeno como causante de los síntomas de cada árbol considerado afectado por el chancro resinoso. La patogenicidad de dichos aislados fue confirmada en condiciones de invernadero tras su inoculación en plántulas de *Pinus radiata* de dos savias.

Tabla 1. Incidencia y severidad del chancro resinoso en plantaciones de coníferas del País Vasco según hospedador.

	Árboles totales <sup>1</sup>	Nº árb. enfermos	Incidencia (%)	Severidad (%)		
				Baja	Media	Alta
<i>Pinus halepensis</i>	9	0	0	0	0	0
<i>Pinus nigra</i>	39	0	0	0	0	0
<i>Pinus pinaster</i>	67	1	1,5	1	0	0
<i>Pinus pinea</i>	4	0	0	0	0	0
<i>Pinus radiata</i>	772	130	16,8	5	56	69
<i>Pinus sylvestris</i>	29	0	0	0	0	0
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	38	0	0	0	0	0

## 5. Discusión

La prospección hecha en las especies de *Pinus* y *Pseudotsuga menziesii* del País Vasco muestran que la enfermedad está presente mayoritariamente en *P. radiata*. 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. Potencialmente todas las especies de *Pinus* aquí prospectadas son susceptibles de ser atacadas por *F. circinatum* en base a resultados obtenidos en inoculaciones artificiales en invernadero (Iturrutxa et al., 2012). También *Pseudotsuga menziesii* ha mostrado un amplio rango de resistencia a *F. circinatum* en ensayos de inoculación y en condiciones de invernadero (Gordon et al., 2006). Además, en California se ha detectado *P. menziesii* naturalmente infectada (Gordon et al., 2001). Sin embargo, a fecha de hoy no se han detectado infecciones naturales de *P. menziesii* en España, incluso en lugares donde esta especie coexiste con *P. radiata* severamente afectados por el patógeno. En el contexto actual, basado en el estado sanitario observado en campo y en el crecimiento óptimo de las plantaciones, esta especie forestal es considerada por los gestores de plantaciones forestales en el País Vasco como una alternativa óptima al *P. radiata* en áreas con antecedentes de presencia de *F. circinatum*.

La distribución espacial de la enfermedad obedece a un patrón de agrupamiento que es compatible con que el agente causante de la enfermedad es de reciente introducción. Aunque con los datos actuales *Fusarium circinatum* parece tener su óptimo de desarrollo en el bioclima descrito como templado oceánico, es necesario estudiar 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 posible, pero parece que no está ocurriendo, como lo demuestran los análisis sistemáticos que se han venido haciendo de los lotes de semilla de acuerdo al Real Decreto 637/2006. Desde 1994 hasta el día de hoy se han analizado un total de 170 lotes de semilla nacional y de importación (Chile y Nueva Zelanda). Ninguno de los lotes analizados hasta el momento ha dado positivo en la detección de *F. circinatum*. (Fuente: Servicio de Semillas y Plantas de Vivero del Gobierno Vasco).

## 6. Conclusiones

Se ha detectado *Fusarium circinatum*, agente causal del chancro resinoso del pino, en las especies de *P. radiata* y *P. pinaster* del País Vasco, con una incidencia del 16,8 y 1,5% del total de los árboles muestreados por especie (772 y 67 árboles, respectivamente). Ninguna de las otras especies de *Pinus* examinadas presentes en el País Vasco mostraron síntomas de la enfermedad.

## Epidemiología del complejo *Armillaria* en ecosistemas forestales del País Vasco

### Epidemiología del complejo *Armillaria* en ecosistemas forestales del País Vasco

Autores: MESANZA NEBAI & ITURRITXA EUGENIA

Colaboradores: ANDER ISASMENDI & FRANCISCO SÁENZ DE URTURI

neiker  
tecnalia



La enfermedad de pudrición de raíces causada por el género *Armillaria*, es uno de los más serios problemas que afectan a ecosistemas forestales, tanto de bosques como de plantaciones de un amplio rango de especies causando a su vez serios problemas en frutales, especies ornamentales y viñedos.

En el País Vasco no era considerado un serio problema pero en condiciones especiales de estrés (inundación, sequía, contaminación etc.) puede llegar a ocasionar serios daños, aumentando severamente la mortalidad de los árboles y la susceptibilidad de los mismos a ser derribados por el viento. En los últimos ocho años desde que se inició su estudio en Neiker tecnalia se ha observado un importante aumento de la mortalidad asociada a este patógeno (Iturrutxa et al., 2007).

En Europa han sido descritas siete especies de *Armillaria* (Guillaumin et al., 1991). Aunque la presencia de *Armillaria* ha sido bien conocida en España, la identificación a nivel de especie ha sido bastante reciente (Aguin et al., 2004).

En el País Vasco las especies de *Armillaria* están ampliamente distribuidas por diferentes ecosistemas forestales zonas de frutales y viñedos. Se han detectado más de 300 focos con problemas asociados a este género. En dichos focos se han identificado cinco especies diferentes de *Armillaria*: *A. mellea* (patrones 1 y 2) *A. ostoyae* (patrones 1 y 2) *A. cepistipes*, *A. gallica* y *A. tabescens* (Iturrutxa et al., 2007).

El principal objetivo de este estudio es tratar de comprender los patrones de la estructura poblacional y diversidad genética del género *Armillaria* en parcelas de País Vasco.

#### Muestreo

En el año 2004-2006 se llevó a cabo una prospección de focos dañados por la enfermedad en plantaciones, bosques y viñedos del País Vasco.

A partir de estos resultados, en 2011, se seleccionaron tres parcelas fuertemente afectadas por la enfermedad.

Se recogieron muestras en las plantaciones, se etiquetaron y georeferenciaron, registrándose la posición en la parcela de cada uno de ellos y transferidos a un mapa mediante el software ARMAP 10.

#### Cultivo y aislamiento de cepas

Las muestras se trasladaron al laboratorio para la consecución de cultivos puros. En todos los casos, los aislados se obtuvieron mediante siembra en medio semi-selectivo BDS (Benomilo Dichloran Estreptomocina) (Worral, 1991). Los cultivos se incubaron a 20°C durante un periodo de una a dos semanas.

#### Estudio de los grupos de compatibilidad vegetativa

Para detectar la respuesta de incompatibilidad somática entre aislados obtenidos en las parcelas, se enfrentaron entre ellos. Se transfirieron porciones de unos 2 mm de longitud y se sembraron dos a dos, cada uno de ellos en la parte aproximadamente central de la mita de la placa de Petri, sobre medio MEA (Malte Extract Agar). Estas placas se incubaron a 20°C durante un periodo de un mes (Hood & Sandberg, 1967). El ensayo se repitió dos veces.

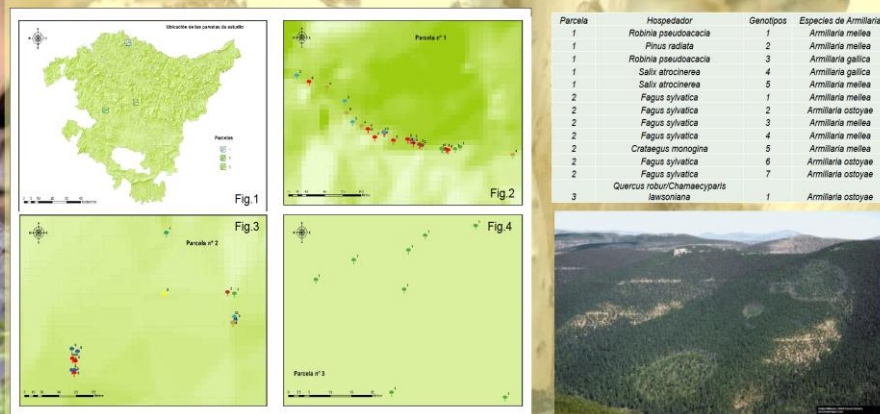
#### Análisis molecular

La identificación de las cepas se extracción de ADN de las cepas se realizó a partir de cultivos puros mediante el kit de extracción Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los aislados de *Armillaria* fueron identificados mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) de la región espaciadora intergénica (intergenic spacer region, IGS) del ADN ribosomal (rDNA) con los cebadores LR12R y O-1, las condiciones de amplificación aplicadas fueron las propuestas por Harrington y Wingfield (1995) y modificadas por Pérez et al. (1999). Los productos resultantes de la reacción de PCR anterior se llevó a cabo el análisis de RFLP.

#### Resultados

En la figura 1 se muestra la ubicación de las parcelas. Los aislados obtenidos en las parcelas de estudio fueron identificados como *Armillaria mellea*, *A. ostoyae* y *A. gallica*. La distribución de especies, genotipos, hospedadores en las parcelas se define en la tabla 1.

En las figura 2, 3 y 4 se muestra la distribución espacial de los árboles infectados así como la de los genotipos identificados en cada parcela.



#### Discusión

El patosistema de *Armillaria* en el País Vasco está actualmente directamente relacionado con el declive de plantaciones forestales, bosques y ecosistemas forestales en zonas protegidas, parques naturales, causando una mortalidad importante en plantaciones y hayedos y robledales de alto valor cultural y medioambiental.

La amplia distribución (300 focos) y diversidad de especies detectadas en esta comunidad es considerablemente alta. En dichos focos se han identificado cinco especies diferentes de *Armillaria*: *A. mellea* (patrones 1 y 2) *A. ostoyae* (patrones 1 y 2) *A. cepistipes*, *A. gallica* y *A. tabescens* (Iturrutxa et al., 2007).

En este trabajo se observan tres tipos de patosistemas diferentes en lo referido a composición de especies y potenciales vías de dispersión de la enfermedad. Las especies más virulentas están representadas, *A. ostoyae* y *A. mellea*. Todas las especies tienen la capacidad de colonizar raíces vivas pero se ha comprobado que algunas especies son la causa principal de mortalidad en plantas (Prospero et al., 2004). Entre las más virulentas están descritas *A. ostoyae* en plantaciones forestales y *A. mellea* en cultivos agrícolas (Gregory et al., 1991). Sin embargo esta diferencia puede reflejar una diferencia de distribución geográfica más que una preferencia por el hospedador lo cual está en consonancia con lo observado en este trabajo en el que tanto en la parcela nº1 y nº2 ambas especies coexisten causando serios daños en las masas boscosas.

La distribución de los grupos de compatibilidad en las parcelas revela el patrón de dispersión (Shaw y Roth, 1976). La presencia de diferentes grupos de compatibilidad sugiere una posible dispersión por basidiosporas a demás de una dispersión vegetativa, visible en parcelas 1 y 2. En contraste con esta situación, la parcela 3 muestra un patrón diferente, mono-específico y sugiere una dispersión por micelio, clonal.

#### Conclusiones

*Armillaria* es uno de los más importantes géneros causantes de pudrición en raíz en los ecosistemas forestales del País Vasco. De todas las especies detectadas en esta zona, *A. mellea* (patrones 1 y 2) *A. ostoyae* (patrones 1 y 2) *A. cepistipes*, *A. gallica* y *A. tabescens*, en el estudio de parcelas están representadas las de mayor trascendencia por ser altamente virulentas, *A. mellea* y *A. ostoyae*.

Basándose en el estudio de identificación de especies y grupos de compatibilidad vegetativa, los patrones de distribución y variabilidad de genotipos apuntan a vías de dispersión por contacto entre árboles sanos y enfermos y mediante dispersión por basidiosporas. El manejo de las parcelas infectadas teniendo en cuenta esta información, refleja que el aislamiento físico de sistemas radiculares infectados de los sanos pudiera no ser suficiente para detener la dispersión de la enfermedad en todas las casos.



## Resumen

*Armillaria* es uno de los más importantes géneros causantes de pudrición en raíz a nivel mundial. Las especies de *Armillaria* desempeñan un importante papel en la descomposición de la madera, pero algunas de estas especies son importantes patógenos con capacidad de matar árboles y comprometer de forma considerable la sostenibilidad de los bosques. Los árboles jóvenes o estresados son a menudo mortalmente afectados pero la mortalidad de árboles altamente vigorosos cuando el patógeno incrementa su potencial de inóculo es cada vez más frecuente en plantaciones y bosques y parques naturales del País Vasco. Este hongo puede sobrevivir durante décadas en madera en proceso de degradación y los métodos de control resultan limitados y de difícil aplicación.

