



ESCUELA DE INGENIERÍA AGRARIA Y FORESTAL

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN INGENIERÍA FORESTAL Y DEL MEDIO NATURAL

**IDENTIFICACIÓN TEMPRANA DE ESPECIES DE PATÓGENOS FOLIARES EN
PLANTACIONES DE *P. RADIATA* EN EL PAÍS VASCO**

***EARLY IDENTIFICATION OF FOLIAR PATHOGEN SPECIES IN *P. RADIATA*
PLANTATIONS IN THE BASQUE COUNTRY***

Aitor Saez de Zerain Albizu

Tutor: Fernando Castedo Dorado
Colaboradora externa: Eugenia Iturritxa Vélez del Burgo

Ponferrada, julio de 2020

ANEXO 9. HOJA DE CONFORMIDAD

TRABAJOS DE CARÁCTER CIENTÍFICO O TÉCNICO

Título: IDENTIFICACIÓN TEMPRANA DE ESPECIES DE PATÓGENOS FOLIARES EN PLANTACIONES DE P. RADIATA EN EL PAÍS VASCO

Autor: **Aitor Saez de Zerain Albizu**

ELEMENTOS DE OBLIGADA APARICIÓN

- Resumen.** De 400 palabras como máximo.
- Introducción.** Debe incluir los motivos por los que se realiza el trabajo y los antecedentes o estudios previos sobre el mismo.
- Objetivos.** Se detallarán de forma clara y concisa los objetivos que se pretenden alcanzar.
- Material y Métodos / Metodología.** Descripción de las técnicas, los materiales empleados, y los métodos de análisis de datos, de forma que se garantice la repetibilidad de los mismos.
- Resultados / Análisis / Diagnóstico.** La información obtenida con el estudio se presentará de forma sistemática, preferentemente mediante tablas y figuras que deberán ser en todo caso autoexplicativas, y deberán aparecer debidamente numeradas y referenciadas en un índice propio.
- Discusión.** Los resultados propios del trabajo deberán ser discutidos relacionándolos, en su caso, con otros de estudios precedentes.
- Conclusiones.** Deberán ser claras, concisas, y coherentes con los objetivos propuestos. En el caso planes de ordenación de recursos forestales, propuestas concretas con objetivos, líneas y medidas.
- Planos / Mapas.** Serán obligatorios en trabajos topográficos, estudios de implantación de cultivos o transformaciones de explotaciones, y en general, cualquier trabajo técnico o científico asociado a áreas, parcelas, o territorios determinados.
- Bibliografía.** Listado de las fuentes de información utilizadas debidamente referenciadas y ordenadas.

OBTENIDA LA CONFORMIDAD



DENEGADA LA CONFORMIDAD
(No se autoriza la presentación)



El tutor/es:

Firmado por
CASTEDO
DORADO
FERNANDO -
DNI 33333580W

Fdo.: Fernando Castedo Dorado

Fdo.:

Agradecimientos:

A Eugenia Iturritxa y Nebai Mesanza por su inestimable ayuda.

A Ander Isasmendi y Patxi Saenz-Urturi por hacer las largas jornadas de campo más amenas.

A Neiker-Tecnalia por los medios facilitados.

A Fernando Castedo por su cuantioso apoyo y asesoramiento.

A todas las personas (familiares, pareja y amigos) que de alguna u otra forma han colaborado en el proyecto.

Sin todos ellos este trabajo no hubiera sido posible.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 El pino radiata	3
1.2 Breve historia del pino radiata en el País Vasco	9
1.3 Patógenos defoliadores.....	13
1.3.1 Principales especies de patógenos defoliadores.....	14
1.3.2 El caso de Nueva Zelanda	29
1.3.3 El caso de Chile	31
1.3.4 El caso del País Vasco.....	33
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS	42
3.1 Instalación de trampas en campo	45
3.2 Análisis inmunológico preliminar para la detección de género <i>Phytophthora</i>	48
3.3 Recogida en campo de muestras de acículas en estaciones con resultado positivo preliminar en género <i>Phytophthora</i>	51
3.4 Análisis de las muestras en laboratorio mediante técnicas moleculares.....	52
3.4.1 Extracción de ADN	52
3.4.2 Análisis de la pureza del ADN	56
3.4.3 Métodos de análisis del ADN	57
3.4.3.1 <i>Phytophthora pinifolia</i> y <i>Phytophthora pluvialis</i>	65
3.4.3.2 <i>Dothistroma</i> y <i>Lecanosticta</i>	65
3.5 Observación con microscopía	66
3.6 Identificación de los patógenos	67
4. RESULTADOS	70
4.1. Análisis inmunológico preliminar de detección de género <i>Phytophthora</i>	70
4.2 Resultados de pureza en las extracciones de ADN.....	78
4.3 Identificación de especies	79
4.3.1 <i>Phytophthora</i> spp.	79
4.3.2 <i>Dothistroma</i> spp. y <i>Lecanosticta acicola</i>	81
4.4 Relación entre el nivel de defoliación, el número de especies identificadas y la edad de la masa	83

4.5 Optimización de la metodología para la detección de patógenos defoliadores de acículas de pino radiata y estudio de su epidemiología, con especial hincapié en el estudio de la presencia de <i>Phytophthora</i> spp.	84
4.6 Cuerpos y estructuras observadas	87
5. DISCUSIÓN	89
6. CONCLUSIONES	96
7. BIBLIOGRAFÍA	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de diversos países europeos según su superficie forestal.	2
Figura 2. Clasificación de diversos países europeos según su porcentaje de superficie forestal.....	2
Figura 3. Localización de las poblaciones de pino radiata en su área natural (izquierda) y localización de las masas artificiales de pino radiata en España (derecha).....	3
Figura 4. Distribución mundial de las principales masas de pino radiata.	4
Figura 5. Distribución de las masas del pino radiata en el País Vasco.....	5
Figura 6. a) Ejemplar joven de pino radiata; b) Masa adulta bien gestionada y tratada.	6
Figura 7. a) Detalle de la corteza; b) Detalle de los verticilos.....	6
Figura 8. a) Detalle de las acículas; b) Detalle de los estróbilos.....	7
Figura 9. Detalle de la inflorescencia masculina.	8
Figura 10. Datos históricos de las cortas de madera en el País Vasco (1950-1979).	10
Figura 11. Evolución histórica del precio de la madera en el País Vasco.....	11
Figura 12. Evolución de la superficie ocupada por pino radiata entre los periodos 1898-1997 por territorios históricos.	12
Figura 13. Distribución mundial del género <i>Dothistroma</i>	17
Figura 14. Lesiones foliares que se pueden apreciar en campo.....	19
Figura 15. Detalle de las lesiones necróticas.....	19
Figura 16. Masa de pino radiata prácticamente defoliada en su totalidad por los patógenos.	20
Figura 17. <i>Dothistroma septosporum</i> : a) Conidios b) Conidióforos.	21
Figura 18. Detalle de las esporas con un aumento de x40 y x100, respectivamente.	25
Figura 19. Esquema del ciclo de vida de <i>Phytophthora</i> spp.	27
Figura 20. Clasificación de los diferentes clados del género <i>Phytophthora</i>	29
Figura 21. Declaración del Gobierno chileno sobre la identificación de un nuevo hongo en follaje de <i>Pinus radiata</i>	32
Figura 22. Evolución de las cortas de madera y de la superficie de pino existente en los últimos años en el País Vasco.....	34
Figura 23. Pérdida de superficie ocupada por el pino radiata entre 2015 y 2019.	35
Figura 24. Representación gráfica de la decadencia del pino radiata frente al avance del eucalipto..	35
Figura 25. Superficie de pino radiata afectada por un alto nivel de defoliación en agosto de 2018. ..	36
Figura 26. Nivel de riesgo de las masas de pino radiata ante los patógenos.	37
Figura 27. Plantación de pino radiata totalmente defoliada.	37
Figura 28. Montes totalmente afectados por los patógenos.	38
Figura 29. Plantaciones bien gestionadas pero con gran afeción de patógenos foliares.	39
Figura 30. Productos de amplificación por PCR con cebadores específicos para cada patógeno.....	39

Figura 31. Estructura del trabajo realizado.	43
Figura 32. Calendario de las actividades realizadas. Las llevadas a cabo en el presente estudio son las posteriores a julio de 2019.	43
Figura 33. Localización de las estaciones de control, trampas fijas y laboratorio de Sanidad Vegetal dentro de la zona de estudio.	44
Figura 34. Trampa de esporas con hoja de rododendro dispuesta en el suelo.	46
Figura 35. Trampa de esporas con hoja de rododendro fijada en un árbol.	46
Figura 36. Muestra etiquetada y numerada.	47
Figura 37. Trampa de esporas con placa portaobjeto junto a planta trampa de rododendro.	47
Figura 38. Instalaciones del laboratorio de Sanidad Vegetal.	48
Figura 39. Cámara refrigeradora para el almacenamiento de muestras.	48
Figura 40. Bolsa de extracción SEB1.	49
Figura 41. Los tres posibles resultados del ensayo inmunológico de detección de <i>Phytophthora</i> spp. y forma en la que se manifiestan.	50
Figura 42. Ejemplos de positivos en género <i>Phytophthora</i> obtenidos mediante este ensayo.	50
Figura 43. a) Proceso de corta de una rama para extraer la muestra; b) Ejemplo de las dificultades presentadas para obtener ramas con acículas debido a la acusada defoliación.	51
Figura 44. a) Extracción de acículas de una rama; b) Muestra de acículas introducida en una bolsa, etiquetada y numerada.	52
Figura 45. Porciones de acícula troceadas listas para ser introducidas en su respectivo tubo Eppendorf.	53
Figura 46. Proceso de ruptura de los tejidos vegetales mediante la máquina disruptora.	53
Figura 47. Baño térmico con las muestras en corcho.	54
Figura 48. Proceso de centrifugación de las muestras en una centrifugadora.	54
Figura 49. Tubos de filtro utilizados en el proceso.	55
Figura 50. Vista de las 87 muestras de extracción de ADN finalmente obtenidas.	56
Figura 51. Espectrofotómetro UV-VIS NanoDrop2000 usado para el análisis espectrofotométrico. ...	57
Figura 52. Proceso de dispensado con pipeta multicanal.	59
Figura 53. Placa de muestra y productos utilizados.	60
Figura 54. Proceso de termociclado con el ciclo programado.	60
Figura 55. Proceso de preparación del gel y electroforesis.	63
Figura 56. Gel tras el proceso de electroforesis.	63
Figura 57. Aparato utilizado para la visualización y toma de imágenes de los geles (ChemiDoc).	64
Figura 58. Microscopio de fluorescencia utilizado para visualizar las esporas.	66
Figura 59. Observación de las lesiones aciculares mediante microscopio estereoscópico.	67

Figura 60. Marcador de tamaño de peso molecular para <i>Phytophthora</i> spp.	68
Figura 61. Marcador de tamaño de peso molecular para <i>Dothistroma</i> spp. y <i>Lecanosticta acicola</i>	69
Figura 62. Localización de las 9 estaciones con más de un positivo en el análisis preliminar de detección de <i>Phytophthora</i> spp.	75
Figura 63. Representación del patrón espectral de las extracciones de ADN, a) con una buena relación de absorbancia 260/280; b) con una relación de absorbancia 260/230 inferior a la óptima.	78
Figura 64. Detalle del positivo en <i>Phytophthora</i> spp. (señalado en color naranja) observado en la lectura del gel.	79
Figura 65. Detalle del control positivo de <i>Phytophthora cinnamoni</i> (señalado en color naranja) observado en la lectura del gel.	80
Figura 66. Productos de la amplificación PCR para la muestra UMBE 217 con resultado positivo (cuadro en color naranja) en <i>Lecanosticta acicola</i> (La) y <i>Dothistroma septosporum</i> (DS). Resultado negativo en <i>Phytophthora pinifolia</i> (Ph1) y en <i>Phytophthora pluvialis</i> (Ph2).	80
Figura 67. Detalle de lectura del gel con positivos en <i>L. acicola</i>	81
Figura 68. Detalle de lectura del gel con positivos en <i>D. septosporum</i>	81
Figura 69. Distribución de los resultados positivos disponibles para los diferentes patógenos en cada etapa del estudio.	83
Figura 70. Relación del porcentaje medio de defoliación de cada estación y número hongos defoliadores diagnosticados en cada una de ellas.	83
Figura 71. Relación entre la edad de la masa y el porcentaje de defoliación media.	84
Figura 72. Esquema metodológico para la detección de patógenos defoliadores sin la aplicación de la optimización expuesta en el presente estudio.	85
Figura 73. Esquema metodológico para la detección de hongos defoliadores con la aplicación de la optimización expuesta en el presente estudio.	86
Figura 74. Conidios de <i>L. acicola</i> observadas en diferente estado de desarrollo.	87
Figura 75. Estructura similar a un oogonio observada en una de las muestras de acículas.	88

Todas las figuras presentadas en este trabajo son de elaboración propia a no ser que se indique lo contrario.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de superficie total de pino adulto defoliado para determinadas fechas.....	36
Tabla 2. Volúmenes de los productos a utilizar por cada muestra.....	58
Tabla 3. “Master Mix” para las 93 reacciones.....	59
Tabla 4. Ciclo utilizado en el termociclador basado en Alvarado-Marchena <i>et al.</i> (2017).....	61
Tabla 5. Cebadores específicos utilizados para cada patógeno.	65
Tabla 6. Resultados obtenidos en el ensayo inmunológico de detección preliminar del género <i>Phytophthora</i> durante el periodo febrero 2019 - julio 2019.....	71
Tabla 7. Resultados obtenidos en el ensayo inmunológico de detección preliminar del género <i>Phytophthora</i> en el periodo octubre 2019 - febrero 2020 (1/2).	72
Tabla 8. Resultados obtenidos en el ensayo inmunológico de detección preliminar del género <i>Phytophthora</i> en el periodo octubre 2019 - febrero 2020 (2/2).	73
Tabla 9. Distribución de las detecciones positivas obtenidas en el análisis preliminar de detección del género <i>Phytophthora</i> por estación y temporada.	74
Tabla 10. Datos por árbol de las estaciones con mayor defoliación (1/2).	76
Tabla 11. Datos por árbol de las estaciones con mayor defoliación (2/2).	77
Tabla 12. Datos de edad de la masa y defoliación media por estación.	77
Tabla 13. Resultado diagnóstico de las 87 muestras analizadas.	82
Tabla 14. Balance de positivos y negativos de cada patógeno detectado en las 9 estaciones con más de un positivo preliminar en <i>Phytophthora</i>	82

Todas tablas presentadas en este trabajo son de elaboración propia a no ser que se indique lo contrario.

RESUMEN

Muchas de las plantaciones de *Pinus radiata* en el País Vasco han sido intensamente defoliadas en 2018, 2019 y 2020 debido a un brote virulento de enfermedades foliares, entre las que destacan las denominadas "banda roja", causada por hongos del género *Dothistroma*, y "banda marrón", causada por *Lecanosticta acicola*. Dado que se tiene constancia de la presencia de estas enfermedades en nuestro país desde hace casi un siglo, este reciente pico en la afección hizo pensar en la posible implicación de otros patógenos defoliadores del género *Phytophthora*, al igual que ya ha ocurrido en países como Chile y Nueva Zelanda.

Por ello, el principal objetivo del presente trabajo ha sido la identificación de los patógenos defoliadores involucrados en este brote epidémico, haciendo especial hincapié en las especies pertenecientes al género *Phytophthora*. Para ello se ha desarrollado e implementado una metodología que optimiza los costes materiales y de tiempo necesarios. Se partió de 55 estaciones de control, donde se instaló una planta trampa de esporas que se revisó periódicamente y en diferentes estaciones del año. En aquellas estaciones de control con más de un positivo a lo largo del año se llevó a cabo un ensayo inmunológico preliminar de detección de patógenos del género *Phytophthora*. Mediante este ensayo se diagnosticaron 9 estaciones con resultado positivo en género *Phytophthora*, de forma que se recogieron en ellas 87 muestras de acículas que posteriormente se analizaron en laboratorio mediante métodos moleculares (PCR y electroforesis). Estos métodos moleculares confirmaron de forma definitiva la ausencia de patógenos del género *Phytophthora* con carácter defoliador en las plantaciones del País Vasco estudiadas. Sin embargo, de las 87 muestras analizadas el 66,7% se encontraban infectadas por *L. acicola*, el 16,1 % por *D. septosporum* y el 13,8% por ambas especies de hongos. El porcentaje medio de defoliación de cada estación aumentó cuando fueron dos las especies de hongos presentes, lo que podría indicar la existencia de efectos sinérgicos entre ambas. Por otra parte, el porcentaje de defoliación fue proporcional a la edad media de la masa, de forma que los árboles más adultos fueron los más dañados.

La optimización de la metodología propuesta permite la detección y el diagnóstico de patógenos foliares en masas de pino radiata, economizando significativamente los recursos materiales y humanos necesarios. El ahorro viene dado, fundamentalmente, por la reducción del número de muestras a analizar mediante técnicas moleculares, y por lo tanto el número de preparaciones, respecto a la metodología habitualmente utilizada y que se ha cuantificado en un 755%.

1. INTRODUCCIÓN

Pese a su limitada superficie, las diversas características fisiográficas y climáticas del País Vasco convierten a esta región en una potencia forestal por excelencia, siendo uno de los territorios europeos con mayor proporción de superficie arbolada. Más de un 50% del uso de la superficie de la Comunidad Autónoma del País Vasco está dedicado al uso forestal arbolado de manera que representa un 0,4% de la superficie forestal de la Unión Europea (Figura 1), y se sitúa tras Finlandia y Suecia como el territorio con mayor proporción de superficie arbolada de la UE (Figura 2) (Sáenz y Cantero, 2001).

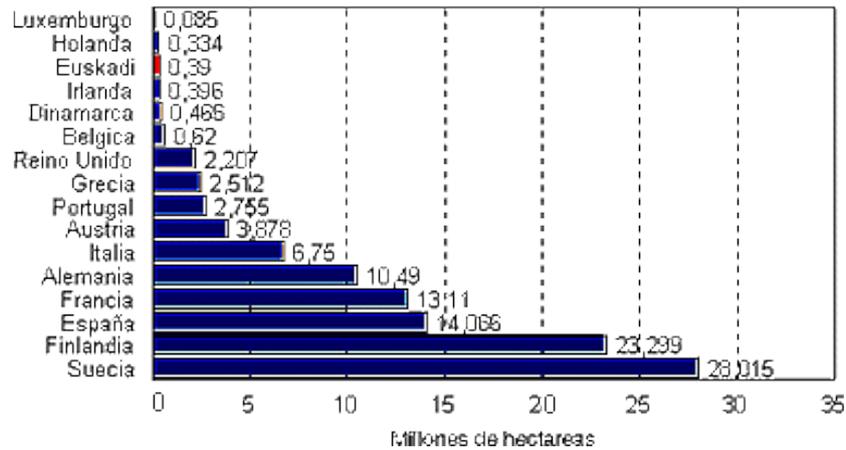


Figura 1. Clasificación de diversos países europeos según su superficie forestal.
Fuente: Sáenz y Cantero (2001).

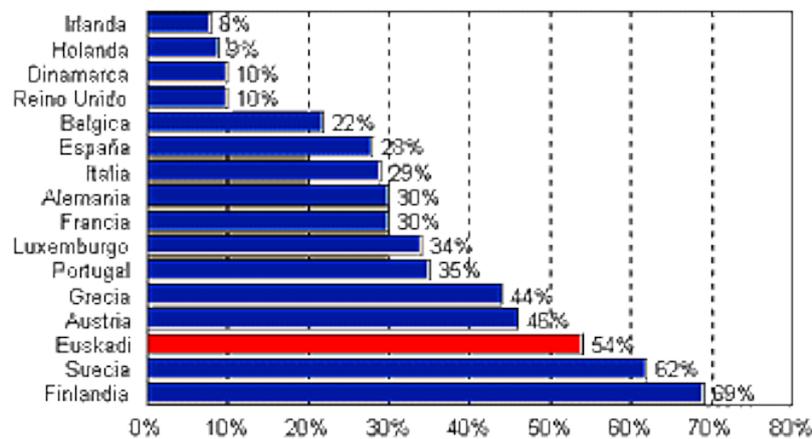


Figura 2. Clasificación de diversos países europeos según su porcentaje de superficie forestal.
Fuente: Sáenz y Cantero (2001).

Más de la mitad de la superficie arbolada del País Vasco está ocupada por coníferas, representadas en su mayor parte en forma de plantaciones de pino radiata (*Pinus radiata* D. Don). Actualmente, el pino radiata supone cerca del 85% de las cortas anuales y es el motor económico del sector forestal en la región, empleando a más de 20.000 personas (Hazi, 2019c).

1.1 El pino radiata

El pino radiata, pino de Monterrey, pino insigne o pino insignis pertenece a la familia de las Pináceas, género *Pinus*, subgénero *Diploxylon*, y sección *Taeda*. Dentro de ésta se encuentra el grupo de los Insignes en el que figuran *Pinus radiata*, *Pinus muricata* y *Pinus attenuata*, comúnmente denominados “pinos de conos cerrados de California” por el carácter serótino de las piñas (Shaw, 1914; Dans *et al.*, 1999).

En la actualidad se distinguen tres variedades de la especie: la variedad continental denominada variedad radiata, y dos variedades, binata y cedronensis, originarias de las islas mexicanas de Guadalupe y Los Cedros (Sánchez y Rodríguez, 2012). La variedad continental tiene tres procedencias diferentes; Año Nuevo, Monterrey y Cambria, las cuales se encuentran genéticamente muy próximas entre sí (Morán *et al.*, 1988; Sánchez y Rodríguez, 2012).

Pinus radiata tiene su origen en la costa de California y las islas cercanas (Figura 3) (Rogers *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2008). Dentro de su rango nativo, está ecológicamente restringido a climas mediterráneos costeros, creciendo en solo cinco localizaciones; tres a lo largo de la costa central de California, Año Nuevo, Monterrey y Cambria, nominadas de norte a sur, y dos en las islas mexicanas de Baja California, Guadalupe y Los Cedros (Rogers, 2004; Rogers *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2008, Sánchez y Rodríguez, 2012). Es uno de los pinos con un área natural más reducida, limitándose actualmente a unas 4.000 ha, dividida en pequeños núcleos, entre los 37º y los 35º 30' N (McDonald y Laacke, 1990; Aizpuru *et al.*, 1996; García, 2011; Sánchez y Rodríguez, 2012).

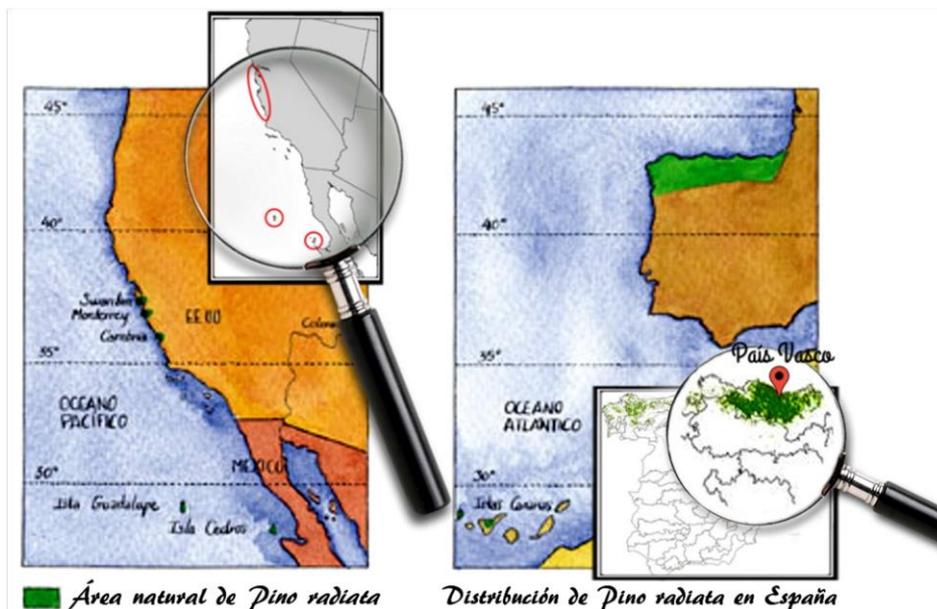


Figura 3. Localización de las poblaciones de pino radiata en su área natural (izquierda) y localización de las masas artificiales de pino radiata en España (derecha).

Fuente: Elaboración propia a partir de Critchfield y Little (1966) y Dans *et al.* (1999).

Según Lavery (1986), las procedencias de Año Nuevo y Monterrey, las dos procedencias localizadas más al norte, probablemente sean origen de las repoblaciones efectuadas fuera del área de origen de esta conífera. Concretamente, en el País Vasco existe una gran afinidad genética entre los pinos utilizados en plantación y los de la procedencia de Año Nuevo (Arregui *et al.*, 1999; Sánchez y Rodríguez, 2012).

Las poblaciones silvestres de la especie se encuentran actualmente en declive debido al aumento de urbanizaciones que ocupan buena parte de su área original, la falta de incendios que estimulen su regeneración natural y la aparición del hongo *Fusarium circinatum* (Farjon, 2010; García, 2011).

P. radiata ha mostrado un mejor desarrollo en otras áreas del mundo que tienen un clima con tendencia mediterránea, incluyendo partes de Sudáfrica, Australia, Chile, Nueva Zelanda y España (Rogers, 2004; Durán *et al.*, 2008). Actualmente, la mayor superficie ocupada por la especie se encuentra en el Hemisferio Sur, siendo en Australia, Nueva Zelanda y Chile la principal conífera productora de madera (Figura 4). En Nueva Zelanda ocupa 1.545.000 ha, en Chile 1.478.000 ha, y en Australia 773.000 ha (Mead, 2013).



Figura 4. Distribución mundial de las principales masas de pino radiata.
Fuente: Dans *et al.* (1999).

Gracias a sus peculiares características (gran crecimiento sobre climas templado-húmedos, gran plasticidad y adaptabilidad a medios diferentes, relativa buena calidad de su madera apta para diversos usos, facilidad de recolección de importantes cantidades de semilla, fácil propagación, relativa variabilidad genética existente en su área nativa útil para la selección de genotipos adaptados a diferentes ambientes y condiciones y una flexibilidad selvícola considerable) esta especie ha pasado de ocupar, a comienzos del siglo anterior, un área natural particularmente reducida, alrededor de 6.000

hectáreas, a ser una de las especies forestales más empleadas a nivel mundial. La superficie que ocupa a día de hoy es más de 660 veces superior que la que ocupaba a principios del siglo pasado, y 6 veces superior a la estimada en 1960 (Scott, 1961; Lavery, 1986; Dans *et al.*, 1999; Sánchez y Rodríguez, 2012; Mead, 2013).

Actualmente, la producción anual de madera de esta especie rebasa los 40 millones de metros cúbicos, con previsiones de cara a un futuro no demasiado lejano de duplicar esta cifra. Gracias a estos datos es posible comprender la importancia a nivel global que ha adquirido el pino radiata, especie que supone más del 13% del consumo de madera de la Unión Europea (Dans *et al.*, 1999).

En la actualidad es la conífera exótica más utilizada en España en plantaciones forestales constituyendo uno de los elementos típicos del paisaje del País Vasco, y en especial, los de las provincias de Vizcaya y Guipúzcoa (Figura 5). En España ocupa unas 250.000 ha, ubicándose aproximadamente el 45 % de las masas en el País Vasco, 115.349 ha, lo que supone el 30% de la superficie forestal arbolada total de la comunidad autónoma y cerca del 85-90% de la cortas anuales (Hazi, 2019c).

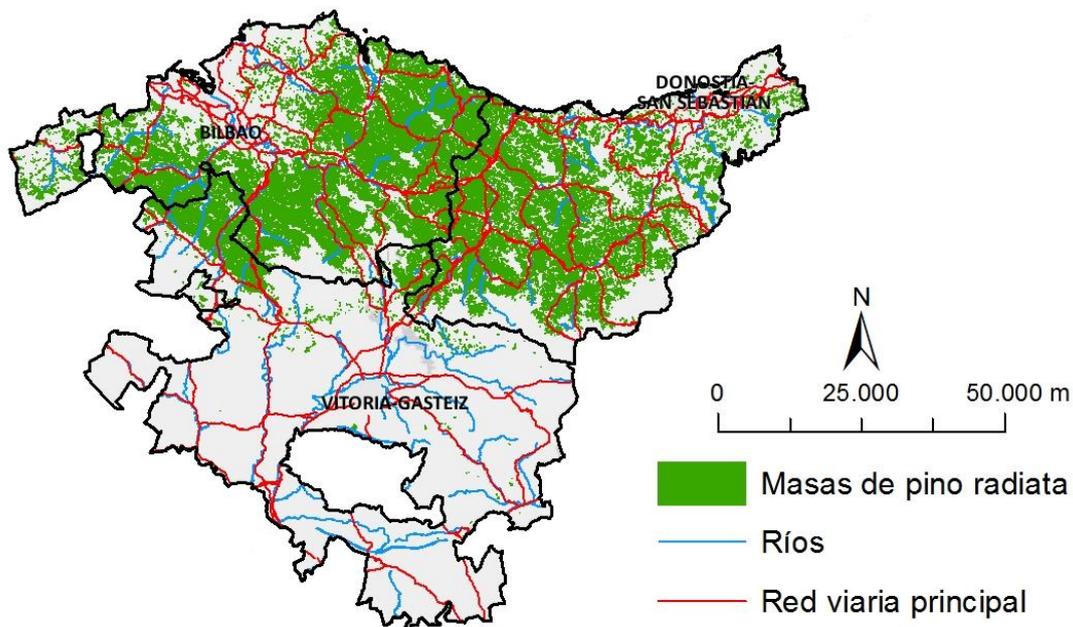


Figura 5. Distribución de las masas del pino radiata en el País Vasco.
Fuente: Elaboración propia a partir del Mapa Forestal del País Vasco, MFPV (2018).

El pino radiata es un árbol de talla mediana o elevada, que generalmente no supera los 30 m, pero puede llegar hasta los 50 m. El tronco puede alcanzar hasta 0,9 m de diámetro. De porte cónico y copa aguda, estructurada en pisos regulares cuando es joven, mientras que en la madurez se abre y deforma (Figura 6). La copa es densa y en los árboles aislados comienza casi desde la base del tronco (Ruiz de la Torre, 1971).



Figura 6. a) Ejemplar joven de pino radiata; b) Masa adulta bien gestionada y tratada.

El tronco es columnar, recto, de corteza gruesa y muy surcada con numerosas grietas, en forma de V, rojizas en la base y elipsoides. La corteza presenta protuberancias irregularmente rectangulares con la superficie, que es escamosa y de color gris negruzco (Figura 7a). Las ramas son verticiladas en forma de brazos de candelabro, horizontales o erecto-patentes en el arranque, vertical ascendentes en sus extremos, cortas con relación a los entrenudos, dando al árbol un aspecto muy característico (Figura 7b). Las ramillas presentan muchos nudos, y son densamente hojosas (Ruiz de la Torre *et al.*, 1990; Alamany y Romo, 1997; Moro, 2007).



Figura 7. a) Detalle de la corteza; b) Detalle de los verticilos.

Las hojas son persistentes, aciculares (Figura 8a), y están reunidas, en la mayoría de los casos, en fascículos de tres, excepto la variedad "binata" de las islas mexicanas de Guadalupe y Los Cedros en la que se presentan, generalmente, en fascículos de dos (Alamany y Romo 1997; Dans *et al.*, 1999). Son recias, verdes brillantes de 8 a 15 cm de largo por 1,3 a 2 mm de ancho, los márgenes están serrulados y se mantienen tres o cuatro años en el árbol. Las vainas alcanzan de 1,5 a 2 cm (Alamany y Romo, 1997).

Los estróbilos son claramente asimétricos, con las apófisis de las escamas basales externas más prominentes que el resto, ovoideos, subsentadas, de color pardo amarillento y en verticilos de tres a cinco. Miden 10 cm de largo y 7 cm de ancho y no disponen de un pedúnculo apreciable (Figura 8b). Las semillas o piñones, verrugosos y mates, miden 7 mm, son negruzcos y el ala membranosa que les rodea tiene tres veces su longitud (Ruiz de la Torre *et al.*, 1990; Aizpuru *et al.*, 1996; Alamany y Romo, 1997; Moro, 2007).



Figura 8. a) Detalle de las acículas; b) Detalle de los estróbilos.

Las inflorescencias masculinas (Figura 9), grupos de amentos, están agrupadas en el extremo de las ramitas, son cilíndricos y miden unos 4-5 cm de largo, se presentan en forma de espigas ovals muy apretadas de color pardo amarillentas con visos rosados. Las femeninas violáceas, en grupos menos numerosos en forma de conos floríferos purpúreo-violáceos. Florece en primavera, entre marzo y abril. Los piñones maduran en el segundo otoño, y la diseminación tiene lugar en la primavera del tercer año, o más tarde. A veces la piña permanece cerrada durante muchos años, sin que disminuya la capacidad germinativa de los piñones y tienen un carácter serótino que les proporciona la capacidad de abrirse rápidamente tras un incendio. La apertura de las mismas solamente se produce de forma temporal cuando las temperaturas son altas, de forma que parte de los piñones son liberados y la piña vuelve a cerrarse. Por lo tanto, los incendios estimulan este proceso y provocan una intensa

diseminación (Ruiz de la Torre, 1971; Ruiz de la Torre *et al.*, 1990; Alamany y Romo, 1997; Dans *et al.*, 1999; Moro, 2007; García, 2011). El peso medio del estróbilo es de 100 g y contiene entre 70 y 120 piñones. Por cada kilogramo, el número de piñones almacenado oscila entre 28.000 y 40.000 unidades. La fructificación da inicio a los 7-8 años, y alcanza la plenitud y la facultad de producir en abundancia a partir de los 15 o 20 años (Dans *et al.*, 1999).



Figura 9. Detalle de la inflorescencia masculina.

Es una especie de media luz, de temperamento bastante robusto. Higrófila, que requiere un régimen húmedo para un buen desarrollo (Moro, 2007). Según Rivas Martínez (1987) el piso bioclimático más apropiado y donde mejor encaja la especie es el colino-montano y el montano.

No tolera los suelos carbonatados (Alamany y Romo, 1997). En el País Vasco, los suelos fuertes y húmedos, y en especial los silíceo-arcillosos profundos son los más aptos para la especie. En la costa pacífica de Estados Unidos de donde es originario, habita en suelos arcillosos, areniscas o esquistos silíceos. Presenta grandes dificultades para crecer en suelos compactos, poco profundos o mal drenados. El sistema radical es somero, y habitualmente de poco desarrollo con relación al porte; la mayor parte de las raíces están situadas en los 30 cm superiores. Es termófilo, y teme las heladas, sobre todo las tardías (Moro, 2007).

En el País Vasco el pino radiata se asienta en espacios de cota baja, de hasta 600 msnm, sometido a un clima templado-húmedo de influencia oceánica (Michel, 2006). En cuanto a sus requerimientos de precipitaciones, el óptimo se encuentra entre los 900 y 2000 mm anuales pudiendo resistir entre 2 y 3 meses de sequía estival (Sánchez y Rodríguez, 2012; Mongil, 2019). De toda la vertiente cantábrica es en el País Vasco donde se ha aclimatado mejor (Moro, 2007). Por lo general, se

reproduce de semilla en vivero, pasando las plantas al terreno definitivo con un año (Ruiz de la Torre *et al.*, 1990).