En este estudio se pretende conocer la diversidad de este género a nivel de plantaciones para definir estrategias de control acordes a la epidemiología de la enfermedad a nivel local. Para ello el estudio se circunscribe a plantaciones de coníferas y bosques seriamente dañados por la enfermedad. En ello se detectan diferentes situaciones, la coexistencia de varios genotipos de una misma especie, la combinación de ello con individuos de otras especies y la colonización de un área considerable por tan solo un genotipo. Este amplio abanico de posibilidades nos lleva a plantear la posibilidad de tener que aplicar diferentes estrategias de control dependiendo de este factor y la importancia de conocer a priori la distribución y estructura poblacional del patógeno.

## 1. Introducción

La enfermedad de pudrición de raíces causada por el género *Armillaria*, es uno de los más serios problemas que afectan a ecosistemas forestales, tanto de bosques como de plantaciones de un amplio rango de especies causando a su vez serios problemas en frutales, especies ornamentales y viñas.

En el País Vasco no era considerado un serio problema pero en condiciones especiales de estrés (inundación, sequía, contaminación etc.) puede llegar a ocasionar serios daños, aumentando severamente la mortalidad de los árboles y la susceptibilidad de los mismos a ser derribados por el viento. En los últimos ocho años desde que se inició su estudio en Neiker tecnalia se ha observado un importante aumento de la mortalidad asociada a este patógeno (Iturrutxa et al., 2007).

En Europa han sido descritas siete especies de *Armillaria* (Guillaumin et al., 1991). Aunque la presencia de *Armillaria* ha sido bien conocida en España, la identificación a nivel de especie ha sido bastante reciente (Aguín et al., 2004).

En el País Vasco las especies de *Armillaria* están ampliamente distribuidas por diferentes ecosistemas forestales zonas de frutales y viñedos. Se han detectado más de 300 focos con problemas asociados a este género. En dichos focos se han identificado cinco especies diferentes de *Armillaria*: *A. mellea* (patrones 1 y 2) *A. ostoyae* (patrones 1 y 2) *A. cepistipes*, *A. gallica* y *A. tabescens* (Iturrutxa et al., 2007).

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este estudio es tratar de comprender los patrones de la estructura poblacional y diversidad genética del género *Armillaria* en parcelas de País Vasco.

## 3. Metodología

### Muestreo

En el año 2004-2006 se llevó a cabo una prospección de focos dañados por la enfermedad en plantaciones, bosques y viñedos del País Vasco. A partir de estos resultados, en 2011, se seleccionaron tres parcelas fuertemente afectadas por el complejo patogenico.

Se recogieron muestras en las plantaciones, se etiquetaron y georeferenciaron, registrándose la posición en la parcela de cada uno de ellos y transferidos a un mapa mediante el software ARMAP 10.

### **Cultivo y aislamiento de cepas**

Las muestras se trasladaron al laboratorio para la consecución de cultivos puros. In todos los casos, los aislados se obtuvieron mediante siembra en medio semi-selectivo BDS (Benomilo Dichloran Estreptomina) (Worral, 1991). Los cultivos se incubaron a 20°C durante un periodo de una a dos semanas.

### **Estudio de los grupos de compatibilidad vegetativa**

Para detectar la respuesta de incompatibilidad somática entre aislados obtenidos en las parcelas, se enfrentaron entre ellos. Se transfirieron porciones de unos 2 mm de longitud y se sembraron dos a dos, cada uno de ellos en la parte aproximadamente central de la mitas de la placa de Petri, sobre medio MEA (Malte Extract Agar). Éstas placas se incubaron a 20°C durante un periodo de un mes a dos meses (Hood & Sandberg, 1987). El ensayo se repitió dos veces.

### **Análisis molecular**

La identificación de las cepas se extracción de AND de las cepas se realizó a partir de cultivos puros mediante el kit de extracción Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los aislados de *Armillaria* fueron identificados mediante la técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) de la región espaciadora intergénica (intergenic spacer región, IGS) del ADN ribosomal (rDNA) con los primers LR12R y O-1, las condiciones de amplificación aplicadas fueron las propuestas por Harrington y Wingfield (1995) y modificadas por Pérez et al. (1999). Los productos resultantes de la reacción de PCR anterior se llevó a cabo el análisis de RFLP.

Los productos resultantes de la amplificación se cortaron con las endonucleasas de restricción AluI, BsmI (Roche Diagnostics) y NdeI (Takara Bio Inc.), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Se identifican las distintas especies de *Armillaria* según los patrones resultantes descritos por Harrington y Wingfield (1995) y Pérez et al. (1999).

## **4. Resultados**

En la figura 1 se muestra la ubicación de las parcelas. Los aislados obtenidos en las parcelas de estudio fueron identificados como *Armillaria mellea*, *A. ostoyae* y *A. gallica*. La distribución de especies, genotipos, hospedadores en las parcelas se define en la tabla 1.

Parcela	Hospedador	Genotipos	Especies de <i>Armillaria</i>
1	<i>Robinia pseudoacacia</i>	1	<i>Armillaria mellea</i>
1	<i>Robinia pseudoacacia</i>	2	<i>Armillaria mellea</i>
1	<i>Robinia pseudoacacia</i>	3	<i>Armillaria gallica</i>
1	<i>Salix atrocinerea</i>	4	<i>Armillaria gallica</i>
1	<i>Salix atrocinerea</i>	5	<i>Armillaria mellea</i>
2	<i>Fagus sylvatica</i>	1	<i>Armillaria mellea</i>
2	<i>Fagus sylvatica</i>	2	<i>Armillaria ostoyae</i>
2	<i>Fagus sylvatica</i>	3	<i>Armillaria mellea</i>
2	<i>Fagus sylvatica</i>	4	<i>Armillaria mellea</i>
2	<i>Crataegus monogina</i>	5	<i>Armillaria mellea</i>
2	<i>Fagus sylvatica</i>	6	<i>Armillaria ostoyae</i>
2	<i>Fagus sylvatica</i>	7	<i>Armillaria ostoyae</i>
3	<i>Quercus robur/Chamaecyparis lawsoniana</i>	1	<i>Armillaria ostoyae</i>

En las figuras siguientes se muestran algunas de las distribuciones espaciales de los árboles infectados así como la de los genotipos identificados en cada parcela.

## 5. Discusión

El patosistema de *Armillaria* en el País vasco está actualmente directamente relacionado con el declive de plantaciones forestales, bosques y ecosistemas forestales en zonas protegidas, parques naturales, causando una mortalidad importante en plantaciones y hayedos y robledales de alto valor cultural y medioambiental.

La amplia distribución (300 focos) y diversidad de especies detectadas en esta comunidad es considerablemente alta: En dichos focos se han identificado cinco especies diferentes de *Armillaria*: *A. mellea* (patrones 1 y 2) *A. ostoyae* (patrones 1 y 2) *A. cepistipes*, *A. gallica* y *A. tabescens* (Iturrutxa et al., 2007)

En este trabajo se observan tres tipos de patosistemas diferentes en lo referido a composición de especies y potenciales vías de dispersión de la enfermedad. Las especies más virulentas están representadas, *A. ostoyae* y *A. mellea*. Todas las especies tienen la capacidad de colonizar raíces vivas pero se ha comprobado que algunas especies son la causa principal de mortalidad en plantas (Prospero et al., 2004). Entre las más virulentas están descritas *A. ostoyae* en plantaciones forestales y *A. mellea* en cultivos agrícolas (Gregory et al., 1991). Sin embargo esta diferencia puede reflejar una diferencia de distribución geográfica más que una preferencia por el hospedador lo cual está en consonancia con lo observado en este trabajo en el que tanto en la parcela nº1 y nº2 ambas especies coexisten causando serios daños en las masas boscosas.

La distribución de los grupos de compatibilidad en las parcelas revela el patrón de dispersión (Shaw y Roth, 1976). La presencia de diferentes grupos de compatibilidad sugiere una posible dispersión por basidiosporas a demás de una dispersión vegetativa, visible en parcelas 1 y 2. En contraste con esta situación, la parcela 3 muestra un patrón diferente, monoespecífico y sugiere una dispersión por micelio, clonal.

## 6. Conclusiones

*Armillaria* es uno de los más importantes géneros causantes de pudrición en raíz en los ecosistemas forestales del País Vasco. De todas las especies detectadas en esta zona, *A. mellea* (patrones 1 y 2) *A. ostoyae* (patrones 1 y 2) *A. cepistipes*, *A. gallica* y *A. tabescens*, en el estudio de parcelas están representadas las de mayor trascendencia por ser altamente virulentas, *A. mellea* y *A. ostoyae*.

Basándose en el estudio de identificación de especies y grupos de compatibilidad vegetativa, los patrones de distribución y variabilidad de genotipos apuntan a vías de dispersión por contacto entre

árboles sanos y enfermos y mediante dispersión por basidioesporas. El manejo de las parcelas infectadas teniendo en cuenta esta información, refleja que el aislamiento físico de sistemas radicales infectados de los sanos pudiera no ser suficiente para detener la dispersión de la enfermedad en todos los casos.

---



# Estructura de las poblaciones de *Heterobasidion annosum* en plantaciones de coníferas del País Vasco

Autores: MESANZA NEBAI & ITURRITXA EUGENIA

Colaboradores : ANDER ISASMENDI & FRANCISCO SÁENZ DE URTURI

neiker  
tecnalia



## Introducción

La enfermedad de pudrición de la raíz causada por *Heterobasidion* es en términos económicos, la enfermedad más importante en coníferas en bosques y plantaciones de las regiones templadas del hemisferio Norte.

Potencialmente este género tiene diversas vías de dispersión en masas forestales. En primer lugar puede infectar a su hospedador a través de heridas mediante la dispersión de esporas por el aire, meiosporas y es capaz de secundariamente dispersarse de árbol a árbol a través de las raíces (Redfern & Stenlid, 1998).

En la segunda mitad del siglo XX se produjo un incremento considerable de la superficie forestal en el Norte de España mediante repoblaciones y sustitución de los bosques. Esta reforestación se llevó a cabo mayoritariamente introduciendo monocultivos de especies de coníferas exóticas (Euzko Jaurlaritza, 2002). Una de las implicaciones de la explotación forestal intensiva es el incremento de los brotes de enfermedades como la causada por *Heterobasidion annosum*. En el País Vasco han sido detectados 45 focos en declive debidos a *Heterobasidion annosum* s.s. (P-tipo Europeo) en *Chamaecyparis lawsoniana* (11.1%), *Pinus pinaster* (2.2%), *P. radiata* (42.2%), *P. nigra* (2.2%), *P. sylvestris* (17.8%), *Pseudotsuga menziesii* (17.8%) and *Picea abies* (6.7%) (Mesanza & Iturrutxa, 2012)

Se precisa profundizar en el conocimiento de los ecosistemas forestales en relación a dicha enfermedad para poder establecer estrategias de prevención y control acordes a la estructura poblacional de la especie patógena. Los grupos de compatibilidad vegetativa representan una vía natural de subdivisión de las poblaciones de hongos, el intercambio de información genética se potencia en esta especie y permiten a los individuos identificarse y diferenciarse unos de otros, proporcionando información sobre la variabilidad de las poblaciones (Leslie, 1990)

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este estudio es obtener información detallada sobre la presencia de *Heterobasidion* a nivel de parcelas, especies, tamaño y la distribución espacial de los grupos de compatibilidad vegetativa

## 3. Metodología

### Muestreo

En el año 2009-2011 se llevó a cabo una evaluación de daños producidos por la enfermedad en plantaciones y bosques de coníferas del País Vasco. A partir de estos resultados se seleccionaron cuatro plantaciones, con la severidad e incidencia de la enfermedad más alta, para su muestreo.

Se recogieron muestras en las plantaciones, se etiquetaron y georeferenciaron, registrándose la posición en la parcela de cada uno de ellos y transferidos a un mapa mediante el software ARMAP 10.

### Cultivo y aislamiento de cepas

Las muestras se trasladaron al laboratorio para la consecución de cultivos puros. En todos los casos, los aislados se obtuvieron mediante siembra en medio semi-selectivo BDS (Benomil Dichloran Estreptomicona) (Worral, 1991). Los cultivos se incubaron a 20°C durante un periodo de una a dos semanas.

### Estudio de los grupos de compatibilidad vegetativa

Para detectar la respuesta de incompatibilidad somática entre aislados obtenidos en las parcelas, se enfrentaron entre ellos. Se transfirieron porciones de unos 2 mm de longitud y se sembraron dos a dos, cada uno de ellos en la parte aproximadamente central de la mita de la placa de Petri, sobre medio MEA (Malte Extract Agar). Estas placas se incubaron a 20°C durante un periodo de un mes a dos meses (Stenlid, 1985). El ensayo se repitió dos veces.

### Análisis molecular

La extracción de AND de las cepas se realizó a partir de cultivos puros mediante el kit de extracción Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA).

Para la identificación de la especie a nivel molecular se utilizó la técnica de polimorfismo de digestión de la regiones intergénicas descrito por Kasuga et al, (1993) y técnicas de secuenciación (Mesanza & Iturrutxa, 2011)

## 4. Resultados

En la figura 1 se muestra la ubicación de las parcelas. Los aislados obtenidos en todas las parcelas fueron identificados como *Heterobasidion annosum*. Al ser observados al microscopio, en todos ellos se identificó la presencia de fitulas, características de la naturaleza heterocariótica de los mismos.

En las figuras 2, 3, 4 y 5 se muestra la distribución espacial de los árboles infectados así como la de los genotipos identificados en cada parcela.

## 5. Discusión

Todos los aislados obtenidos en las parcelas fueron identificados como la especie *Heterobasidion annosum*. Hasta el momento ha sido la única especie detectada en coníferas del País Vasco (*Pinus radiata*, *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies*, *Chamaecyparis lawsoniana*) (Mesanza & Iturrutxa, 2012).

Los mayores tamaños de genotipos se observan en las parcelas de plantaciones mixtas 2 y 3, entorno a los 50-60 metros, resultados que están en mayor consonancia con los obtenidos en otras plantaciones españolas y Europeas (Vita et al., 2007; Keca, 2008; Linres et al., 2010), en los que este mayor tamaño se atribuye a que las infecciones iniciales son antiguas (>20 años), con una dispersión alta de la enfermedad, entre árboles colindantes, a través del contacto radical entre raíces sanas y enfermas (Sharting 1878, 1894; Olson, 1941). A todo esto se añade la ausencia de tratamientos de prevención y control de la enfermedad en las zonas afectadas por dicha enfermedad.

En el caso de la parcela de experimentación nº 1 este patrón cambia, detectándose un mayor número de genotipos de menor tamaño. Esta observación indica que las basidioesporas desempeñan un importante papel en el establecimiento de nuevas infecciones, situación que se asemeja a la descrita por Keca (2008)

En el contexto actual de las plantaciones estudiadas y observadas en estudios anteriores, resulta de especial trascendencia la reducción de la presión de inóculo mediante la eliminación de material infectado para evitar tanto las infecciones por contacto entre material sano enfermo como para evitar la producción de basidiocarpos y dispersión vía aérea de basidioesporas.

## 6. Conclusiones

Hasta el momento la única especie detectada de *Heterobasidion* en bosques de coníferas en el País Vasco es *Heterobasidion annosum* s.s. (P-tipo Europeo). Los patrones de distribución y variabilidad de genotipos apuntan a vías de dispersión por contacto entre árboles sanos y enfermos y mediante dispersión por basidioesporas.

La gestión y manejo de las parcelas infectadas ha de tener en cuenta las vías potenciales de dispersión en la zona, a través de tocones, heridas, raíces etc.

Figura 1: Ubicación de las de estudio, parcela 1 Cabaña, parcela 2 Azaceta, parcela 3 Barcena, parcela 4 Legorreta



Figura 2: Distribución de la enfermedad y los genotipos en la parcela nº 1, bosque de *Pinus sylvestris*



Figura 3: Distribución de la enfermedad y los genotipos en la parcela nº 2, plantación mixta de *Picea* y *Chamaecyparis lawsoniana*

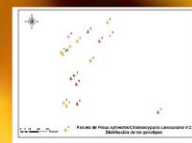


Figura 4: Distribución de la enfermedad y los genotipos en la parcela nº 3, plantación mixta de *Picea* y *Sequoia sempervirens*



Figura 5: Distribución de la enfermedad y los genotipos en la parcela nº 4, plantación mixta de *Pinus radiata* y *Sequoia sempervirens*

## Resumen

*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref sensu lato, es considerada la principal causa



de pudrición de raíz en coníferas en el hemisferio norte. Causa daños importantes en bosques adultos. Se estima que los daños anuales ocasionados por esta enfermedad a nivel de la UE ascienden a más de 500 millones de euros.

Se pueden dar varias vías potenciales de infección: por basidioesporas, infección de los tocones de árboles, por el crecimiento del micelio, a través de las raíces y transmisión por contacto entre raíces infectadas y sanas, mediante esporas que germinan en el suelo hacia las raíces.

Se analiza la estructura de las poblaciones de *Heterobasidion annosum* en cuatro plantaciones de coníferas, se observa en todas ellas una variabilidad amplia de grupos de compatibilidad vegetativa. A nivel taxonómico se detecta una única especie de *Heterobasidion*, *H. annosum* sensu stricto (Tipo P europeo de *Heterobasidion annosum* sensu lato) en todas las plantaciones analizadas.

## 1. Introducción

La enfermedad de pudrición de la raíz causada por *Heterobasidion* es en términos económicos, la enfermedad más importante en coníferas en bosques y plantaciones de las regiones templadas del hemisferio Norte.

Potencialmente este género tiene diversas vías de dispersión en masas forestales. En primer lugar puede infectar a su hospedador a través de heridas mediante la dispersión de esporas por el aire, meiosporas y es capaz de secundariamente dispersarse de árbol a árbol a través de las raíces (Redfern & Stenleid, 1998; Stenleid & Redfern 1998).

En la segunda mitad del siglo XX se produjo un incremento considerable de la superficie forestal en el Norte de España mediante repoblaciones y sustitución de los bosques. Esta reforestación se llevó a cabo mayoritariamente introduciendo monocultivos de especies de coníferas exóticas (Eusko Jaurlaritza, 2002). Una de las implicaciones de la explotación forestal intensiva es el incremento de los brotes de enfermedades como la causada por *Heterobasidion annosum*. En el País Vasco han sido detectados 45 focos en declive debidos a *Heterobasidion annosum* s.s. (P-tipo Europeo) en *Chamaecyparis lawsoniana* (11.1%), *Pinus pinaster* (2.2%), *P. radiata* (42.2%), *P. nigra* (2.2%), *P. sylvestris* (17.8%), *Pseudotsuga menziesii* (17.8%) and *Picea abies* (6.7%) (Mesanza & Iturrutxa, 2012)

Se precisa profundizar en el conocimiento de los ecosistemas forestales en relación a dicha enfermedad para poder establecer estrategias de prevención y control acordes a la estructura poblacional de la especie patógena. Los grupos de compatibilidad vegetativa representan una vía natural de subdivisión de las poblaciones de hongos, el intercambio de información genética se potencia en esta especie y permiten a los individuos identificarse y diferenciarse unos de otros, proporcionando información sobre la variabilidad de las poblaciones (Leslie, 1990)

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este estudio es obtener información detallada sobre la presencia del complejo armillaria a nivel de parcelas, especies, tamaño y la distribución espacial de los grupos de compatibilidad vegetativa

## 3. Metodología

### Muestreo

En el año 2009-2011 se llevó a cabo una evaluación de daños producidos por la enfermedad en plantaciones y bosques de coníferas del País Vasco. A partir de estos resultados se seleccionaron cuatro plantaciones, con la severidad e incidencia de la enfermedad más alta, para su muestreo.

Se recogieron muestras en las plantaciones, se etiquetaron y georeferenciaron, registrándose la posición en la parcela de cada uno de ellos y transferidos a un mapa mediante el software ARMAP 10.

### **Cultivo y aislamiento de cepas**

Las muestras se trasladaron al laboratorio para la consecución de cultivos puros. En todos los casos, los aislados se obtuvieron mediante siembra en medio semi-selectivo BDS (Benomilo Dichloran Estreptomycin) (Worral, 1991). Los cultivos se incubaron a 20°C durante un periodo de una a dos semanas.

### **Estudio de los grupos de compatibilidad vegetativa**

Para detectar la respuesta de incompatibilidad somática entre aislados obtenidos en las parcelas, se enfrentaron entre ellos. Se transfirieron porciones de unos 2 mm de longitud y se sembraron dos a dos, cada uno de ellos en la parte aproximadamente central de la mitad de la placa de Petri, sobre medio MEA (Malte Extract Agar). Estas placas se incubaron a 20°C durante un periodo de un mes a dos meses (Stenlid, 1985). El ensayo se repitió dos veces.

### **Análisis molecular**

La extracción de ADN de las cepas se realizó a partir de cultivos puros mediante el kit de extracción Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA). Para la identificación de la especie a nivel molecular se utilizó la técnica de polimorfismo de digestión de las regiones intergenicas descrito por Kasuga et al, (1993) y técnicas de secuenciación (Mesanza & Iturrutxa, 2011)

## **4. Resultados**

En la figura 1 se muestra la ubicación de las parcelas. Los aislados obtenidos en todas las parcelas fueron identificados como *Heterobasidion annosum*. Al ser observados al microscopio, en todos ellos se identificó la presencia de fíbulas, características de la naturaleza heterocariótica de los mismos.

En las figuras 2, 3, 4 y 5 se muestra la distribución espacial de los árboles infectados así como la de los genotipos identificados en cada parcela.

## **5. Discusión**

Todos los aislados obtenidos en las parcelas fueron identificados como la especie *Heterobasidion annosum*. Hasta el momento ha sido la única especie detectada en coníferas del País Vasco (*Pinus radiata*, *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies*, *Chamaecyparis Lawsoniana*) (Mesanza & Iturrutxa, 2012).

Los mayores tamaños de genotipos se observan en las parcelas de plantaciones mixtas 2 y 3, entorno a los 50–60 metros, resultados que están en mayor consonancia con los obtenidos en otras plantaciones españolas y Europeas (Vita et al., 2007; Keca, 2008; Linres et al., 2010), en los que este mayor tamaño se atribuye a que las infecciones iniciales son antiguas (>20 años), con una dispersión alta de la enfermedad, entre árboles colindantes, a través del contacto radicular entre raíces sanas y enfermas (Sharting 1878, 1894; Olson, 1941). A todo esto se añade la ausencia de tratamientos de prevención y control de la enfermedad en las zonas afectadas por dicha enfermedad.

En el caso de la parcela de experimentación nº 1 este patrón cambia, detectándose un mayor número de genotipos de menor tamaño. Esta observación indica que las basidioesporas desempeñan un importante papel en el establecimiento de nuevas infecciones, situación que se asemeja a la descrita por Keca (2008)

En el contexto actual de las plantaciones estudiadas y observadas en estudios anteriores, resulta de especial trascendencia la reducción de la presión de inóculo mediante la eliminación de material infectado para evitar tanto las infecciones por contacto entre material sano enfermo como para evitar la producción de basidiocarpos y dispersión vía aérea de basidioesporas.

## 6. Conclusiones

Hasta el momento la única especie detectada de *Heterobasidion* en bosques de coníferas en el País Vasco es *Heterobasidion annosum* s.s. (P-tipo Europeo).

Los patrones de distribución y variabilidad de genotipos apuntan a vías de dispersión por contacto entre árboles sanos y enfermos y mediante dispersión por basidioesporas.

La gestión y manejo de las parcelas infectadas ha de tener en cuenta las vías potenciales de dispersión en la zona, a través de tocones, heridas, raíces etc.



# Bioensayos de control biológico y químico frente a *Fusarium circinatum* en *Pinus radiata*

## Bioensayos de control biológico y químico frente a *Fusarium circinatum* en *Pinus radiata*

ITURRITXA E.<sup>1</sup>, MESANZA N.<sup>1</sup>, AITKEN J.<sup>2</sup>



### INTRODUCCIÓN

*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (teleomorph= *Gibberella circinata*) es uno de los principales agentes causantes de daños en pinos, especialmente sobre *Pinus radiata*, tanto sobre semilla, plántula como sobre árboles adultos, en plantaciones y bosques naturales de esta especie (Sincilar and Lyon 2005). Diversas evidencias sugieren que *Fusarium circinatum* puede ser originario de Méjico aunque fuera por primera vez detectado en el sudeste de Estados Unidos causando la enfermedad del chancro resinoso (Gordon 2006). Desde entonces ha sido detectada su dispersión hacia otras partes del mundo causando serios daños en viveros y plantaciones forestales como por ejemplo en California (Storer et al., 1994; Storer et al., 2002) Sudáfrica (Viljoen et al. 1994), Chile (Wingfield et al. 2002), España (Collar Urquijo 1995; Dwinell et al. 1998; Dwinell 1999, Landera et al., 2005, Iturrutxa et al., 2011). Se considera una de las mayores amenazas para plantaciones en Australia y Nueva Zelanda (Gadgil et al. 2003, Ganley et al., 2009). El transporte de semillas y plántulas representa una vía de dispersión importante para la introducción del patógeno en nuevas áreas (loos et al., 2009). La prevención de la dispersión del patógeno es un aspecto fundamental en las líneas de control. Las medidas preventivas deben proporcionar un control eficaz de la enfermedad con bajo impacto ambiental. Este aspecto puede ser optimizado mediante la búsqueda de nuevos tratamientos químicos, sustancias de origen natural y organismos de control biológico. Los resultados obtenidos por la investigadora Jenny Aitken en Kiwi han resultado muy prometedores y de gran trascendencia en el diseño de este trabajo experimental.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Material fúngico y vegetal

La cepa de *Fusarium circinatum* (F37-02, Grupo de compatibilidad vegetativa A y tipo de apareamiento 2) fue obtenida a partir de muestras de *Pinus radiata* procedentes de Gipuzkoa (Iturrutxa et al 2011) representativa de la población analizada en el País Vasco.