El pino radiata es una especie de gran interés para la industria maderera debido a las cualidades de su madera y su relativo rápido crecimiento, características que lo convierten en el árbol más industrializado del mundo (Dans *et al.*, 1999).

Aunque puede vivir unos 150 años, el turno de aprovechamiento en plantaciones suele ser de unos 30-35 años. El crecimiento en el País Vasco oscila entre 8,8 a 23,7 m³/ha y año (Dans *et al.*, 1999).

El peso específico en verde del tronco, incluida la corteza, se acerca e incluso en ocasiones rebasa los 1.000 kg/m³ (Echeverría, 1942; Dans *et al.*, 1999).

La madera es esponjosa y blanda, de fibra larga y fácilmente blanqueable, por lo que resulta especialmente apta para la obtención de pasta de papel. La madera es más blanda que la de los demás pinos y tiene, en general, muchos nudos. En el País Vasco es utilizada para la fabricación de tableros contrachapados, listonados, perfiles laminados para carpintería exterior, carpintería interior, revestimientos, mobiliario, pallets etc. y para la obtención de pulpa y papel. Su valor como ornamental es también considerable, debido al color de su abundante follaje y su porte piramidal, sobre todo cuando es joven y presenta un color verde intenso junto a un porte cónico y copas agudas estructuradas en pisos regulares (Ruiz de la Torre *et al.*, 1990, Moro, 2007).

1.2 Breve historia del pino radiata en el País Vasco

El pino radiata fue introducido en el País Vasco hacia 1850 cuando Carlos Adán de Yarza (1812-1863), Padre de Provincia del Señorío de Vizcaya, plantó varios ejemplares en los jardines del Palacio de Zubieta, en Ispaster, en las proximidades de Lequeitio, Vizcaya. Sin embargo, no fue hasta 1871 cuando Mario Adán de Yarza (1846-1920), hijo del Maestrante de Granada, reparó en el rápido crecimiento de la especie lo que le motivó a plantarlo en diversos montes de la provincia de Vizcaya. Podría decirse que estas parcelas de ensayo dieron origen al proceso de reforestación con pino insigne de los montes vascos de manera que en 1898 el joven bilbaíno realizaría la primera repoblación de cierta entidad con carácter productivo. De 1898 a 1925 se estima que llegó a plantar alrededor de 11 millones de coníferas, en su mayor parte pino radiata (Michel, 2006).

Siguiendo la iniciativa de Adán de Yarza, y de manera coetánea, los ayuntamientos y propietarios privados optaron por aprovechar la alta cotización del mercado de la leña para iniciar una corta generalizada de los montes trasmochos con el objetivo repoblar el territorio con parte de los beneficios obtenidos. Resulta imprescindible entender la coyuntura y el contexto socio-económico de la época a la que nos remontamos, ya que en 1914 con el estallido de la Primera Guerra Mundial surge

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

una amplia demanda de la madera, lo que supuso un lento ascenso en cuanto a la superficie reforestada con pino radiata tanto en montes públicos como privados. Sumado a esto, las Diputaciones iniciaron un proceso de impulsión de los servicios forestales en pro de las repoblaciones con pino radiata. Los defensores de la especie trataron de divulgar la excepcional adaptación del pino a la estación vasco-cantábrica y su impresionante rendimiento, hasta entonces desconocido para la sociedad (Michel, 2006; Ainz, 2008).

Con la llegada de la dictadura franquista, la anteriormente incipiente generalización de las plantaciones de pino insigne en la orla cantábrica llegó a su plenitud. Las industrias especializadas en el consumo de la madera de pino fueron consolidándose. Las medidas tomadas por el Estado para implantar una autarquía y el establecimiento del Patrimonio Forestal en los territorios históricos de Guipúzcoa y Vizcaya auparon aún más la progresión del pino radiata (Michel, 2006).

El año 1956 marcó un punto crítico en la historia del forestalismo en el País Vasco debido a la severa helada que sufrieron numerosas masas de pino radiata. Pese a ello, el sector forestal en su conjunto tomó la decisión inequívoca de seguir apoyando las plantaciones de la especie. Esta decisión supuso la repentina aparición de amplias superficies coetáneas de nueva plantación; sólo en Guipúzcoa, se plantaron 20 millones de pinos en un tiempo récord de 5 años. La gran rentabilidad económica que suponía la explotación del pino radiata y el alto abandono del suelo existente suscitó una dinámica repobladora que cambió por completo la orografía vasca y el mercado de la madera (Figura 10). Este periodo ha sido definido por algunos autores como "fiebre pinífera" u "oro verde" (Michel, 2006).

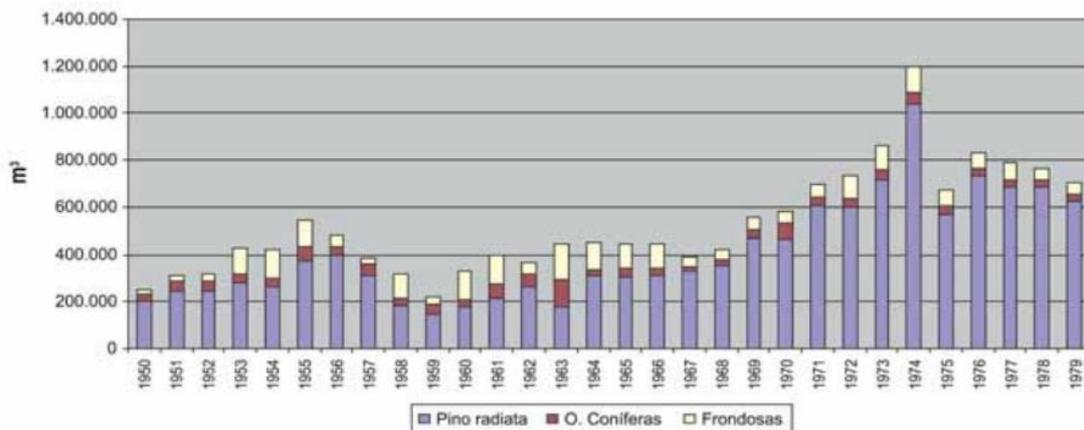


Figura 10. Datos históricos de las cortas de madera en el País Vasco (1950-1979).

Fuente: Michel (2006).

Esta situación vino motivada por diferentes factores, fundamentalmente la escasez de la oferta de madera debido a la falta de existencias y la prohibición de las importaciones de madera durante la dictadura, provocando de esta manera aumentos en el precio de la madera vasca (Figura 11). Los

ingentes beneficios obtenidos con la tala de los primeros pinares motivaron a muchos titulares de montes a repoblar de nuevo con pino insigne tras las cortas a hecho (Trueba, 1956; Ainz, 2008).

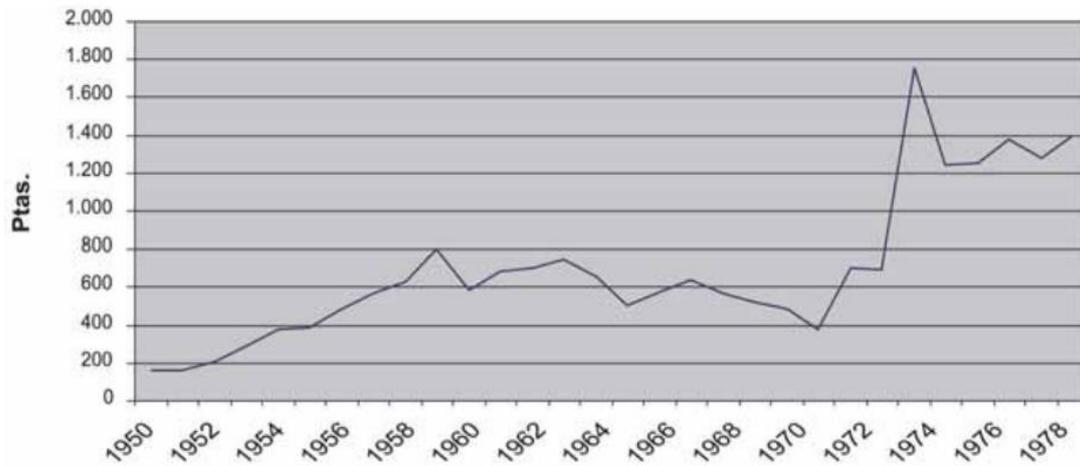


Figura 11. Evolución histórica del precio de la madera en el País Vasco.
Fuente: Michel (2006).

En 1989 las llamas devastaron muchas plantaciones de Vizcaya en forma de feroces incendios forestales, y a diferencia de 1956, no se recuperó toda la superficie perdida lo que conllevó a una nueva definición de las políticas sectoriales (Michel, 2006).

Desde la década de los 90, la madera del pino radiata se ha revalorizado en el mercado gracias a sus nuevos usos, generando así en el sector forestal un incremento del 15 % en 10 años. Sin embargo, el mercado de la madera del pino ha estado condicionado en los últimos años por la llegada de la crisis económica de 2009, la disminución de la demanda de madera gruesa y el catastrófico vendaval Klaus ocurrido en 2009, que puso en circulación una gran volumen de madera a precios muy bajos (Cantero, 2014).

Por estos motivos, la superficie que ocupa el pino insigne se encuentra en un progresivo declive, a un ritmo de aproximadamente 1.000 ha anuales desde que alcanzó el máximo histórico de 163.000 ha en 1986. No obstante, el Cuarto Inventario Forestal Nacional, llevado a cabo en el año 2011, cuantifica un volumen de 30 millones de m³ de madera de pino radiata en pie, y un promedio de existencias de 216m³/ha (MAPAMA, 2013), lo cual significa que jamás ha existido tal cantidad de madera en pie en los pinares del País Vasco como ahora. A modo de comparativa, en el Primer Inventario Forestal Nacional, de 1972, se contabilizaron 15 millones de m³ de madera en pie y un promedio de existencias de 94 m³/ha (Michel, 2006; Cantero, 2014).

En consecuencia, pese a que el pino radiata cada vez va ocupando menor superficie (Figura 12) (Michel, 2006), el volumen de madera acumulado en los montes cada vez es mayor. Este valor tan elevado de existencias se debe, entre otras razones, a la caída de demanda de madera. Se estima que

el crecimiento anual de los pinares es de unos 1,8 millones de m³ mientras que la demanda actual está entre 1 y 1,5 millones de m³ por año (Cantero, 2014).

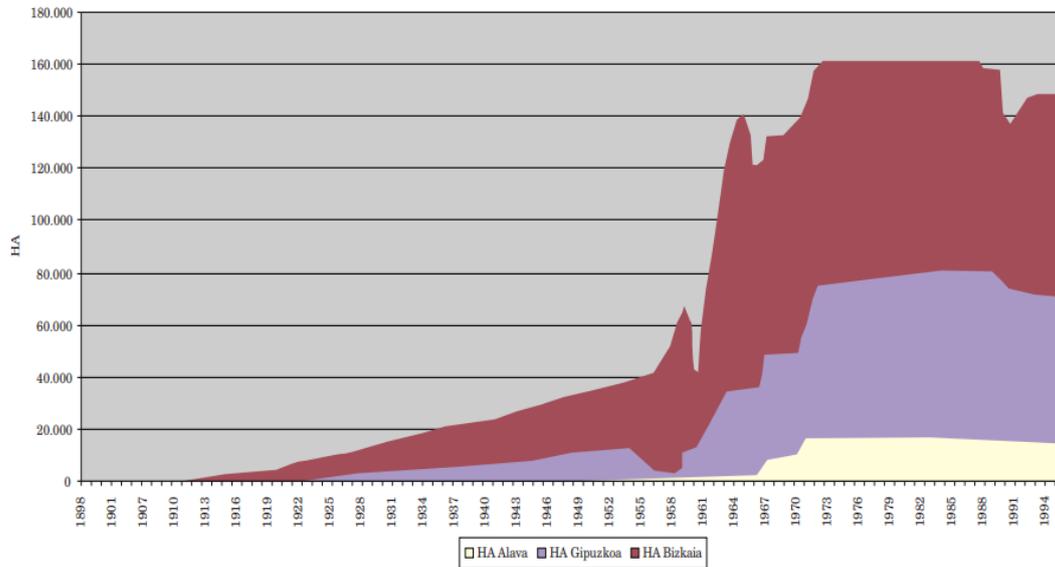


Figura 12. Evolución de la superficie ocupada por pino radiata entre los periodos 1898-1997 por territorios históricos.
Fuente: Michel (2006).

Si la decreciente demanda de madera de pino radiata no fuese suficiente, la existencia de oferta de madera de otras especies forestales hizo perder aún más terreno a esta especie. Hasta hace pocos años el pino radiata era la única especie en el País Vasco que ofrecía importantes cantidades de madera de aprovechamiento forestal. Ahora, sin embargo, coexiste junto a otras especies como el eucalipto (*Eucalyptus spp.*) que ocupa unas 15.000 ha, el abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) con unas 6.500 ha o el pino laricio (*Pinus nigra*) con unas 13.700 ha. De hecho, en las zonas costeras, sobre todo en Vizcaya, y en los montes de suelos pobres o arenosos el pino insigne ha sido sustituido por el eucalipto. En laderas ubicadas a una cota superior de los 500 msnm, que es un factor limitante del pino radiata en la Comunidad Autónoma, se tiende a plantar abeto de Douglas en suelos profundos y fértiles o pino laricio en suelos más pobres o con mayor riesgo de nieve o viento (Cantero, 2014).

Actualmente, un 85% de los montes vascos son superficies arboladas, correspondiendo aproximadamente la mitad a masas de pino insigne, las cuales ocupan la casi totalidad de los montes vizcaínos y guipuzcoanos por debajo de la cota de los 600 m de altitud (Ainz, 2008).

En cuanto a la propiedad de los montes, apenas un 15% de la superficie ocupada por el pino insigne se localiza en los montes públicos. El 85% restante está repartido en aproximadamente 20.000 propietarios, lo que supone una media de 5,6 ha de pinar por cada propietario, y en una mayoría de casos, se trata de varias parcelas no colindantes (Cantero, 2014). La Confederación de Forestalistas del País Vasco está compuesta en la actualidad por unos 5.200 socios. Sin embargo, aunque el número

total de propietarios de pinares prácticamente sea cuatro veces mayor a esta cifra, la superficie que acaparan los socios representa un 75% de la ocupada por el pino radiata (Ainz, 2008).

En la situación socioeconómica actual, el ser propietario de un pinar, para muchos propietarios, representa más un quebradero de cabeza que una inversión rentable. Ello es debido, entre otras cosas, a la inacción de las administraciones en el apoyo decidido al sector, al éxodo rural, a la falta de relevo generacional y a la falta de comprensión de la sociedad urbana sobre la importancia de las masas arbóreas productivas.

A toda esta lista de elementos coyunturales negativos se le debe añadir la problemática de las enfermedades forestales. Son varias las enfermedades fitopatógenas que afectan al pino radiata, principalmente las conocidas como "banda roja" y "banda marrón" (producidas por especies del género *Dothistroma* y por la especie *Lecanosticta acicola*, respectivamente). A pesar de que estas enfermedades llevan décadas presentes en el País Vasco, la virulencia que han alcanzado en los últimos 2-3 años es totalmente sin igual, lo que ha ocasionado el devastamiento de muchos pinares, provocando una alarma económica por parte de los forestalistas a la par que una alarma social.

1.3 Patógenos defoliadores

El aumento de las plantaciones de *Pinus radiata* en diferentes áreas fuera de su rango nativo ha llevado pareja la proliferación de diversos patógenos que causan daños muy importantes, hasta llegar a provocar el abandono de este cultivo en algunas partes del mundo, como ha ocurrido ya en diversos países de África y en algunos Estados de Australia (Lavery, 1986; Sánchez y Rodríguez, 2012).

Las masas artificiales de pino insigne reúnen en su conjunto una serie de características que propician el desarrollo y proliferación de plagas y enfermedades. Entre ellas destaca el hecho de formar masas puras y coetáneas, donde la facilidad de dispersión o contagio favorecen el aumento poblacional de los organismos nocivos, ya sean nuevos insectos o patógenos también introducidos o nativos. Hay que tener en cuenta que, en general, los organismos nocivos exóticos son los de mayor virulencia potencial, al carecer de enemigos naturales o estar bajo otras condiciones ambientales distintas a las de su distribución natural (Cobos-Suarez y Ruiz-Urrestarazu, 1990; de Urbina *et al.*, 2017).

Históricamente, han sido muchas las alegaciones que se han hecho acerca de la susceptibilidad de este pino a diferentes patógenos como justificación de no llevar a cabo grandes repoblaciones con esta especie. Así, en el País Vasco, Echevarría y De Pedro (1956) se manifestaban ya con elocuencia, resaltando el mal estado de los pinares de pino insigne cuando éstos son establecidos en terrenos pobres o de escaso fondo. Asimismo, según Lavery (1986) la introducción de esta especie sobre unas malas condiciones del suelo en las zonas de climas apropiados fue lo que causó que se produjeran ataques fúngicos provocando serios daños, de forma que hasta que no se ha estudiado y comprendido

los requerimientos edáficos de la especie, no se ha podido extender con garantía las plantaciones de pino radiata.

Actualmente, los problemas sanitarios que azotan al pino radiata siguen expandiéndose a nivel mundial y cada vez con más virulencia. Se sabe que a nivel global existen más de 400 especies que puede ocasionar plagas y enfermedades al pino radiata, pero solo un puñado de ellas causa daños económicos importantes (Flux *et al.*, 1993; Dick *et al.*, 2014). Las más graves son las distintas micosis que infectan las acículas, produciendo fuertes defoliaciones en el árbol, llegando a causar el detenimiento de la actividad vegetativa y en algunos casos la muerte (Martínez, 1933, 1942; Fernández de Ana, 1975; Mansilla *et al.*, 1997; Sánchez y Rodríguez, 2012).

Dichos hongos defoliadores de acículas pertenecen a los géneros *Dothistroma* y *Lecanosticta*, y aunque han sido registrados en diferentes países del mundo desde mediados del siglo pasado, ha sido en las décadas recientes cuando se está viendo un incremento significativo en la virulencia de sus ataques. Estos patógenos han causado brotes epidémicos severos en plantaciones del Hemisferio Sur (África Central, Chile, Nueva Zelanda y Australia) y en la actualidad están causando graves daños en las plantaciones de diversos países del Hemisferio Norte. Así, por ejemplo, brotes epidémicos severos están ocurriendo la Columbia Británica sobre masas *Pinus contorta* var. *latifolia*, en Reino Unido sobre *Pinus nigra*, en Escandinavia sobre *Pinus sylvestris* y *Pinus nigra*, y sobre *Pinus radiata* en el País Vasco (de Urbina *et al.*, 2017).

Las plantaciones del Hemisferio Sur (Chile y Nueva Zelanda principalmente), han sufrido ya en el pasado reciente una mayor virulencia del ataque de dichos patógenos. Sin embargo, en los últimos años se han registrado ataques devastadores en los que está involucrado el género *Phytophthora*. Ello ha provocado un repunte en la afección, lo que está suponiendo grandes pérdidas económicas en el sector (Drenth *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2008; 2009; Ahumada *et al.*, 2013; Dick *et al.*, 2014; Dyck, 2018). Este fenómeno podría estar sucediendo con retardo en todo el Hemisferio Norte, incluido en el País Vasco (de Urbina *et al.*, 2017; Mesanza *et al.*, 2019; Hazi, 2019a), de tal forma que se empezó a sospechar también de la posible implicación de patógenos del género *Phytophthora* en los daños existentes.

En una especie de crecimiento rápido como es el pino insigne los daños provocados por patógenos tienen una importancia económica indiscutible (Cobos-Suarez y Ruiz-Urrestarazu, 1990) por lo que su estudio y comprensión son de vital importancia.

1.3.1 Principales especies de patógenos defoliadores

El concepto de plagas y enfermedades emergentes en el ámbito forestal hace referencia a un amplio conjunto de elementos bióticos susceptibles de causar graves daños en las masas forestales en

una región y que, o bien han aparecido en los últimos años, o bien ya estaban presentes pero en los últimos años han multiplicado sus daños (Hazi, 2019b). Por consiguiente, las enfermedades causadas por los patógenos objeto de estudio encajan en la acepción descrita del término “enfermedad emergente”.

Los patógenos de los géneros *Dothistroma* y *Lecanosticta* son los principales agentes causantes de las enfermedades defoliadoras más importantes que afectan al pino radiata, tanto en plantaciones como en masas naturales (Schneider *et al.*, 2019).

Las especies del género *Dothistroma* causan bandas rojas transversales en las acículas, lo que dio origen al nombre de la enfermedad (“banda roja de las acículas”). Las especies involucradas son *Dothistroma septosporum* y *Dothistroma pini*, que solo pueden ser distinguidas mediante análisis genéticos en laboratorio (Schneider *et al.*, 2019).

Por otro lado, *Lecanosticta acicola* es una especie que produce la enfermedad conocida con el nombre de “banda marrón de las acículas” debido a la infección que causa en la acícula, de manera que ésta se torna de color marrón provocando su muerte y caída prematura (Mesanza *et al.*, 2019).

Cabe mencionar que existe una confusión extendida acerca de las denominaciones coloquiales de “banda marrón” y “banda roja” debido a la similitud en la sintomatología que presentan en forma de anillos o bandas oscuras que circunscriben la acícula. Actualmente, la comunidad científica da por buena la distinción realizada anteriormente, de forma que el término de “banda roja” hace referencia a la enfermedad causada por los patógenos del género *Dothistroma* y “banda marrón” hace referencia a la enfermedad producida por *Lecanosticta acicola* (Hazi, 2019a).

Dichas enfermedades poseen una amplia gama de hospedadores y se encuentran distribuidas por varios países. La presencia de *L. acicola* y *Dothistroma* spp. ha sido confirmada en 53 y 96 especies de *Pinus*, respectivamente, incluyendo los híbridos. La propagación de estos patógenos en territorio europeo parece estar asociada a la dispersión conidial y diseminación de ascosporas, y también a la introducción accidental por parte del hombre. Todas estas especies están recogidas en la lista EPPO A2 (European and Mediterranean Plant Protection Organization) como especies para las que se recomienda la regulación de cuarentena (Mesanza *et al.*, 2019).

Estos patógenos pueden reducir significativamente la fotosíntesis e influir en la capacidad del árbol para defenderse del estrés biótico o abiótico, directa o indirectamente, ya que afecta a la producción de metabolitos secundarios que son esenciales en la reacción de defensa (de Urbina *et al.*, 2017).

La humedad y la temperatura son los dos factores ambientales más importantes para estos patógenos foliares, pues son críticos para la esporulación, dispersión e infección (Mesanza *et al.*, 2019).

Muchas plantaciones, y en especial las ubicadas cerca de la costa de las provincias de Vizcaya y Guipúzcoa donde se concentran las principales masas de pino radiata, cumplen con estas condiciones ambientales favorables para los patógenos, por lo que superan con creces los citados umbrales de defoliación en los que se produce daño ecológico y económico.

Otro importante grupo de organismos que causan daños y sintomatología similar a la “banda marrón” y “banda roja” son los pertenecientes al género *Phytophthora*, destacando las especies *P. pluvialis* y *P. pinifolia*. *P. pluvialis* fue detectada en 2008 en Nueva Zelanda como causante de una nueva enfermedad defoliadora en *P. radiata* y *Pseudotsuga menziensis*, mientras que *P. pinifolia* fue detectada en 2004 en plantaciones de *P. radiata* en la costa central de Chile. Ambas especies producen una sintomatología similar en forma de bandas oscuras en las acículas, manchas negras, y enrojecimiento y caída de las acículas. Además, *P. pinifolia* causa chancros en la base de las acículas (Mesanza *et al.*, 2019).

1.3.1.1 Banda roja (*Dothistroma* spp.)

La “banda roja” causada por especies del género *Dothistroma*, conocida en inglés con el acrónimo DNB (Dothistroma Needle Blight), es una de las enfermedades más dañinas en pinares naturales y plantaciones de todo el mundo (Barnes *et al.*, 2004; Bulman *et al.*, 2008; Jankovský *et al.*, 2004; Karadžić, 1989; Drenkhan *et al.*, 2016). La enfermedad se consideró por primera vez como un problema sanitario grave en los años 50 y 60 en plantaciones de *P. radiata* en el Hemisferio Sur y en varias especies de pino en América del Norte (Gibson, 1972; 1974; Drenkhan *et al.*, 2016). Las dos especies involucradas en esta enfermedad son *D. pini* y *D. septosporum*. Estas especies pueden hospedarse en más de 100 taxones de *Pinaceae*, principalmente *Pinus* spp. (Elvira-Recuenco *et al.*, 2020).

Los dos tipos de reproducción (MAT 1 y MAT 2) están ya presentes en algunos países europeos. Dado que la reproducción sexual aumenta la diversidad genética, puede promover la proliferación de estos hongos en nuevos entornos, la virulencia en hospedantes nativos y exóticos y la resistencia a fungicidas (de Urbina *et al.*, 2017).

Esta enfermedad redujo significativamente el número de plantaciones de pinos a gran escala en el Este de África (Gibson, 1974; Drenkhan *et al.*, 2016) e India (Bakshi y Singh, 1968; Drenkhan *et al.*, 2016) y provocó el abandono de plantaciones en otros países de África, Asia, Australasia, Europa y Norteamérica (Bulman *et al.*, 2016; Drenkhan *et al.*, 2016). Asimismo, sigue siendo una limitación importante para la silvicultura de plantaciones de pino en Nueva Zelanda, Chile y otras áreas del Hemisferio Sur (Ahumada, 2013; Bulman *et al.*, 2013; Rodas *et al.*, 2016; Drenkhan *et al.*, 2016). Desde la década de 1990, la enfermedad ha aumentado en incidencia y gravedad en el Hemisferio Norte,

especialmente en Canadá y, más recientemente, en algunos países europeos (Barnes *et al.*, 2014; Bradshaw, 2004; Drenkhan *et al.*, 2013; Hanso y Drenkhan, 2008; Markovskaja y Treigienė, 2009; Millberg *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2009; Solheim y Vuorinen, 2011; Gales *et al.*, 2014; Drenkhan *et al.*, 2016).

La “banda roja” se halla en casi todos los países donde se encuentran hospedadores susceptibles, en un rango de condiciones ambientales que incluye desde un clima tropical a subártico (Figura 13). *D. septosporum* parece tener una distribución mundial, si bien su distribución exacta basada en informes validados usando métodos moleculares no se ha mapeado todavía. Por contra, *D. pini* parece tener una distribución geográfica más limitada, aunque tampoco se ha delimitado su distribución de forma precisa. Por consiguiente, hasta que no se haga un análisis profundo utilizando métodos moleculares no es posible conocer su distribución exacta (Watt *et al.*, 2009; Drenkhan *et al.*, 2016).

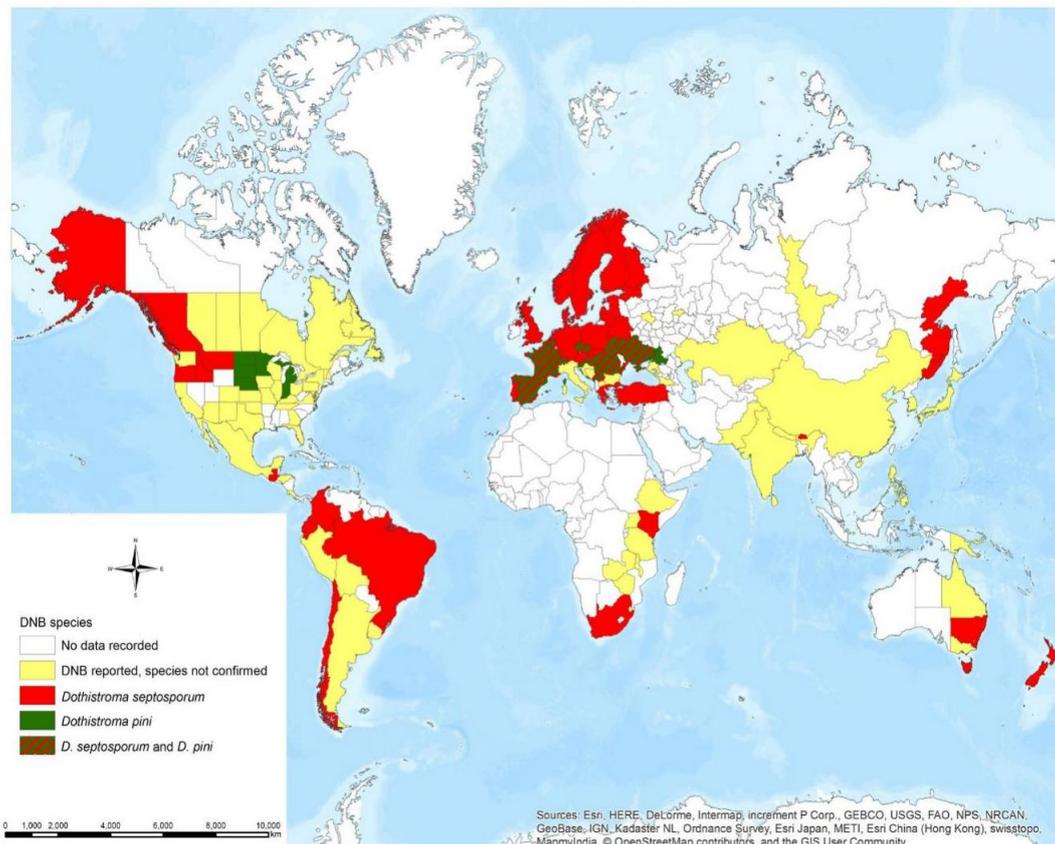


Figura 13. Distribución mundial del género *Dothistroma*.
Fuente: Drenkhan *et al.* (2016).

Dothistroma septosporum parece el patógeno más relevante del género, encontrándose en al menos 44 países de 76 analizados de los 5 continentes en un estudio reciente (Drenkhan *et al.*, 2016). *Dothistroma pini* se encontró en 13 países de dos continentes, Europa y Norte América (Queloz *et al.*, 2014).

Algunos estudios genéticos recientes indican que *D. septosporum* podría ser originario de Europa mientras que el origen de *D. pini* sigue siendo desconocido (Elvira-Recuenco *et al.*, 2020). Un estudio en Francia indica que la distribución de *D. pini* está restringida a las partes oeste y sur del país. Este mismo estudio sugiere que *D. pini* puede preferir ambientes más cálidos que *D. septosporum* (Fabre *et al.*, 2012).

1.3.1.1.1 Taxonomía

Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Clase Dothideomycetes, Subclase Dothideomycetidae, Orden Capniodales, Familia Mycosphaerellaceae y Género *Dothistroma*.

1.3.1.1.2 Hospedadores

A nivel mundial, más de 100 taxones de la familia *Pinaceae* son potenciales hospedadores. *Pinus radiata* posee una extremada susceptibilidad a la enfermedad. Otras especies susceptibles son *P. nigra* var. *salzmannii*, *P. mugo*, *P. ponderosa*, *Pseudotsuga menziensis*, *Larix* spp. y un largo etcétera. Por otro lado, *P. pinaster* parece no ser muy susceptible (van Halder *et al.*, 2002; Hazi, 2019a).

1.3.1.1.3 Identificación

Los primeros síntomas se presentan con amarillamiento o bandas marrones pálidas. Las bandas se vuelven marrón más oscuro y luego normalmente desarrollan un rojo ladrillo característico por encima del punto de infección hasta que terminan muriendo (Figuras 14 y 15). El color permanece hasta mucho después de que la acícula haya muerto. Adyacente a la banda roja, se ven áreas de tejido marrón necrótico, seguido por un área de células altamente lignificadas de color verde oscuro. Las bandas rojas son variables en color y frecuencia dependiendo de la especie hospedadora, y no siempre están presentes (van Halder *et al.*, 2002; Franich *et al.*, 1986; Barnes *et al.*, 2008; Bulman *et al.*, 2013).



Figura 14. Lesiones foliares que se pueden apreciar en campo.



Figura 15. Detalle de las lesiones necróticas.

Es bastante común que estos síntomas se confundan por los producidos por daños por cercópidos *Cercopis* spp., *Hematoloma* spp., o con deficiencias nutricionales, y por supuesto con *Lecanosticta acicola*. Las dos especies del género (*D. septosporum* y *D. pini*) y *L. acicola* son prácticamente imposibles de diferenciar visualmente en campo y solo pueden ser diagnosticadas con seguridad en laboratorio mediante técnicas moleculares (van Halder *et al.*, 2002).

Por lo general, cuando se trata de árboles adultos, la infección suele estar limitada a la parte inferior de la copa, pero cuando se producen ataques intensos y repetidos, la copa entera puede ser defoliada (van Halder *et al.*, 2002). En las plantaciones del País Vasco, donde se han sucedido ataques repetidos en los últimos años, son frecuentes los ejemplares adultos totalmente defoliados o con porcentajes de defoliación muy elevados (Figura 16).



Figura 16. Masa de pino radiata prácticamente defoliada en su totalidad por los patógenos.

1.3.1.1.4 Daños

Causa desecación y defoliación en la parte inferior y media de los árboles. Esta defoliación a su vez causa la reducción del crecimiento en altura y diámetro cuando es severa. Los picos de severidad del ataque se alcanzan en la primavera tardía y en verano (van Halder *et al.*, 2002; de Urbina *et al.*, 2017).

1.3.1.1.5 Biología

Los conidiomas, cuerpos fructíferos asexuales que contienen los conidios, son negros, variables en tamaño y forma, ya se presenten individualmente o en grupos en el centro de la banda de la acícula. Inicialmente subepidérmicos y acervulares, desarrollan una protuberancia y son estromáticos y cupulados. Se pueden formar dos tipos diferentes de cuerpos de fructificación sobre los estromas negros de las acículas infectadas: los picnidios (en la forma asexual), y en algunas ocasiones peritecas (en la forma sexual). Las esporas asexuales hialinas o conidios, que se forman en masas viscosas de color crema, son de forma variable y tamaño, que va desde clavados cortos hasta filiformes (Figura 17). Su tamaño varía de 10 a 40 mm de largo por 1.5 - 3 mm de ancho, con uno a siete septos (Thyr y Shaw, 1964; Evans, 1984; van Halder *et al.*, 2002; Bulman *et al.*, 2013).