El hongo se cultivó en medio agarizado de patata dextrosas agar (PDA, extracto de patata en polvo, 4 g l<sup>-1</sup>, glucosa 20 g l<sup>-1</sup>, agar 15 g l<sup>-1</sup> (Oxoid, Unipath Ltd., Bedford, UK). Las acículas de pino se obtuvieron a partir de plántulas cultivadas en invernadero de año y medio de edad y acículas de árboles adultos de plantaciones del País Vasco, en ambos casos fueron obtenidas a partir de la especie forestal *Pinus radiata*.

#### Bioensayo

Para la preparación de los medios con los tratamientos químicos, sustancias naturales y combinado de agentes de control biológico y su posterior traslado desde Nueva Zelanda al laboratorio de Neiker, se utiliza un sistema de pequeñas bolsas de plástico con cierre hermético. A posteriori se colocan en dichas bolsas una media de cuatro fragmentos de acículas de pino. Los tratamientos se aplican sobre acículas infectadas en condiciones naturales y acículas inoculadas en condiciones controladas de invernadero (Bioseguridad P2). Estas acículas fueron previamente desinfectadas, lavándose cinco minutos con lejía y aclaradas con agua corriente durante otros dos minutos.

A continuación las bolsas con las acículas se inoculan con una suspensión de esporas (10 esporas por microlitro) aplicando, aproximadamente, 10 microlitros de dicha suspensión por bolsa. Se realiza una media de cinco repeticiones por tratamiento y el ensayo se repite dos veces.

Se evalúa el desarrollo del hongo inoculado semanalmente hasta que se estabilizan los resultados, al cabo de un mes, a posteriori se realiza una última evaluación a los 4 meses desde la inoculación y se lleva a cabo el ensayo para confirmar el efecto fungicida/fungistático de los tratamientos aplicados con respecto al control sin tratar.

Se estima el efecto de los tratamientos en la inhibición del crecimiento de *F. circinatum* y en aquellos casos en los que esta inhibición se produce se confirma el efecto fungicida o fungistático transfiriendo una porción del medio inoculado a una nueva placa de medio selectivo FSM.

### RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este bioensayo muestran el efecto de los tratamientos, positivo o negativo, en el crecimiento de *F. circinatum* y en presencia de material vegetal, acículas de pino Monterey (Tabla 1).

En la Tabla 2 se exponen los resultados obtenidos al definir la respuesta del hongo a los tratamientos aplicados, es decir, efecto fungicida, letal (0) o fungistático (+), inhibidor del crecimiento.

TRATAMIENTOS	Actividad + Fc (invernadero)	Actividad + Fc (invernadero)	Actividad + Fc (invernadero)	Actividad + Fc (invernadero)	Fc solo	Fc solo
OMNIWETT (HIGH)	0	0	0	0	0	0
BIOSEKUR (LOW)	+	+	+	+	+	+
PROPOLIS 0.5%	0	0	0	0	0	0
MANEIRA OL. (1.000/1000)	+	+	+	+	+	+
LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L)	0	0	0	0	0	0
PL SHIELD WHITE (COBWEB)	+	+	+	+	+	+
POWDER A	AF	AF	AF	AF	AF	AF
POWDER B	0	0	0	0	0	0
POWDER PINE TREE (1/2000000000)	0	0	0	0	0	0
TRIFLOMACHNE	+	+	+	+	+	+
P. FUSCA	+	+	+	+	+	+
Combinado aceites esenciales 1	0	0	0	0	0	0
LAURENCE	+	+	+	+	+	+
Combinado aceites esenciales 2	0	0	0	0	0	0
CONTROL	+	+	+	+	+	+

Tabla 1: Resultados obtenidos en las 2 repeticiones del ensayo para definir el efecto de los tratamientos en el crecimiento del hongo *Fusarium circinatum* (Fc) en los tres bioensayos de inoculación, sobre acículas procedentes de invernadero (1a y 1b), sobre acículas procedentes de invernadero (2a y 2b), directamente sobre el medio con el tratamiento sin acículas. 0=Inhibición total del crecimiento, +=Crecimiento del hongo.



TRATAMIENTOS	Actividad Fc invernadero	Actividad Fc invernadero	Actividad Fc invernadero	Actividad Fc invernadero	Fc solo	Fc solo
OMNIWETT (HIGH)	0	0	0	0	0	0
PROPOLIS 0.5%	0	0	0	0	0	0
LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L)	0	0	0	0	0	0
PL SHIELD WHITE (COBWEB)	0	0	0	0	0	0
POWDER A	AF	AF	AF	AF	AF	AF
POWDER B	0	+	0	0	0	0
POWDER PINE TREE (1/2000000000)	0	+	0	0	0	0
Combinado aceites esenciales 1	0	+	0	0	0	0
Combinado aceites esenciales 2	0	0	0	0	0	0
CONTROL	+	+	+	+	+	+

Tabla 2: Resultados obtenidos en las 2 repeticiones del ensayo para definir el efecto fungicida o fungistático de los tratamientos en el crecimiento del hongo *Fusarium circinatum* (Fc) en los tres bioensayos de inoculación, sobre acículas procedentes de invernadero (1a y 1b), sobre acículas procedentes de invernadero (2a y 2b), directamente una vez se transfirió la muestra a un medio sin tratamientos de control. 0=Efecto fungicida del tratamiento aplicado, +=Efecto fungistático.

### DISCUSIÓN & CONCLUSIONES

En este estudio se muestra el efecto fungicida y fungistático de varios de los tratamientos ensayados frente a *F. circinatum*. La utilización de métodos de inoculación artificial y el desarrollo de nuevos bioensayos con material vegetal altamente susceptible a la enfermedad, nos permite comprobar la eficiencia de los tratamientos y realizar una selección rápida de los más eficaces simulando condiciones naturales en las cuales el patógeno puede persistir.

Los tratamientos que mostraron una eficacia del cien por cien en la inhibición del crecimiento fueron: OMNIWETT (HIGH), PROPOLIS 0.5%, LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L), PL SHIELD WHITE (COBWEB), POWDER B, POWDER PINE TREE 1/de20120430 (LIQA+LIQB), y los dos combinados de aceites esenciales.

El efecto letal, fungicida se produjo en los tratamientos siguientes: LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L), PL SHIELD WHITE (COBWEB) y los 2 combinados de aceites esenciales. En el contexto actual en el que varias sustancias químicas con efecto fungicida y fungistático han sido excluidas de la lista de productos fitosanitarios (Directive 91/414/CEE) y que nos enfrentamos a enfermedades de alta virulencia, aumenta la necesidad de encontrar nuevas alternativas de biocontrol que permitan una reducción en los inputs de fungicidas y una reducción en los costes de producción.

Los combinados de aceites esenciales han mostrado una alta eficacia en el control de la enfermedad, así como el propóleo a pesar de responder de forma menos eficaz en lo relativo al efecto fungicida en presencia de acículas. Estos resultados son consistentes con los que otros autores han trabajado con sustancias naturales como tratamientos de biocontrol frente a *Fusarium* como Ozcan et al. (2004), Win et al. (2007), Iturrutxa et al. (2011), Aitken (pers.com 2012). Uno de los factores limitantes a la hora de aplicar tratamientos tanto procedentes de síntesis química como de origen natural, es su actividad fitotóxica. En el caso de los aceites esenciales se conoce la toxicidad de monoterpenos volátiles, en fase de vapor en las plantas vasculares y semillas (Ward G.M. & Nagy J.G., 1966; Owen, 1968, Iturrutxa et al., 2011). El resto de los agentes biológicos utilizados en este ensayo que aún están en fase de desarrollo, son componentes comunes de la rizosfera, con un crecimiento rápido y que pueden tolerar un amplio rango de condiciones ambientales, lo que los hace buenos candidatos como agentes de biocontrol tales como *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. (Howell, 2003). Además hay evidencias de que algunas de estas cepas producen metabolitos que aumentan el nivel de resistencia de la planta vía la activación de la respuesta de defensa del hospedador (Hanson & Howell, 2004). Algunos de los organismos antagonistas testados mostraron un efecto eficaz frente a *F. circinatum*, como los incluidos en los tratamientos POWDER A, POWDER B, POWDER PINE TREE 1/de20120430(LIQA+LIQB).

## Resumen

En este trabajo se testan dieciséis tratamientos fungicidas y se desarrolla un nuevo método para seleccionar sustancias químicas y agentes biológicos, evaluándose su eficacia frente al hongo patógeno *Fusarium circinatum*, organismo causante del chancro del pino de mayor trascendencia en países como EEUU, Sudáfrica, España y Chile y con un riesgo significativo para Nueva Zelanda y Australia.

En los últimos años, se ha estudiado la capacidad de persistencia del hongo en el suelo a nivel local, siendo capaz de subsistir por periodos superiores al año, tanto en restos de madera como en acículas. Se pone a punto un método innovador, utilizando acículas de *Pinus radiata* infectadas con *F. circinatum*. La presión del inóculo se incrementa mediante inoculación adicional con una suspensión de esporas. Los tratamientos se aplican tanto a acículas infectadas en condiciones naturales como a acículas inoculadas en condiciones controladas de invernadero.

De los dieciséis tratamientos analizados nueve mostraron actividad en la inhibición del crecimiento de *F. circinatum*. Siendo ocho de ellos sustancias de origen natural y organismos antagonistas de control biológico lo que amplía el espectro de tratamientos biológicos frente a la enfermedad.

Los tratamientos que mostraron una eficacia del cien por cien en la inhibición del crecimiento fueron: OMNIWETT (HIGH), PROPOLIS 0,5%, LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L), PL SHIELD WHITE (COBWEB), POWDER B, POWDER PINE TREE 1/de20120430 (LIQA+LIQB), y los dos combinados de aceites esenciales.

El efecto letal, fungicida se produjo en los tratamientos siguientes: LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L), PL SHIELD WHITE (COBWEB) y los 2 combinados de aceites esenciales.

## 1. Introducción

*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (teleomorph= *Gibberella circinata*) es uno de los principales agentes causantes de daños en pinos, especialmente sobre *Pinus radiata*, tanto sobre semilla, plántula como sobre árboles adultos, en plantaciones y bosques naturales de esta especie (Sinclair and Lyon 2005). Diversas evidencias sugieren que *Fusarium circinatum* puede ser originario de México aunque fuera por primera vez detectado en el sudeste de Estados causando la enfermedad del chancro resinoso (Gordon 2006). Desde entonces ha sido detectada su dispersión hacia otras partes del mundo causando serios daños en viveros y plantaciones forestales como por ejemplo en California (Storer et al, 1994; Storer et al, 2002) Sudáfrica (Viljoen et al 1994), Chile (Wingfield et al 2002), España (Collar Urquijo 1995; Dwinell et al. 1998; Dwinell 1999, Landera et al, 2005, Iturriza et al., 2011). Se considera una de las mayores amenazas para plantaciones en Australia y Nueva Zelanda (Gadgil et al. 2003, Ganley et al, 2009).

El transporte de semillas y plántulas representa una vía de dispersión importante para la introducción del patógeno en nuevas áreas (loos et al., 2009).

La prevención de la dispersión del patógeno es un aspecto fundamental en las líneas de control. Las medidas preventivas deben de proporcionar un control eficaz de la enfermedad con bajo impacto ambiental. Este aspecto puede ser optimizado mediante la búsqueda de nuevos tratamientos químicos, sustancias de origen natural y organismos de control biológico. Los resultados obtenidos por la investigadora Jenny Aitken en Kiwi han resultado muy prometedores y de gran trascendencia en el diseño de este trabajo experimental.