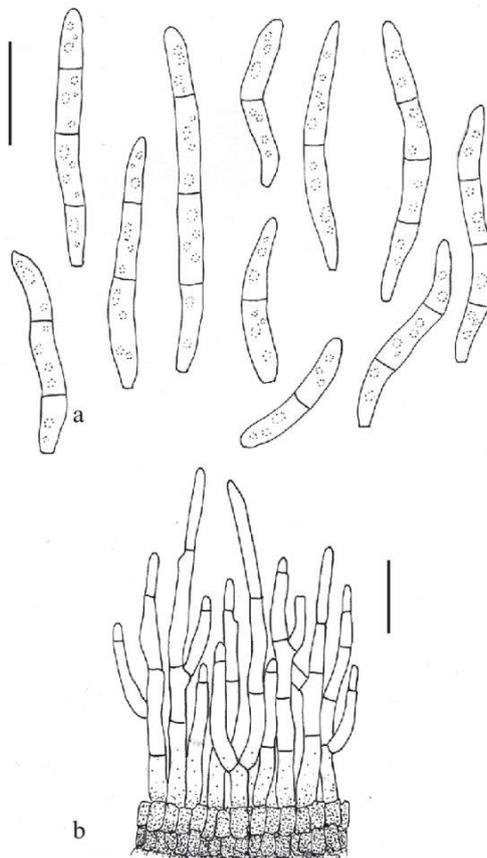


Figura 17. *Dothistroma septosporum*: a) Conidios b) Conidióforos.
Fuente: Svetlana y Treigiené (2009).

Los cuerpos de fructificación producen y liberan los conidios que son dispersados por la lluvia. En general, la dispersión en el campo es muy localizada, siendo la mayoría de conidios diseminados dentro de los 50-100 m de la fuente de emisión. Se piensa que la dispersión a larga distancia puede producirse a través de conidios que son transportadas en nubes de condensación, niebla o neblina, o por transporte humano de plántulas infectadas. Algunos autores sugieren que la dispersión a larga

distancia en Canadá se dio a través de ascosporas del teleomorfo, con propagación local, principalmente a través de conidios (Gibson *et al.*, 1964; Gadgil, 1967; Ivory, 1967; 1972; van Halder *et al.*, 2002; Bulman *et al.*, 2013).

Una vez los conidios se encuentran sobre las acículas y después de producirse la germinación de propágulos, los tubos germinales crecen sobre la superficie de la acícula y se introducen a través de los poros del estoma. Este proceso lleva aproximadamente 3 días, dependiendo de los niveles de temperatura y humedad (van Halder *et al.*, 2002; Bulman *et al.*, 2013).

Las hifas generalmente crecen en la superficie de la acícula hasta 10 días y pueden producir conidios secundarios. Después de introducirse en los estomas, las hifas se ramifican y crecen principalmente en el tejido mesofílico. Finalmente, el tejido mesofílico acaba muriendo (Gadgil, 1967; Peterson, 1969; Ivory, 1972; Muir y Cobb, 2005; Bulman *et al.*, 2013).

1.3.1.1.6 Factores de riesgo

Los periodos húmedos y templados son especialmente peligrosos (van Halder *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta que las principales plantaciones de pino radiata en el País Vasco se concentran cerca de la costa bajo la influencia de un clima húmedo y templado, se comprende la elevada susceptibilidad de estas masas.

1.3.1.1.7 Control

Se ha demostrado que las medidas preventivas y la selvicultura no son eficientes, o al menos no obtienen los resultados esperados para el control de esta enfermedad (Scott, 1973; Hood y Ramsden; 1996, Bulman *et al.*, 2013; de Urbina *et al.*, 2017). Por ello, en países como Nueva Zelanda llevan años aplicando tratamientos sistemáticos en las plantaciones con productos anticriptogámicos, generalmente óxido cuproso, con el objetivo de impedir el decaimiento de la planta y las pérdidas de producción (Dans *et al.*, 1999; Dyck, 2018). En el País Vasco se ha planteado la realización de este tipo de tratamientos (no exento de polémica medioambiental), de manera que actualmente se está estudiando la efectividad de diferentes tratamientos experimentales en pequeñas parcelas (Hazi, 2019a).

Sin embargo, también sucede que en ocasiones los tratamientos químicos no son efectivos, como por ejemplo, en los casos en los que el nivel de infección es demasiado alto para un solo tratamiento, o la aplicación no sea correcta. Para solventar estas limitaciones se está investigando en la realización de control biológico mediante hongos endófitos (Dyck, 2018).

1.3.1.2 Banda marrón (*Lecanosticta acicola*)

La especie *Lecanosticta acicola* causa en especies de *Pinus* la enfermedad que recibe el acrónimo en inglés de BSNB (Brown Spot Needle Blight; el tizón de manchas marrones). Produce defoliaciones severas, y también puede producir el crecimiento atrofiado y conducir al árbol a la muerte. Durante los últimos 10 años este patógeno parece más frecuente, según los informes, en Europa y América del Norte, y ello a pesar del hecho de que es una especie de cuarentena en muchos países y de que existen protocolos de erradicación (van der Nest *et al.*, 2019).

El patógeno fue descrito por primera vez por de Thümen en 1878 y los primeros reportes de *Lecanosticta* son del siglo XIX cuando fue observado en *Pinus palustris* en el sur y en el sureste de Estados Unidos. De 1972 a 2012, el nombre *Mycosphaerella dearnessii* fue ampliamente utilizado para referirse al agente causal de la “banda marrón”. Sin embargo, recientemente se reconoció que *Mycosphaerella* es polifilética y debe usarse estrictamente para hongos del género *Ramularia* (Crous *et al.*, 2007; Crous, 2009, van der Nest *et al.*, 2019).

Se han descrito cinco especies de *Lecanosticta*: *L. acicola*, *L. brevispora*, *L. guatemalensis*, *L. gloeospora*, y *L. longispora* pero se sabe que existen por lo menos nueve especies. *L. acicola* sigue siendo hasta ahora la especie con más registros conocidos, lo que sugiere que tiene una amplia distribución en América del Norte y del Sur, Europa y Asia. Los cuatro restantes solo se conocen en Mesoamérica (Evans, 1984; Marmolejo, 2000; Quaedylic *et al.*, 2012, van der Nest *et al.*, 2019).

En Europa, *L. acicola* fue detectada por primera vez en 1940, en España. Las primeras referencias lo situaban en zonas urbanas de España, desde donde se extendió por el resto de Europa (Martínez, 1942; Schneider *et al.*, 2019; van der Nest *et al.*, 2019).

Actualmente *L. acicola* ha sido detectada en Sur, Centro y Norte América, China y en otros países de Europa incluyendo Austria, Croacia, República Checa, Estonia, Francia, Alemania, Italia, Lituania, Polonia, Eslovaquia, Eslovenia, España y Suiza (Gibson, 1980; Evans, 1989; Huang, Smalley y Guries, 1995; Sinclair y Lyon 2005; Ivanova y Benodoviova 2010; Schneider *et al.*, 2019). Se cree que América Central es el centro de origen de *L. acicola*. Esta hipótesis fue propuesta por primera vez por Evans (1984), cuando el hongo se aisló de árboles nativos en bosques vírgenes. En un estudio filogenético reciente, se encontraron altos niveles de diversidad en la región del gen 1- α (TEF1) de aislados de México y Guatemala (Evans, 1984; Janoušek *et al.*, 2016, van der Nest *et al.*, 2019).

1.3.1.2.1 Taxonomía

Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Clase Dothideomycetes, Subclase Dothideomycetidae, Orden Capniiales, Familia Mycosphaerellaceae y Género *Lecanosticta*.

1.3.1.2.2 Hospedadores

Hasta la fecha ha sido registrada en 53 taxones de pino diferente, incluidos híbridos. Potencialmente, todas las pináceas son susceptibles de ser hospedantes de esta especie de hongo. Las especies más susceptibles son los híbridos de *Pinus attenuata* x *radiata*, *P. palustris*, *P. radiata*, *P. attenuata*, *P. sylvestris* y *P. ponderosa*. El patógeno ha sido descrito también en *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. uncinata*, *P. taeda* y *P. mugo* (van Halder *et al.*, 2002; Mesanza, 2019).

1.3.1.2.3 Identificación

La enfermedad se caracteriza por presentar manchas marrones necróticas y lesiones amarillas en los puntos de infección (Figura 14) y, posteriormente, causar la muerte de las acículas del ápice, que a menudo conduce a una defoliación temprana (Ivory, 1987; van der Nest *et al.*, 2019). Las acículas afectadas presentan tres zonas bien definidas; un ápice seco, manchas marrones en el medio, y la base de las acículas de color verde (Figura 15). Finalmente, la acícula se torna marrón en su totalidad y cae prematuramente. En infecciones moderadas los síntomas se desarrollan principalmente en las partes bajas del árbol, pero puede ser infectado en su totalidad (Figura 16). Estos síntomas pueden ser observados durante todo el año, en primavera y verano con mayor acentuación (van Halder *et al.*, 2002).

1.3.1.2.4 Daños

Causa clorosis, defoliación de acículas, y como se ha constatado en gran cantidad de plantaciones del País Vasco, provoca la detección del crecimiento del árbol y en los casos más extremos la muerte del mismo (van Halder *et al.*, 2002; Mesanza *et al.*, 2019).

1.3.1.2.5 Biología

Lecanosticta acicola puede manifestarse en su forma asexual o sexual (Siggers, 1939; van der Nest *et al.*, 2019). El patógeno pasa el invierno en forma de acérvulo (forma asexual) o como ascostroma (forma sexual), y en el tejido muerto de las acículas muertas o vivas. También puede pasar el invierno como micelio vegetativo en las acículas infectadas (Siggers, 1944; van der Nest *et al.*, 2019). Los conidios son liberados en masas gelatinosas en las acículas cuando la luz, la temperatura y la humedad son favorables (Kais, 1975; Tainter y Baker, 1996; van der Nest *et al.*, 2019).

Por lo general, se reproduce asexualmente y se propaga a través de la lluvia por dispersión de conidios. Como resultado de un ataque severo, las acículas enteras se vuelven de color marrón y se forman cuerpos fructíferos alargados de color verde grisáceo a negro oliva, llamados acérvulo, bajo la epidermis de la porción necrótica de las acículas. La infección y la defoliación comienzan desde las ramas inferiores como en el caso de *Dothistroma* spp. La etapa sexual rara vez aparece en acículas

caídas muertas, pero se sabe poco sobre la reproducción sexual del patógeno (Elvira-Recuenco *et al.*, 2020).

Existe una fase asintomática en la que *L. acicola* se establece dentro de las acículas, fase que puede durar de varios días a 3 meses (Setliff y Patton, 1974; Skilling y Nicholls, 1974; van der Nest *et al.*, 2019). Esto depende de la cepa del patógeno y la duración de la estación húmeda. Este retraso en el desarrollo de los síntomas podría conducir a la accidentalidad del movimiento de plantas infectadas a nuevas áreas (Kais, 1972; van der Nest *et al.*, 2019).

Bajo condiciones de humedad las esporas se producen en las acículas infectadas durante todo el año y puede ser esporas asexuales (conidios) (Figura 18). El principal método de dispersión de las esporas es la lluvia, aunque se cree que pueden ser transportadas a grandes distancias por insectos. Asimismo, también pueden ser transportadas por las herramientas de poda y de otros tratamientos selvícolas. Las esporas penetran por los estomas de las acículas. Las acículas jóvenes son más propensas a la infección. En principio, la infección puede darse en un amplio rango de temperaturas, pero entre los 21 y 30 °C es mucho más veloz (van Halder *et al.*, 2002; van der Nest *et al.*, 2019).



Figura 18. Detalle de las esporas con un aumento de x40 y x100, respectivamente.

El micelio permanece en las acículas de uno a dos años. La defoliación ocurre en las acículas infectadas, las cuales caen durante el otoño o a principios del invierno. En el caso de ataques severos, se pueden producir defoliaciones continuas hasta primavera siguiente. Una vez que el tejido mesofílico ha sido invadido por *L. acicola* comienzan a formarse los picnidios. Estos comienzan a integrarse con el tejido de la acícula y aumentar de tamaño hasta que son visibles a simple vista (Wolf y Barbour, 1941; van der Nest *et al.*, 2019).

L. acicola produce compuestos tóxicos LAI y LAII, que son resistentes al calor. Los dos compuestos interactúan con el hospedador de forma independiente y no promueven ni inhiben la interacción entre ellos. Parece probable que estas toxinas estén involucradas en la destrucción del tejido mesofílico de las acículas de pino en el punto de infección (Jewell, 1983; Yang *et al.*, 2002, 2005; van der Nest *et al.*, 2019).

1.3.1.2.6 Factores de riesgo

Es un patógeno con gran capacidad de adaptación. Sus conidios y ascosporas son liberadas durante todo el año en temperaturas que van desde -5,5 a 28°C (Kais, 1971; Siggers, 1944; Wyka *et al.*, 2018; van der Nest *et al.*, 2019). Los conidios no germinan por debajo de los 5°C, pero la mayoría sobrevive a esta temperatura y comienza la germinación una vez que la temperatura vuelve a aumentar (Siggers, 1944; van der Nest *et al.*, 2019).

Por ejemplo, en Japón se constató que el primer año de infección los conidios se produjeron desde principios de primavera a otoño, registrando un pico de dispersión en pleno verano. Sin embargo, durante un segundo año de infección, la dispersión fue más abundante desde finales del verano hasta mediados del otoño del año siguiente (Suto, 2002; van der Nest *et al.*, 2019). Ello da una idea de que se trata de un patógeno con gran capacidad de adaptación y de reproducción, y por ende, muy difícil de controlar.

El componente principal que facilita la propagación de conidios y ascosporas es la humedad, pero otros factores ambientales también pueden ayudar en su dispersión, como la alta densidad de plantación, la pluviometría o las temperaturas elevadas (van der Nest *et al.*, 2019). Asimismo, es posible que algunos insectos puedan representar mecanismos de extensión conidial, si bien este extremo no está demostrado (Skilling y Nicholls, 1974; van der Nest *et al.*, 2019).

La dispersión a larga distancia de *L. acicola*, es probable que sea el resultado del movimiento antropogénico de material vegetal infectado. Esto no incluiría la transmisión mediante semillas infectadas ya que los conidios de *L. acicola* no pueden sobrevivir en la superficie de una semilla de pino más de 30 días (Jianren y Chuandao, 1988; van der Nest *et al.*, 2019).

Una investigación reciente sobre la capacidad de dispersión de *Dothistroma*, patógeno que tiene unos mecanismos de dispersión conidial muy similar al de *L. acicola*, mostró que los conidios podría diseminarse naturalmente en más de 1 km de distancia (Mullett *et al.*, 2016). Por lo tanto, la dispersión que alcanza *L. acicola* puede ser muy similar.

1.3.1.2.7 Control

Al igual que sucede con *Dothistroma* spp., no existen tratamientos fitosanitarios registrados en España, y se está estudiando la efectividad de diferentes productos.

1.3.1.3 *Phytophthora* spp.

Phytophthora es un género de microorganismos del superfilo Stramenopile que incluye mohos de agua, diatomeas y algas pardas. Las especies de *Phytophthora* se parecen a los hongos verdaderos porque crecen por medio de hifas y producen esporas (Figura 19). Pero a diferencia de los hongos verdaderos, sus paredes celulares contienen celulosa en lugar de quitina, sus hifas carecen de paredes cruzadas y la fase diploide, en lugar de la fase haploide, domina su ciclo de vida. Otra característica llamativa de *Phytophthora* es que produce esporas natatorias, llamadas zoosporas, durante una fase de su ciclo de vida, un vestigio de sus orígenes evolutivos en el agua (Parke y Ebenhart, 2020).

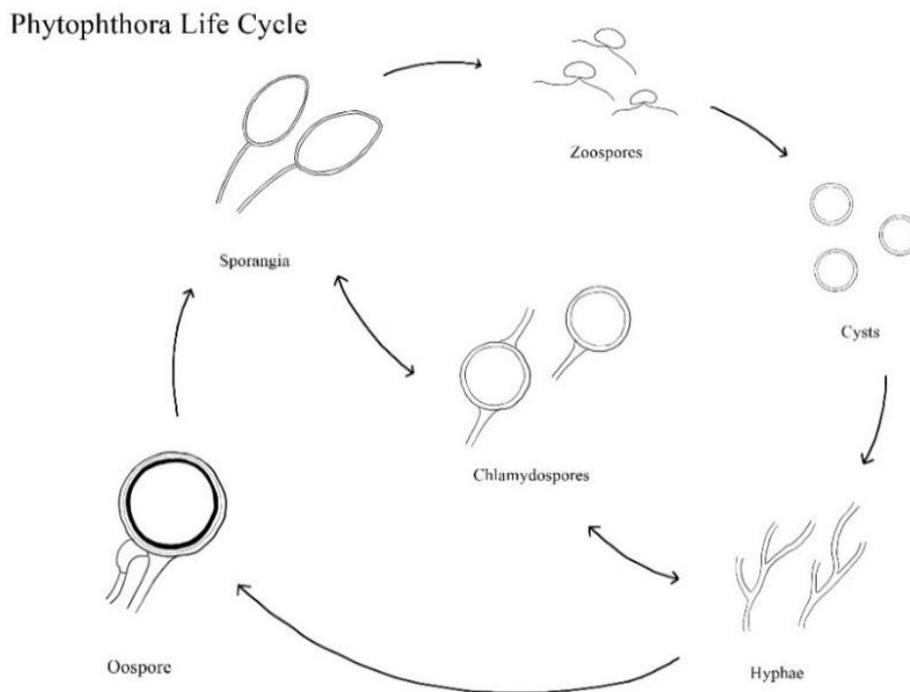


Figura 19. Esquema del ciclo de vida de *Phytophthora* spp.
Fuente: Parke y Ebenhart (2020).

Su clasificación taxonómica completa es la siguiente: Reino Protista, Superfilo Heterokonta o Stramenopiles, Filo Pseudofungi, Clase Oomycetes, Orden Peronosporales, Familia Peronosporaceae y Género *Phytophthora*.

Desde que Anton de Bary describiese el género *Phytophthora* y la primera especie, *P. infestans*, en 1876, han sido descritas alrededor de 80 especies diferentes. Todas las especies de *Phytophthora* son patógenas y causan daños severos en una gran variedad de árboles, plantas ornamentales y agrícolas

(de Bary, 1876; Drenth *et al.*, 2006; Parke y Ebenhart, 2020). El nombre *Phytophthora* deriva del griego y literalmente significa "destructor de plantas". Ejemplos notables de la devastación causado por *Phytophthora* incluyen *P. infestans* que causó la hambruna irlandesa de la patata en la década de 1840, *P. cinnamomi* que infecta a más de 1000 especies de plantas y *P. ramorum* recientemente asociado a la muerte súbita del roble (Parke y Ebenhart, 2020).

En términos de forestería, las enfermedades emergentes provocadas por las especies *P. ramorum* y *P. austrocedrae* (Rizzo *et al.*, 2002; Greslebin *et al.*, 2007; Ahumada *et al.*, 2013) han reforzado la teoría de que estos patógenos son una seria amenaza para la vida silvestre de los bosques, tanto en ecosistemas naturales como en plantaciones (Davidson *et al.*, 2003; Garbelotto *et al.*, 2003, Greslebin y Hansen, 2010; Ahumada *et al.*, 2013).

Según Cooke (2000), las especies de *Phytophthora* son muy difíciles de identificar con precisión, y los diagnósticos certeros requieren de tratamientos especialistas y experimentados. Los procedimientos de identificación de *Phytophthora*, incluyen o están basados en métodos moleculares, y más concretamente en comparación de secuencias de ADN (Schena y Cooke, 2006; Durán *et al.*, 2009).

Estos métodos han permitido descubrir varias nuevas especies de *Phytophthora* que no hubieran podido ser identificadas mediante métodos tradicionales. Los métodos moleculares han supuesto un crecimiento muy significativo de protocolos de rápida identificación de algunos de los grupos más importantes de *Phytophthora* (Martin y Tolley, 2004; Durán *et al.*, 2009). Ejemplo de esto son las dos especies de *Phytophthora* recientemente descubiertas y que atacan a las acículas de pino radiata con suma agresividad: *P. pinifolia* en 2004 en Chile (Durán *et al.*, 2008; Ahumada *et al.*, 2013), y *P. pluvialis* en 2008 en Nueva Zelanda (Dick *et al.*, 2014; Dyck, 2018).

En la Figura 20 se detalla la clasificación desarrollada por Cooke (2000) de los diferentes clados que componen el género, adaptada por McCarthy y Fitzpatrick (2017) incorporando las recientemente descubiertas especies con carácter defoliador.

los últimos años el agente causante de mayores daños se corresponde con especies del género *Phytophthora*. Las pérdidas económicas causadas por *Phytophthora* en la industria australiana se estiman en unos AU \$ 250 millones/año (145 millones de euros, aproximadamente), suponiendo además unas limitaciones severas para la expansión de algunas industrias, especialmente las del sector de fruticultura y plantas ornamentales (Irwin *et al.*, 1995; Drenth *et al.*, 2006).

Dadas las condiciones ambientales adecuadas, las acículas de *Pinus radiata* pueden ser susceptibles a la infección por una amplia gama de especies de *Phytophthora*. Históricamente, existen registros de un patógeno del género *Phytophthora* que ataca a las coníferas del país. Previamente conocido como “tizón fisiológico de la acícula” y en inglés “Physiological Needle Blight” (PNB), y actualmente registrado como *Phytophthora kernoviae*, ha causado daños en las plantaciones desde 1980, y no fue confirmado como causa hasta hace recientemente poco. No se sabe demasiado sobre este patógeno, pero se especula que puede ser nativo de Nueva Zelanda. En la actualidad, *Phytophthora pluvialis*, descubierto en 2008, es el patógeno del género que mayor preocupación causa en el sector forestal de Nueva Zelanda (Dick *et al.*, 2014; Dyck, 2018).

Phytophthora pluvialis se caracteriza por causar un primer síntoma en forma de lesión de color oliva pálido en la acícula, de longitud variable. Frecuentemente también se presenta una marca resinosa oscura distintiva que a menudo se expresa como una banda lateral estrecha dentro de la lesión. Las lesiones se expanden a lo largo de la acícula de forma que ésta adquiere una tonalidad amarilla y posteriormente marrón. Estas lesiones se desarrollan aún más para dar como resultado una rápida senescencia de la acícula y una defoliación prematura (Dick *et al.*, 2014).

Se descubrió que la enfermedad es más común en los árboles de más de cuatro años y más grave en árboles de más de diez años. También se ha constatado la presencia de síntomas en árboles y plántulas más jóvenes pero generalmente solo cuando crecen junto a rodales viejos muy infectados (Dick *et al.*, 2014). El momento y la aparición de los síntomas causado por *P. pluvialis* es diferente de cualquiera de las otras enfermedades foliares de pino radiata conocidas en Nueva Zelanda, como por ejemplo las causada por hongos del género *Dothistroma* (Ganley *et al.*, 2014).

Lamentablemente, los intentos de aislar *P. pluvialis* de otros tejidos vegetales no han tenido éxito. Del mismo modo, los intentos de colonizar artificialmente material vegetal distinto de las acículas tampoco han tenido éxito (Hood *et al.*, 2014; Ganley *et al.*, 2014). Esto sugiere que *P. pluvialis* es un patógeno muy específico y de difícil estudio.

Estudios preliminares del nivel de diversidad en los aislamientos recogidos en los últimos años apuntan que *P. pluvialis* es una introducción relativamente reciente (Reeser *et al.*, 2013; Dick *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que se necesitan algunos años para que las poblaciones de *P. pluvialis* lleguen a niveles de afección notables, es probable que la invasión ocurriera algunos años antes de detectarse los primeros síntomas en 2008. Desde entonces, los daños registrados han ido creciendo (Dick *et al.*, 2014).

Frente a este escenario, el sector forestal neozelandés ha tomado diferentes decisiones, partiendo de la idea central de que la sustitución de pino radiata por otra especie no se plantea como una opción viable. La medida básica de control del patógeno a corto plazo ha sido la fumigación con ácido fosforoso (fosfito) (Shearer y Crane, 2009; Kanaskie *et al.*, 2011; Ganley *et al.*, 2014), mientras que a largo plazo se están utilizando hongos endófitos que neutralicen al patógeno y la creación de líneas genéticas a partir del mejoramiento genético, de manera que los genotipos mejorados sean resistentes al patógeno (Dyck, 2018).

1.3.3 El caso de Chile

En febrero de 2004 surgió una inusual mortalidad en árboles de 6 años de *P. radiata* en una masa de 70 ha de la región de Arauco, en la costa de Chile. El daño se incrementó rápidamente expandiéndose hasta aproximadamente 60.000 ha al final de 2006 (Durán *et al.*, 2008; Ahumada *et al.*, 2013).

La enfermedad fue denominada “Daño Foliar del Pino” (DFP), pero no fue hasta 2007 cuando *Phytophthora pinifolia* fue identificado como el agente causal (Figura 21). Hasta hace recientemente poco, ha sido considerada como el problema sanitario más grave del país que ha afectado a la forestería de pino junto con la plaga *Sirex noctilio* (Durán *et al.*, 2008; Ahumada *et al.*, 2013). Anteriormente, las plantaciones de *Pinus radiata* de Chile han sido afectadas por *Dothistroma septosporum*, *Diplodia pinea* y *Cyclaneusma minus* (Lanfanco, 2000; Ahumada, 2003; Ahumada *et al.*, 2013).

Su origen es incierto, y es probable que el origen sea de las áreas donde el pino radiata es nativo (Durán *et al.*, 2009). La realización de estudios para determinar su origen podría ayudar a identificar las vías de introducción y contribuir a reducir el riesgo de que *P. pinifolia* sea introducido en otras áreas del mundo (Durán *et al.*, 2009; Ahumada *et al.*, 2013).



SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO
DIVISIÓN PROTECCIÓN AGRÍCOLA
SUBDEPTO. VIGILANCIA Y CONTROL OFICIAL FITOSANITARIO
Unidad Vigilancia Forestal

IDENTIFICACION DE NUEVO HONGO EN FOLLAJE DE *Pinus radiata*

El 28 de septiembre del año en curso el Servicio Agrícola y Ganadero recibió la notificación de la identificación de una nueva especie de hongo asociada al follaje de árboles de *Pinus radiata*. Esta determinación fue realizada por el Dr. Mike Wingfield, Director del Instituto de Biotecnología Forestal y Agrícola (FABI) de Sudáfrica, quien ha propuesto denominarla como *Phytophthora pinifolia* nom. prov.

La nueva especie a ser descrita por el Dr. Wingfield fue obtenida como producto de las investigaciones que realiza el equipo técnico de la empresa Bioforest S. A., tendientes a determinar la o las causas del Daño Foliar del Pino (DFP), fenómeno que esta afectando plantaciones de *P. radiata* localizadas principalmente en la Provincia de Arauco, Región del Bío Bío, y en algunos sectores de las Regiones de la Araucanía y de Los Ríos, y que se caracteriza por provocar una clorosis no habitual en los árboles y la posterior pérdida de su follaje, debilitándolos y predisponiéndolos al ataque de plagas oportunistas o secundarias. Cabe destacar que el SAG, en conjunto con la CONAF, el INFOR y empresas forestales, ha elaborado e implementado un Programa Nacional de Vigilancia Fitosanitaria de este fenómeno, cuyo objetivo es determinar su distribución y comportamiento en las plantaciones de pino del país, conocer su o sus causas, evaluar su impacto sobre la productividad, producción y comercio, y establecer las medidas para mitigar sus efectos.

No obstante que *P. pinifolia* nom.- prov. ha sido identificada a partir de aislamientos obtenidos de acículas de árboles de *P. radiata*, que presentaban los síntomas característicos del DFP, a la fecha no existen las pruebas científicas de rigor que permitan establecer que este hongo sería el causante del este fenómeno. Como es habitual en estos casos, el Servicio Agrícola y Ganadero ha solicitado a la empresa Bioforest S. A. todos los antecedentes respecto de los procedimientos técnicos de identificación del nuevo hongo, con el fin de proceder a la ratificación del diagnóstico en sus laboratorios.

Se han identificado mundialmente más de 40 especies del género *Phytophthora*, todas como agentes causales de importantes enfermedades de los vegetales, asociadas mayoritariamente a las raíces, la corona y el cuello, en pocas ocasiones a órganos aéreos de las plantas. En general, son poco conocidos los mecanismos de dispersión de este último tipo de enfermedades, estableciéndose que una de sus formas de introducción a nuevas áreas pueden ser plantas infectadas. Por tal razón, el SAG propiciará la ejecución a la mayor brevedad de estudios epidemiológicos de *P. pinifolia* nom. prov., en el marco del Programa Nacional de Vigilancia Fitosanitaria, tendientes a determinar la biología, patogenicidad, saprogenesis, mecanismos de dispersión, entre otros aspectos.

PGE

Figura 21. Declaración del Gobierno chileno sobre la identificación de un nuevo hongo en follaje de *Pinus radiata*.

Fuente: Gobierno de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero (2007).

Phytophthora pinifolia se caracteriza por provocar una rápida mortandad de las acículas, seguido de defoliaciones generalizadas de los árboles. Las acículas infectadas presentan bandas resinosas. Cuando la infección alcanza la base de la acícula, la resina es exudada desde el peciolo causando la muerte de las células cambiales, rodeando los fascículos y generando pequeños chancros en el punto de contacto entre la acícula y el tallo (Ahumada *et al.*, 2013).

El patógeno es propagado por esporangios. Los esporangios son producidos en las acículas vivas y en las acículas muertas, ya sea en el propio árbol o ya en el suelo. La mayoría de los esporangios son producidos durante los meses de invierno y la humedad de las acículas y la temperatura son factores clave para la infección y propagación de síntomas del DFP (Durán *et al.*, 2009).

Los primeros test de patogenicidad llevados a cabo con *P. pinifolia* demuestran claramente es capaz de infectar y causar enfermedad en los brotes en un periodo de menos de 30 días (Durán *et al.*, 2008; Ahumada *et. al.*, 2013).

La zona de Chile con plantaciones de *P. radiata* tiene un clima de tendencia mediterránea, y los síntomas se observan generalmente desde mayo hasta noviembre, durante la estación de lluvias. Otras especies de pinos y coníferas que se encuentran en áreas afectadas por DFP no se ven infectadas por *P. pinifolia*, por lo que todo apunta a que el pino radiata es un hospedador específico (Durán *et al.*, 2009).

1.3.4 El caso del País Vasco

Hasta hace pocos años, las enfermedades foliares solo habían tenido un impacto menor en los árboles forestales nativos y exóticos del País Vasco. Sin embargo, entre 2018 y 2019 ocurrió el mayor brote epidémico registrado hasta la fecha de defoliación severa del pino radiata. Los altos niveles de defoliación, y el inusual ratio de mortandad han causado una alarma económica, ecológica y social que pone en cuestión la base del actual modelo de gestión de los recursos forestales productivos de la región, y que demanda una solución (de Urbina *et al.*, 2015; Mesanza *et al.*, 2019).

Los principales patógenos involucrados en dicho brote histórico parecen ser los hongos *Lecanosticta acicola* y *Dothistroma septosporum*. Sin embargo, se desconoce la causa de tan repentino y drástico incremento de la virulencia. Se sugiere la posible implicación de patógenos del género *Phytophthora* ya que, como se ha explicado anteriormente, en otras partes del mundo donde abundan las plantaciones de pino radiata (ej., Chile y Nueva Zelanda), se constató su implicación en los brotes epidémicos ocurridos en los últimos años.

Los primeros reportes de la presencia de dichos patógenos en España fueron en 1933 cuando se detectó *Dothistroma* spp. y en 1942 cuando se detectó *Lecanosticta* spp. (Martínez 1933; 1942; Mesanza *et al.*, 2019). En 1942 se publica por parte del Ministerio la obra “Las Micosis del Pinus insignis en Gipuzkoa”, obra en la que se nombra la presencia de *Septoria acicola* (sinonimia de *Lecanosticta acicola*) en los montes Jaizkibel, Irisasi y Achu. Asimismo, en el libro de “Patología Forestal” de 1975 de Juan Torres se cita la presencia de *Scirrhia pini* (= *Dothistroma septosporum*), causante de algunos daños en Vizcaya (Hazi, 2019a).

Desde entonces, la superficie ocupada por la enfermedad ha ido creciendo muy lentamente, pasando por los primeros reportes donde comenzó a causar daños secundarios pero sin suponer un problema relevante para la industria del pino radiata del País Vasco, hasta que finalmente llegara la actual crisis que ha puesto en amenaza gran parte de las plantaciones de pino radiata de territorio (Aspiazu, 2012; Hazi, 2019a). Según el Cuarto Inventario Forestal Nacional para el País Vasco (MAPAMA,

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

2013), aproximadamente más del 40% de los montes vascos con pino radiata están dañados, estimándose que unas 40.000 ha de plantaciones están gravemente afectadas.

Debido a esto, el pino radiata se encuentra en claro retroceso, lo que está motivando a los dueños a proceder con cortas urgentes y no previstas de la madera y en los peores casos en el abandono del monte (Hazi, 2019a). En Guipúzcoa, la Diputación proporciona ayudas económicas para la realización de claras o cortas a hecho de pinares dañados. Estas ayudas se prestan a pinares afectados de menos de 30 años, y para ello los propietarios requieren de un informe sanitario que certifique que la enfermedad afecta a más del 20% de la masa (Urkola, 2017).

Como consecuencia de las intensas cortas que se están realizando, el pino radiata está perdiendo superficie a un ritmo desenfrenado (Figuras 22 y 23). Además, la crisis sanitaria está motivando a los propietarios a utilizar otras especies en la reforestación, especialmente el eucalipto, por lo que muchos paisajes que hasta ahora conocíamos están cambiando a un ritmo alarmante (Figura 24).

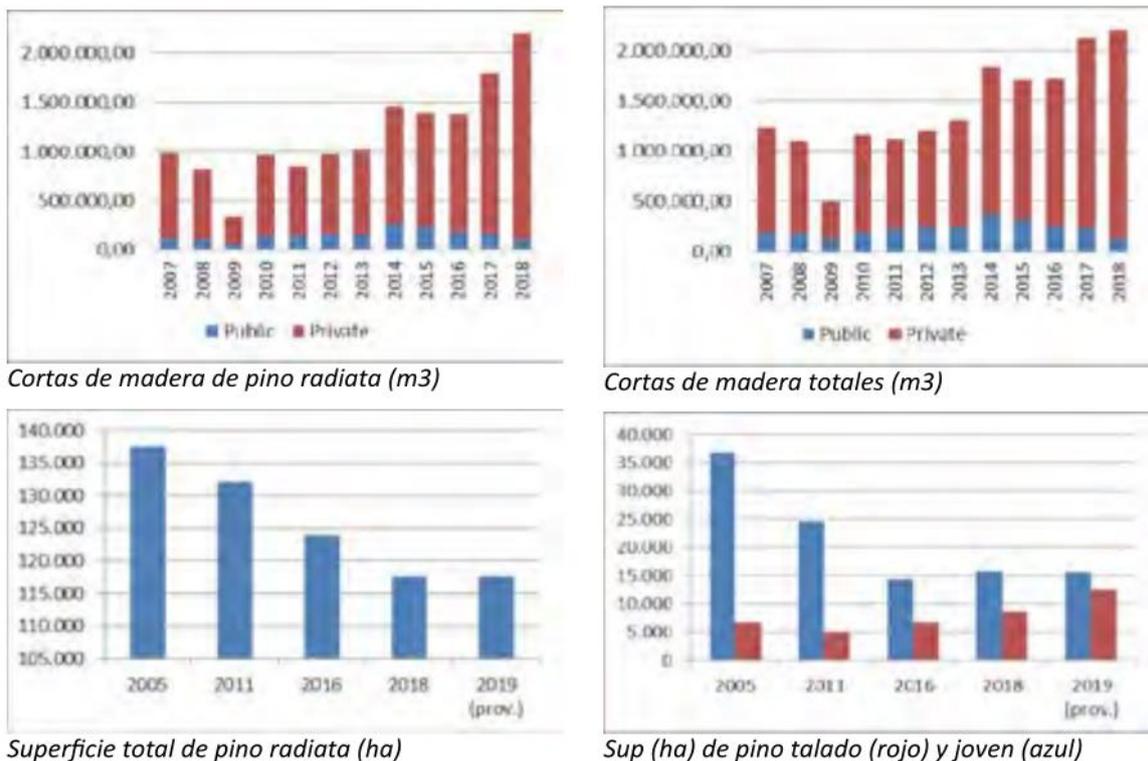


Figura 22. Evolución de las cortas de madera y de la superficie de pino existente en los últimos años en el País Vasco. Fuente: Hazi (2019a).

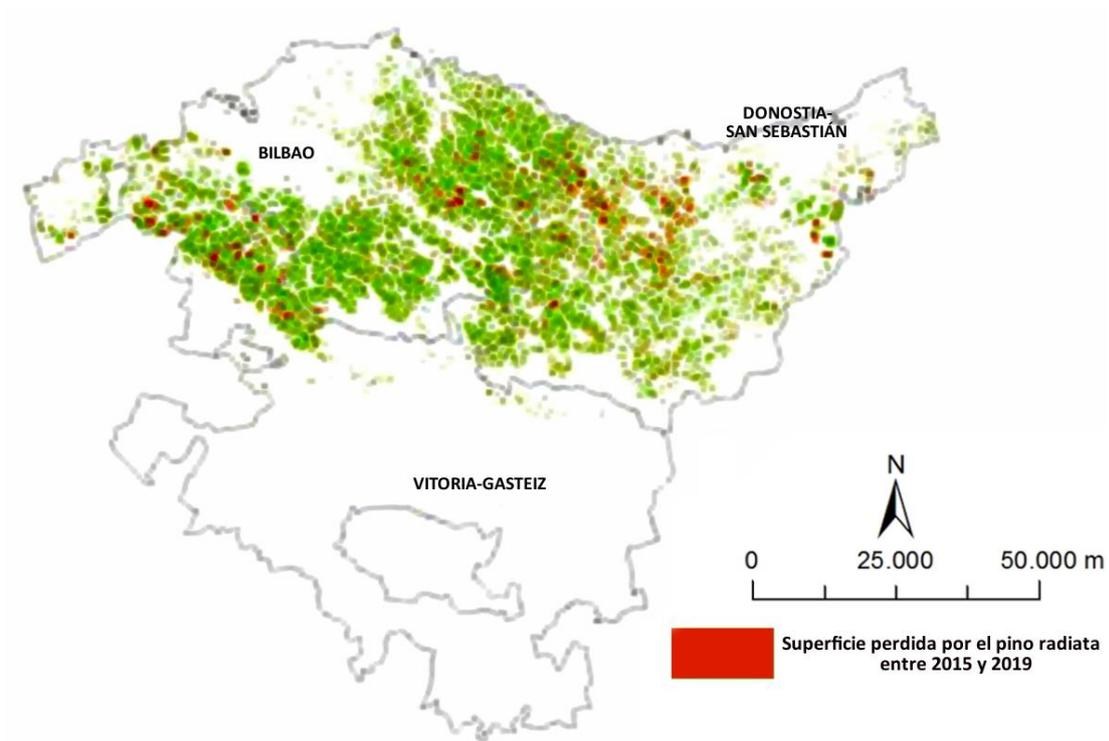


Figura 23. Pérdida de superficie ocupada por el pino radiata entre 2015 y 2019.
Fuente: Adaptado de Hazi (2019a).



Figura 24. Representación gráfica de la decadencia del pino radiata frente al avance del eucalipto.

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

En agosto de 2018 se estimó a partir de imágenes Sentinel 2 que la superficie de pinares de radiata dañados superaba las 40.000 hectáreas (Tabla 1 y Figura 25). Con tecnología LiDAR se calculó que aproximadamente 8 millones de m³ estarían afectados. Esto supone que cerca de la mitad de la superficie que ocupa el pino radiata en Euskadi está afectado por la enfermedad. En abril de 2019 la superficie defoliada de árboles adultos de pino ya era de más de 53 mil hectáreas (Tabla 1) (Hazi, 2019a).

Tabla 1. Datos de superficie total de pino adulto defoliado para determinadas fechas.
Fuente: Hazi (2019a).

TERRITORIO HISTÓRICO	Pino adulto defoliado, agosto de 2018 (ha)	Pino adulto defoliado, abril-mayo de 2019 (ha)	Variación (ha)
ÁLAVA	998	3432	2434
VIZCAYA	21.157	26.640	5483
GUIPÚZCOA	22.093	23.155	1062
TOTAL CAPV	44.248	53.227	8.979

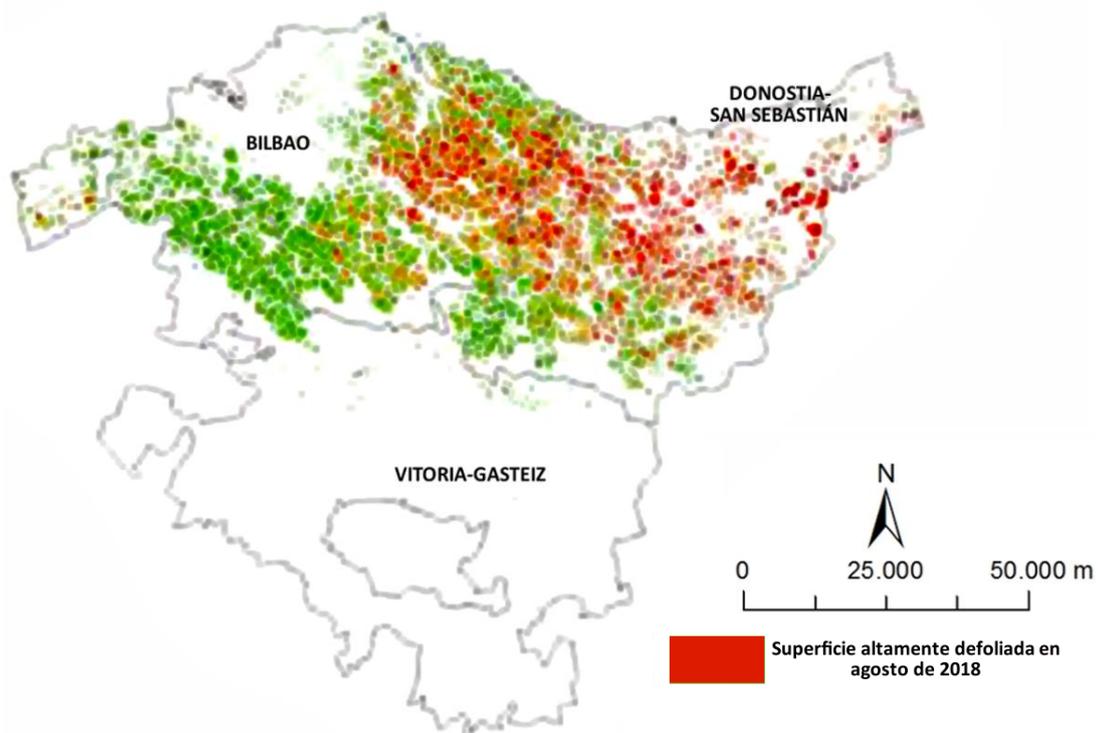


Figura 25. Superficie de pino radiata afectada por un alto nivel de defoliación en agosto de 2018.
Fuente: Adaptado de Hazi (2019a).

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

En las masas del País Vasco, la severidad oscila entre el 5% y 95% (de Urbina *et al.*, 2017), siendo las que se encuentran cerca de la costa, influenciadas por una mayor humedad y una altitud menor, las que presentan un mayor riesgo de ataque (Figura 26) y unos mayores porcentajes de defoliación (Figura 27 y 28).

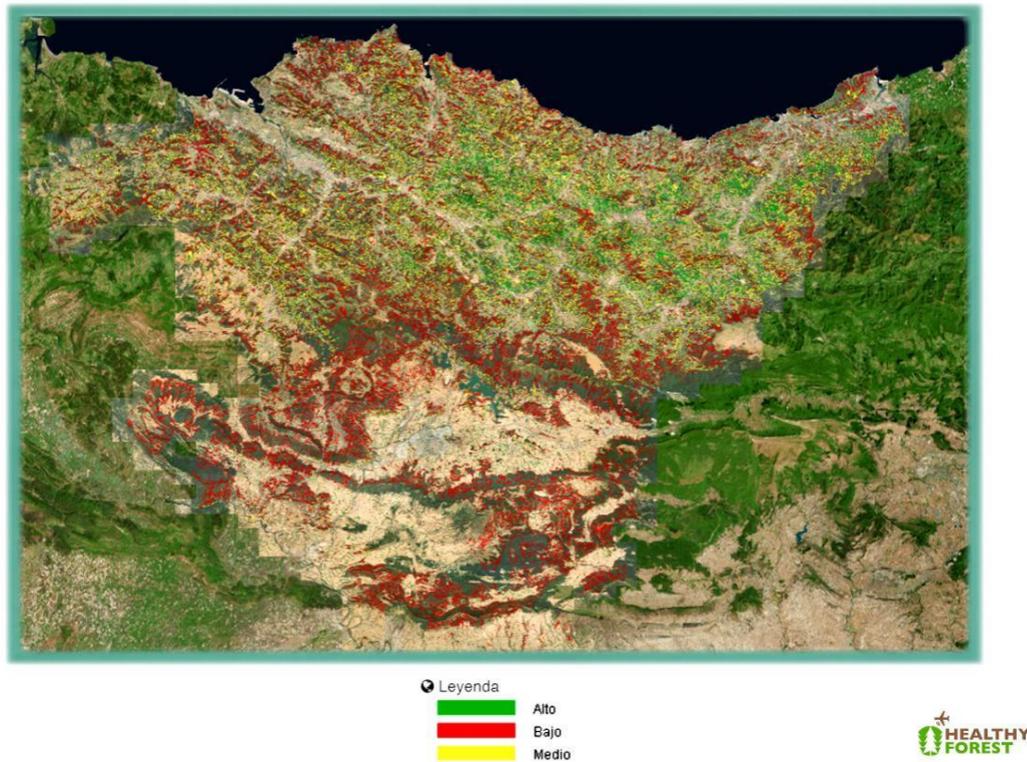


Figura 26. Nivel de riesgo de las masas de pino radiata ante los patógenos.
Fuente: Elaboración propia a partir del visor cartográfico de Hazi (2020).



Figura 27. Plantación de pino radiata totalmente defoliada.



Figura 28. Montes totalmente afectados por los patógenos.

Por otra parte, cabría pensar que una buena gestión de las masas y una aplicación de la silvicultura ayudaría a paliar los problemas. Sin embargo, los tratamientos selvícolas parecen ayudar a reducir los impactos causados por las enfermedades pero no de forma demasiado significativa (Figura 29) (de Urbina *et al.*, 2017).



Figura 29. Plantaciones bien gestionadas pero con gran afección de patógenos foliares.

Por otro lado, se tiene constancia de la presencia tanto de *L. acicola*, *D. septosporum* como *D. pini* en el País Vasco, en todas sus formas sexuales, MAT 1 y MAT 2 (Figura 30), incluso en algunos casos en la misma plantación. La presencia de ambas formas sexuales en las tres especies en las mismas plantaciones puede indicar el posible cruce sexual entre ellas lo que podría conllevar el aumento en la dispersión y severidad de la enfermedad y en una mayor adaptabilidad a condiciones de estrés (de Urbina *et al.*, 2017).



Figura 30. Productos de amplificación por PCR con cebadores específicos para cada patógeno.
Fuente: Iturritxa y Mesanza (2017).

Si esto fuese así, el aumento de la variabilidad genética de las especies complicaría aún más su detección y control. Se ha encontrado que la introducción de la segunda forma sexual de un patógeno,

como consecuencia del intercambio genético, puede agravar la severidad de la enfermedad y puede incrementar la resistencia de los patógenos ante controles químicos o biológico (de Urbina *et al.*, 2017).

La experiencia previa existente en Chile y Nueva Zelanda, así como las hipótesis planteadas por diversos técnicos chilenos y neozelandeses al visitar el País Vasco y examinar la problemática, apuntaban a la posible implicación del género *Phytophthora* en las defoliaciones ocurridas recientemente. Por ello, y dado que *Pinus radiata* puede ser susceptible a una amplia gama de especies del género *Phytophthora* (Durán *et al.*, 2008; Ahumada *et al.*, 2013; Dick *et al.*, 2014), desde Neiker-Tecnalia se emprendió un estudio orientado a confirmar la presencia de especies defoliadores de dicho género en las masas de pino radiata de la Comunidad Autónoma.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es la identificación temprana de los patógenos foliares que afectan al pino radiata en el País Vasco mediante el desarrollo e implementación de una metodología que permita hacerlo de manera rápida, eficaz y eficiente. Este objetivo global se ha dividido en los siguientes objetivos específicos:

- Detectar o descartar la presencia de *Phytophthora* spp., y si es el caso, estudiar si está asociada con las defoliaciones.
- Determinar la abundancia relativa de *Dothistroma* spp. y *Lecanosticta acicola* en las masas afectadas.
- Analizar la severidad del ataque en las diferentes plantaciones estudiadas y su relación con los patógenos existentes y la edad de la masa.

Asimismo, se plantea que el trabajo sirva para adaptar los protocolos existentes de análisis de patógenos foliares a las particularidades de la crisis fitosanitaria del pino radiata en el País Vasco y para perfeccionar las técnicas moleculares de laboratorio para la identificación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en 2 fases principales. En la primera fase se filtraron las parcelas a analizar con técnicas moleculares mediante la instalación de plantas trampa y la aplicación de un ensayo inmunológico de detección preliminar de patógenos del género *Phytophthora*. En la segunda fase del trabajo se recolectaron muestras de acículas en las parcelas con resultado positivo en el ensayo preliminar, y posteriormente se aplicaron técnicas moleculares con el objetivo de identificar y dar un diagnóstico definitivo de los patógenos foliares presentes.

A continuación, se presenta la estructura del trabajo realizado (Figura 31) y el tiempo ocupado por cada actividad (Figura 32). Cabe reseñar que aunque el presente estudio diera inicio en julio de 2019, para ese entonces ya existía una base de datos iniciada en febrero de ese mismo año, elaborada por científicos de Neiker-Tecnalia, de modo que las denominadas “trampas fijas” y “estaciones de control” (ver definiciones más abajo) ya estaban definidas como tal.

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

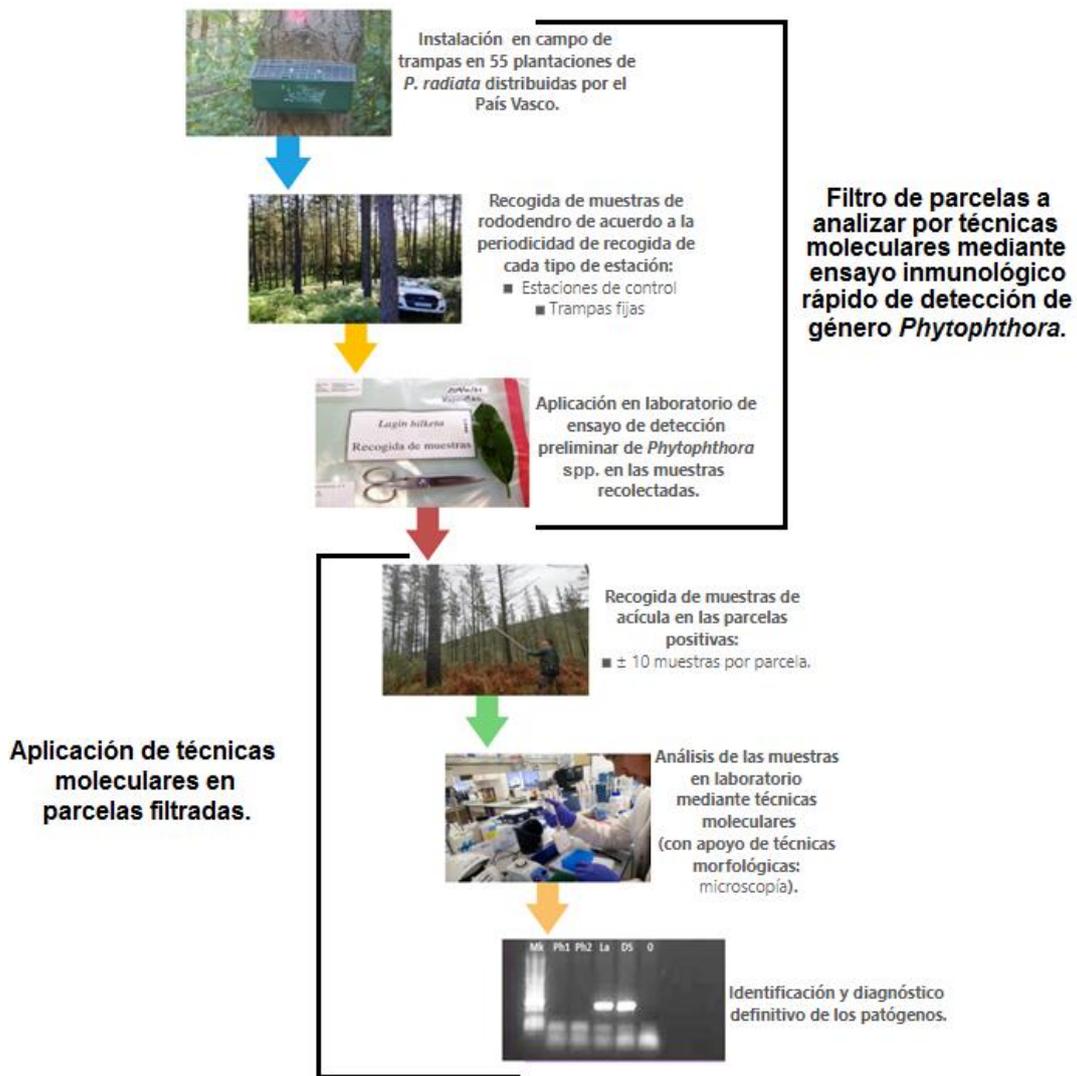


Figura 31. Estructura del trabajo realizado.



Figura 32. Calendario de las actividades realizadas. Las llevadas a cabo en el presente estudio son las posteriores a julio de 2019.

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

La zona de estudio se corresponde con la Comunidad Autónoma del País Vasco (Figura 33). En ella se seleccionaron una serie de parcelas representativas de plantaciones de pino radiata.

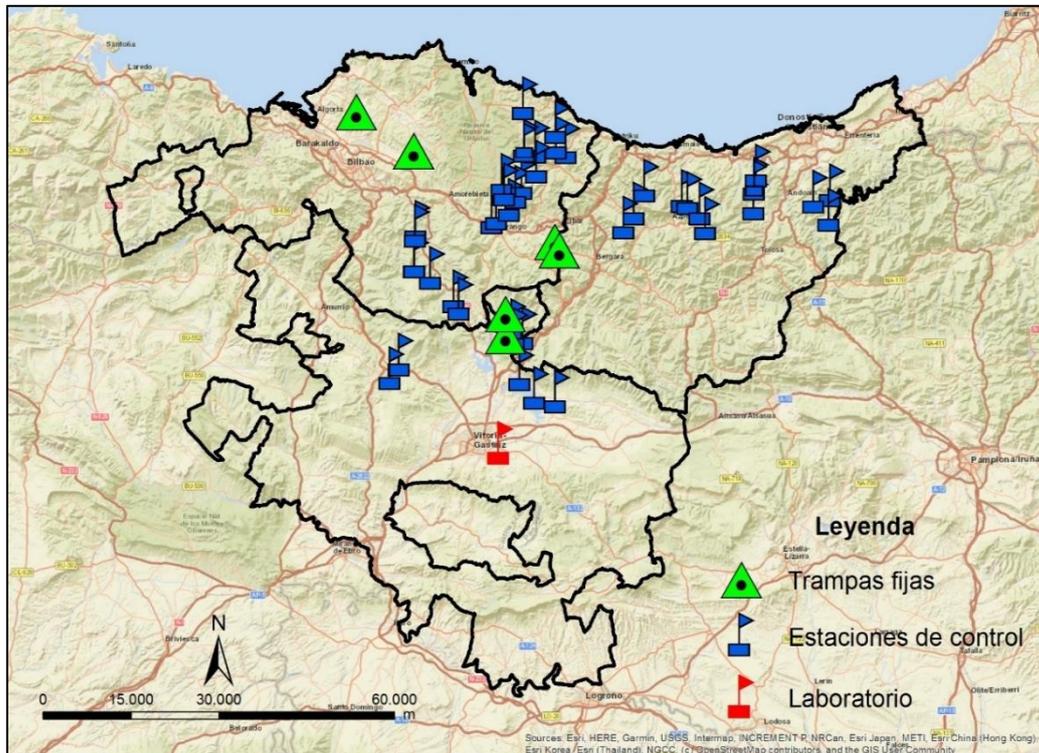


Figura 33. Localización de las estaciones de control, trampas fijas y laboratorio de Sanidad Vegetal dentro de la zona de estudio. Algunas trampas fijas no se aprecian debido a su proximidad espacial.

En cada parcela estudiada se instaló una planta trampa de rododendro, pasando a denominarse a las parcelas “estaciones”. Estas estaciones se dividieron en estaciones de control y trampas fijas de acuerdo a la periodicidad de recogida de cada una. Las estaciones de control están representadas en la Figura 33 con el símbolo . Se colocaron un total de 47 y cada una de ellas ha sido visitada y monitorizada periódicamente. Por otro lado, se colocaron 8 trampas fijas de planta de rododendro representadas en la Figura 33 con el símbolo . Dichas trampas se visitaron con mayor periodicidad que las anteriores.

Finalmente, con el símbolo  está representado el laboratorio de Sanidad Vegetal perteneciente a Neiker-Tecnalia, organismo dedicado a la investigación y desarrollo tecnológico en materia de Medio Ambiente, el cual es colaborador y financiador de este estudio, y donde se ha realizado el análisis y procesamiento de las muestras recolectadas en campo.

A continuación, se detalla la metodología empleada.

3.1 Instalación de trampas en campo

Para llevar a cabo la primera fase del trabajo, se establecieron 55 estaciones (47 de estaciones de control y 8 trampas fijas) repartidas en diversas masas de pino radiata en el País Vasco (Figura 33). Las denominadas “trampas fijas” son estaciones que, en base a resultados previos obtenidos por investigadores de Neiker-Tecnalia, presentaban gran afección y se estimó deberían ser analizadas con mayor detalle.

De este conjunto de 55 estaciones, 31 (56,36%) pertenecen a la provincia de Vizcaya, 15 (27,28%) a la de Guipúzcoa y 9 (16,36%) a la de Álava. Es decir, las estaciones se encuentran distribuidas en los tres territorios históricos del País Vasco y en zonas con distinta susceptibilidad.

En todas las estaciones se colocó una planta trampa de esporas próxima a ejemplares de pino radiata. Con estas plantas trampa se capturaron las esporas de los posibles patógenos que podían encontrarse en el campo, entre ellos especies del género *Phytophthora*. La periodicidad de recogida de las muestras de las trampas de las estaciones de control fue de entre dos y tres meses, mientras que la de las trampas fijas fue de dos semanas, aproximadamente. De esta manera se recogieron las muestras de las trampas de cada tipo de estación (de control y trampas fijas) al menos una vez por cada temporada del año (primavera, verano, otoño e invierno). *Phytophthora* es un género compuesto por especies con un comportamiento variable a lo largo del año (Erwin y Ribeiro, 1996), por lo que de esta manera se garantiza un análisis más robusto de los datos. Asimismo, con la repetición de la prueba se minimiza la posibilidad de falsos positivos.

La trampa estaba compuesta por un recipiente que contiene un medio acuoso, y en él se encuentra suspendidas varias hojas de rododendro (*Rhododendron degronianum*) que actúan como captoras de las esporas de hongos que puedan desplazarse por el ambiente. El medio acuoso evita la desecación de las hojas, ya que las trampas permanecen varias semanas en el campo. Las hojas de rododendro deben estar sanas y no deben presentar lesiones, y son extraídas de la planta momentos previos a su depósito en el recipiente. La razón de la utilización de esta planta es debido a que el kit que se utilizó en el laboratorio, y que se detalla más adelante, obtiene muy buenos resultados con hojas de especies de este género.

Rhododendron degronianum es una especie que no presenta indumento, característica necesaria para un correcto análisis, con la que se pueden detectar muchas especies de *Phytophthora*. Además, es de fácil adquisición y produce la toxina grayanotoxina por lo que se reduce el riesgo de que los polinizadores, o cualquier tipo de organismo fitófago no específico, puedan interferir en el proceso de captura de las esporas (Erwin y Ribero, 1996). De igual manera, existía una malla metálica que cubría

el recipiente y funcionaba como tapa impidiendo el acceso a cualquier cuerpo extraño de cierto tamaño.

Las trampas fueron colocadas generalmente en el suelo (Figura 34), pero en las zonas más conflictivas donde abunda la fauna silvestre o el ganado que podía voltearlas se fijaron sobre la corteza de un árbol (Figura 35).



Figura 34. Trampa de esporas con hoja de rododendro dispuesta en el suelo.



Figura 35. Trampa de esporas con hoja de rododendro fijada en un árbol.

Tras el tiempo estipulado para cada trampa, las muestras de hojas fueron recolectadas, guardadas en bolsas, etiquetadas y numeradas, indicando también la fecha de recogida (Figura 36). Asimismo, las hojas de las trampas fueron sustituidas por otras 2-3 hojas y se realizó un aporte de agua. Seguidamente las muestras se llevaban al laboratorio para su análisis.



Figura 36. Muestra etiquetada y numerada.

Por otro lado, en las estaciones definidas como trampas fijas se instaló, además, otro tipo de trampas de esporas, compuestas por un soporte que contiene varias placas portaobjetos de laboratorio a las que se les aplicó vaselina con el objetivo de que capturasen las esporas que hicieran contacto con ellas (Figura 37). Estas placas portaobjetos fueron recogidas con menor periodicidad que las plantas trampa (cada tres meses) ya que su importancia es secundaria y se limita a un análisis visual de búsqueda de esporas con microscopio, mientras que el uso de material vegetal para las capturas permite la realización de extracciones de ADN y la aplicación de métodos moleculares.



Figura 37. Trampa de esporas con placa portaobjeto junto a planta trampa de rododendro.

3.2 Análisis inmunológico preliminar para la detección de género *Phytophthora*

Las muestras de rododendro fueron procesadas en el laboratorio de Sanidad Vegetal de Neiker-Tecnalia, donde se disponía de todo el material necesario para llevar a cabo el análisis de las muestras (Figura 38). Las muestras fueron conservadas en una cámara frigorífica a 4°C (Figura 39) hasta que fueron analizadas.



Figura 38. Instalaciones del laboratorio de Sanidad Vegetal.



Figura 39. Cámara refrigeradora para el almacenamiento de muestras.

A todas las muestras recolectadas se le aplicó un ensayo inmunológico preliminar de detección de género *Phytophthora*, que no diferencia especies. Para ello, se siguió el protocolo diseñado por la casa comercial Agdia, Inc. para el kit *ImmunoStrip® for Phytophthora (Phyt)* de la misma casa. Esta metodología permitió una detección preliminar del género *Phytophthora* en las muestras actuando como un filtro sin tener que recurrir a herramientas más complejas como las técnicas moleculares con

una gran cantidad de muestras. Los resultados se obtuvieron en minutos por lo que resultó muy práctico y efectivo, si bien los resultados no pueden tomarse como un diagnóstico definitivo.

El kit está basado en un reactivo de captura policlonal y un reactivo de detección monoclonal, y está compuesto por tiras ImmunoStrips y bolsas de extracción de muestra SEB1. El ensayo consistió en preparar las bolsas de extracción SEB1 en las que se introdujeron las muestras (Figura 40), realizando un corte de apertura con unas tijeras en la parte superior de la bolsa, previa redirección del líquido hacia la parte inferior de forma manual. Cada bolsa contiene 3 ml de tampón de extracción (buffer).



Figura 40. Bolsa de extracción SEB1.

Las muestras de plantas trampa contienen varias hojas de rododendro, por lo que se seleccionó la zona que más lesiones reportaba y se separó del resto de la hoja mediante un corte empleando las tijeras. En caso de que la hoja no presentara ninguna lesión apreciable, se recortó la zona próxima al peciolo. La porción de hoja fue introducida en el fondo de la bolsa (una porción de hoja por bolsa), entre dos mallas que se encuentran en su interior. A continuación, se procedió a machacar la hoja dentro del sobre con un homogenizador de rodamientos hasta que la solución que contiene la bolsa se tiñó de color verde. Se introdujo la tira de ImmunoStrip en la parte superior del sobre, por la zona lateral derecha, donde no hay red. Se extremó precaución para que el líquido no sobrepasara la zona azul de la tira. La bolsa fue colocada sobre un portabolsas de forma que ésta permaneciera en posición vertical para así evitar que el líquido se derramara.

La prueba ImmunoStrip permaneció en el extracto de muestra durante 30 minutos. Los resultados positivos comenzaron a ser visibles a partir de los primeros 5 minutos. Una vez concluido

un tiempo prudencial, se obtuvo uno de los tres resultados posibles: positivo, negativo o inválido (Figura 41).

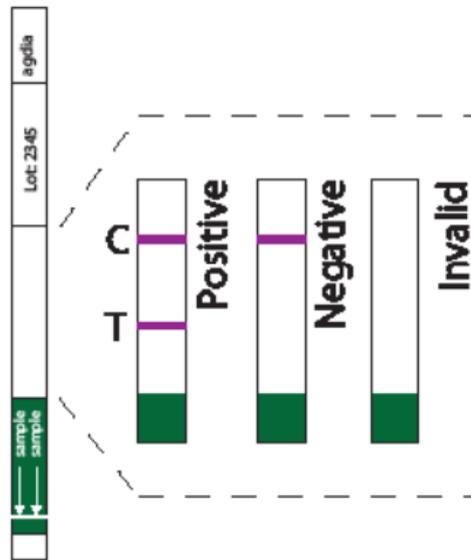


Figura 41. Los tres posibles resultados del ensayo inmunológico de detección de *Phytophthora* spp. y forma en la que se manifiestan.
Fuente: Agdia, Inc. (2017).

Una vez reflejado el resultado, la tira ImmunoStrip fue retirada de la bolsa para así poder realizar una interpretación más clara. Si solo la línea de control, representada con la letra C en la Figura 41, es visible indica que el resultado es negativo. Si la línea de prueba, representado con la letra T en la Figura 41, también está presente, ya sea en una intensidad de rosa, rojo o púrpura, indica un resultado positivo (Figura 42). Si se da el caso de que no hay líneas presentes, la prueba es inválida y se debe de repetir.



Figura 42. Ejemplos de positivos en género *Phytophthora* obtenidos mediante este ensayo.

Con los resultados que se fueron obteniendo con la aplicación de este ensayo a todas las muestras recolectadas se elaboró una base de datos. Las estaciones que no tuvieron detecciones positivas o que solamente tuvieron una fueron descartadas. Las estaciones que obtuvieron más de una detección positiva fueron visitadas, se recogieron muestras de acículas de las ramas de los árboles, y se aplicaron técnicas moleculares para confirmar o descartar la presencia de especies defoladoras de *Phytophthora*, *Dothistroma* spp. y *Lecanosticta acicola*. Este proceso se detalla a continuación.

3.3 Recogida en campo de muestras de acículas en estaciones con resultado positivo preliminar en género *Phytophthora*

Todas las estaciones en las que hubo más de una detección positiva fueron visitadas con el objetivo de recolectar muestras de acículas para posteriormente realizar un análisis molecular de las mismas, y de esta forma, analizar la presencia de especies defoladoras de *Phytophthora*. Asimismo, estas muestras se utilizaron para el análisis molecular de *Dothistroma* spp. y *Lecanosticta acicola*.

La recolección de las acículas de los árboles se realizó mediante una pértiga telescópica con serrucho (Figura 43). Para ello, se cortaron ramas de ± 10 árboles diferentes por parcela, de tal forma que por cada árbol se llenó una bolsa o sobre de acículas (Figura 44). En algunos casos, debido a la alta defoliación presentada en los ejemplares, no fue posible la recolección de acículas de las ramas por lo que se recogieron acículas del suelo bajo cada árbol elegido. Asimismo, se georreferenció cada árbol del que se extrajeron las acículas.



Figura 43. a) Proceso de corta de una rama para extraer la muestra; b) Ejemplo de las dificultades presentadas para obtener ramas con acículas debido a la acusada defoliación.



Figura 44. a) Extracción de acículas de una rama; b) Muestra de acículas introducida en una bolsa, etiquetada y numerada.

Para cada muestra recolectada se rellenó una ficha en la que se recogieron los siguientes datos: número de muestra, fecha, localidad, edad del árbol, porcentaje de defoliación, otros posibles daños y coordenadas.

3.4 Análisis de las muestras en laboratorio mediante técnicas moleculares

Con las muestras recolectadas en campo de las diferentes estaciones positivas se procedió a la aplicación de métodos moleculares con el objetivo de detectar o descartar la presencia de los patógenos *Phytophthora* spp., *Dothistroma* spp. y *Lecanosticta acicola*. Los métodos moleculares son un conjunto de aplicaciones tecnológicas que permiten la determinación, aislamiento y manipulación de productos o procesos moleculares, con especial relevancia del ADN, ARN, y las proteínas (FAO, 2011). Por consiguiente, son varias las técnicas moleculares utilizadas en el presente estudio, de forma que cada una de ellas es detallada a continuación.

3.4.1 Extracción de ADN

En primer lugar, se realizaron extracciones de ADN de las muestras de acícula recolectadas. De cada muestra se realizó una extracción. Para ello, se siguió el protocolo primero desarrollado por Analytikjena for DNA Extraction Kit. Este protocolo está compuesto por numerosos pasos y se debe extremar especial precaución en cada uno de ellos puesto que cualquier equívoco supone la anulación del ensayo. El kit está compuesto por los siguientes elementos: Elution Buffer (B4), Washing Solution MS (B3), Binding Solution - SBS (B2), Lysis Solution SLS (B1), tubos Eppendorf de diferente diseño y tamaño y Proteinasa K.

El proceso seguido se presenta a continuación. Primeramente, las muestras de acículas, debidamente conservadas en la cámara frigorífica, fueron troceadas en pequeñas porciones (Figura 45). Previamente, las acículas fueron examinadas minuciosamente con el objetivo de encontrar

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

lesiones y así incluirlas en la porción de muestra a analizar. Por cada muestra se realizó una preparación. Estos trozos de acículas fueron introducidos en un tubo Eppendorf, sin rebasar $\frac{1}{4}$ de su capacidad, junto a cuatro bolas de acero.

En segundo lugar, se añadió a cada tubo mediante una pipeta apta para cada capacidad, 600 μ l de la solución B1 y 20 μ l de Proteinasa K.



Figura 45. Porciones de acícula troceadas listas para ser introducidas en su respectivo tubo Eppendorf.