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de diferentes combinados de agentes de control biológico y sustancias de origen natural proporcionados por empresas neozelandesas en colaboración con The treelab y el centro de investigación Neiker para su posterior aplicación en viveros. Los tratamientos fueron testados por un sistema innovador, en condiciones de in vitro. Se testa su impacto en la inhibición del crecimiento del hongo así como su actividad fungicida y fungiestática.

### 3. Metodología

#### Material fúngico y vegetal

La cepa de *Fusarium circinatum* (F37-02, Grupo de compatibilidad vegetative A y tipo de apareamiento 2) fue obtenido a partir de muestras de *Pinus radiata* procedentes de Gipuzkoa (Iturrutxa et al 2011) representativa de la población analizada en el País Vasco.

El hongo se cultivo en medio agarizado de patata dextrosas agar (PDA, extracto de patata en polvo, 4 g l<sup>-1</sup>, glucosa 20 g l<sup>-1</sup>, agar 15 g l<sup>-1</sup> ( Oxoid, Unipath Ltd., Bedford, UK). Las acículas de pino se obtuvieron a partir de plántulas cultivadas en invernadero de año y medio de edad y acículas de árboles adultos de plantaciones del País Vasco, en ambos casos fueros obtenidas a partir de la especie forestal *Pinus radiata*.

#### Bioensayo

Para la preparación de los medios con los tratamientos químicos, sustancias naturales y combinado de agentes de control biológico y su posterior traslado desde Nueva Zelanda al laboratorio de Neiker, se utiliza un sistema de pequeñas bolsas de plástico con cierre hermético. A posteriori se colocan en dichas bolsas una media de cuatro fragmentos de acículas de pino. Los tratamientos se aplican sobre acículas infectadas en condiciones naturales y acículas inoculadas en condiciones controladas de invernadero (Bioseguridad P2).

Estas acículas fueron previamente desinfectadas, lavándose cinco minutos con jabón y aclaradas con agua corriente durante otros dos minutos.

A continuación las bolsas con las acículas se inoculan con una suspensión de esporas (10 esporas por microlitro) aplicando, aproximadamente, 10 microlitros de dicha suspensión por bolsa. Se realiza una media de cinco repeticiones por tratamiento y el ensayo se repite dos veces

Se evalúa el desarrollo del hongo inoculado semanalmente hasta que se estabilizan los resultados, al cabo de un mes, a posteriori se realiza una última evaluación a los 4 meses desde la inoculación y se lleva a cabo el ensayo para confirmar el efecto fungicida/fungiestático de los tratamientos aplicados con respecto al control sin tratar.

Se estima el efecto de los tratamientos en la inhibición del crecimiento de *F. circinatum* y en aquellos casos en los que esta inhibición se produce se confirma el efecto fungicida o fungiestático transfiriendo una porción del medio inoculado a una nueva placa de medio selectivo FSM.

### 4. Resultados

Los resultados obtenidos en este bioensayo muestran el efecto de los tratamientos, positivo o negativo, en el crecimiento de *F. circinatum* y en presencia de tejido vegetal, acículas de pino Monterey (Tabla 1).

En la Tabla 2 se exponen los resultados obtenidos al definir la respuesta del hongo a los tratamientos aplicados, es decir, efecto fungicida, letal (0) o fungiestático (+), inhibidor del crecimiento.



TRATAMIENTOS	Acículas + Fc (invernadero)	Acículas + Fc (invernadero)	Acículas + Fc (plantación)	Acículas + Fc (plantación)	Fc (solo)	Fc (solo)
	1a	1b	2a	2b	3a	3b
OMNIWETT (HIGH)	0	0	0	0	0	0
BUDBREAKER (LOW)	+	+	+	+	0	0
PROPOLIS 0,5%	0	0	0	0	0	0
MANUKA OIL (5 DROPS/100ml)	+	+	+	+	+	+
LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L)	0	0	0	0	0	0
PLANT SHIELD BROWN (HIGH)	+	+	+	+	+	+
PL SHIELD WHITE (COBWEB)	0	0	0	0	0	0
POWDER A	AF	AF	AF	AF	AF	AF
POWDER B	0	0	0	0	0	0
POWDER PINE TREE 1/de20120430(LIQA+LIQB)	0	0	0	0	0	0
STREPTOMICINE	+	+	+	+	+	+
P.PUTIDA	+	+	+	+	+	+
Combinado aceites esenciales 1	0	-	0	0	0	0
LAVENDER	+	+	+	+	+	+
Combinado aceites esenciales 2	0	0	0	0	0	0
CONTROL	+	+	+	+	+	+

Tabla 1: Resultados obtenidos en las 2 repeticiones del ensayo para definir el efecto de los tratamientos en el crecimiento del hongo *Fusarium circinatum* (Fc) en los tres bioensayos de inoculación, sobre acículas procedentes de invernadero (1a y 1b), sobre acículas procedentes de invernadero (2a y 2b), directamente sobre el medio con el tratamiento sin acículas. 0=Inhibición total del crecimiento, +=Crecimiento del hongo.

TRATAMIENTOS	Acículas Fc invernadero 1a	Acículas Fc invernadero 1b	Acículas Fc field 2a	Acículas Fc field 2b	Fc solo 3a	Fc solo 3b
OMNIWETT (HIGH)	0	0	0	0	0	0
PROPOLIS 0,5%	0	0	+	+	0	0
LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L)	0	0	0	0	0	0
PL SHIELD WHITE (COBWEB)	0	0	0	0	0	0
POWDER A	AF	AF	AF	AF	AF	AF
POWDER B	0	+	0	0	0	0
POWDER PINE TREE 1/de20120430(LIQA+LIQ B)	0	+	0	0	0	0
Combinado aceites esenciales 1	0	-	0	0	0	0
Combinado aceites esenciales 2	0	0	0	0	0	0
CONTROL	+	+	+	+	+	+

Tabla 2: Resultados obtenidos en las 2 repeticiones del ensayo para definir el efecto fungicida o fungiestático de los tratamientos en el crecimiento del hongo *Fusarium circinatum* (Fc) en los tres bioensayos de inoculación, sobre acículas procedentes de invernadero (1a y 1b), sobre acículas procedentes de invernadero (2a y 2b), directamente una vez se transfiere la muestra a un medio sin tratamientos de control.

0=Efecto fungicida del tratamiento aplicado, +=Efecto fungiestático.



## 5. Discusión

En este estudio se muestra el efecto fungicida y fungiestático de varios de los tratamientos ensayados frente a *F. circinatum*. La utilización de métodos de inoculación artificial y el desarrollo de nuevos bioensayos con material vegetal altamente susceptible a la enfermedad, nos permite comprobar la eficiencia de los tratamientos y realizar una selección rápida de los más eficaces simulando condiciones naturales en las cuales el patógeno puede persistir.

Los tratamientos que mostraron una eficacia del cien por cien en la inhibición del crecimiento fueron: OMNIWETT (HIGH), PROPOLIS 0,5%, LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L), PL SHIELD WHITE (COBWEB), POWDER B, POWDER PINE TREE 1/de20120430 (LIQA+LIQB), y los dos combinados de aceites esenciales.

El efecto letal, fungicida se produjo en los tratamientos siguientes: LIQA/20120427 (35ml/L) + LIQB (35ml/L), PL SHIELD WHITE (COBWEB) y los 2 combinados de aceites esenciales.

En el contexto actual en el que varias sustancias químicas con efecto fungicida y fungiestático han sido excluidas de la lista de productos fitosanitarios (Directive 91/414/CEE) y que nos enfrentamos a enfermedades de alta virulencia, aumenta la necesidad de encontrar nuevas alternativas de biocontrol que permitan una reducción en los inputs de fungicidas y una reducción en los costes de producción.

Los combinados de aceites esenciales han mostrado una alta eficacia en el control de la enfermedad, así como el propoleo a pesar de responder de forma menos eficaz en lo relativo al efecto fungicida en presencia de acículas. Estos resultados son consistentes con los que otros autores han trabajado con sustancias naturales como tratamientos de biocontrol frente a *Fusarium* como Ozcan et al. (2004), Win et al. (2007), Iturrutxa et al. (2011), Atkien (pers.comm 2012). Uno de los factores limitantes a la hora de aplicar tratamientos tanto procedentes de síntesis química como de origen natural, es su actividad fitotóxica. En el caso de los aceites esenciales se conoce la toxicidad de monoterpenos volátiles, en fase de vapor en las plantas vasculares y semillas (Ward G.M. & Nagy J.G., 1966; Owen, 1968, Iturrutxa et al., 2011).

El resto de los agentes biológicos utilizados en este ensayo que aún están en fase de desarrollo, son componentes comunes de la rizosfera, con un crecimiento rápido y que pueden tolerar un amplio rango de condiciones ambientales, lo que los hace buenos candidatos como agentes de biocontrol tales como *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. (Howell, 2003). Además hay evidencias de que algunas de estas cepas producen metabolitos que aumentan el nivel de resistencia de la planta vía la activación de la respuesta de defensa del hospedador (Hanson & Howell, 2004). Algunos de los organismos antagonistas testados mostraron un efecto eficaz frente a *F. circinatum*, como los incluidos en los tratamientos POWDER A, POWDER B, POWDER PINE TREE 1/de20120430(LIQA+LIQB).

## Conclusiones

Nueve de los dieciséis tratamientos ensayados mostraron una media y alta eficacia frente al desarrollo del hongo *F. circinatum*, y su utilización no supone un impacto ambiental tan negativo como el que supone la producción y el tratamiento con sustancias procedentes de síntesis química y fungicidas de alta toxicidad.

La utilización de este nuevo bioensayo en el que se incluye material vegetal del hospedador, incrementa el nivel de selección de las sustancias debido a que supone un apoyo sustancial al aumento del vigor del patógeno, las posibilidades de supervivencia en las condiciones ensayadas y la presión del inóculo.

### Otros resultados

En plantaciones de coníferas se están realizando prospecciones detectándose defoliadores del grupo de las bandas, concretamente banda marrón, *Lecanosticta* acícula y a nivel de pudriciones de raíces en

bosques de coníferas y caducifolios destaca la presencia de los géneros *Armillaria* y *Heterobasidion* dándose focos de mortalidad importante tanto en plantaciones como en bosques naturales y otros hongos de pudrición asociados cuya identificación está en fase de realización.

Defoliadores de coníferas, las bandas marrón y roja *Dothistromas*.

Durante el año 2012 se han registrado de nuevo fuertes ataques de *Lecanosticta acicola*, también conocida como banda marrón, se han marcado las zonas afectadas detectadas para su estudio posterior, la identificación se ha realizado hasta el momento por métodos morfológicos. En las imágenes se muestran las esporas y los daños causados en una plantación joven de *P. radiata*. En líneas generales se observa un empeoramiento de las masas causado por el desarrollo de esta enfermedad, se tratará en la medida de lo posible de integrarla en los ensayos de control y propuestas de estrategias de prevención.

Defoliadores de eucaliptos. Se detecta un incremento en la presencia de defoliadores causando daños que van incrementando año tras año.