A continuación, se realizó la ruptura de los tejidos vegetales de las muestras mediante la máquina disruptora durante 5 minutos a 30 hercios de frecuencia (Figura 46).



Figura 46. Proceso de ruptura de los tejidos vegetales mediante la máquina disruptora.

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

Con esto se consiguió homogenizar el material, logrando que las proteínas celulares y los carbohidratos de alto peso molecular también fuesen separados. Una vez finalizado el proceso de ruptura, se procedió a colocar los tubos en un corcho y a introducirlos en un baño térmico de forma que permanecieron en suspensión en agua a 65 °C durante 30 minutos (Figura 47). Cada 10 minutos las muestras fueron sometidas a un agitado en el agitador Vortex y se volvieron a introducir en el baño. Se realizaron tres agitados.



Figura 47. Baño térmico con las muestras en corcho.

Tras esto, se introdujeron los tubos en la centrifugadora a 14.000 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos (Figura 48).



Figura 48. Proceso de centrifugación de las muestras en una centrifugadora.

Una vez finalizado el proceso de centrifugación, se procedió a extraer de la forma más limpia posible el líquido contenido en el tubo, obviando los cuerpos sólidos. Se utilizaron unos nuevos tubos los cuales no tienen tapa y que llevan en su interior otro tubo de color violeta donde posteriormente fue depositado el líquido. Los anteriores tubos se desecharon. Estos tubos violetas, al igual que los verdes posteriormente utilizados, funcionan como filtro y permiten la depuración y limpieza del líquido (Figura 49).



Figura 49. Tubos de filtro utilizados en el proceso.

Estos nuevos tubos fueron sometidos a un centrifugado durante 1 minuto a 12000 rpm. De esta manera, el contenido que se encontraba dentro del tubo violeta pasó al tubo inferior por lo que ya pudo ser desechado el tubo violeta. A continuación, se añadieron 200 μ l del B2, que fue mezclado con la pipeta.

Seguidamente, se extrajo el líquido del tubo y fue introducido sobre un nuevo tubo verde. Se desechó el anterior tubo y se utilizó uno nuevo como base. Después se sometió a un centrifugado durante 2 minutos a 12.000 rpm. De esta forma se consiguió que la suciedad y las impurezas pasaran al tubo inferior que posteriormente fue desechado, quedando en la parte superior el contenido de ADN limpio.

Ulteriormente se añadieron 650 μ l del B3 y se volvió a realizar un centrifugado de limpieza durante 1 minuto a 12.000 rpm eliminando así el material que no era de interés. Se descartó el tubo inferior y se volvió a utilizar otro para realizar un nuevo centrifugado con las mismas características habiendo añadido otros 650 μ l de B3 previamente.

De nuevo, se descartó el tubo y se realizó otro centrifugado de 2 minutos a 14.000 rpm. Cuando esto terminó se introdujo el tubo verde sobre un tubo con pico y tapa y se le añadieron 50 μ l de B4. Se

esperó un 1 minuto para que el líquido reposara. Esto permitió que al realizar un nuevo centrifugado el líquido pasará al tubo inferior con el ADN de interés para analizar. Finalmente, se realizó un último centrifugado a 8000 rpm y 1 minuto de duración.

De esta forma, la extracción de ADN quedó lista para su uso en las siguientes técnicas de análisis. En total, se obtuvieron 87 muestras de extracción de ADN (Figura 50).



Figura 50. Vista de las 87 muestras de extracción de ADN finalmente obtenidas.

3.4.2 Análisis de la pureza del ADN

Una vez obtenida la extracción de ADN se procedió a realizar un análisis espectrofotométrico para medir la variación de absorbancia de cada muestra y la pureza del ADN. Para ello se empleó un espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral. El modelo empleado ha sido el NanoDrop2000, de la casa comercial ThermoScientific™ (Figura 51). El aparato realizó una lectura a partir de una gota de 2 μ l de muestra, la cual fue depositada con una pipeta sobre el lector óptico. El monitor reflejó varios resultados a interpretar.

El procedimiento seguido es el siguiente:

Se realizó una medición para cada muestra. Para ello, en primer lugar, se limpió y secó el lector óptico del aparato mediante un paño de laboratorio. A continuación se aplicaron sobre el mismo 2 μ l de agua ultrapura mediante pipeteado. Seguidamente se realizó el calibrado de la máquina.



Figura 51. Espectrofotómetro UV-VIS NanoDrop2000 usado para el análisis espectrofotométrico.

A continuación, y utilizando para cada extracción de ADN una punta de pipeta nueva, se extrajo cuidadosamente con la pipeta 2 μ L de muestra y se depositó la gota con sumo cuidado sobre el lector, sin tocar el mismo con la pipeta. Una vez depositada la gota, se realizó la medición y lectura de cada muestra. El monitor reflejó las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, indicadores de la pureza del ADN, de cada muestra.

3.4.3 Métodos de análisis del ADN

3.4.3.1 *Phytophthora* spp.

3.4.3.1.1 Preparación de la Master Mix

La región ITS (Internal Transcribed Spacer) sintetiza el 18srRNA, subunidad del ARN ribosómico. Esta región se encuentra presente en todas las células eucariotas, pero de forma muy diferente en cada organismo, por lo que es un excelente identificador de especies (Mesanza, 2020).

En esta parte del trabajo, se aplicaron las técnicas que permiten la manipulación del ADN a partir de las extracciones realizadas, y con ello, la detección e identificación definitiva de las especies a las que pertenecen los patógenos. Se utilizó el protocolo desarrollado por Drenth *et al.* (2006) para la preparación de cebadores específicos basados en la región ITS para el género *Phytophthora*.

Dicho método es exclusivo para la detección e identificación del género *Phytophthora*. La pareja de cebadores A2 (forward) e I2 (reverse) utilizada es la siguiente:

- **A2** - ACTTTCCACGTGAACCGTTTCAA

○ **I2** - GATATCAGGTCCAATTGAGATGC

Para ello, en primer lugar, se preparó una “Master Mix” o mezcla maestra. La mezcla maestra contiene precursores y enzimas, y está compuesta por diferentes productos. Esta mezcla fue preparada para su posterior uso en la técnica PCR. La elección de los contenidos y de sus volúmenes influye en la sensibilidad y consistencia de la prueba, por ello se consideró el desarrollado por Drent *et al.* (2006) como el más apropiado para el ensayo, con ligeras adaptaciones basadas en los buenos resultados obtenidos por científicos de Neiker-Tecnalia.

El kit que se utilizó es de la casa comercial IBIAN®. Se realizaron alícuotas y diluciones de cada producto, obteniendo los siguientes; 10 x Buffer 2 µl, F primer (20 µM), R primer (20 µM), dNTPs (10 mM), Taq (5 unidades/µl), ddH2O. La Taq polimerasa utilizada es IBIAN®-Taq DNA Polymerase, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*. Cada muestra fue preparada con 18 µl de “Master Mix” y 2 µl de ADN.

Seguidamente, teniendo en cuenta la concentración inicial obtenida de cada producto, la concentración final deseada, y que el volumen total para cada muestra de la mezcla maestra, incluido el ADN, es de 20 µl, se calculó el volumen inicial de cada producto a partir de la siguiente ecuación de estequiometría:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f \quad \text{Ec. 1}$$

donde **C_i**: Concentración de la solución madre; **V_i**: Volumen de la solución madre; **C_f**: Concentración final; **V_f**: Volumen final

A continuación se detalla la mezcla maestra utilizada (Tabla 2).

Tabla 2. Volúmenes de los productos a utilizar por cada muestra.
Se muestran en orden de añadido en la preparación.

Producto	Volumen (µl)
ddH2O	15
10 x Buffer	2
F primer (0,2 µM)	0,2
R primer (0,2 µM)	0,2
dNTPs (0,2 mM)	0,4
Taq (1/20 U)	0,2
DNA	2
TOTAL	20

Teniendo en cuenta que el número de muestras de ADN es de 87, se preparó una sola “Master Mix” para todas ellas de forma que la preparación resultara más sencilla. Se añadieron 4 reacciones

más de margen por posibles errores en la elaboración, además de un control negativo y un control positivo.

Para el control positivo se utilizó ADN de *Phytophthora cinnamomi*. Con esto, en total fueron 93 reacciones. Por lo tanto, los volúmenes quedaron de la siguiente manera (Tabla 3).

Tabla 3. "Master Mix" para las 93 reacciones.

El ADN no figura en la tabla, puesto que es añadido posteriormente, como se explica más adelante.

Producto	Volumen (μl)
ddH2O	1395
10 x Buffer	186
F primer (0,2 μM)	18,6
R primer (0,2 μM)	18,6
dNTPs (0,2 mM)	37,2
Taq (1/20 U)	18,6
TOTAL	1674

La "Master Mix" fue dispensada en una bandeja o placa de muestras mediante una pipeta multicanal (Figura 52), añadiendo 18 μl correspondientes a cada muestra en cada pozo de la placa. Posteriormente se añadieron 2 μl de ADN de cada muestra, cada una en un pozo ya dispensado, es decir, en 87 pozos, de forma que los 6 restantes quedaron ocupados para los posibles errores cometidos y el control negativo y positivo (Figura 53).



Figura 52. Proceso de dispensado con pipeta multicanal.



Figura 53. Placa de muestra y productos utilizados.

3.4.3.1.2 Termociclado de muestras.

Una vez preparada cada muestra junto a la “Master Mix” en su respectivo pozo, se selló la placa y se llevó a cabo el proceso de termociclado. Para ello, se utilizó una máquina termocicladora PCR (Figura 54), la cual permite establecer ciclos de temperatura predeterminados para así provocar una reacción en cadena de la polimerasa, logrando la amplificación del ADN.

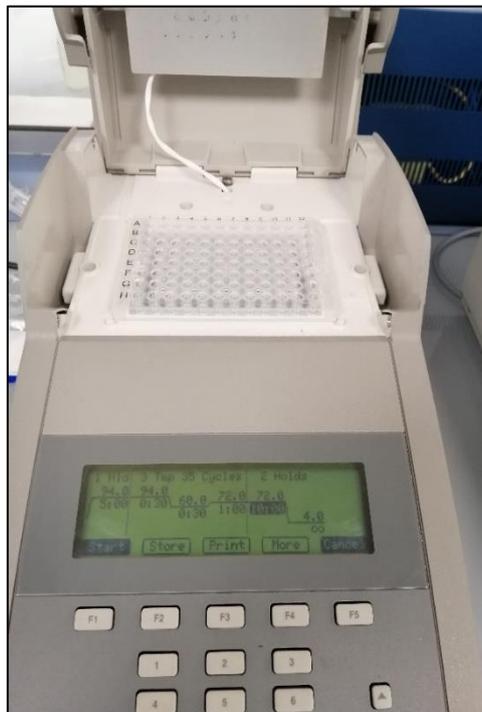


Figura 54. Proceso de termociclado con el ciclo programado.

El Taq anteriormente añadido elimina la necesidad de añadir nuevas cantidades de polimerasa durante el proceso de termociclado.

El ciclo utilizado fue el desarrollado por Alvarado-Marchena *et al.* (2017) (Tabla 4).

Tabla 4. Ciclo utilizado en el termociclador basado en Alvarado-Marchena *et al.* (2017).

Temperatura	Tiempo
94°C	5'
94°C	30" rowspan="3">} x35 ciclos
60°C	30"
72°C	1'
72°C	10'

Como se aprecia en la Tabla 4, el ciclo fue programado con tres temperaturas distintas. Los tres procesos centrales se realizan a 35 ciclos de diferente duración y temperatura.

Con este proceso se obtuvieron los productos PCR que posteriormente fueron visualizados bajo luz ultravioleta en los siguientes procesos.

3.4.3.1.3 Electroforesis en gel

Seguido del termociclado y las reacciones de secuenciación se llevó a cabo la técnica de electroforesis en gel (Figura 55), con la que se consiguió separar los fragmentos de ADN dependiendo de su tamaño y carga, a través de la aplicación de una corriente eléctrica en un gel que contiene los productos anteriormente creados, y con ello conocer el número de fragmentos de ADN existentes en cada muestra y su tamaño.

Para ello, en primer lugar, se realizó la preparación del gel. En este caso se necesitaron dos geles debido al número de muestras. El gel estaba compuesto por Agarosa D-1 (1 g por cada 100 ml de buffer), 100 ml de buffer 0,5x TBE (Tris, borato y EDTA), el cual separa los ácidos nucleicos, y 4 µl de gelRed, tinción que se une al ADN pudiendo así observar la amplificación mediante luz ultravioleta.

Primeramente, se vertieron 100 ml de TBE en un matraz, se añadió un 1 g de Agarosa (Figura 55a) y seguidamente 4 µl de gelRed. Esta última sustancia aportó un color rojizo a la disolución. A continuación se introdujo la disolución en un microondas el cual se mantuvo en funcionamiento hasta que la disolución empezó a hervir, proceso que toma menos de un minuto.

En ese instante, se sacó la disolución del microondas y se dejó enfriar. Se volvió a introducir en el microondas unos segundos más hasta que estuvo lista para ser vertida en contenedor donde más tarde se solidificaría. (Figura 55b).

Se vertió la disolución en el contenedor. En caso de que se creara alguna burbuja, ésta fue picada con una punta de pipeta. El contenedor está compuesto por una bandeja transparente, una bandeja mayor que contiene a ésta, y los peines. Se colocaron los peines sobre el gel y se dejó enfriar durante un lapso de 30 minutos - 1 hora.

Tras el lapso de tiempo estipulado, el gel se endureció (Figura 55c) por lo que se retiraron los peines, los cuales crearon unas celdas en el gel donde posteriormente se depositaron las muestras, formándose una malla por la que discurrieron las moléculas. Por lo tanto, se introdujeron las muestras en las celdas del gel, previo aporte de 5 μ l de colorante de carga, Bio-Rad Nucleic Acid Sample Buffer 5x (Figura 55d), en las muestras para así dar una mayor densidad a la muestra para que éstas bajaran hasta el fondo de la celda, además de aportar una coloración a la muestras. Para ello, se retiró la bandeja transparente de metacrilato junto al gel y se colocó en la cubeta de electroforesis. Se introdujo cada muestra en una celda del gel, con sumo cuidado, empleando una pipeta y una punta para cada operación (Figura 55e). De esta forma cada celda se tiñó de un color azul. En la primera celda de cada fila se añadió el "ladder" o marcador HyperLadder™ 50bp de la casa Bioline, como referencia para conocer el tamaño de amplificación de los pares de bases. También se añadió el control positivo y negativo.

Una vez introducidas todas las muestras en ambos geles, se conectó la máquina a la corriente eléctrica, se colocó la tapa de seguridad y se puso en marcha un voltaje de 100 V (Figura 55f). El proceso tomó, aproximadamente, unos 40 minutos en completarse. La mayoría de moléculas están cargadas eléctricamente, por lo que, al aplicar un campo eléctrico, se consiguió estimular y separarlas, de manera que éstas fueron avanzando por la malla del gel creada (Figura 56). El avance fue progresivo dependiendo del tamaño de cada molécula.

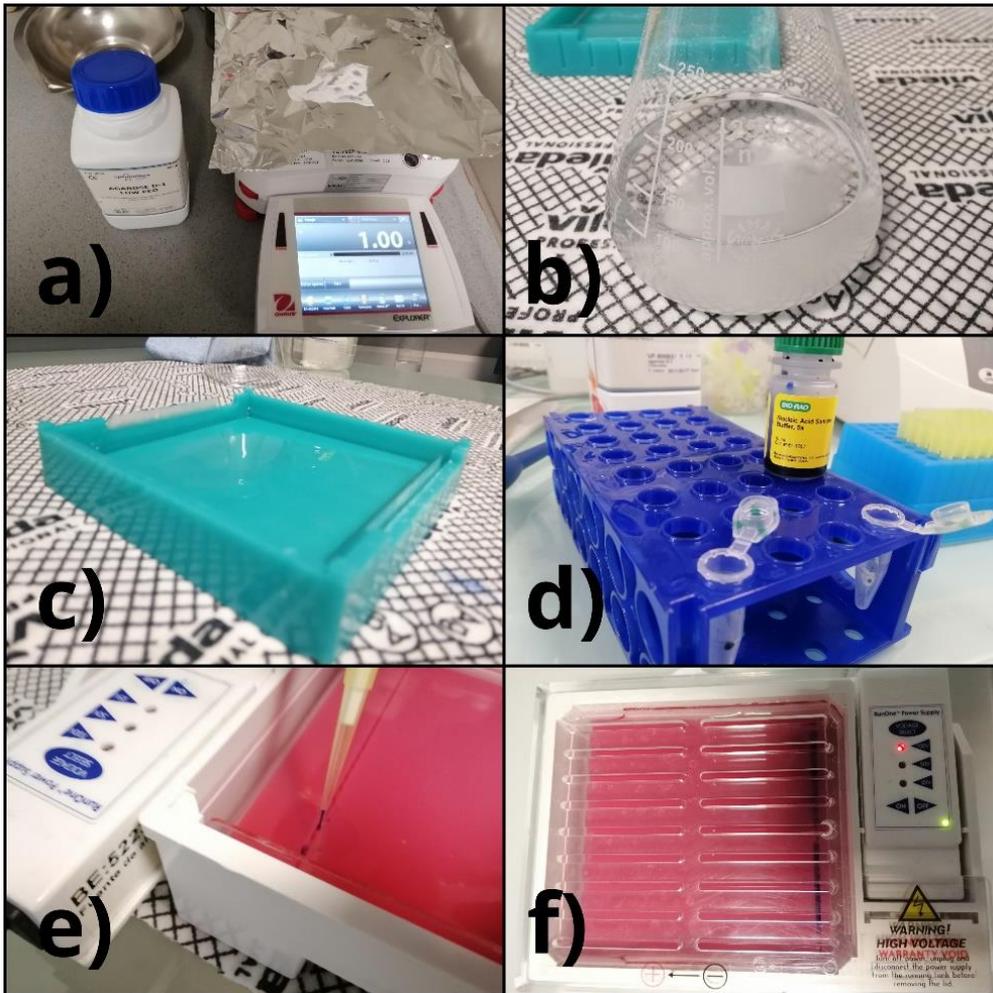


Figura 55. Proceso de preparación del gel y electroforesis.

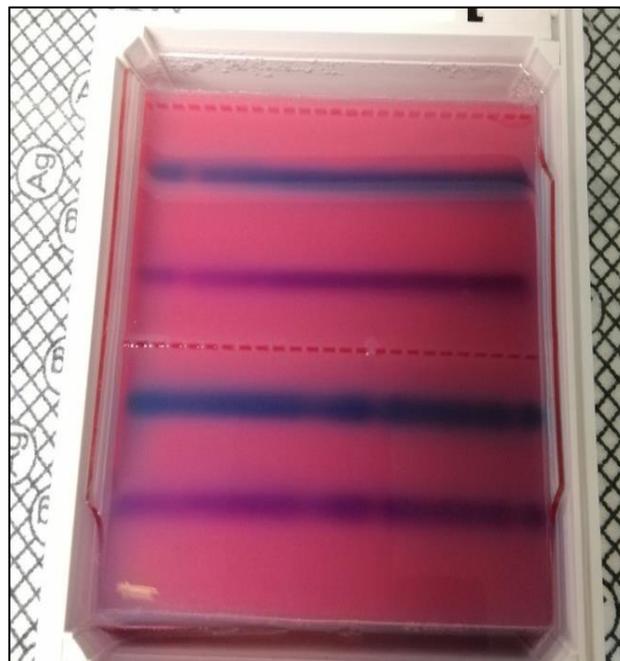


Figura 56. Gel tras el proceso de electroforesis.

Al igual que en la dispensación de muestras junto a la “Master Mix” en la placa de muestras, en la realización de la electroforesis en gel el orden de añadido de cada muestra fue el mismo, el cual está referenciado para saber a qué muestra corresponde cada celda o pozo.

3.4.3.1.4 Visualización en ChemiDoc

Con el proceso de electroforesis concluido, se realizó la lectura de los resultados. Para ello se empleó el instrumento Bio-Rad ChemiDoc XRS (Figura 57), el cual visualiza y analiza los geles y toma imágenes de los mismos mediante fluorescencia múltiple y quimioluminiscencia.



Figura 57. Aparato utilizado para la visualización y toma de imágenes de los geles (ChemiDoc).

Previo desconexión de la red eléctrica del aparato de electroforesis, se extrajo de la cubeta de electroforesis el recipiente de metacrilato que contiene el gel y se introdujo en el ChemiDoc, dejando que el gel resbalara hasta la bandeja de lectura, con cuidado. Se centró el gel en la bandeja del aparato para que la lectura pudiera ser realizada correctamente.

Seguidamente se ejecutó la visualización desde el monitor, mediante el software de control del aparato, en el que se seleccionó la opción de GelRed ya que es el compuesto con el que se trabajó. Posteriormente se seleccionó la opción de gel Agarosa y una exposición de imagen con bandas intensas.

Se ejecutó el posicionamiento de gel para ver si éste estaba correctamente posicionado. Una vez correctamente posicionado, se realizó la lectura del número de pares de bases amplificado por cada muestra.

3.4.3.1 *Phytophthora pinifolia* y *Phytophthora pluvialis*

Tras realizar el análisis con cebadores específicos del género *Phytophthora* se volvió a repetir la PCR y electroforesis en las muestras que se diagnosticó la presencia de *Phytophthora* mediante el mismo procedimiento y condiciones de prueba pero utilizando los cebadores específicos Pfoli1-F (forward), Pfoli1-R (reverse), Yfoli1-R y Yfoli1-F desarrollados por Durán *et al.* (2009) para analizar la presencia de *P. pinifolia* y *P. pluvialis*.

3.4.3.2 *Dothistroma* y *Lecanosticta*

Aparte de la identificación de especies de *Phytophthora* se llevó a cabo también un análisis de identificación y diagnóstico de *Dothistroma* spp. y *Lecanosticta acicola* en las 87 extracciones de ADN. El proceso seguido es el mismo que para *Phytophthora*. Los detalles diferenciales se especifican a continuación.

En este caso, los cebadores específicos utilizados fueron LAtef-F (forward), LAtef-R (reverse), DStub2-F, DStub2-R, DPtef-F y DPtef-R (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores específicos utilizados para cada patógeno.
Fuente: loos *et al.* (2010).

Cebadores	Secuencia 5´- 3´	Patógeno
LAtef-F,	GCAAATTTTCGCCGTTTATC	<i>Dothistroma pini</i>
LAtef-R,	TGTGTTCCAAGAGTGCTTGC	<i>Dothistroma pini</i>
DStub2-F	CGAACATGGACTGAGCAAAC	<i>Dothistroma septosporum</i>
DStub2-R	GCACGGCTCTTTCAAATGAC	<i>Dothistroma septosporum</i>
DPtef-F	ATTTTTCGCTGCTCGTCACT	<i>Lecanosticta acicola</i>
DPtef-R	CAATGTGAGATGTTTCGTCGTG	<i>Lecanosticta acicola</i>

La PCR se basó en el protocolo elaborado por de Urbina *et al.* (2017) y se realizó bajo las siguientes condiciones: tampón de PCR (500 mM de KCl; 100 mM de Tris-HCl pH 8,8; 0,1% de polisorbato 20; 15 mM de MgCl₂), 200 µM de dNTP, 8 pmol de cada cebador específico, 0,5 U de Taq ADN polimerasa de la casa comercial Bioron, y una muestra de ADN de 10-20 ng en un volumen total de 20 µl para todos los productos.

En cuanto a las condiciones del ciclo en el termociclado, fueron las siguientes: desnaturalización de 10 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C, 45 segundos, a 72 °C y una última extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR obtenidos fueron preparados por electroforesis a 100 voltios durante 30 minutos en un gel de agarosa al 1,5%, en tampón 1 x de Tris-acetato-EDTA (Tris 0,4 M, acetato sódico 0,05 M y EDTA 0,01 M, pH 7,8) y visualizados bajo luz ultravioleta en el ChemiDoc.

3.5 Observación con microscopía

Los portaobjetos de las trampas colocadas en campo fueron analizados con un microscopio de fluorescencia (Figura 58), mientras que las acículas de pino recolectadas fueron examinadas con microscopio estereoscópico y microscopio de fluorescencia.



Figura 58. Microscopio de fluorescencia utilizado para visualizar las esporas.

Mediante la observación de los portaobjetos con microscopía de fluorescencia se pudieron observar las esporas adheridas. Para ello se utilizó el colorante azul de lactofenol aplicándolo sobre el portaobjetos y cubriendo el mismo con un cubreobjetos, de forma que quedara el colorante dispersado (Figura 59). Se realizaron barridos pudiendo encontrar esporas de los patógenos utilizando aumentos de $\times 40$ y $\times 100$. Para realizar barridos con aumentos $\times 100$ se utilizó aceite de inmersión.

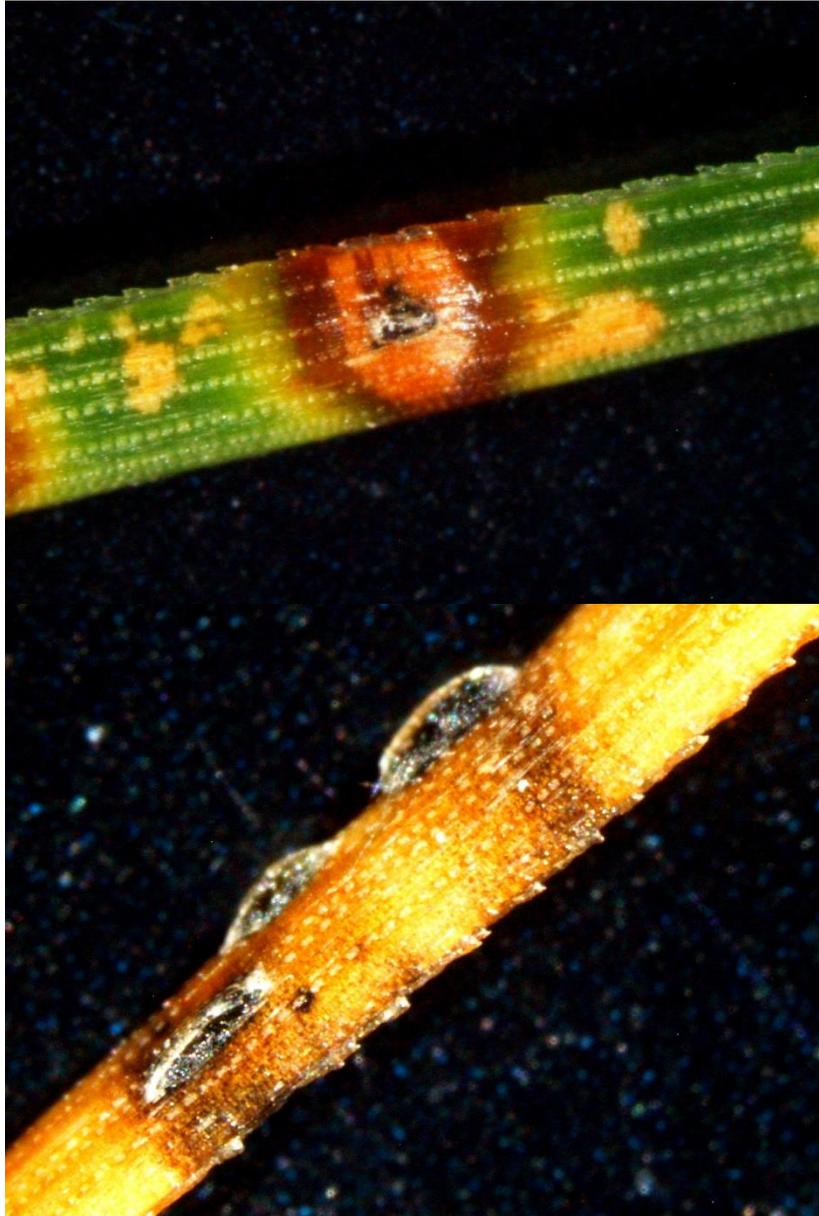


Figura 59. Observación de las lesiones aciculares mediante microscopio estereoscópico.

3.6 Identificación de los patógenos

La identificación y diagnóstico de los patógenos se llevó a cabo gracias a la utilización de cebadores específicos basados en la región ITS, capaces de detectar 2 pg de ADN objetivo. Tras la visualización de las amplificaciones bajo luz ultravioleta, la identificación fue llevada a cabo a partir del tamaño de los pares de bases amplificados.

Para *Phytophthora* spp., siguiendo el método de Drenth *et al.* (2006) para la detección e identificación de especies de este género, se consideró el rango de 752-832 pares de bases como el adecuado (Figura 60).

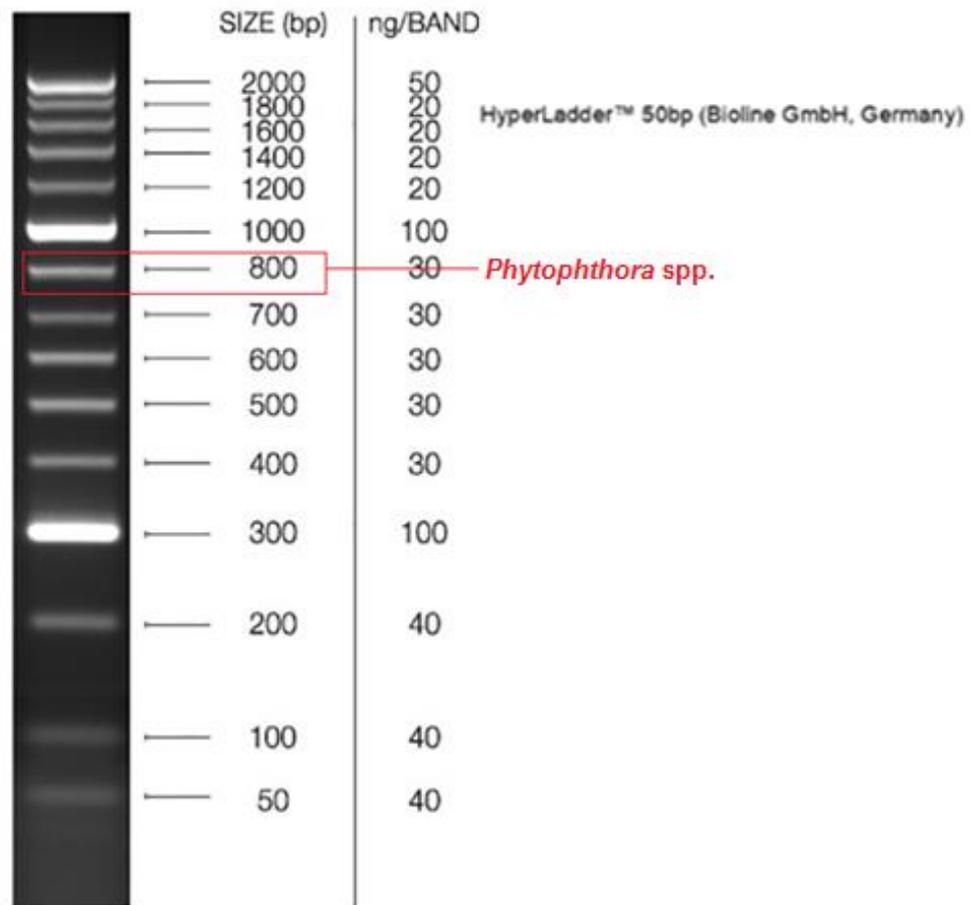


Figura 60. Marcador de tamaño de peso molecular para *Phytophthora* spp.
Fuente: Bioline GmbH (2020).

Para identificar *P. pinifolia* y *P. pluvialis* solo fue necesario que se produjera amplificación, ya que se utilizaron cebadores específicos de especie.

Para *Dothistroma* spp. y *Lecanosticta acicola*, siguiendo el protocolo elaborado por de Urbina *et al.* (2017), se consideró el rango de 200-300 pares de bases como el adecuado (Figura 61). De todos modos, al utilizar cebadores específicos de especie, al igual que con *P. pinifolia* y *P. pluvialis*, el hecho de que se produzca amplificación ya confirma la presencia del patógeno.

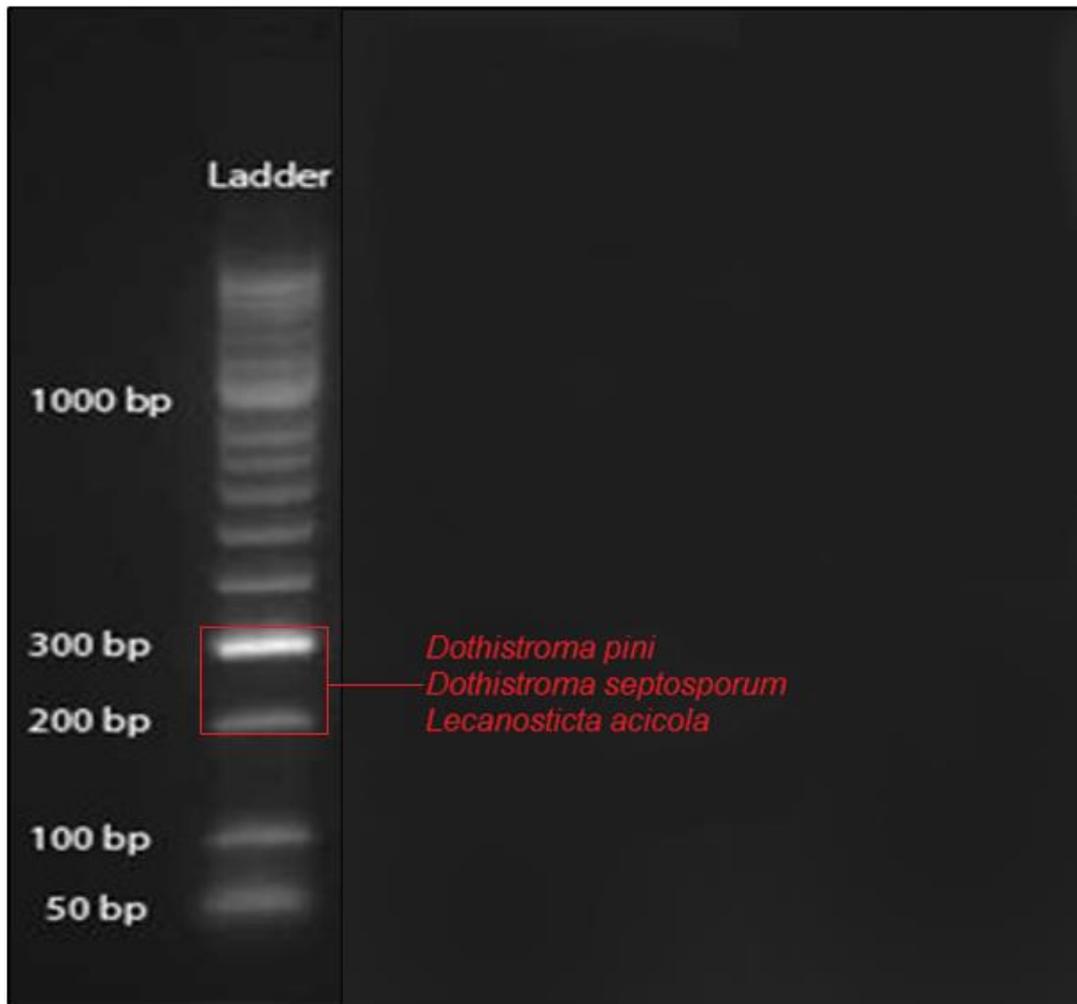


Figura 61. Marcador de tamaño de peso molecular para *Dothistroma* spp. y *Lecanosticta acicola*.
Fuente: de Urbina *et al.* (2017).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis inmunológico preliminar de detección de género *Phytophthora*

A continuación se muestran los resultados del ensayo inmunológico preliminar de detección del género *Phytophthora*. Teniendo en cuenta la diferente disponibilidad de datos existente, se han definido dos periodos: un período correspondiente a la primera parte del año, de febrero de 2019 a julio de 2019 (Tabla 6) y un segundo periodo de octubre de 2019 a febrero de 2020 (Tablas 7 y 8). En dichas tablas (y en el resto que se muestran en el documento), el número 1 refleja un resultado de detección positiva en el análisis y el número 0 un resultado negativo. En los resultados del primer periodo únicamente se han reflejado los datos de las estaciones marcadas como trampas fijas (señaladas con un asterisco (*) junto al nombre de la estación) y de las 4 estaciones restantes que han tenido alguna detección positiva en dicho periodo.