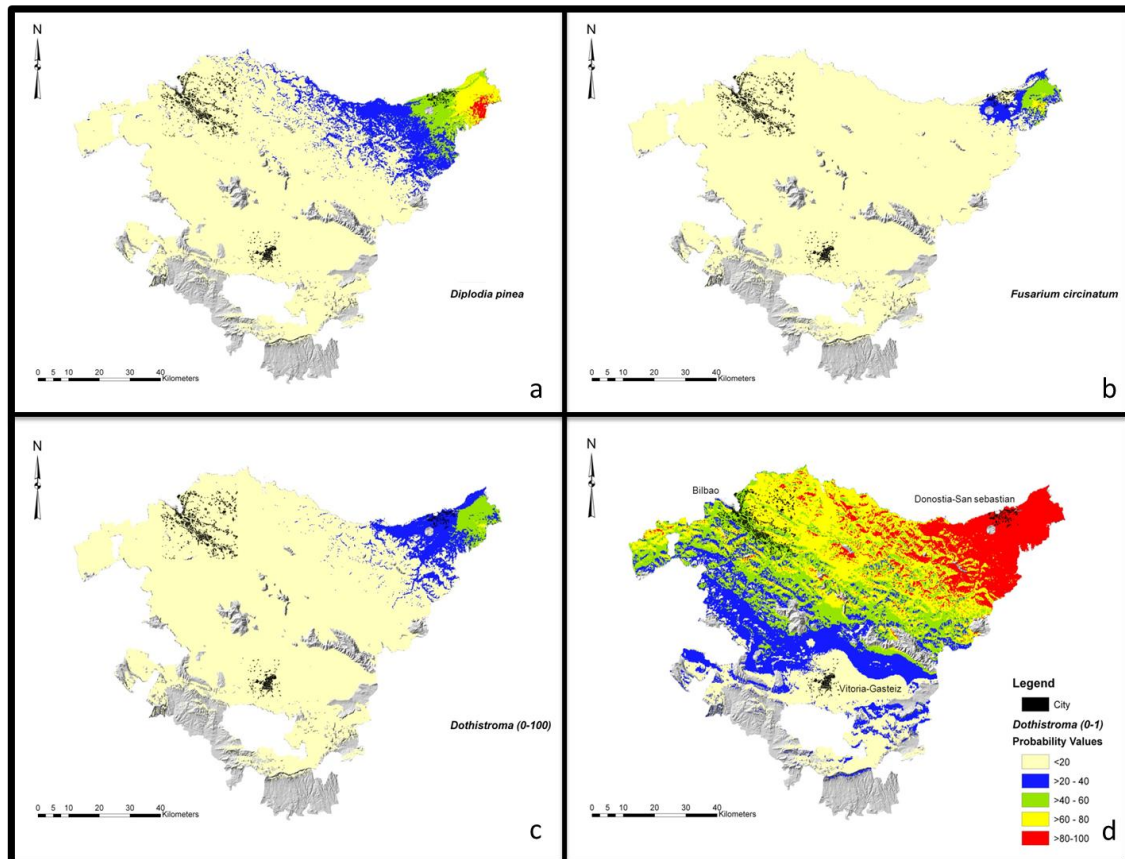
Inicialmente estos daños eran comunes en hoja joven pero ahora se comienzan a ver en hojas adultas. Han sido detectadas en el País Vasco nuevas especies aún no detectadas en otras comunidades.

## Modelización de la distribución y riesgo de las enfermedades causadas por *Fusarium*, *Diplodia*, *Dothistroma*

La generación del modelo de distribución así como el modelo de riesgo de enfermedades de masas boscosas se llevó a cabo para la comunidad del País Vasco.

En colaboración con la Universidad de Canadá en 2013, se ha mejorado el modelo de riesgo para las enfermedades causadas por los patógenos mencionados.

Este trabajo será publicado en la revista Plant Pathology Journal.



# ESTUDIO DE LOS HONGOS BASIDIOMICETOS CAUSANTES DE PUDRICIÓN DE RAÍZ *HETEROBASIDION ANNOSUM* S.L. Y *ARMILLARIA* SP.

## Introducción

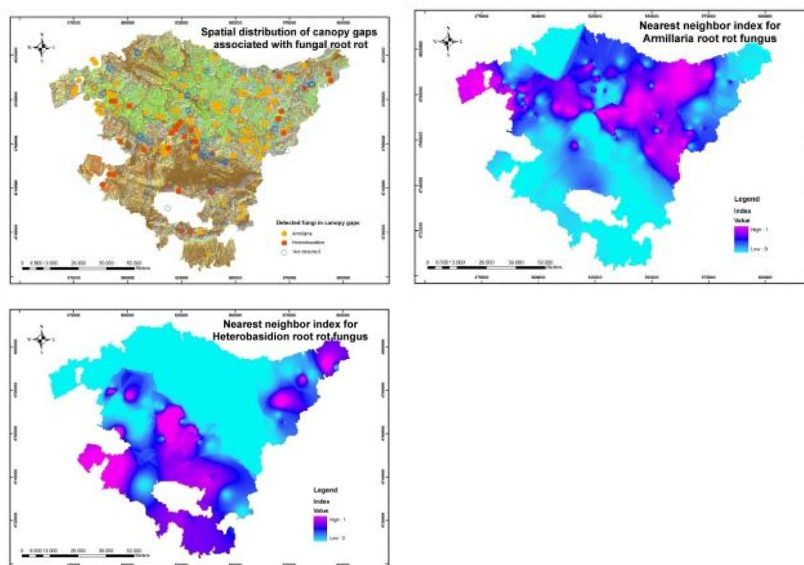
*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. sensu lato y *Armillaria* (Fr.) Staude son dos hongos basidiomicetos de pudrición de raíz causantes de pérdidas económicas muy elevadas en el sector forestal y con un impacto importante en ecosistemas naturales. En lo que se refiere a las especies de *Heterobasidion*, se encuentran entre las enfermedades más severas de los bosques de coníferas del hemisferio norte afectando a especies de *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Cedrus*, *Pseudotsuga* y *Tuja*. Causa pérdidas estimadas en 800 millones de euros anuales en Europa según Woodward et al., 1998. El género *Armillaria* es uno de los géneros más comunes en causar enfermedades de la raíz en coníferas y árboles angiospermos y aunque desempeñan un importante papel en la descomposición de la madera, algunas especies son importantes patógenos con capacidad de causar la muerte a árboles y comprometer de forma considerable la sostenibilidad de los bosques. Los árboles jóvenes o estresados son a menudo mortalmente afectados, pero la mortalidad de árboles altamente vigorosos cuando *Armillaria* incrementa su potencial de inóculo es cada vez más frecuente en plantaciones, bosques y parques naturales. Este hongo puede sobrevivir durante décadas en madera en proceso de degradación y los métodos de control resultan limitados y de difícil aplicación (Gregory et al., 1991).

Los microorganismos de suelo con actividad beneficiosa en el crecimiento y la salud de plantas representan una interesante alternativa a la agricultura convencional (Antoun and Prevost, 2005). Aunque todas las partes de la planta son susceptibles de ser colonizadas por microorganismos, la rizosfera representa la principal fuente de bacterias con actividad beneficiosa para la planta. Estas bacterias se definen generalmente como bacterias promotoras del crecimiento de plantas (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR) (Bashan and Holguin, 1998). Estos organismos promueven el crecimiento de las plantas principalmente de dos formas: por estimulación directa y por biocontrol (Glick, 1995). El control biológico que desarrollan este tipo de organismos se basa en diferentes capacidades incluyendo la competición por la colonización espacial, o por los nutrientes, la producción de antibióticos y enzimas y la inducción de resistencia sistémica frente a patógenos (Raaijmakers et al., 2009). Además estos organismos beneficiosos pueden competir con diversos patógenos degradando compuestos orgánicos o secuestrando micronutrientes que son requeridos para el crecimiento y desarrollo de estos últimos (Fravel et al., 2003; Lemanceau et al., 1992).

Así, los objetivos de este estudio son: identificar las especies de *Heterobasidion* y *Armillaria* causantes de daños en plantaciones forestales y bosque nativo del País Vasco, determinar su ecología y epidemiología y establecer mecanismos de control para dichos patógenos incluyendo la selección de cepas y aplicación de bacterias promotoras del crecimiento en plantas.

## Determinación de la distribución de *Heterobasidion annosum* s.l. y *Armillaria* spp.

Con objetivo de determinar la distribución de *Heterobasidion annosum* s.l. y *Armillaria* spp. en el País Vasco se examinaron tanto plantaciones forestales como bosque nativo, sumando un total de 159 parcelas, en áreas representativas de cada provincia. Este proceso se llevó a cabo mediante un muestreo estratificado aleatorio, centrado en árboles con síntomas de decaimiento o que se encontraban en núcleos de mortalidad. En los casos en los que se apreciaron estructuras fúngicas, las muestras se georreferenciaron, etiquetaron, y se transportaron al laboratorio donde se procesaron en menos de 48 horas. Así, se recogieron un total de 94 aislados del género *Heterobasidion annosum* s.l y un total de 174 aislados del género *Armillaria* spp.



**Fig.1.:** Distribución espacial de claros de bosque asociados con los hongos de pudrición de raíz *H.annosum* y *Armillaria* spp. **Fig.2.:** Patrones de distribución para *Armillaria* spp. **Fig.3.:** Patrones de distribución para *H. annosum*. Según la media obtenida a partir del procedimiento Nearest Neighbor Distance, se observó en ambos casos un patrón de distribución en grupo con un valor significativo de  $p < 0,01$ .

Los lugares en los que se encontraron los patógenos están caracterizados por factores litológicos (detritos alternantes, baja permeabilidad por porosidad). La presencia de focos de *Armillaria* spp. en plantaciones de *Pinus radiata* en relación con otras coníferas es remarcable. A menudo aparece en suelos de areniscas silíceas y depósitos aluviales en la región Eurosiberiana. *H. annosum* s.l. se encuentra en plantaciones de *P. nigra* y *P. radiata*, prácticamente en igual proporción, y especialmente en áreas de areniscas, suelos limosos y turberas de la región Mediterránea.

## Caracterización de los aislados fúngicos

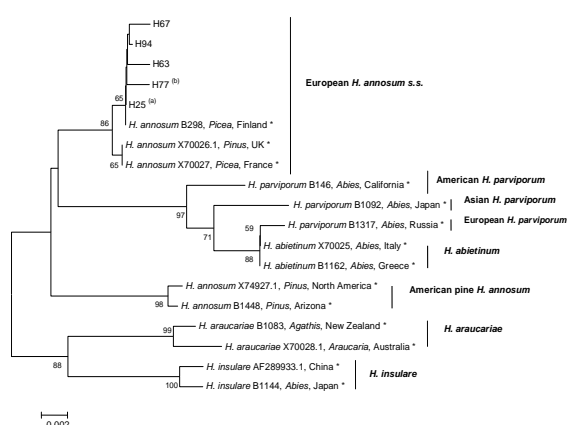


Para proceder a la caracterización de los aislados fúngicos se obtuvieron previamente los cultivos puros de las cepas escogidas mediante cultivo en medio BDS (Benomyl, Dichloran, Streptomycin) (Worral, 1991) de dos a cuatro semanas. Una vez obtenidos los aislados puros se llevó a cabo extracción de ADN (Ácido DesoxirriboNucleico), el cual se utilizó por un lado para la identificación de diferentes especies y por el otro, para la determinación de grupos de compatibilidad somática.

Para la identificación, en el caso de *Heterobasidion annosum* s.l., se procedió de dos maneras diferentes, para 46 de las muestras obtenidas se amplificó la región ITS (Internal Transcribed Spacer region) del ADN ribosómico mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) (Kasuga et al, 1993), después se secuenció este fragmento (Baseclear, Sequencing Service, The Netherlands) y se analizaron las secuencias con el programa Mega software versión 4.0., posteriormente se llevó a cabo un análisis filogenético (Mesanza & Iturrity, 2012). Para el resto de las cepas se utilizó la técnica RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR) haciendo la digestión con la enzima BanII de la región ITS previamente amplificada con los cebadores ITS1-F e ITS4 (Gonthier et al., 2001).

En el caso de *Armillaria* sp. la identificación se realizó utilizando la técnica de RFLP-PCR para todas las muestras. En este caso se amplificó la región del ADN ribosómico mediante los cebadores LR12R y O-1 y las enzimas de restricción utilizadas fueron AluI, NdeI y BsmI (Harrington y Wingfield, 1995; Pérez et al., 1999).

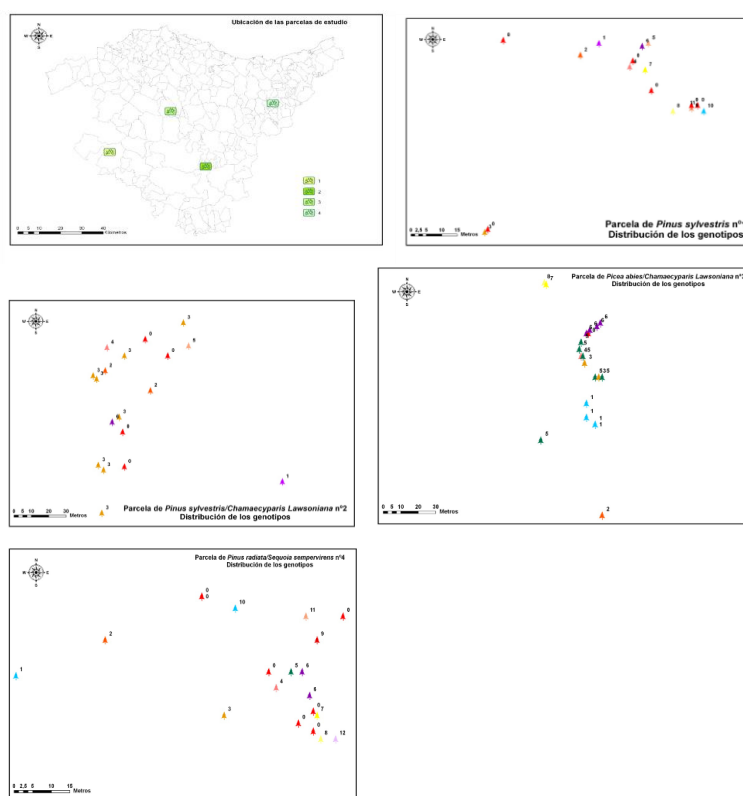
Así, dentro del género *Heterobasidion annosum* s.l se detectó solamente una especie, *Heterobasidion annosum* s.s. (Grupo europeo de pinos), y dentro del género *Armillaria* sp. se detectaron cinco especies: *Armillaria mellea*, *A. ostoyae*, *A. cepistipes*, *A. tabescens* y *A. gallica*.



**Fig. 4.:** Árbol filogenético de secuencias ITS de *Heterobasidion* spp. inferido a partir de 2.000 réplicas. Las secuencias obtenidas del NCBI van seguidas de un asterisco. Las secuencias de ITS del Gen Bank de *H. insulare* y *H. araucariae* se utilizaron como "outgroups" (Asiegbu et al., 2004). (a) El aislado H25 se utilizó como representativo de 38 aislados idénticos a la cepa de *H. annosum* B298 (H64, H33, H34, H89, H103, H56, H47, H82, H87, H80, H85, H26, H70, H65, H86, H60, H59, H61, H99, H31, H30, H75, H84, H104, H68, H100, H57, H54, H88, H95,

H49, H81, H32, H101, H91, H55). (b) La secuencia correspondiente al aislado H77 se utilizó como representativa de cuatro aislados (H50, H77, H90, and H97).

Para la determinación de grupos de compatibilidad somática o genotipos se seleccionaron cuatro grupos pertenecientes a cuatro parcelas para aislados de *Heterobasidion annosum* s.l. y tres grupos pertenecientes a tres parcelas para *Armillaria* sp. lo que hizo un total de 60 cepas por género. Primero, se enfrentaron todos los aislados de las mismas parcelas en medio de cultivo malta extracto agar (Stenlid, 1985; Hood & Sandberg, 1987) este ensayo se repitió dos veces, y posteriormente, con el fin de conseguir un método rápido de diferenciación entre grupos somáticos se procedió al test de 11 cebadores universales en la técnica de biología molecular denominada UP-PCR (Universally Primed-PCR) (Tyson et al., 2002), de esta manera se encontraron cebadores que avalaban los resultados obtenidos anteriormente en los ensayos *in vitro*. Dichos cebadores son L15/AS19 (5' GAGGTGGCGGCTAG 3') y AS4 (5' TGTGGGCGCTCGACAC 3') para los grupos de compatibilidad somática de *Armillaria* sp. y L21 (5' GGATCCGAGGGTGGCGGTTCT 3') y AS4 para los grupos de compatibilidad somática de *Heterobasidion annosum* s.l.



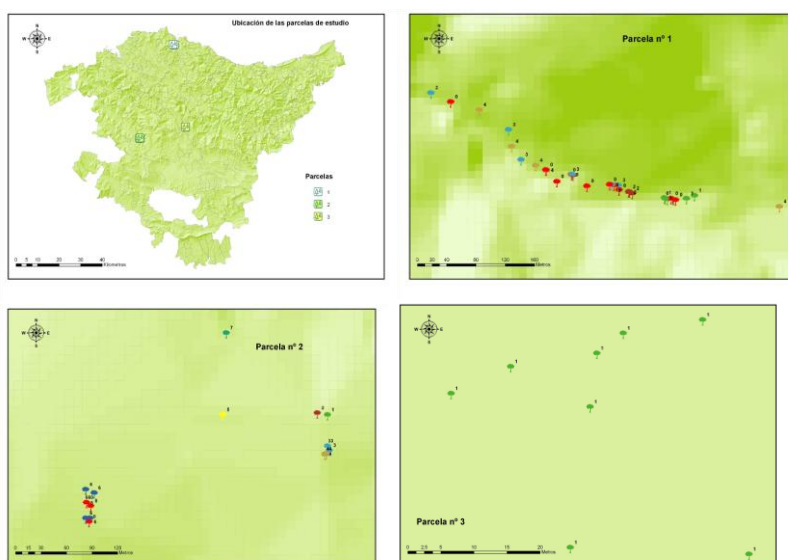
**Fig.5.:** Ubicación de las parcelas de estudio para *H. annosum*, parcela 1 Caranca, parcela 2 Azaceta, parcela 3 Barazar y parcela 4 Legorreta. **Fig.6.:** Distribución de la enfermedad causada por *H.annosum* s.s y genotipos en las parcelas de estudio. N°1, bosque de *Pinus sylvestris*. **Fig.7.:** N°2, plantación mixta de *Pinus sylvestris* y *Chamaecyparis lawsoniana*.

**Fig.8.:** N°3, plantación mixta de *Picea abies* y *Chamaecyparis lawsoniana*. **Fig.9.:** N°4, plantación mixta de *Pinus radiata* y *Sequoia sempervirens*.

En general, la distribución de los grupos de compatibilidad en las parcelas revela el patrón de dispersión (Shaw y Roth, 1976). Para *H. annosum* s.s. los mayores tamaños de genotipos se observan en las parcelas de plantaciones mixtas 2 y 3, entorno a los 50–60 metros, resultados que están en mayor consonancia con los obtenidos en otras plantaciones españolas y europeas (Vita et al., 2007; Keca, 2008), en los que este mayor tamaño se atribuye a que las infecciones iniciales son antiguas (>20 años), con una dispersión alta de la enfermedad, entre árboles colindantes, a través del contacto radical entre raíces sanas y enfermas (Olson, 1941). A todo esto se añade la ausencia de tratamientos de prevención y control de la enfermedad en las zonas afectadas por dicha enfermedad.

En el caso de la parcela de experimentación nº 1 este patrón cambia, detectándose un mayor número de genotipos de menor tamaño. Esta observación indica que las basidioesporas desempeñan un importante papel en el establecimiento de nuevas infecciones, situación que se asemeja a la descrita por Keca (2008). En el contexto actual de las plantaciones estudiadas y observadas en estudios anteriores, resulta de especial trascendencia la reducción de la presión de inóculo mediante la eliminación de material infectado para evitar tanto las infecciones por contacto entre material sano enfermo como para evitar la producción de basidiocarpos y dispersión vía aérea de basidioesporas.

En conclusión, los patrones de distribución y variabilidad de genotipos de *H. annosum* s.s. apuntan a vías de dispersión por contacto entre árboles sanos y enfermos y mediante dispersión por basidioesporas.



**Fig. 10.:**Ubicación de las parcelas de estudio para *Armillaria* spp.. Los aislados obtenidos en las parcelas de estudio fueron identificados como *Armillaria mellea*, *A. ostoyae* y *A. gallica*. En



las **figuras 11, 12 y 13** se muestra la distribución espacial de los árboles infectados así como la de los genotipos identificados en cada parcela.

En el caso de *Armillaria* spp. la presencia de diferentes grupos de compatibilidad sugiere una posible dispersión por basidiosporas además de una dispersión vegetativa, visible en parcelas 1 y 2. En contraste con esta situación, la parcela 3 muestra un patrón diferente, mono-específico y sugiere una dispersión por micelio, clonal.

Basándose en el estudio de identificación de especies y grupos de compatibilidad vegetativa, los patrones de distribución y variabilidad de genotipos apuntan a vías de dispersión por contacto entre árboles sanos y enfermos y mediante dispersión por basidiosporas.

El manejo de las parcelas infectadas teniendo en cuenta esta información, refleja que el aislamiento físico de sistemas radiculares infectados de los sanos pudiera no ser suficiente para detener la dispersión de la enfermedad en todos los casos.

## **Resistencia de hospedadores**

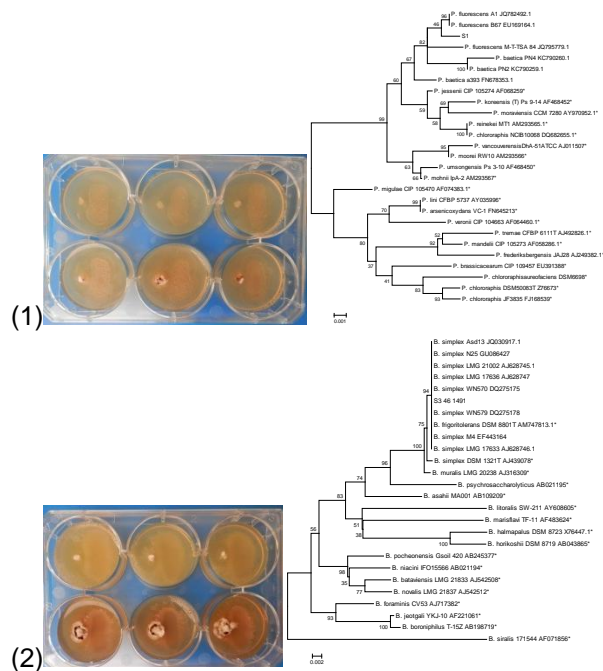
Con el fin de determinar la resistencia de diferentes hospedadores hacia el hongo patógeno *Armillaria* se seleccionó una cepa de dicho género, identificada previamente como *A. mellea*, la cual había demostrado su alto nivel de patogenicidad, se cultivó en medio BDS al cual se le habían añadido bellotas previamente esterilizadas y que fueron las que sirvieron como fuente de inóculo (Mansilla et al., 2001). Las especies arbóreas seleccionadas fueron las siguientes: *Pinus radiata*, *P. sylvestris*, *P. nigra* var. *Corsicana*, *Cryptomeria japonica*, *Quercus robur*, *Q. ilex*, *Q. petraea*, *Fagus sylvatica* y plántulas del género *Prunus*. Se utilizó planta de 2 años de edad y una vez inoculada se dejó durante tres meses en invernadero en condiciones de temperatura y humedad controladas. Después de este tiempo se midieron las lesiones causadas por el hongo tanto de raíz, tallo y diámetro de cuello afectado, así como, el número de plántulas muertas. Después de analizar los datos obtenidos se llegó a la conclusión de que la especie menos resistente era *P. radiata* con un 100% de mortalidad y las más resistentes *Cryptomeria japonica* con un 0% de mortalidad y 0% de infección y *Secoioadendron giganteum* con un 5% de infección y 0% de mortalidad.

## **Agentes de biocontrol**

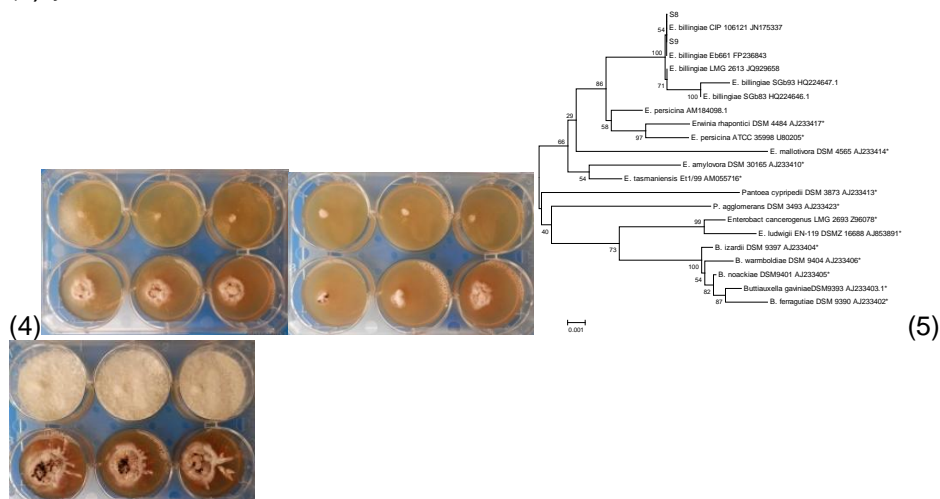
### **1. Bacterias de biocontrol**

Una vez seleccionadas las bacterias biorremediadoras se aplicaron sobre semillas de *P. radiata*, especie forestal altamente sensible a ambos patógenos, para ver si actuaban como promotoras del crecimiento en pino y para ver si demostraban efecto antagónico *in vivo*. Las cepas J11 y GR12-2 produjeron un efecto positivo en cuanto al aumento en el diámetro de cuello, pero el efecto antagónico no fue apreciable.