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

Tabla 6. Resultados obtenidos en el ensayo inmunológico de detección preliminar del género *Phytophthora* durante el periodo febrero 2019 - julio 2019. Dentro de las estaciones que no son fijas, solo se muestran aquellas en las que ha habido detección positiva en alguna fecha.

Estación	Fecha												
	15/02/2019	04/03/2019	18/03/2019	29/03/2019	19/04/2019	06/05/2019	15/05/2019	03/06/2019	18/06/2019	01/07/2019	15/07/2019	16/07/2019	30/07/2019
Elorrio*	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-	-
Pagatza*	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-	-
Umbe1*	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	-	-
Umbe2*	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	-	1
Lezama1*	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	-	1
Lezama 2*	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	-	1
Albina*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
Arangio*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
Kruzeta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Areatza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Aulestia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Miloi deposito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	-

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

Tabla 7. Resultados obtenidos en el ensayo inmunológico de detección preliminar del género *Phytophthora* en el periodo octubre 2019 - febrero 2020 (1/2).

Estación	Fecha																		
	15/10/2019	16/10/2019	18/10/2019	21/10/2019	31/10/2019	04/11/2019	15/11/2019	18/11/2019	19/11/2019	20/11/2019	20/12/2019	26/12/2019	08/01/2020	10/01/2020	13/01/2020	20/01/2020	23/01/2020	10/02/2020	11/02/2020
	Resultado																		
Elorrio*	-	-	-	1	0	1	-	-	0	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-
Pagatza*	-	-	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-	-	-	-	0	-	0	-
Umbe1*	-	-	-	0	-	0	-	-	1	-	0	-	-	-	-	0	-	1	-
Umbe2*	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-
Lezama1*	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	0	-	0	-
Lezama 2*	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	0	-
Albina*	-	-	-	-	-	0	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0
Arangio*	-	-	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	-	0
Parketxe	-	-	0	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Barazar	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0
Zekutze 1	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	0	0	-	-	-	0	-	0
Zekutze 2	-	-	1	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	-
Oiz 3	-	1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-
Ganbe Albiz	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Oiz 2	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Kortaun Oiz	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0
Ipintza	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
Albizuri	1	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Durakogain	-	-	0	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-
Argoate	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
Landa	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
Marieta	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
Sta Engrazia	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
Kruzeta	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

Tabla 8. Resultados obtenidos en el ensayo inmunológico de detección preliminar del género *Phytophthora* en el periodo octubre 2019 - febrero 2020 (2/2).

Estación	Fecha													
	14/10/2019	15/10/2019	16/10/2019	17/10/2019	18/10/2019	31/10/2019	15/11/2019	19/11/2019	26/12/2019	08/01/2020	09/01/2020	10/01/2020	13/01/2020	23/01/2020
	Resultado													
Onddi	1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-
Elgea	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-
Zizurkil	1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-
Oiz 1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
Aginaga	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-
Irisasi	0	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
Ugaldetxo	1	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-
Madariaga	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
Narea	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Ea	-	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-
Miloi	-	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-
Miloi deposito	-	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-
Areatza	0	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-
Aulestia	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Ernani-aginieta	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
Iurreta	-	-	0	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-
Zizurkil	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-
Aguinaga	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-
Uriona	-	-	1	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-
Kortaun	-	-	0	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-
Artea 1	-	-	0	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-
Artea 2	-	-	1	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-
Amezaga	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0	-
Ereio berri	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-
Argoate	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-
Amoroto	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-
Karrantza	-	-	-	-	-	1	0	-	0	-	-	-	-	0
Mallabia	-	-	-	-	-	1	-	-	0	-	-	-	-	0
Muxika	-	-	-	-	-	1	-	-	0	-	-	-	-	0
Gueñes	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-	0
Villaro	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-
Etumeta	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-

En la Tabla 9 se muestra la distribución de las detecciones positivas del género *Phytophthora* según la temporada en la que se han obtenido (PR, primavera; VE, verano; OT, otoño; IN, invierno). La temporada del año en la que más detecciones positivas en género *Phytophthora* se reportó fue otoño con 21 (47,73%) casos, seguido del invierno y el verano con 9 (20,45%) cada una y finalmente la primavera con 5 (11,37%).

Tabla 9. Distribución de las detecciones positivas obtenidas en el análisis preliminar de detección del género *Phytophthora* por estación y temporada. Los asteriscos (*) indican trampas fijas.

Estación	Provincia	Temporada	Resultado
Kruzeta	Álava	VE	1
Albizuri	Guipúzcoa	OT	1
Onddi	Guipúzcoa	OT	1
Zizurkil	Guipúzcoa	OT	1
Ugaldetxo	Guipúzcoa	OT	1
Irisasi	Guipúzcoa	OT-IN	1
Elorrio*	Vizcaya	PR-VE-OT-IN	1
Umbe 1*	Vizcaya	PR-VE-IN	1
Umbe 2*	Vizcaya	PR-VE-OT-IN	1
Lezama 1*	Vizcaya	PR-VE-OT-IN	1
Lezama 2*	Vizcaya	PR-VE-OT-IN	1
Zekutze 1	Vizcaya	OT-IN	1
Zekutze 2	Vizcaya	OT	1
Oiz 1	Vizcaya	OT	1
Oiz 2	Vizcaya	OT	1
Oiz 3	Vizcaya	OT	1
Ganbe Albiz	Vizcaya	OT-IN	1
Narea	Vizcaya	OT-IN	1
Uriona	Vizcaya	OT	1
Karrantza	Vizcaya	OT	1
Mallabia	Vizcaya	OT	1
Muxika	Vizcaya	OT	1
Areatza	Vizcaya	VE	1
Alestia	Vizcaya	VE	1
Artea 2	Vizcaya	OT	1
Miloi deposito	Vizcaya	VE	1

Como se puede apreciar existen 26 estaciones, de un total de 55, en las que en algún momento durante los periodos de realización del ensayo ha habido detecciones positivas al género *Phytophthora*. Nueve de estas 26 estaciones han obtenido detecciones positivas en más

Identificación temprana de especies de patógenos foliares en plantaciones de *P. radiata* en el País Vasco

de una temporada del año. Las estaciones Elorrio, Umbe 2, Lezama 1 y Lezama 2, todas ellas definidas como trampas fijas, han obtenido detecciones positivas en las cuatro temporadas del año.

De las 26 estaciones con detección positiva en el análisis preliminar, 20 pertenecen a Vizcaya (76,92%), 5 a Guipúzcoa (19,23%) y 1 a Álava (3,85%). De las 9 con más de una detección positiva, 8 pertenecen a Vizcaya (88,89%) y 1 a Guipúzcoa (11,11%) (Figura 62).

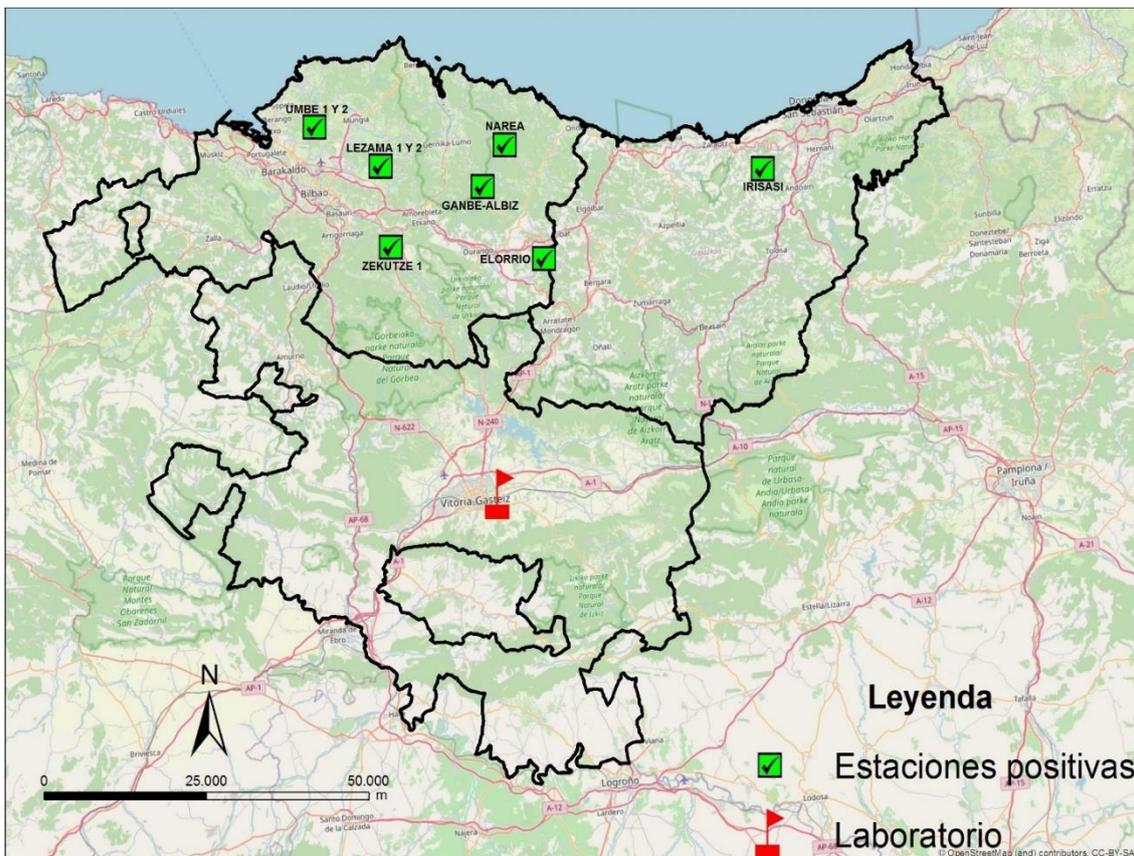


Figura 62. Localización de las 9 estaciones con más de un positivo en el análisis preliminar de detección de *Phytophthora* spp.

Estas 9 estaciones (de las que se recogieron muestras de acículas de los árboles), aún cuando se sitúan en plantaciones con diferentes características fisiográficas y con diferente estados de desarrollo de las masas, presentan importantes niveles de defoliación. Los casos más destacables (más de 50% de defoliación media por estación) son los de Lezama 1, Lezama 2, Irisasi, Narea, Umbe 1, Umbe 2 y Elorrio, cuyos datos por árbol se expresan en las Tablas 10 y 11 y por estación en la Tabla 12.

Tabla 10. Datos por árbol de las estaciones con mayor defoliación (1/2).

Estación	Nº de muestra	Edad árbol (años)	% Defoliación	Otros daños
Lezama 1	43	5	40	-
	75		60	-
	74		70	-
	76		55	-
	73		60	-
	lq. 73		55	-
	72		50	-
	77		50	-
	41		65	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>
	78		50	-
Lezama 2	11	5	70	-
	10		40	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>
	15		40	-
	13		55	-
	14		65	-
	88		75	-
	89		55	-
	Encima trampa		90	-
	11 bis		60	-
	88		50	-
81	40	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>		
Irisasi	Irisasi 1	22	50	-
	Irisasi 2		90	-
	Irisasi 3		90	-
	Irisasi 4		80	-
	Irisasi 5		70	-
	Irisasi 6		75	-
	Irisasi 7		80	-
	Irisasi 8		90	-
	Irisasi 9		50	-
	Irisasi 10		60	-
Narea	Narea 1	30	60	-
	Narea 2		90	-
	Narea 3		70	-
	Narea 4		80	-
	Narea 5		75	-
	Narea 6		80	-
	Narea 7		90	-
	Narea 8		70	-
	Narea 9		70	-
	Narea 10		75	-

Tabla 11. Datos por árbol de las estaciones con mayor defoliación (2/2).

Estación	Nº de muestra	Edad árbol (años)	% Defoliación	Otros daños
Umbe 1	Umbe 187	15	60	-
	Umbe 245		90	-
	Umbe 217		55	-
	Umbe 215		70	-
	Umbe 347		40	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>
	Umbe 185		65	-
	Umbe 217 bis		60	-
	Umbe 308		80	-
	Umbe 226		65	-
Umbe 2	Umbe 309	15	70	-
	Umbe 358		65	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>
	Umbe 186		60	-
	Umbe 187 bis		60	-
	Umbe 215 bis		40	-
	Umbe 185 bis		70	-
	Umbe 188		50	-
	Umbe 218		70	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>
	Umbe 186		60	-
Elorrio	Elorrio 1	4	50	-
	Elorrio 2		50	-
	Elorrio 3		65	-
	Elorrio 4		40	-
	Elorrio 5		60	-
	Elorrio 6		50	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>
	Elorrio 7		50	-
	Elorrio 8		55	-
	Elorrio 9		40	-
	Elorrio 10		45	-

Tabla 12. Datos de edad de la masa y defoliación media por estación.

Estación	Edad árbol (años)	% Defoliación media
Lezama 1	5	55,5
Lezama 2	5	58,2
Irisasi	22	73,5
Narea	30	76
Umbe 1	15	65
Umbe 2	15	60
Elorrio	4	50,5

Son especialmente reseñables los casos de las masas adultas de Irisasi y Narea, con un porcentaje de defoliación medio de 73,5% y 76%, respectivamente. Por otra parte, pese a que los patógenos defoliadores parecen ser los causantes de los daños más significativos, también

es destacable la existencia de daños por procesionaria (*Thaumetopoea pityocampa*) en las estaciones de Lezama 1, Lezama 2, Umbe 1, Umbe 2 y Elorrio.

4.2 Resultados de pureza en las extracciones de ADN

78 de las 87 extracciones de ADN realizadas han alcanzado una pureza de aceptable a buena en la relación de absorbancia 260/280 según las indicaciones de NanoDrop Technologies (2007). Sin embargo, 5 muestras de las 87 han mostrado una relación 260/230, más baja de la considerada como óptima. Este resultado sugiere que, por lo general, las muestras se encontraban libres de contaminantes, por lo que eran aptas para su uso en aplicaciones posteriores.

En las muestras en las que el patrón espectral se ajustó al estándar, la curva adopta el patrón espectral característico del ácido nucleico, comenzando con un ascenso entorno a los 230 nm de longitud de onda, donde son representadas las sales, hasta alcanzar un pico elevado alrededor de los 260 nm de longitud de onda, lo cual indica la abundancia de ácidos nucleicos. La curva desciende en el punto donde se representan las proteínas (Figura 63a). Por el contrario, en el patrón espectral de las 5 extracciones de ADN con una relación de absorbancia 260/230 inferior se puede apreciar una menor concentración de ácidos nucleicos (Figura 63b).

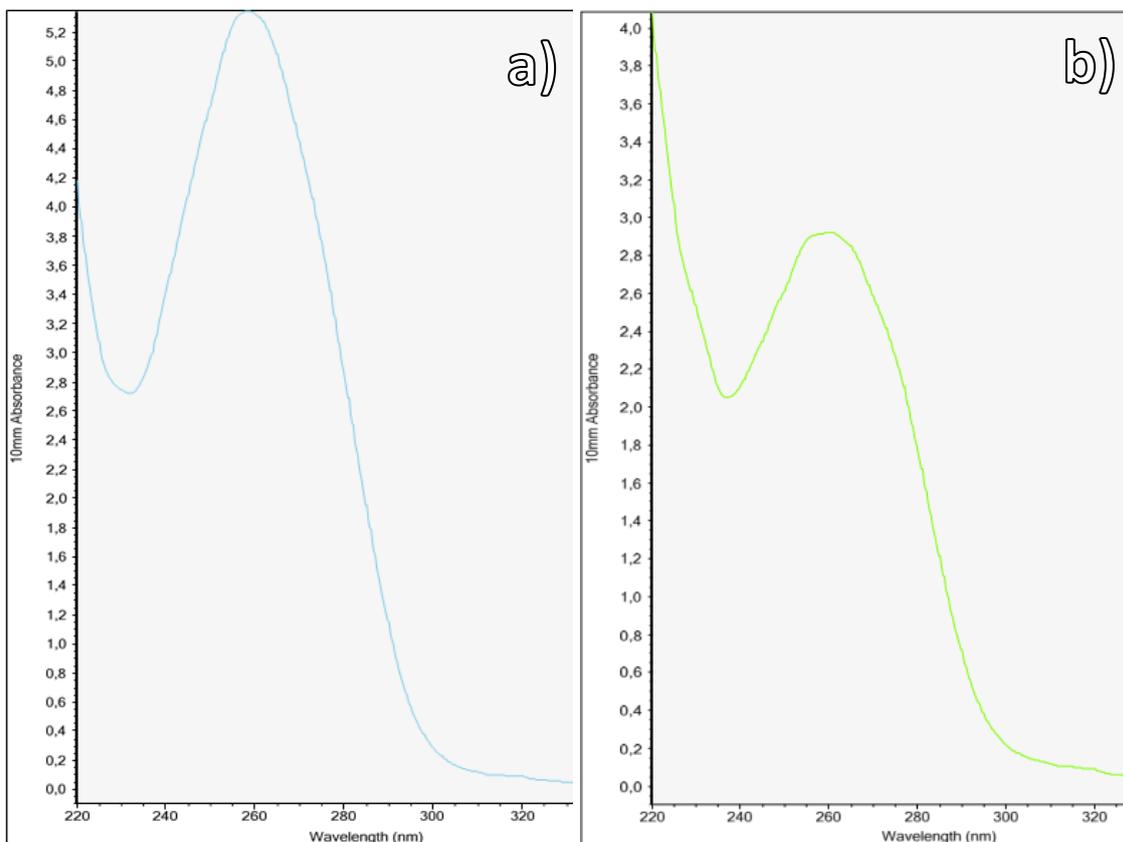


Figura 63. Representación del patrón espectral de las extracciones de ADN, a) con una buena relación de absorbancia 260/280; b) con una relación de absorbancia 260/230 inferior a la óptima.

4.3 Identificación de especies

4.3.1 *Phytophthora* spp.

De las 87 extracciones de ADN analizadas, únicamente una (1,5%) obtuvo un resultado positivo en *Phytophthora* spp. tras la realización de la PCR y electroforesis. Se trata de la muestra con el código UMBE 217, correspondiente a la estación Umbe 1 (provincia de Vizcaya). El producto resultante de la amplificación por PCR de la muestra con un tamaño próximo a 800 pares de bases (Figura 64) se encuentra dentro del rango descrito por Drenth *et al.* (2006) para la detección e identificación de especies del género *Phytophthora*.

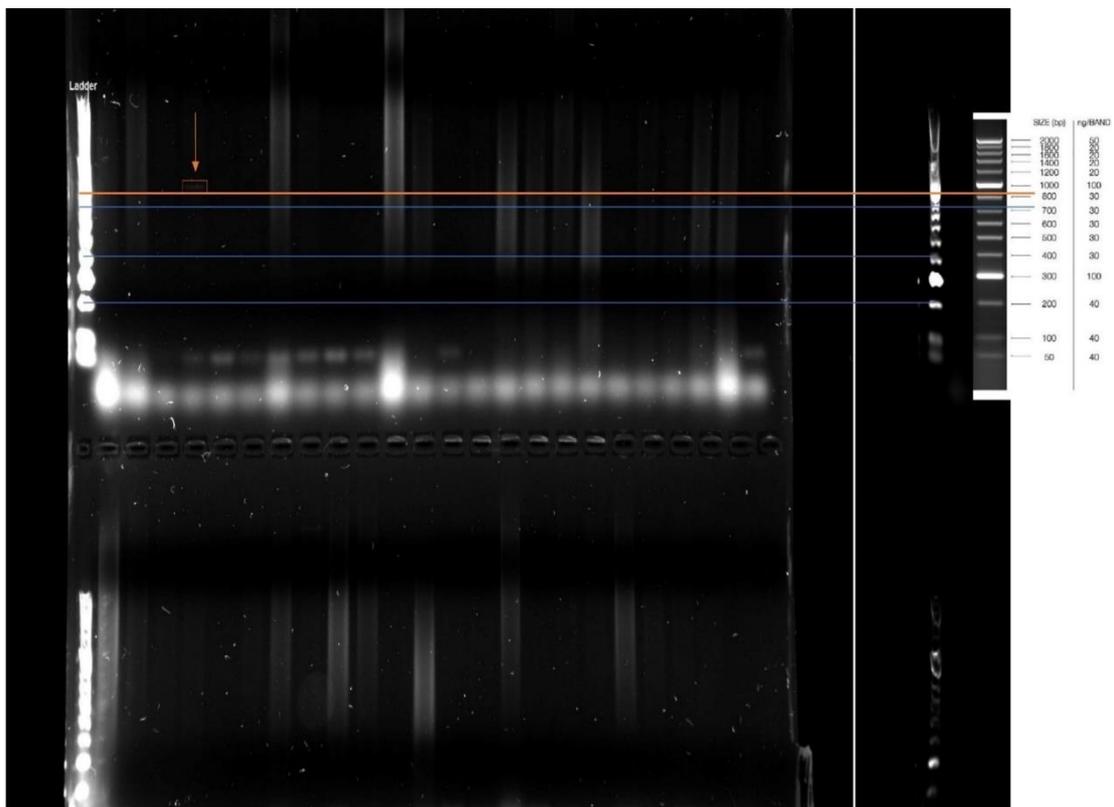


Figura 64. Detalle del positivo en *Phytophthora* spp. (señalado en color naranja) observado en la lectura del gel.

Por otro lado, el control positivo de *Phytophthora cinnamoni* amplificó correctamente, lo que indica que el proceso de análisis se llevó a cabo de forma correcta (Figura 65).

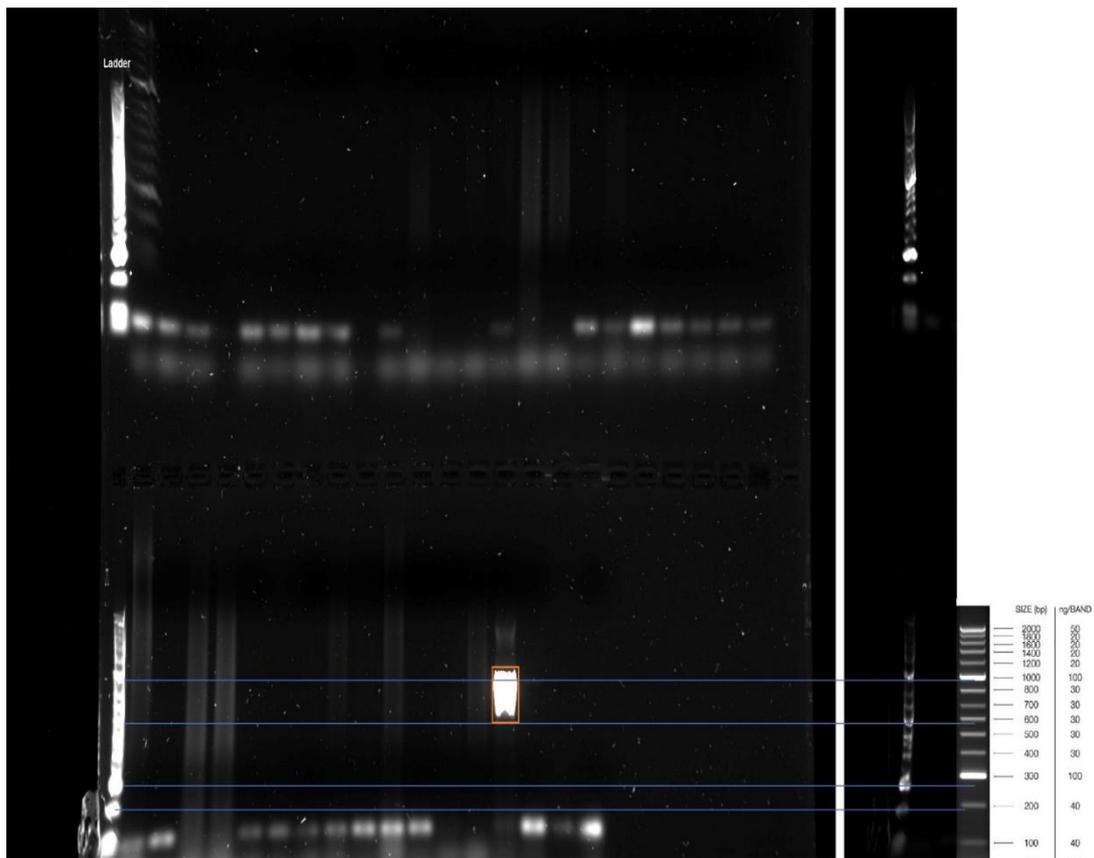


Figura 65. Detalle del control positivo de *Phytophthora cinnamoni* (señalado en color naranja) observado en la lectura del gel.

Sin embargo, tras repetir la prueba PCR y la electroforesis con la muestra positiva en género *Phytophthora* utilizando cebadores específicos Pfoli1f-Pfoli1R, Yfoli1R-Yfoli1F para *P. pinifolia* y *P. pluvialis* no se observó ninguna amplificación del fragmento de ADN específico para ninguna de ellas (Figura 66), por lo que se descartó la presencia de una especie defoliadora de *Phytophthora*.

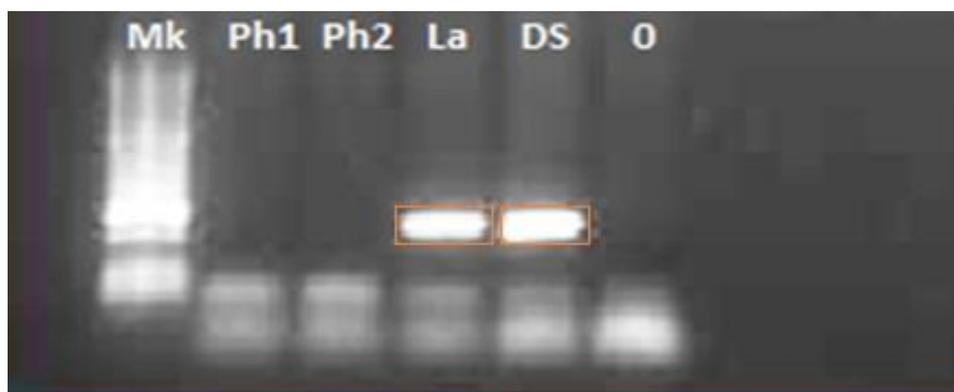


Figura 66. Productos de la amplificación PCR para la muestra UMBE 217 con resultado positivo (cuadro en color naranja) en *Lecanosticta acicola* (La) y *Dothistroma septosporum* (DS). Resultado negativo en *Phytophthora pinifolia* (Ph1) y en *Phytophthora pluvialis* (Ph2). Mk representa el marcador de peso molecular y 0 el control negativo.

4.3.2 *Dothistroma* spp. y *Lecanosticta acicola*

De las 87 muestras analizadas, en 72 (82,56%) se diagnosticó la presencia de alguno de estos dos patógenos foliares. En 58 muestras se diagnosticó la presencia de *Lecanosticta acicola* (Figura 67), es decir, el 66,67% de las muestras totales. En 14 muestras se diagnosticó la presencia de *Dothistroma septosporum* (Figura 68), lo que supone el 16,09% de las muestras totales.

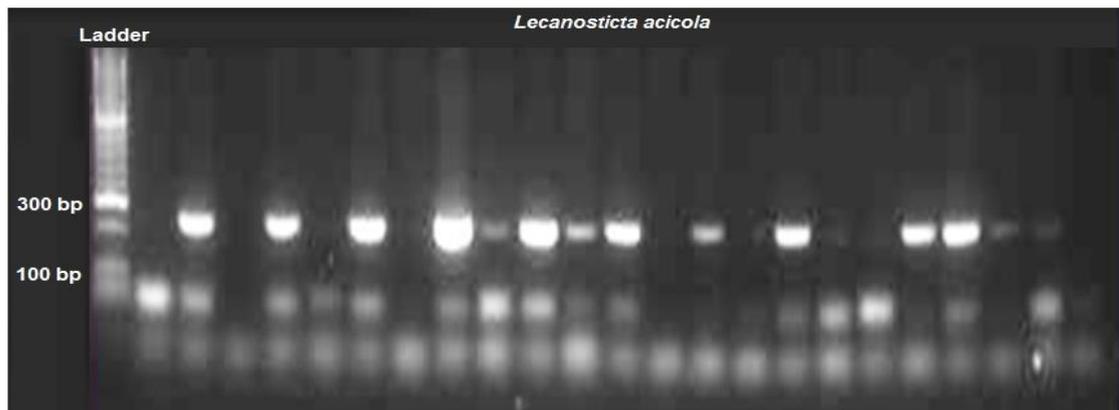


Figura 67. Detalle de lectura del gel con positivos en *L. acicola*.

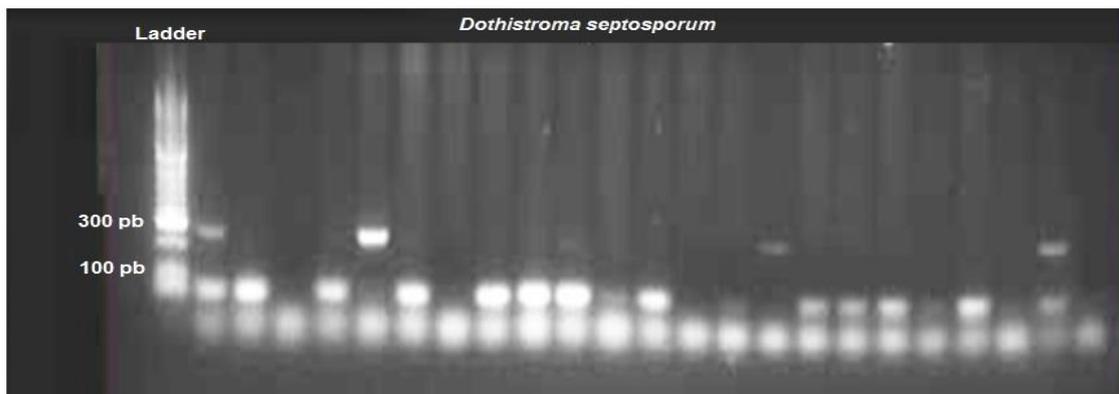


Figura 68. Detalle de lectura del gel con positivos en *D. septosporum*.

En 12 muestras se diagnosticó *L. acicola* junto a *D. septosporum* (13,79% de las muestras totales). En 15 muestras no se diagnosticó ningún patógeno (17,24% de las muestras totales). *D. pini* no fue diagnosticada en ninguna muestra. En la Tabla 13 se expone resumidamente el resultado del diagnóstico obtenido para las 87 muestras testeadas.

Del total de muestras infectadas (72), el 80,56% fue infectado por *L. acicola* mientras que el 19,44% fue infectado por *D. septosporum*. En el 18,18% de las muestras infectadas se diagnosticó la presencia de ambos patógenos.

Tabla 13. Resultado diagnóstico de las 87 muestras analizadas.

Resultado de la prueba	Número de muestras con dicho resultado
Ausencia de patógeno	15
<i>Lecanosticta acicola</i>	58
<i>Dothistroma septosporum</i>	14
<i>Dothistroma pini</i>	0
<i>L. acicola</i> + <i>D. septosporum</i>	12

La presencia de *L. acicola* se confirmó en las 9 estaciones que resultaron positivas en el análisis inmunológico preliminar de *Phytophthora* spp. Por otro lado, *D. septosporum* fue confirmado en 7 de las 9 estaciones estudiadas (Tabla 14). Es decir, la relación de estaciones positivas en *D. septosporum* y en *L. acicola*, es de 7/9, o lo que es lo equivalente 1/1,3.

Tabla 14. Balance de positivos y negativos de cada patógeno detectado en las 9 estaciones con más de un positivo preliminar en *Phytophthora*.

Estación	<i>Dothistroma septosporum</i>	<i>Lecanosticta acicola</i>
Irisasi	1	1
Narea	1	1
Ganbe-albiz	0	1
Zekutze 1	0	1
Elorrio	1	1
Umbe 1	1	1
Umbe 2	1	1
Lezama 1	1	1
Lezama 2	1	1

En definitiva, incluyendo la información previa a este estudio suministrada por Neiker-Tecnalia (22 estaciones positivas en *Dothistroma septosporum* y 60 estaciones positivas en *Lecanosticta acicola*), la distribución de los positivos por especies de patógenos foliares en el País Vasco es la que se expone en la Figura 69.

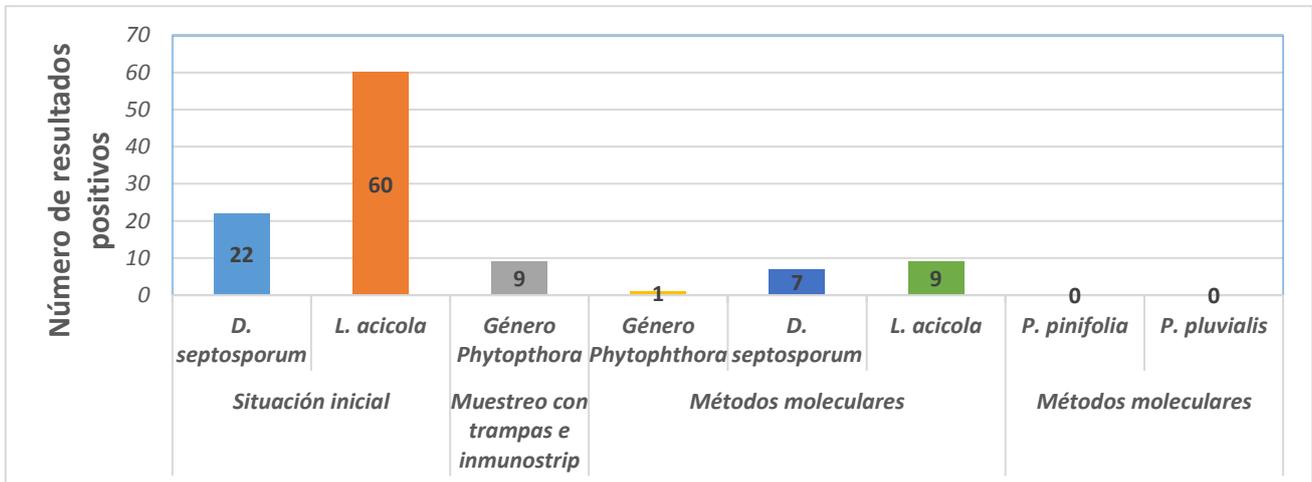


Figura 69. Distribución de los resultados positivos disponibles para los diferentes patógenos en cada etapa del estudio.