Para encontrar bacterias autóctonas con posibles efectos de biocontrol, ya que las anteriores no eran nativas, se seleccionaron ejemplares de árboles sanos dentro de parcelas contaminadas por los hongos patógenos *H. annosum* s.l y *Armillaria* sp., y se tomaron muestras radicales y de suelo. Posteriormente se eligieron al azar 200 bacterias, se aislaron y se procedió a los enfrentamientos *in vitro* en el medio seleccionado anteriormente con los hongos patógenos. Con las 11 bacterias que demostraron un efecto antagonístico frente al hongo se verificó dicho efecto repitiendo el ensayo anterior y se pasó a su identificación mediante el 16s ADN (Baker et al., 2003) y análisis filogenético (Ngamau et al., 2012). Una vez verificado que las especies de bacterias encontradas no eran patógenos humanos se procedió a verificar su no patogenicidad en plantas. Después de estos análisis se obtuvo un total de cuatro cepas bacterianas con posibilidad de uso debido a su no patogenicidad animal ni vegetal y a su efecto antagonístico fúngico las cuales resultaron ser de dichas especies: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus simplex* o *Brevibacterium frigoritolerans* y las dos últimas *Erwinia billingiae*.



(3) y



**Fig .14.:** Efectos antagonicos de bacterias seleccionadas y arboles filogeneticos para la secuencia del 16s inferido a partir de 2.000 réplicas. Las cepas tipo van seguidas de un asterisco. (1) *Ps. fluorescens*; (2) *Bacillus simplex* o *Brevibacterium frigoritolerans*; (3) y (4) *Erwinia billingiae*; (5) *Escherichia coli* como control negativo La primera fila de cada placa de cultivo está sembrada con *H. annosum* s.s. y la segunda con *A. mellea*.

## 2. Otros agentes de biocontrol

En paralelo se realizaron otros ensayos de antagonismo con otros agentes de biocontrol conocidos.

### Aceites esenciales

Se probaron los siguientes aceites esenciales: orégano, lavanda, tomillo, canela y clavo a diferentes concentraciones (10%, 25%, 50%, 75% y 100%). Las diluciones se realizaron en aceite de sésamo el cual se utilizó también como control y se incorporaron a la placa de cultivo una vez el hongo había crecido (Toroglu, 2007). Así, el aceite esencial de orégano resulto ser el más efectivo a menores concentraciones (10%), seguido por los aceites esenciales de lavanda y tomillo.

### *Trichoderma* spp.

Se eligió este género por haber demostrado ciertos efectos antagonicos frente a determinados hongos (Matroudi et al., 2009) y por su amplia distribución en los bosques del País Vasco. El ensayo se desarrolló de manera que se verificara el efecto antagonico con respecto al nivel de colonización por parte del hongo patógeno y de *Trichoderma* spp. Así, en algunos casos se dejó al

hongo patógeno colonizar la placa de cultivo y después se añadió *Trichoderma* spp., en otros, los dos hongos se sembraron a la vez, y en otros, se dejó que *Trichoderma* spp. colonizara la placa de cultivo antes de añadir el hongo patógeno. Solo en este último se apreció cierto efecto antagónico, que parecía corresponder al nivel de colonización y no a la inhibición por parte de algún compuesto producido por *Trichoderma* spp.

## Referencias

- Antoun H., Prévost D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, pp. 1–38.
- Asiegbu F.O., Abu S., Stenlid J., Johansson M. 2004. Sequence polymorphism and molecular characterization of laccase genes of the conifer pathogen *Heterobasidion annosum*. *Mycol Res* 108:136–148.
- Baker G., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analysis of Domain-specific 16S primers, *Journal of microbiological methods* 55(3):541-555.
- Bashan Y., Holguin G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30: 1225-1228.
- Fravel D., Olivain C., and Alabouvette C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493-502.
- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41: 109-117.
- Gonthier P., Garbelotto M., Varese G.C., Nicolotti G. 2001 Relative abundance and potential dispersal range of intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in pure and mixed forests. *Can J Bot* 79:1057-1065
- Gregory S.C., Rishbeth J., Shaw C.G. III. 1991. Pathogenicity and virulence. In: Shaw CG III, Kile GA, eds. *Armillaria* root disease USDA Forest Service, Agriculture Hand-book No. 691. p 76–87
- Harrington T.C., Wingfield B.D., 1995. A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* 87, 280 – 8
- Hood I. A., Sandberg C.J. 1987. Occurrence of *Armillaria* rhizomorphs populations in the soil beneath indigenous forests in the Bay of Plenty, New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science* 17: 83–99.
- Kasuga T., Mitchelson K. 1993: Determination of the DNA sequence of the 5.8S ribosomal gene of *Heterobasidion annosum* and *Heterobasidion araucariae*. *Nucleic Acids Res.* 21, 1320.

- Keca N. 2008. Distribution of *Heterobasidion* genets on a Norway spruce site: case study in national park "Kopaonik" The European Library. Serbia.98: 117-125
- Lemanceau, P., P.A.H.M. Baker, W.J. De Kogel, C. Alabouvette and B. Schippers, 1992. Effect of *Pseudobactin* 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnation by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. Applied Environ. Microbiol., 58: 2978-2982.
- Vita D.P., Jiménez J.J., Trapero A., Capretti P., Sánchez M.E. 2007. La podredumbre radical del pinsapo II: Diseminación de *H. Abietinum* en bosques de *Abies pinsapo*. Bol. San. Veg. Plagas, 33: 537-545.
- Mansilla J.P., O. Aguin and M.J. Sainz, 2001. A fast method for production of *Armillaria* inoculum. Mycologia 93, 612–615.
- Matroudi S., Zamani M.R., & Motallebi M. 2009. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. Egyptian Journal of Biology, 11, 37-44.
- Mesanza N., Iturriza E. (2012). Root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* in Atlantic coniferous ecosystems of Spain. Forest Pathology 42: 514-520.
- Ngamau C.N., Matiru V.N., Tani, A., Muthuri C.M. 2012. Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. Afr. J. Microbiol. Res., vol. 6 p.6414-6422
- Olson A.J. 1941. A root disease of Jeffrey and ponderosa pine reproduction. Phytopathology 31: 1063-1077.
- Peréz A., Whitehead D., Whitehead M. (1999). Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species. Mycol. Res. 103:1631-1636
- Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., Moenne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. PLANT AND SOIL. 321(1-2):341-361.
- Shaw, C.G., III; Roth, L.F. 1976. Persistence and distribution of a clone of *Armillaria mellea* in a ponderosa pine forest Phytopathology. 66:1210-1213.
- Shirling E.B., Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology 16: 313 – 340
- Stenlid J. 1985. Population structure of *Heterobasidion annosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility, and isoenzyme patterns. Can. J. Bot. 63:2268-2273.
- Toroglu S. 2007. *In vitro* antimicrobial activity and antagonistic effect of essential oils from plant species. Journal of Environmental Biology, 28 (3) (2007), pp. 551–559
- Tyson J.L., Ridgway H. J., Fullerton R. A., Stewart A. 2002. Genetic diversity in New Zealand populations of *Sclerotium cepivorum*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 30: 37-48.
- Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A., 1998 Preface. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A, eds. *Heterobasidion annosum* biology, ecology, impact and control. London, England: CAB International. p xi–xii
- Worral J. 1991: Media for selective isolation of *Hymenomycetes*. Mycologia 83, 298–302.



### 3. Información científica generada en el año 2013

Tesis Doctorales que está siendo dirigida

Doctoranda: Nebai Mesanza  
Universidad: Universidad del País Vasco  
Facultad / Escuela: Ciencias

Tesis de final de carrera:

Ester Ortiz de Urbina  
Universidad de Oviedo

Tyler Dennis  
Universidad de New Brunswick (Canadá)

+ Comunicaciones a Congresos, Reuniones, Simposios  
Congreso de la Sociedad Española de ciencias forestales 2013.  
4 comunicaciones  
Un artículo de investigación.

### 4. Actividades de formación y transferencia realizadas

Cursos de Sanidad Forestal en la escuela agraria Mendikoi dirigidos a técnicos y otros profesionales relacionados con el sector

Curso de sanidad en viveros forestales, Mendikoi.  
Dirección de tesis de master de la universidad del País Vasco.

Tutoria y dirección del trabajo de investigación de una alumna de la Escuela Forestal de Ingeniería Universidad de Oviedo y de la Universidad de New Brunswick.

Alumnos en prácticas: Impartición de clases prácticas en el laboratorio a alumnos de la Escuelas Agraria de Arkaute, Mendikoi

Participación en la mesa de Sanidad Forestal del Departamento de Agricultura del Gobierno Vasco.

Asistencia a congresos: Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Forestales 2013.

Reuniones del proyecto Marie Curie con la participación de las Universidades de Waterloo y New Brudswick 2013

Workshop de los miembros participantes en la acción Marie Curie.  
Estancia en la Universidad de Waterloo y New Brunswick, Canadá, realizada por el jefe de proyecto y la doctoranda, un total de cinco meses.



PROYECTOS FINAL DE CARRERA 2013:

# **UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

ESCUELA POLITÉCNICA DE MIERES

INGENIERÍA TÉCNICA FORESTAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL

PROYECTO FIN DE CARRERA  
Proyecto de Investigación Aplicada

## **BIODIVERSIDAD FÚNGICA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DEL CHANCRO EN PLANTACIONES DE EUCALIPTO DEL PAÍS VASCO**

Autora: Esther Ortiz de Urbina Fernández de Pinedo

Directores en Neiker: Eugenia Iturritxa Vélez del  
Burgo

TESTING THE INHIBITORY EFFECTS OF SOIL ISOLATED BACTERIA ON THE  
GROWTH OF *FUSARIUM CIRCINATUM* IN *PINUS RADIATA* OF PAIS VASCO,  
NORTHERN SPAIN

By  
Tyler Trask

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFULMENT OF THE  
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
Bachelor of Science with  
Honours in Biology

The thesis is submitted for review

.....

Chairman, Department of  
Biology  
THE UNIVERSITY OF NEW BRUNSWICK  
December 2013

Original Article

**Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea***

1. E. Iturrutxa<sup>1,\*</sup>,
2. R. J. Ganley<sup>2</sup>,
3. R. Raposo<sup>3</sup>,
4. I. García-Serna<sup>1</sup>,
5. N. Mesanza<sup>1</sup>,
6. S. C. Kirkpatrick<sup>4</sup> and
7. T. R. Gordon<sup>4</sup>

Article first published online: 5 JUN 2013

DOI: 10.1111/efp.12061

© 2013 Blackwell Verlag GmbH

Issue



**Forest Pathology**

[Volume 43, Issue 6](#), pages 488–495, December 2013

Additional Information([Show All](#))

[How to Cite](#)[Author Information](#)[Publication History](#)

**How to Cite**

Iturrutxa, E., Ganley, R. J., Raposo, R., García-Serna, I., Mesanza, N., Kirkpatrick, S. C., Gordon, T. R. (2013), Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*. *Forest Pathology*, 43: 488–495. doi: 10.1111/efp.12061



## Summary

Pitch canker, caused by *Fusarium circinatum*, and Diplodia shoot blight, caused by *Diplodia pinea*, are both damaging to pines (*Pinus* spp.) grown in plantations throughout the world, including Spain. To assess the potential for interspecific differences in susceptibility to contribute to the management of pitch canker and Diplodia shoot blight in the Atlantic region of Spain, the present study was undertaken to characterize the susceptibility of six pine species (*P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. halepensis* and *P. pinea*) and Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) to *F. circinatum* and *D. pinea*. Based on inoculations of 2-year-old trees, *Ps. menziesii*, *P. pinea* and *P. nigra* were the most resistant to *F. circinatum*, with lesion lengths ranging from 3.7 to 21.5 mm, 2.2 to 12.6 mm and 2.8 to 30.9 mm, respectively. At the other extreme, *Pinus radiata* was the most susceptible, sustaining lesions that ranged from 8.5 to 74.8 mm in length. *Pinus sylvestris*, *P. pinaster* and *P. halepensis* showed an intermediate response to *F. circinatum*. Broadly similar results were observed in inoculations with *D. pinea*, with *Ps. menziesii* being relatively resistant and *P. radiata* being highly susceptible. Consistent with these results, field surveys revealed no pitch canker in stands of *Ps. menziesii* and low severity of Diplodia shoot blight, whereas *P. radiata* was severely affected by both diseases. Our findings suggest that selection of appropriate species can greatly reduce the risk of damage from two important canker diseases affecting pine plantations in the Atlantic region of Spain. Furthermore, intraspecific variation in susceptibility implies that selection may allow for the enhancement of resistance in otherwise susceptible species.