4.4 Relación entre el nivel de defoliación, el número de especies identificadas y la edad de la masa

Las 9 estaciones estudiadas alcanzaron elevados niveles de defoliación, existiendo una aparente relación positiva entre el porcentaje medio de defoliación y el número de especies de hongos defoliadores detectados en cada una de ellas (Figura 70). Así, se aprecia que las dos estaciones donde se detectó únicamente *Lecanosticta acicola* son las que poseen un porcentaje más bajo de defoliación.

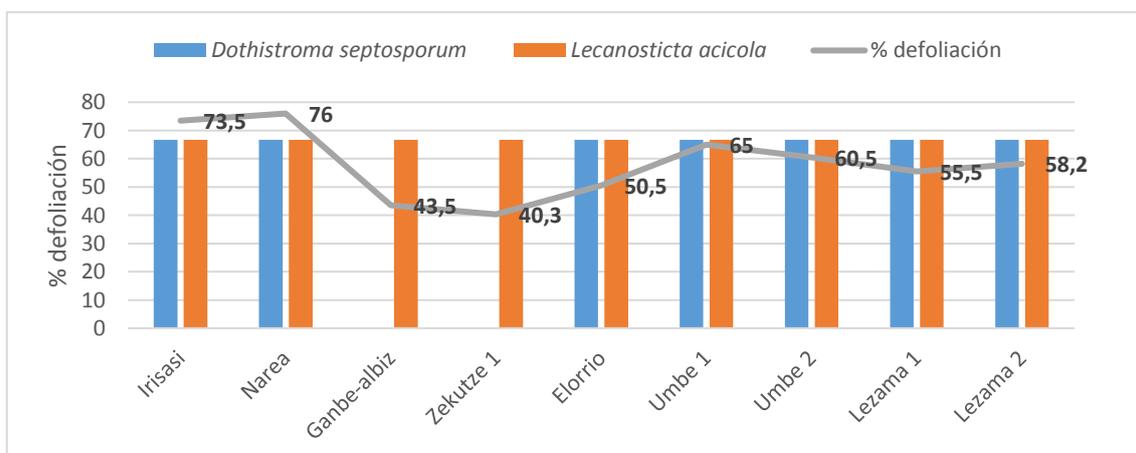


Figura 70. Relación del porcentaje medio de defoliación de cada estación y número hongos defoliadores diagnosticados en cada una de ellas.

Los porcentajes medios de defoliación detectados en cada estación se relacionaron positivamente con la edad media de la masa, presentándose los mayores porcentajes de defoliación cuanto más adultos eran los árboles (Figura 71).

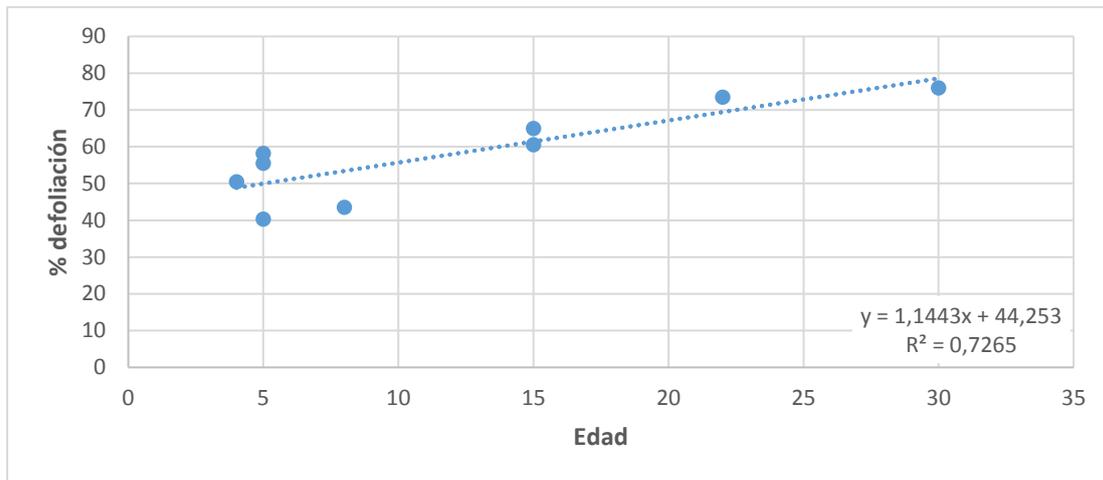


Figura 71. Relación entre la edad de la masa y el porcentaje de defoliación media.

4.5 Optimización de la metodología para la detección de patógenos defoliosos de acículas de pino radiata y estudio de su epidemiología, con especial hincapié en el estudio de la presencia de *Phytophthora* spp.

Con la implementación de la metodología expuesta en el presente estudio (Figura 73) se ha logrado la optimización de la metodología habitualmente utilizada hasta el momento para la detección de patógenos defoliosos en el País Vasco (Figura 72).

Total de preparaciones:

- A) 550 (Extracciones de ADN)
 - a) 550 + 550 (*D. septosporum* + *D. pini*)
 - b) 550 (*L. acicola*)
 - c) 550 (*P. pinifolia*)
 - d) 550 (*P. pluvialis*)
- SUMA
-
- 3300 preparaciones**

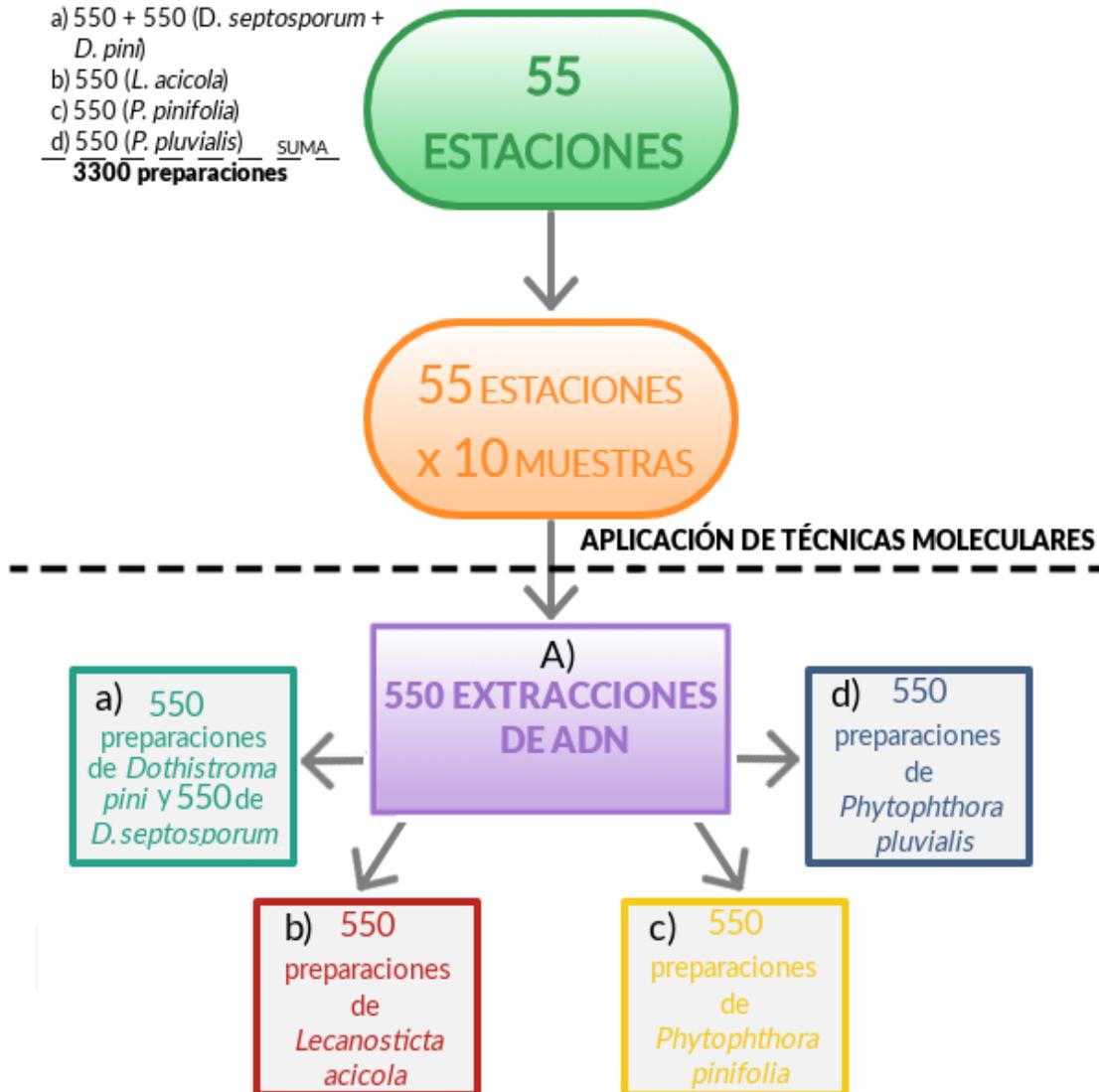


Figura 72. Esquema metodológico para la detección de patógenos defoliadores sin la aplicación de la optimización expuesta en el presente estudio.

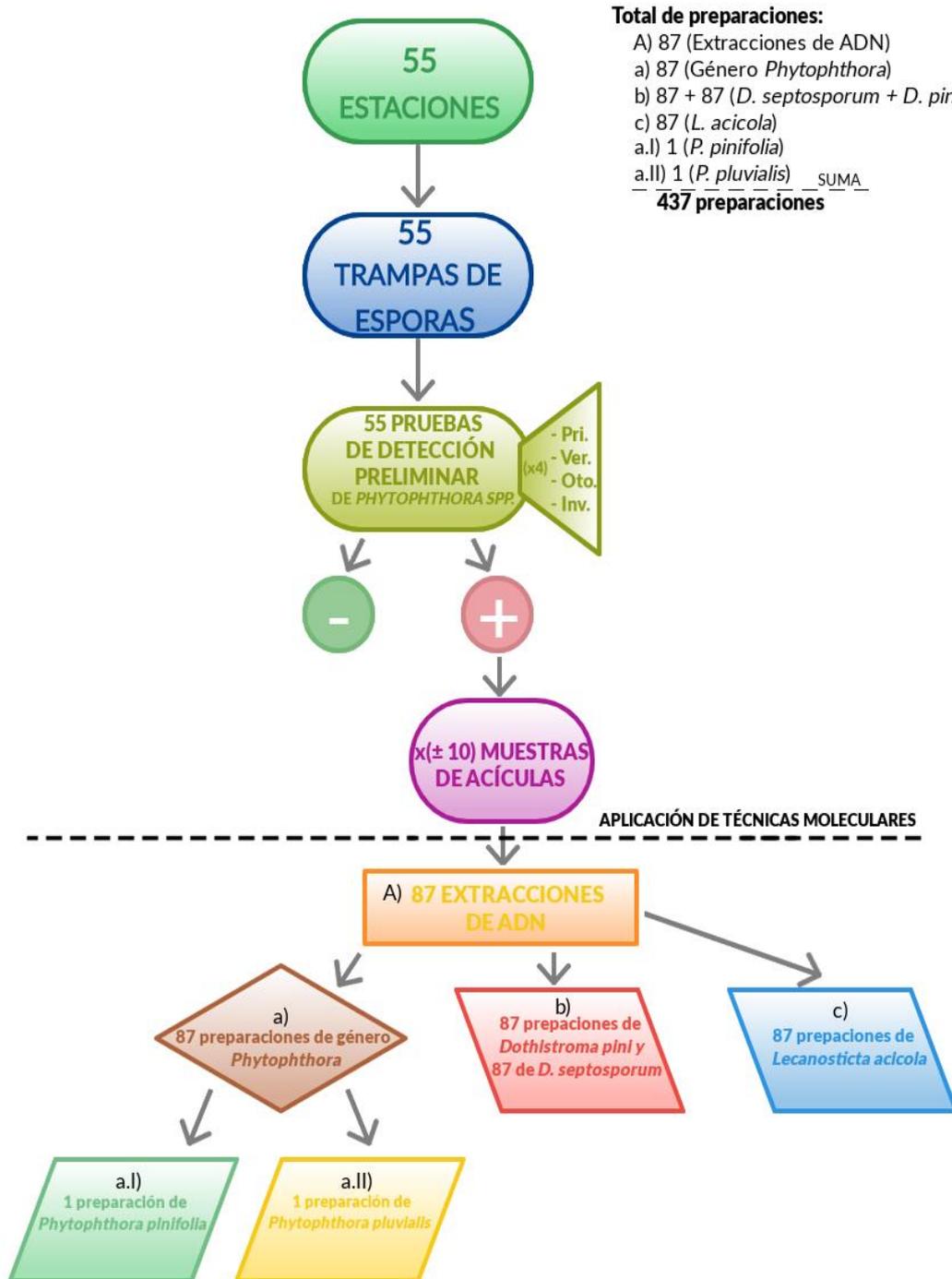


Figura 73. Esquema metodológico para la detección de hongos defoliantes con la aplicación de la optimización expuesta en el presente estudio.

La implementación de esta optimización ha supuesto la reducción de las preparaciones a realizar desde las 3300 que implicaría la metodología habitual a las 437 llevadas a cabo en el presente estudio, lo que supone un 75% de reducción.

4.6 Cuerpos y estructuras observadas

Durante el análisis morfológico de las estructuras fúngicas obtenidas de las acículas sintomáticas se observaron cuerpos fructíferos de los dos patógenos detectados, además de conidios de *L. acicola* en diferente estado de desarrollo (Figura 74). Sin embargo, no se encontraron esporas de *D. septosporum*.

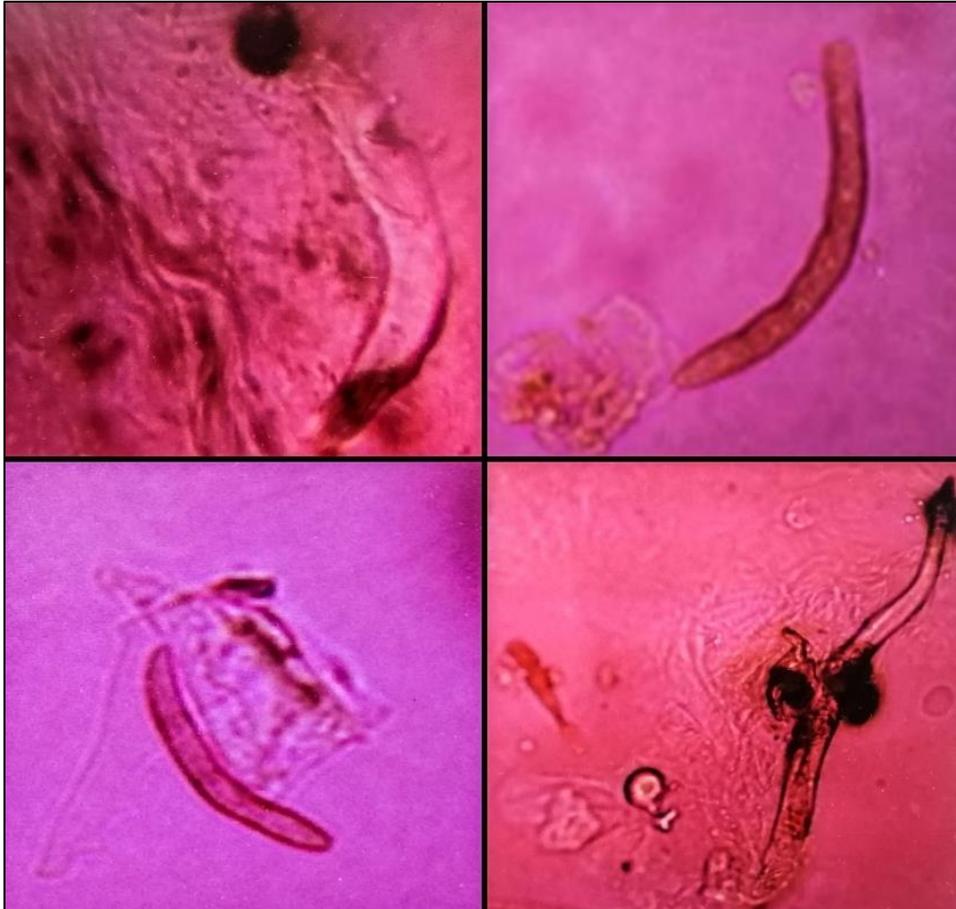


Figura 74. Conidios de *L. acicola* observadas en diferente estado de desarrollo.

Por otro lado, fue observado un cuerpo con una estructura similar a un oogonio, con un diámetro de 20,65 μm (Figura 75), ligeramente más pequeña que las referencias dadas por Reeser *et al.* (2015) para *Phytophthora pluvialis*.

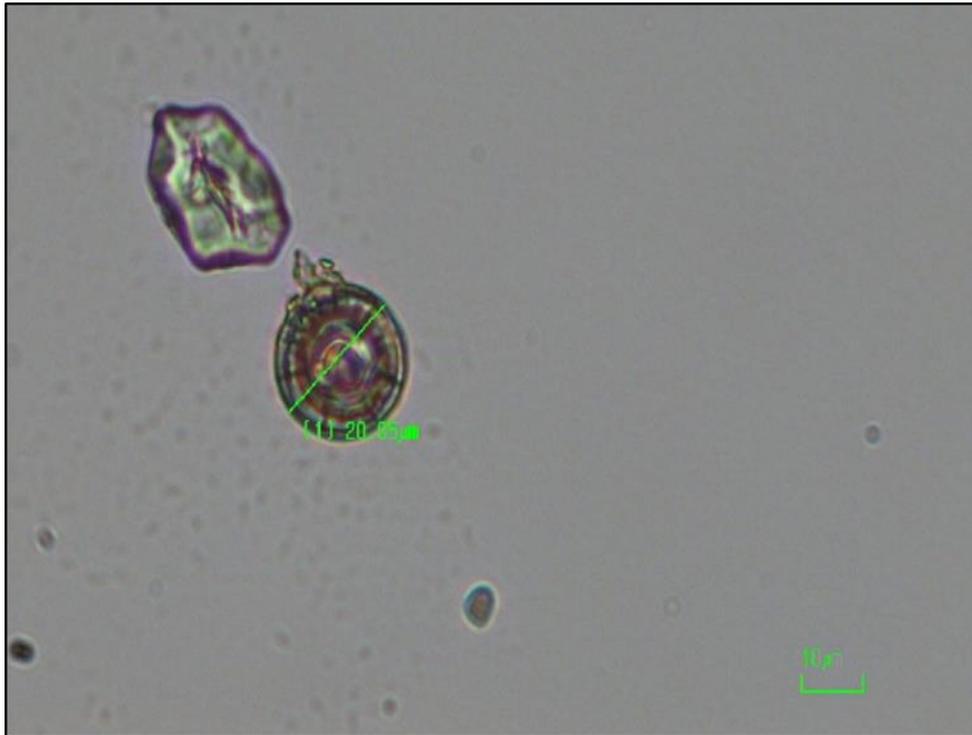


Figura 75. Estructura similar a un oogonio observada en una de las muestras de acículas.

5. DISCUSIÓN

Ante la hipótesis planteada por investigaciones llevadas a cabo en Chile y Nueva Zelanda sobre la implicación de nuevas especies de *Phytophthora* con carácter defoliador en la actual crisis fitosanitaria del pino radiata en el País Vasco, se consideró necesario el desarrollo y la implementación de una metodología para corroborar dicha hipótesis de manera directa, rápida y eficaz, economizando los costes operativos.

Mediante el presente estudio se ha logrado la optimización de la metodología que permite la detección y el diagnóstico de patógenos foliares en masas de pino radiata, economizando significativamente los recursos materiales y humanos necesarios. El ahorro viene dado, fundamentalmente, por la reducción del número de muestras a analizar mediante técnicas moleculares, y por lo tanto el número de preparaciones, respecto a la metodología habitualmente utilizada. La reducción conseguida en este estudio se cuantificó en un 755%.

La aplicación de técnicas moleculares supone una elevada inversión, ya que requiere de unas instalaciones especializadas que se encuentren equipadas con un número elevado de aparatos tecnológicos muy costosos, además del material que se utiliza, que también es costoso y en gran parte fungible. Además, precisa de mucho tiempo, debido principalmente a la cantidad de pasos que se deben seguir hasta conseguir el diagnóstico de una muestra. Con el añadido de la delicadeza con la que se debe de operar y la absoluta precaución que se debe de extremar durante la ejecución de los diferentes procesos.

La experiencia expuesta en este trabajo de desarrollo y puesta a punto de una metodología optimizada puede considerarse como exitosa. Los beneficios logrados con la implementación de la metodología de detección preliminar de *Phytophthora* mediante el ensayo inmúnológico InmunoStrip compensan plenamente los gastos derivados de la adquisición y aplicación del ensayo, puesto que se trata de un material relativamente económico, tanto el kit, como las plantas trampa de esporas, así como el resto del material empleado.

Se conocen pocas experiencias similares en las que se haya utilizado este ensayo inmunológico para la detección de patógenos foliares en *P. radiata* pese a que autores como Miller *et al.* (1994), Fang y Ramasamy (2015) y Soto *et al.* (2017) ya habían descrito la utilización de tiras reactivas para la detección directa de *Phytophthora* spp. como una herramienta rápida y de gran ayuda, siendo el caso más relevante la llevada a cabo por McDougal (2018) en Nueva Zelanda.

En las detecciones preliminares realizadas se detectaron un total de 26 estaciones positivas en el género *Phytophthora*. No obstante, este resultado se redujo a 9 teniendo en

cuenta las estaciones con positivos en más de una temporada del año. Esta alternativa de detección evita los falsos positivos, aspecto muy relevante ya que *Phytophthora* es un género muy difícil de identificar con certeza (Waterhouse *et al.*, 1963; Cooke *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; Duncan y Cooke, 2002) al estar integrado por especies con comportamientos muy diferentes dependiendo de la estación o temporada del año (Erwin y Ribeiro, 1996; Tjosvold *et al.*, 2007). Asimismo, este hecho refuerza la importancia de recolectar muestras de acículas en diferentes estaciones del año.

Las estaciones definidas como trampas fijas fueron las que mayor número de detecciones positivas en *Phytophthora* spp. obtuvieron, siendo 4 de las 8 trampas fijas las que reportaron positivos en las cuatro estaciones del año. Estas trampas fijas, junto a las 5 estaciones con resultado positivo en al menos dos estaciones del año, se corresponden con algunas de las zonas con mayores defoliaciones registradas, por lo que la hipótesis inicial de la participación de *Phytophthora* spp. como causante de los daños parecía inicialmente reforzada.

Sin embargo, con la aplicación de técnicas moleculares se confirmó la ausencia de especies del género *Phytophthora* con carácter defoliador, por lo que dicha hipótesis hubo de ser finalmente rechazada.

Se descarta la posibilidad de que *Phytophthora* no haya sido detectada debido al tipo de trampa empleado, ya que se ha demostrado que con la utilización de hojas de *Rhododendron* spp. es posible detectar un gran número de especies del patógeno (Erwin y Ribeiro, 1996; Ferguson y Jeffers, 1999; Themann *et al.*, 2002; Ivors *et al.*, 2004; Gevens *et al.* 2007; Hong *et al.*, 2010; Tooley y Carras, 2011; Huai *et al.*, 2013; Reeser *et al.*, 2015; Soto *et al.*, 2017).

De la misma forma, la aplicación de técnicas moleculares también excluye la posibilidad de que la estructura con forma de oogonio encontrada pueda pertenecer a *Phytophthora pluvialis*, al descartar aquéllas la existencia del patógeno. Esta estructura podría corresponderse con un oogonio perteneciente a otra especie de *Phytophthora* o de *Phytium*. La identificación inequívoca del género y la especie es imposible de realizar visualmente debido a la estrecha similitud existente entre ambos géneros, y entre las propias especies de cada género, debido a la variabilidad infraespecífica, a la superposición interespecífica de los aspectos morfológicos visualizados y a las numerosas especies nuevas identificadas en los últimos años (Ho, 2018).

Algunas de las estructuras observadas que sí pertenecen a los patógenos identificados son las conidias de *L. acicola* en diferente estado de desarrollo. Las esporas de *L. acicola* pueden diferenciarse de las *Dothistroma* spp. por su morfología (Schneider *et al.*, 2019). No obstante, siempre es recomendable la confirmación del resultado mediante la aplicación de métodos

moleculares. Por su parte, *D. septosporum* y *D. pini* no pueden ser diferenciados por la morfología de sus esporas y su diagnóstico requiere de la aplicación de técnicas moleculares. Para declarar una acícula como infectada mediante microscopía es suficiente con encontrar un cuerpo fructífero con una conidióspora característica separada (Bradshaw *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2019).

El presente trabajo también resaltó que resulta esencial el apoyo recíproco entre la microscopía y las técnicas moleculares en la identificación de los agentes patógenos. Mediante la utilización de microscopía pueden observarse estructuras que ayudan a describir con mayor claridad el patógeno reportado. Sin embargo, la microscopía no permite la detección de síntomas tempranos antes de que se formen conidiósporas, las cuales generalmente disminuyen tras la temporada primaveral (Sinclair y Lyon, 2005). Asimismo, el estudio de la morfología del patógeno precisa de experiencia previa del investigador en aspectos morfológicos (Soto *et al.*, 2017).

La utilización de PCR resulta fundamental, ya que gran parte de las acículas afectadas no presentan esporas, no pudiendo confirmarse, por tanto, la presencia de los patógenos mediante microscopía. Por consiguiente, la aplicación de técnicas moleculares, al permitir detectar tanto el tejido fúngico esporulado como el no esporulado, es menos dependiente de la temporada de esporulación fúngica, la cual es alcanzada entre mayo y septiembre en el Hemisferio Norte (Woods *et al.*, 2016; Schneider *et al.*, 2019). Asimismo, con la aplicación de métodos moleculares los resultados son más precisos, y puede abarcarse un mayor número de muestras en un menor tiempo.

En la extracción de ADN de las muestras para la aplicación de técnicas moleculares, a la hora de medir su pureza, se detectó que la relación de absorbancia 260/230 de 5 muestras era más baja que la que se considera óptima. Esto puede ser debido a la transferencia de carbohidratos, lo que frecuentemente es un problema para la realización de extracciones de ADN en material vegetal ya que muchos tejidos vegetales poseen compuestos con características químicas-físicas similares al ADN, de forma que pueden ser extraídos colectivamente junto al ADN (Wilfinger *et al.*, 1997).

Algunos carbohidratos pueden impedir la reacción PCR (Tecson-Mendoza *et al.*, 2005; GE Healthcare Bio-Sciences, 2009; Thermo Fisher Scientific Inc., 2012). Sin embargo, esto no ocurrió en el presente trabajo, y la reacción PCR y la electroforesis pudieron realizarse sin complicaciones. Otros autores como Ramos-Gómez *et al.* (2014) obtuvieron una relación

260/230, significativamente inferior al óptimo, en extracciones de ADN de productos vegetales y no obstante la PCR pudo realizarse sin mayor problema.

En la primera prueba PCR realizada utilizando cebadores específicos del género *Phytophthora* hubo una muestra con resultado positivo. Tras la repetición de la prueba con cebadores específicos de *P. pluvialis* y *P. pinifolia*, ambas especies fueron descartadas como posible patógenos asociado con las defoliaciones de acículas. Estos cebadores específicos tienen la capacidad de detectar el ADN de los patógenos de interés en muestras extremadamente escasas de hasta 2,5pg μl^{-1} (Durán *et al.*, 2009) por lo que se descarta la posibilidad de que los patógenos no fueran detectados debido a la escasez de muestra.

Tampoco es posible que la prueba fuese defectuosa, puesto que el control positivo de *Phytophthora cinnamoni* se manifestó de una forma muy intensa, lo que indica que el proceso se ejecutó correctamente.

Se descarta también la opción de que dicho resultado sea un positivo en una especie de otro género similar como *Pythium*, puesto que se utilizaron cebadores específicos (Drenth *et al.*, 2006). La implementación de este aspecto en la metodología resulta de gran importancia, ya que metodologías alternativas como la desarrollada por Cooke y Smith (2000) utilizan cebadores genéricos de secuenciación ITS, los cuales pueden amplificar un largo número de organismos, incluyendo oomicetos y especies del género *Pythium*.

Por último, el nivel de infección de la acícula infectada por el patógeno del género *Phytophthora* detectado por PCR fue muy bajo, ya que mostró un producto de amplificación en gel muy tenue, por lo que definitivamente el caso puntual encontrado parece resultar anecdótico.

Los cebadores específicos utilizados en las 87 muestras para la detección de *Lecanosticta acicola* y *Dothistroma* spp. permitieron la detección y el diagnóstico de *L. acicola* y *D. septosporum* en 58 y 14 muestras, respectivamente, lo que significa que el 80,56% de las muestras infectadas lo estaban por *L. acicola* mientras que el 19,44% restante lo estaba por *D. septosporum*. Resultados similares fueron obtenidos por de Urbina *et al.* (2017) en su estudio sobre la presencia de las bandas (“banda marrón” y “banda roja”) en el País Vasco, donde obtuvo que más del 80% de las muestras estaban infectadas por *L. acicola*. Sin embargo, de Urbina *et al.* (2017) sí diagnosticaron la presencia de *D. pini*, aunque en menos de un 1% de los casos y analizando un número más elevado de muestras y de un mayor número de plantaciones.

Estos resultados de abundancia relativa de *Dothistroma septosporum* obtenidos a escala autonómica no concuerdan con los obtenidos a escalas más amplias. A nivel mundial *D.*

septosporum es el patógeno de acículas más relevante, habiéndose detectado en 44 países de todos los continentes, frente a los en 13 países de *D. pini* (en Europa y Norteamérica) (Drenkhan *et al.*, 2016). Por su parte, *L. acicola* ha sido detectado en al menos 17 países de América (Thümen, 1878; Gibson, 1980; Evans, 1984; Stanosz, 1990; Sinclair y Lyon, 2005), Europa (Martínez, 1942; Ivanova y Bernadovicová, 2010; Jurc *et al.*, 2010; Pusz *et al.*, 2014; Novak-Agbaba y Halambek, 2015; Janousek *et al.*, 2016) y en China (Huang *et al.*, 1995).

A modo comparativo, en un estudio de detección de *D. septosporum*, *D. pini* y *L. acicola* en Suiza (Schneider *et al.*, 2019), donde también se analizaron 87 muestras, 19 (51%) fueron positivas en *D. septosporum*, 2 (5%) en *D. pini* y 17 (49%) en *L. acicola*. Es decir, comparativamente: (i) el número de muestras infectadas por *D. septosporum* fue ligeramente superior a las infectadas por *L. acicola*; (ii) el número de muestras no infectadas fue de 49, frente a las 15 reportadas en este estudio; (iii) no se detectó ninguna doble infección por *Dothistroma* spp. y *L. acicola*, mientras que en el presente estudio se detectaron 12; y (iv) se detectaron 2 casos por *D. pini*, frente a ninguno en el presente estudio.

Por otro lado, pese a que *L. acicola* fue el patógeno más abundante (presente en el 66,67% de las muestras analizadas) el ratio de positivos en *D. septosporum*/*L. acicola* obtenido para las 9 estaciones en las que se han aplicado técnicas moleculares fue de solo 1/1,3. Sin embargo, este valor no parece extrapolable al conjunto de las masas del País Vasco debido al pequeño número de estaciones comparadas. Así, según los datos facilitados por Neiker-Tecnalia, la proporción de estaciones infectadas por *L. acicola* puede llegar a ser más del doble que las infectadas por *D. septosporum* (Iturritxa, 2020).

Existen 7 estaciones donde se diagnosticó la presencia de tanto de *L. acicola* como de *D. septosporum*, lo que podría explicar el elevado nivel de defoliación existente en las mismas. Asimismo, tras la confirmación de la presencia de los dos tipos de apareamiento de ambos patógenos en las mismas plantaciones (de Urbina *et al.*, 2017) podría hipotetizarse la presencia de cruces sexuales, lo que daría lugar a una mayor diversidad genética que conllevaría un aumento de su capacidad de propagación y de la severidad de sus daños.

El porcentaje medio de defoliación de cada estación fue proporcional a la edad media de la masa, de forma que los árboles más adultos fueron los más dañados. Sin embargo, este resultado podría estar muy condicionado por el pequeño número de estaciones estudiadas y por el rango de edades considerado. De acuerdo con los resultados proporcionados por de Urbina *et al.* (2017) analizando 94 plantaciones de más de 30 años, 94 de entre 20-30 años, 65 de entre 15 y 20 años, y 58 de menos de 15, el 81 % de las plantaciones en las que se detectó la presencia

de los patógenos tenían menos de 25 años, y los síntomas fueron más severos en la parte inferior y media de la copa en los árboles de menos de 25 años.

Por lo que respecta a la influencia de los tratamientos selvícolas, las dos estaciones adultas con los niveles más altos de defoliación habían recibido en los últimos años un tratamiento selvícola de poda a 5 metros de altura. Según Gibson *et al.* (1964) existen indicios de que la poda puede incrementar el nivel de ataque y acelerar el inicio de la mortalidad en rodales afectados. Sin embargo, otros autores como Scott (1973), Hood y Ramsden (1996), Bulman *et al.* (2013) y de Urbina *et al.* (2017) obtuvieron que la realización de podas no aportó ningún resultado positivo significativo en el nivel de ataque. Finalmente, Gadgil (1984), Mullet *et al.* (2016) y Bulman *et al.* (2008) encontraron que pese a que las podas no eliminaron los patógenos sí redujeron el inóculo y el nivel de ataque.

En cuanto a las perspectivas futuras derivadas del cambio climático, que en el País Vasco previsiblemente implicará temperaturas más cálidas, cambios en la precipitación, mayor frecuencia de sequías e intensificación de los máximos de temperatura diarios (Moncho, 2009), puede propiciar cambios en los patrones de perturbación de las enfermedades forestales, de forma que los patógenos podrían volverse más activos, además de facilitar el establecimiento y la propagación de especies exóticas (Dale *et al.*, 2001).

Bajo este escenario, el actual modelo forestal vasco de gestión intensiva de plantaciones de *Pinus radiata* puede estar en serio peligro. Parece necesario, por tanto, afrontar esta problemática mediante la toma de decisiones técnicas, ya sea adoptando estrategias de control de los patógenos, realización de prácticas culturales, la mejora genética a través de la selección de genotipos resistentes a estas enfermedades o el fomento del conocimiento y la investigación de los patógenos foliares. Posiblemente la primera opción sea la que más dudas suscite, dada la animadversión existente en contra de la aplicación de fungicidas cuprosos, aunque hayan demostrado su eficacia y su bajo impacto ambiental durante décadas en países como Nueva Zelanda (Dyck, 2018). En cuanto a la investigación de los patógenos foliares, si bien no se han detectado especies defoliadoras del género *Phytophthora* en este trabajo, parece necesario continuar con los estudios sobre el comportamiento y la epidemiología de *D. septosporum* y *L. acicola*.

Alternativamente, sólo restaría la opción de la desaparición del modelo de gestión intensiva de pino radiata existente actualmente y la creación de un nuevo modelo basado en otras especies forestales, nativas o exóticas, que puedan adaptarse favorablemente a las

condiciones climáticas y ecológicas locales, sustituyendo el lugar que el pino radiata ha ocupado hasta ahora.

6. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, se desprenden las siguientes conclusiones:

Se ha desarrollado e implementado una metodología de detección e identificación temprana de los posibles patógenos foliares que satisface las necesidades de rapidez, eficacia y eficiencia que son requeridas por la actual crisis fitosanitaria del pino radiata en el País Vasco. Ello posibilitará realizar diagnósticos sin necesidad de una amplia experiencia en el reconocimiento morfológico de los patógenos. La implementación de esta metodología supuso una reducción del 755% en el número de preparaciones a realizar con respecto a la metodología habitualmente utilizada.

La implementación de esta metodología ha permitido abordar la hipótesis surgida de diferentes estudios llevados a cabo en Chile y Nueva Zelanda referida a la posible implicación de especies de *Phytophthora* con carácter defoliador en el sustancial aumento en la severidad de las defoliaciones que sufre el pino radiata en el País Vasco en los últimos años.

El análisis mediante métodos moleculares (PCR y electroforesis) de muestras con positivos en ensayos inmunológicos preliminares de detección de patógenos del género *Phytophthora* descartó definitivamente que especies de este género estén asociadas a las defoliaciones en el País Vasco. Sin embargo, sí se ha corroborado la amplia presencia de *Lecanosticta acicola* y *Dothistroma septosporum* en las plantaciones de la región. Es probable que el repentino incremento en la virulencia de las enfermedades causadas por estos dos hongos se deba a un aumento de su variabilidad genética y a los efectos ambientales derivados del cambio climático.

La mayor parte de las muestras infectadas recogidas lo estaban por *L. acicola*. Asimismo, el ratio de estaciones positivas en *D. septosporum* y en *L. acicola*, es de 7/9. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en el País Vasco, donde *L. acicola* fue también la especie más abundante, pero no concuerdan con la importancia de ambas especies a nivel mundial.

El porcentaje medio de defoliación de cada estación aumentó cuando fueron dos las especies de hongos presentes, lo que podría indicar la existencia de efectos sinérgicos entre ambas. Por otra parte, el porcentaje de defoliación fue proporcional a la edad media de la masa, de forma que los árboles más adultos fueron los más dañados. Sin embargo, este resultado podría estar muy condicionado por el pequeño número de estaciones estudiadas y por el rango de edades considerado.

Se ha verificado la importancia de compatibilizar el uso de métodos de análisis morfológico, inmunológico y los métodos moleculares para obtener unos resultados más fiables, especialmente en los casos donde se trata de identificar una especie no diagnosticada en la zona hasta el momento.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adan de Yarza, M. (1913) *La repoblación forestal en el País Vasco*. Conferencia de D. Mariano Adan de Yarza: Tolosa 29 de julio de 1913. San Sebastián: Imprenta de la Diputación Foral de Guipúzcoa, 38 pp.
- Agdia, Inc. (2017) “User guide for *Phytophthora* ImmunoStrip®”. 2pp.
- Ahumada, R. (2003) *Pathogens in commercial Eucalyptus plantations in Chile, with special reference to Mycosphaerella and Botryosphaeria species*. Trabajo Fin de Master. Universidad de Pretoria, Sudáfrica.
- Ahumada, R., Rotella, A., Slippers, B. y Wingfield, M. (2013) “Pathogenicity and sporulation of *Phytophthora pinifolia* on *Pinus radiata* in Chile”. *Australasian Plant Pathology*, 42 (4), pp. 413-420.
- Ainz Ibarrondo, M. J. (2008) “El monocultivo de pino radiata en el País Vasco: origen y claves de permanencia de un sistema de explotación contrario al desarrollo sostenible” *Estudios Geográficos*, 69 (265), pp. 335-356.
- Aizpuru, I., Atalán, I. P. y Garín, F. (1996) *Guía de los árboles y arbustos de Euskal Herria*. Vitoria-Gasteiz: Servicio de Publicaciones del Gobierno Vasco. 477pp.
- Alvarado-Marchena, R., Chacón-Cerdás, C., Alvarado-Ulloa, A., Schmidt-Durán, A. y Flores-Mora, D. (2017) “IDENTIFICATION OF *Phytophthora* spp. (OOMYCOTA, PERONOSPORA) AS A CAUSAL AGENT OF STEM ROT AND DIEBACK IN FIG TREES (*Ficus carica* var. ‘BROWN TURKEY’ OF COSTA RICA)”. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 12 (10), pp. 307-314.
- Angeles, J. G. C., Laurena, A. C. y Tecson-Mendoza, E. M. (2005) “Extraction of genomic DNA from the lipid-, polysaccharide-, and polyphenol-rich coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Molecular Biology*, 23, pp. 297-298.
- Arregui, A., Espinel, S., Aragonés, A. y Sierra, R. (1999) “Estimación de parámetros genéticos en un ensayo de progenie de *Pinus radiata* D. Don en el País Vasco”. *Invest. Agr. Sist. Rec. For.*, 8 (1), pp. 119-128.
- Aspiazu, A. O., de Montes, S., Foral de Vizcaya/Bizkaia, D. (2012). “Aspectos más relevantes de la sanidad forestal en Vizcaya/Bizkaia”. *Foresta*, 55, pp. 174-179.
- Bakshi, B. K. y Singh, S. (1968) “*Dothistroma* blight - a potential threat to *Pinus radiata* plantations in India”. *Indian Forester*, 94, pp. 824–825.
- Barnes, I., Crous, P. W., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2004) “Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*”. *Studies in Micology*, 50, pp. 551-565.

- Barnes, I., Wingfield, M. J., Carbone, I., Kirisits, T. y Wingfield, B. D. (2014) "Population structure and diversity of an invasive pine needle pathogen reflects anthropogenic activity". *Ecology and Evolution*, 4, pp. 3642-3661.
- Boline GmbH (2020) *Hyperladder-50bp*, *Bioline meridian Bioscience webpage*. Disponible en: <https://www.bioline.com/us/hyperladder-50bp.html> (Accedido: 5 enero 2020).
- Bradshaw, R. E. (2004) "Dothistroma (red-band) needle blight of pines and the dothistromin toxin: A review". *Forest Pathology*, 34, pp. 163-185.
- Bradshaw, R. E., Feng, Z., Schwelm, A., Yang, Y. y Zhang, S. (2009) "Functional analysis of a putative *Dothistroma* toxin MFS transportes gene". *Toxins*, 1, pp. 173-187.
- Brasier, C. y Webber, J. (2010) "Sudden larch death". *Nature*, 466, pp. 824-825.
- Bulman, L. S., Dick, M. A., Ganley, R. J., McDougal, R. L., Schwelm, A. y Bradshaw, R. E. (2013) "*Dothistroma* needle blight". *Infectious forest diseases*, pp. 436-457.
- Bulman, L. S., Ganley, R. J. y Dick, M. (2008) "Needle diseases of radiate pine in New Zealand". *Scion*, 80 pp.
- Bulman, L., Bradshaw, R., Fraser, S., Martín-García, J., Barnes, I., Musolin, D., La Porta, N., Woods, A., Diez, J., Koltay, A., Drenkhan, R., Ahumada, R., Poljaković-Pajnik, L., Queloz, V., Piškur, B., Doğmuş-Lehtijärvi, T., Chira, D., Tomešová-Haataja, V., Georgieva, M. y Tubby, K. (2016) "A worldwide perspective on the management and control of *Dothistroma* needle blight". *Forest Pathology*, 46.
- Cantero, A. (2014) "El futuro del pino radiata en el País Vasco". *Sustrai*, 102, pp. 52-55.
- Cobos-Suarez, J. M. y Ruiz-Urrestarazu, M. M. (1990) "Problemas fitosanitarios de la especie *Pinus radiata* D. Don en España, con especial referencia al País Vasco". *Plagas*, 16, pp. 37-53.
- Cooke, D. E. L. y Smith J. J. (2000) *An online resource for the molecular identification of Phytophthora species*. Disponible en: <https://web.archive.org/web/20081007065214/http://www.phytid.org/> (Accedido: 20 noviembre 2019).
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. y Brasier, C. M. (2000) "A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes". *Biol*, 30 (1), pp. 17-32.
- Critchfield, W. y Little, E. (1966) *Geographic Distribution of the Pines of the World*. Washington D.C., USA: Miscellaneous Publication 991, Department of Agriculture & Forest Service.
- Crous, P. W. (2009) "Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs". *Fungal Divers*, 38, pp. 1-24.

- Crous, P. W., Braun, U. y Groenewald, J. Z. (2007) “*Mycosphaerella* is polyphyletic”. *Stud. Mycol.*, 58, pp. 1- 32.
- Dale, V. H., Joyce, L. A., McNulty, S., Neilson, R. P., Ayres, M. P., Flannigan, M. D., Hanson, P. J., Irland, L. C., Lugo, A. E. y Peterson, C. J. (2001). “Climate change and forest disturbances”. *BioScience*, 51, pp. 723-734.
- Dans del Valle, F., Fernández de Ana Magán, F. y Romero García, Á. (1999) *Manual de selvicultura del pino radiata en Galicia Manuales técnicos*. Galicia: Universidad de Santiago de Compostela.
- Davidson, J. M., Werres, S., Garbelotto, M., Hansen, E. M. y Rizzo, D. M. (2003) “Sudden oak death and associated diseases caused by *Phytophthora ramorum*”. *Plant Health Progress Online*, 23.
- De Bary, A. (1876) “Researches into the nature of potato-fungus, *Phytophthora infestans*”. *Journal for the Royal Agriculture Society of England*, pp. 239-269.
- de Thümen, F. (1878) “Fungorum americanorum triginta species novae”. *Flora*, 61, pp. 177-184.
- de Urbina, E., Mesanza, N., Aragones, A., Raposo, R., Recuenco, M., Boqué, R., Patten, C., Aitken, J. e Iturriza, E. (2016) “Emerging Needle Blight Diseases in Atlantic *Pinus* Ecosystems of Spain”. *Forests*. 8 (18).
- de Urbina, E., Raposo, R., Recuenco, M., Aragones, A., Mesanza, N., Patten, C., Aitken, J. e Iturriza, E. (2015) “Outbreak of needle blight diseases in *Pinus radiata*: emerging forest diseases in the North of Spain”. *Iufro*, 75, pp. 1.
- Dick, M., Williams, N., Gardner, J., Bader, M. y Bulman, L. (2014). “Pathogenicity of *Phytophthora pluvialis* to *Pinus radiata* and its relation with red needle cast disease in New Zealand”. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 44 (10).
- Drenkhan, R., Hantula, J., Vuorinen, M., Jankovský, L. y Müller, M. M. (2013) “Genetic diversity of *Dothistroma septosporum* in Estonia, Finland and Czech Republic”. *European Journal of Plant Pathology*, 136, pp. 71-85.
- Drenkhan, R., Tomešová-Haataja, V., Fraser, S., Bradshaw, R., Vahalík, P., Mullett, M., Martín-García, J., Bulman, L., Wingfield, M., Kirisits, T., Cech, T., Schmitz, S., Baden, R., Tubby, K., Brown, A., Georgieva, M., Woods, A., Ahumada, R., Jankovský, L. y Barnes, I. (2016) “Global geographic distribution and host range of *Dothistroma* species: a comprehensive review”. *Forest Pathology*, 46.
- Drenth, A., Wagel, G., Smith, B., Sendall, B., O’Dwyer, C., Irvine, G. e Irwin, J. (2006) “Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species”. *Australasian Plant Pathology*, 35 (2), pp. 147-159.

- Duncan, J. M. y Cooke, D. E. L. (2002) "Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods". *Mycologist*, 16, pp. 59-66.
- Durán, A., Gryzenhout, M., Slippers, B., Ahumada, R., Rotella, A., Flores, F., Wingfield, B. D. y Wingfield, M. J. (2008) "*Phytophthora pinifolia* sp nov associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile". *Plant Pathology*, 57 (4), pp. 715-727.
- Durán, A., Slippers, B., Gryzenhout, M., Ahumada, R., Drenth, A., Wingfield, B. D., J. Wingfield y M. J., (2009) "DNA-based method for rapid identification of the pine pathogen, *Phytophthora pinifolia*" *FEMS Microbiology Letters*, 298 (1), pp. 99-104.
- Dyck, B. (2018) "Combatting Needle Blight in New Zealand Radiata Pine". *Forest Owners Association*.
- Echeverría, I. (1942) "Ensayo de tablas de producción del *Pinus insignis* en el norte de España". *Boletines del I.F.I.E.*, 22, 67 pp.
- Echeverría, I. y De Pedro, S. (1956) "*Pinus insignis*, crecimiento y producción en el norte de España, y aplicación a la elaboración de la pasta de celulosa" *I.F.I.E.*
- Elvira-Recuenco, M., Cacciola, S. O., Sanz-Ros, A., Garbelotto, M., Aguayo, J., Solla, A., Mullett, M., Drenkhan, T., Oskay, F. Kaya, A. Iturritxa, E., Cleary, M., Witzell, J., Georgieva, M., Papazova, I., Chira, D., Paraschiv, M., Musolin, D., Selikhovkin, A. y Diez, J. (2020) "Potential Interactions Between Invasive *Fusarium circinatum* and Other Pine Pathogens in Europe". *Forests* 1 (1), 32 pp.
- Environmental Systems Research Institute (2016) *ArcGIS Desktop (Versión 10.5)* [Programa de ordenador]. Disponible en: <https://www.esri.com/en-us/arcgis/products/arcgis-desktop-student-trial> (Accedido: 4 de marzo de 2019).
- Erwin, D. C. y Ribeiro, O. K. (1996) "*Phytophthora* diseases worldwide". *APS Press*. 562p.
- Evans, H. C. (1984) "The Genus *Mycosphaerella* and its Anamorphs *Cercoseptoria*, *Dothistroma* and *Lecanosticta* on Pines". *Mycological Papers*, 153.
- Fabre, B., Ios, R., Piou, D. y Marçais, B. (2012) "Is the emergence of dothistroma needle blight of Pine in France caused by the cryptic species *Dothistroma pini*?". *Phytopathology*, 102, pp. 47-54.
- Fang, Y. y Ramasamy, R. P. (2015) "Current and prospective methods for plant disease detection". *Biosensors*, 5 (3), pp. 537-561.
- Farjon, A. (2010) *A Handbook of the World's Conifers (Volume II)*. Leiden-Boston. 1112 pp.
- Ferguson, A. J. y Jeffers, S. N. (1999) "Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental crop nurseries". *Plant Dis*, 83 (12), pp. 1129-1136.

- Fernández de Ana, F. (1975) "La enfermedad de la banda roja en el *Pinus radiata*". *Comunicaciones del I.N.I.A., Serie Protección Vegetal*, 3, 16 pp.
- Flux, A., Gadgil, P. D., Bain, J. y Nuttal, M. J. (1993) "Forest health: forest, tree and woodprotection in New Zealand". *New Zealand: Ministry of Forestry*.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2011) *Introduction to Molecular Biology and genetic engineering*. Roma, 132 pp.
- Franich, R. A., Carson, M. J. y Carson, S. D. (1986) "Synthesis and accumulation of benzoic acid in *Pinus radiata* needles in response to tissue injury by dothistromin, and correlation with resistance of *P. radiata* families to *Dothistroma pini*". *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 28, pp. 267-286.
- Gadgil, P. D. (1967) "Infection of *Pinus radiata* needles by *Dothistroma pini*". *New Zealand Journal of Botany*, 5, pp. 498-503.
- Gadgil, P. D. (1984) "*Dothistroma* Needle Blight". *Forest Pathology in New Zealand*, 5, pp. 1-8.
- Galovic, V., Orlovic, S., Sadikovic, D., Pap, P., Markovic, M., Poljakovic-Pajnik, L. y Pekec, P. (2015) *Red band needle blight in Serbia*. Bosnia: Republic of Srpska, pp. 623.
- Ganley, R., Williams, N., Rolando, C., Hood, I., Dungey, H., Beets, P. y Bulman, L. (2014) "Management of red needle cast, caused by *Phytophthora pluvialis*, a new disease of radiata pine in New Zealand". *New Zealand Plant Protection*, 67, pp. 48-53.
- Garbelotto, M., Davison, J. M., Ivors, K., Maloney, P. E., Hüberli, D., Koike, S. T. y Rizzo, D. M. (2003) "Non-oak native plants are the main hosts for the sudden oak death pathogen in California". *Calif Agric*, 57, pp. 18-23.
- García, I. (2011) "*Diplodia pinea* (Desm.) Kickx y *Fusarium circinatum* Nirenberg y O'Donnell, principales hongos de chancro de las masas forestales de *Pinus radiata* D. Don del País Vasco". Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- GE Healthcare Life Sciences (2013) "Nucleic Acid Sample Preparation for Downstream Analyses. Principles and Methods". 167 pp.
- Gevens, A. J., Donahoo, R. S., Lamour, K. H. y Hausbeck, M. K. (2007) "Characterization of *Phytophthora capsici* from Michigan Surface Irrigation Water". *Phytopathology*, 97, 4, pp. 421-428.
- Gibson, I. A. S (1980) "Two pine needle fungi new to Colombia". *Tropical Pest Management*, 26, pp. 38-40.
- Gibson, I. A. S. (1972) "Dothistroma blight of *Pinus radiata*". *Annual Review of Phytopathology*, 10, pp. 51-72.

- Gibson, I. A. S. (1974) "Impact and control of *Dothistroma* blight of pines". *European Journal of Forest Pathology*, 4, pp. 89-100.
- Gibson, I. A. S. (1979) "Pests and diseases of pines in the tropics" *Joint Meeting of Iufro Working Parties*, Piedras Blancas, Colombia, 1978.
- Gibson, I. A. S., Christensen, P. S. y Munga, F. M. (1964) "First observations in Kenya on a foliage disease of pines caused by *Dothistroma pini* Hulbary". *Commonwealth Forestry Review*, 43, pp. 31-48.
- Gobierno de Chile, Agrícola y Ganadero, S. (2007) "IDENTIFICACION DE NUEVO HONGO EN FOLLAJE DE *Pinus radiata*". 1 pp.
- Gobierno Vasco (2020) *Mapa Forestal del País Vasco. Año 2018*. Disponible en: <https://www.euskadi.eus/mapa-forestal-del-pais-vasco-ano-2018/web01-a2kultur/es/> (Accedido: 20 mayo 2020).
- Greslebin, A. G. y Hansen, E. M. (2010) "Pathogenicity of *Phytophthora austrocedrae* on *Austrocedrus chilensis* and its relation with mal del ciprés in Patagonia". *Plant Pathology*, 59, pp. 604-612.
- Greslebin, A. G., Hansen, E. M. y Sutton W. (2007) "*Phytophthora austrocedrae* sp. nov., a new species associated with *Austrocedrus chilensis* mortality in Patagonia (Argentina)". *Mycol Res*, 111, pp. 308-316.
- Hanso, M. y Drenkhan, R. (2008) "First observations of *Mycosphaerella pini* in Estonia". *Plant Pathology*, 57.
- Hazi (2019a) *PROYECTO LIFE HEALTHY FOREST. Informe final de HAZI Fundazioa. Abril de 2019*. Arkaute: Fundación HAZI Fundazioa, 295 pp.
- Hazi (2019b) *Proyecto SUDOE Plurinfor. Informe final HAZI Fundazioa. Junio 2019*. Arkaute: Fundación HAZI Fundazioa, 302 pp.
- Hazi (2019c) "Informe de HAZI Fundazioa sobre el Inventario forestal del País Vasco-2019. El bosque vasco en cifras 2019".
- Hazi (2020) *Visor cartográfico del proyecto Life Healthy Forest*. Disponible en: <https://geo1.hazi.eus/healthy-forest/index.html> (Accedido: 2 febrero 2020).
- Ho, H. H. (2018) "The Taxonomy and Biology of *Phytophthora* and *Pythium*". *Journal of Bacteriology & Mycology*, 6.
- Hong, C., Gallegly, M., Richardson, P., Kong, P., Moorman, G., Lea-Cox, J. y Ross, D. (2010) "*Phytophthora hydropathica*, a new pathogen identified from irrigation water, *Rhododendron catawbiense* and *Kalmia latifolia*". *Plant Pathology*, 59, pp. 913-921.
- Hood, I. A. y Ramsden, M (1996) "*Dothistroma* Needle Blight on *Pinus Radiata* at Gambubal Forest". *Queensland Forest Research Institute*.

- Hood, I. A., Williams, N. M, Dick, M. A, Arhipova, N., Kimberley, M. O., Scott, P. M. y Gardner, J. F. (2014) "Decline in vitality of propagules of *Phytophthora pluvialis* and *Phytophthora kernoviae* and their inability to contaminate or colonise bark and sapwood in *Pinus radiata* export log simulation studies". *New Zealand Journal of Forestry Science*, 44.
- Huai, W. X., Tian, G., Hansen, E. M., Zhao, W. X., Goheen, E. M., Grünwald, N. J. y Cheng, C. (2013) "Identification of *Phytophthora* species baited and isolated from forest soil sand streams in northwestern Yunnan province, China". *Forest Pathology*, 43 (2), pp. 87-103.
- Huang, Z. Y., Smalley, E. B. y Guries, R. P. (1995) "Diferrentiation of *Mycosphaerella dearnessi* by cultural characters and RAPD analysis". *Phytology*, 85.
- loos, R., Fabre, B., Saurat, C., Fourrier, C., Frey, P. y Marcais, B. (2010) "Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and redband needle blights of pine". *Phytopathology*, 100, pp. 105-114.
- Irwin, J. A. G., Cahill, D. M. y Drenth, A. (1995) "*Phytophthora* in Australia". *Australian Journal of Agricultural Research*, 46, pp. 1311-1337.
- Iturritxa, E. (2020) Comunicación personal.
- Iturritxa, E. y Mesanza, N. (2017) *LIFE14 ENV/ES/000179- LIFE HEALTHY FOREST Early detection and advanced management systems to reduce forest decline caused by invasive and pathogenic agents*. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Eugenia_Iturritxa/publications (Accedido: 20 noviembre 2020).
- Ivanová, H. y Bernadovičová, S. (2010) "Species diversity of microscopic fungi on Austrian pines growing in urban greenery of Nitra town". *Folia Oecologica*, 37.
- Ivors, K. L., Hayden, K. J., Bonants, P. J. M.; Rizzo, D. M. y Garbelotto, M. (2004) "AFLP and phylogenetic analyses of North American and European populations of *Phytophthora ramorum*". *Mycol. Res.*, 108 (4), pp. 378-392.
- Ivory, M. H. (1967) "A new variety of *Dothistroma pini* in Kenya". *Transactions of the British Mycological Society*, 50, pp. 289-297.
- Ivory, M. H. (1972) "Resistance to *Dothistroma* needle blight induced in *Pinus radiata* by maturity and shade". *Transactions of the British Mycological Society*, 59, pp. 205-212.
- Jankovský, L., Palovčíková, D. y Bednářová, M. (2004). "*Picea pungens* Engelm. - a new host of dothistroma needle blight *Mycosphaerella pini* E. Rostrup detected in the CR". *Journal of Forest Science*, 50, pp. 235-236.

- Janoušek, J., Wingfield, M. J., Monsivais, J. G., Jankovský, L., Stauffer, C., Konečný, A. y Barnes, I. (2016) "Genetic analyses suggest separate introductions of the pine pathogen *Lecanosticta acicola* into Europe". *Phytopathology*, 106, (11), pp. 1413-1425.
- Jewell, F. F. (1983) "Histopathology of the brown spot fungus on longleaf pine needles". *Phytopathology*, 73, pp. 854-858.
- Jianren, Y. y Chuandao, L. (1988) "Study on seed transmission of brown spot fungus (*Schirrhia acicola*)". *J. Nanjing Inst. For.*, 12, 21.
- Jurc, D. y Jurc, M. (2010) "*Mycosphaerella dearnessi* occurs in Slovenia". *Plant Pathology*, 59, pp. 808.
- Kais, A. G. (1971) "Dispersal of *Schirrhia acicola* spores in southern Mississippi". *Plant Dis. Rep.*, 55, pp. 309-311.
- Kais, A. G. (1972) "Variation between southern and northern isolates of *Schirrhia acicola*". *The sixty-fourth annual meeting of the American Phytopathological Society*, México: 6-10 de Agosto de 1972, pp. 768.
- Kais, A. G. (1975) "Environmental factors affecting brown-spot infection on longleaf pine". *Phytopathology*, 65, pp. 1389-1392.
- Kanaskie, A., Hansen, E., Sutton, W., Reeser, P. y Choquette, C. (2011) "Application of phosphonate to prevent sudden oak death in south-western Oregon tanoak (*Notholithocarpus densiflorus*) forests". *New Zealand Journal of Forestry Science*, 41, pp. 177-187.
- Karadžić, D. (1989) "*Dothistroma* needle blight in Yugoslavia". *Foliage Disease Conference*. Carlisle, Pennsylvania, pp. 52-56.
- Lanfranco, D. (2000) "Manejo de plagas forestales en Chile: análisis de casos en *Pinus radiata*". *Sér. Téc. IPEF*, 13, pp. 41-48.
- Lavery P. B. (1986) "Plantation forestry with *Pinus radiata*". *Review papers, School of forestry, University of Canterbury*, 12, 255 pp.
- Lavery, P. B. y D. J. Mead (1998). "*Pinus radiata*: a narrow endemic from North America takes the world". *Ecology and Biogeography of Pinus*, pp. 452-449.
- Libby, W. J. (1997) "Native Origins of Domesticated Radiata Pine". *Forest Research Institute Bulletin*, 203, pp. 9-21.
- Mansilla, P., Pérez y R., Vela (1997) *Hongos de las acículas de Pinus sp. en las masas forestales gallegas*. Tomo V. Pamplona: Primer Congreso Forestal Hispano-Luso, pp. 247-252.
- Markovskaja, S. y Treigienė, A. (2009) "New data on invasive pathogenic fungus *Dothistroma septosporum* in Lithuania". *Botanica Lithuanica*, 15, pp. 41-45.

- Marmolejo, J. (2000) "The genus *Lecanosticta* from Nuevo Leon, Mexico". *Mycotaxon*, 76, pp. 393-97.
- Martin, F. y Tooley, P. (2004) "Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction amplified region of mitochondrial DNA". *Phytopathology*, 94, pp. 983-991.
- Martin, R., James, D. y Levesque, C. (2000) "Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management". *Annu Rev Phytopathol*, 38, pp. 207-239.
- Martínez, J. (1933) "Una grave micosis del pino observada por primera vez en España". *Boletín de la Sociedad Española de Historia Natural*, 1(XXXIII), pp. 25-26.
- Martínez, J. (1942) "La micosis del *Pinus insignis* en Guipúzcoa". *Boletín del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias*, 23, 72 pp.
- McCarthy, C. y Fitzpatrick, D. (2017) "Phylogenomic Reconstruction of the Oomycete Phylogeny Derived from 37 Genomes". *mSphere*, pp. 2.
- McDonald, P. y Laacke, R. (1990) "*Pinus radiata* D. Don". *Silvics of North America: 1 Conifers, Forest Service Agriculture Handbook*, 1 (654), pp. 433-441.
- McDougal, R. (2018) Comunicación personal.
- Mead, D. J. (2013) "Sustainable management of *Pinus radiata* plantations". *FAO Forestry Paper*, 170, 246 pp.
- Mesanza, N. (2020) Comunicación personal.
- Mesanza, N., Raposo, R., Recuenco, M., Hernandez-Escribano, L., Barnes, I., van der Nest, A., Pascual, M., Barrena, I., Martín, U., Cantero, A. e Iturritxa, E. (2019) "New Hosts for *Lecanosticta acicola* and *Dothistroma septosporum* in Spain". doi: 10.20944/preprints201912.0031.v1.
- Michel, M. (2006) "El pino radiata en la historia forestal vasca. Análisis de un proceso de forestalismo intensivo". *Munibe*, 23, 247 pp.
- Millberg, H., Hopkins, A., Boberg, J., Davydenko, K. y Stenlid, Jan (2016) "Disease development of *Dothistroma* needle blight in seedlings of *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* under Nordic conditions". *Forest Pathology*, doi:10.1111/efp.12242.
- Miller, S. A., Bhat, R. G. y Schmitthenner, A. F. (1994) "Detection of *Phytophthora capsici* in pepper and cucurbit crops in Ohio with two commercial immunoassay kits". *Plant Dis*, 78, pp. 1042-1046.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2013) *Cuarto Inventario Forestal Nacional. COMUNIDAD AUTÓNOMA DEL PAÍS VASCO / EUSKADI. 2013*. Madrid: Editorial MIC, 59 pp.

- Moncho, R., Chust, G. y Caselles, V. (2009) “Análisis de la precipitación del País Vasco en el periodo 1961–2000 mediante reconstrucción espacial”. *Nimbus*, 23, pp. 149-170.
- Mongil, J. (2019) *Implantación de especies forestales*. Madrid: Ediciones Paraninfo, 224 pp.
- Moran, G. F., Bell, J. C. y Eldridge, K. G. (1988) “The genetic structure and the conservation of the five natural populations of *Pinus radiata*”. *Can. J. For. Res*, 18, pp. 506-14.
- Moro, R. (2007) *Guía de los árboles de España*. 4ª ed. rev. Barcelona: Ediciones Omega, 408 pp.
- Muir, J. A. y Cobb, J. F. W. (2005) “Infection of radiata and bishop pine by *Mycosphaerella pini* in California”. *Canadian Journal of Forest Research*, 35, pp. 2529-2538.
- Müller, M. M., Hantula, J. y Vuorinen, M. (2009) “First observations of *Mycosphaerella pini* on Scots pine in Finland”. *Plant Disease*, 93, pp. 322–339.
- Mullett, M., Tubby, K., Webber, J. y Brown, A. (2016) “A reconsideration of natural dispersal distances of the pine pathogen *Dothistroma septosporum*”. *Plant Pathol*, 65, pp. 1462-1472.
- NanoDrop Technologies (2007) “260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers”. *Technical support bulletin*, T009, 2 pp.
- Novak-Agbaba, S. y Halambe, M. (2015) “The most important plant diseases on forest trees in the coastal region of Croatia”. *Bulletin OEPP/EPPO*, 45.
- Parke, J., Eberhart, J. (2020) *Forest Phytophthoras of the World*. Disponible en: <http://forestphytophthoras.org/> (Accedido: 15 diciembre 2019).
- Peterson, G. W. (1969) “Growth of germ tubes of *Dothistroma pini* conidia positively directed towards stomata of Austrian and ponderosa pine needles”. *Phytopathology*, 59, pp. 1044.
- Pusz, W., Pusz, W. K. W. y Kita, W. (2014) “The occurrence of Brown spot needle blight (*Mycosphaerella dearnesii*) on mountain pine (*Pinus mugo*) in Karkonosze Mountains”. *Progress in Plant Protection*, 54, pp. 252-253.
- Quaedvlieg, W., Groenewald, J. Z., Yáñez-Morales, M. D. J. y Crous, P. W. (2012) “DNA barcoding of *Mycosphaerella* species of quarantine importance to Europe”. *Persoonia*, 29, pp. 101–115
- Queloz, V., Wey, T. y Holdenrieder, O. (2014) “First record of *Dothistroma pini* on *Pinus nigra* in Switzerland”. *Plant Disease*, 98, pp. 1744

- Ramos, S., Busto, M. D., Perez, M. y Ortega N. (2014) "Development of a method to recovery and amplification DNA by real-time PCR from commercial vegetable oils". *Food Chem*, 158, pp. 374-383.
- Reeser, P. W., Sutton, W., Hansen, E. M., Goheen, E. M., Fieland, V. J. y Grunwald, N. J. (2015) "First Report of *Phytophthora occultans* Causing Root and Collar Rot on *Ceanothus*, *Boxwood*, *Rhododendron*, and Other Hosts in Horticultural Nurseries in Oregon, USA". *Plant Disease*, 1282.
- Reeser, P., Sutton, W. y Hansen, E. (2013) "*Phytophthora pluvialis*, a new species found in mixed tanoak-Douglas-fir forests of western Oregon". *USA. North American Fungi*, 8 (7), pp. 1-8.
- Reeser, P., Sutton, W., Ganley, R., Williams, N. y Hansen, E. (2015) "*Phytophthora pluvialis*". *Forest Phytophthoras*, 5.
- Rivas, S. (1987) *Memoria del mapa de series de vegetación de España. 1: 400.000*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 268 pp.
- Rizzo, D. M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. W. y Koike, T. (2002) "*Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* sp. and *Lithocarpus densiflorus* in California". *Plant Dis*, 86, pp. 205-214.
- Rodas, C. A., Wingfield, M. J., Granados, G. M. y Barnes, I. (2016) "Dothistroma needle blight: An emerging epidemic caused by *Dothistroma septosporum* in Colombia". *Plant Pathology*, 65, pp. 53-63.
- Rogers D. L. (2004) "In situ genetic conservation of a naturally restricted and commercially widespread species, *Pinus radiata*". *Forest Ecology and Management*, 197, pp. 311-322.
- Rogers, D. L., Matheson, C. A., Vargas, J. J. y Guerra, J. J. (2006). "Genetic conservation of insular populations of Monterey pine (*Pinus radiata* D. Don)". *Biodiversity and Conservation* 15, pp. 779-798.
- Romo, A. M. y Alamany, O. (1997) *Árboles de la Península Ibérica y Baleares: guía ilustrada para identificar y conocer todas las especies*. Barcelona: Editorial Planeta, pp. 83.
- Ruiz de la Torre, J. (1971) *Árboles y arbustos de la España peninsular*. Madrid: IFIE-ETSIM, 532 pp.
- Ruiz de la Torre, J., Gil Borrell, P., García-Viñas, J., González-Adrados, J. R., Díaz-Ordóñez, F. y Tarrío, F. (1990). *Catálogo de especies vegetales a utilizar en plantaciones de carreteras*. Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo, 500 pp.

- Saenz, D. y Cantero, A. (2001) *Elementos de planificación forestal en el País Vasco*. En Gobierno Vasco y Centro UNESCO Euskal Herria (eds.). Bilbao, pp. 87-91. Disponible en: <http://www.euskonews.eus/0108zkb/gaia10803es.html>
- Sánchez, F. y Rodríguez, R. (2012) "SELVICULTURA DE PINUS RADIATA". *Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Producción Vegetal*, 35 pp.
- Schena, L. y Cooke, D. E. L. (2006) "Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a 'molecular tool box' for the detection and characterization of *Phytophthora species*". *Microbiology Meth*, 67, pp. 70-85.
- Schneider, S., Jung, E., Queloz, V., Meyer, J. y Rigling, D. (2019) "Detection of pine needle diseases caused by *Dothistroma septosporum*, *Dothistroma pini* and *Lecanosticta acicola* using different methodologies". *Forest Pathology*, pp. 1-9.
- Scott, C. A. (1973) "The Influence of Low Pruning on *Dothistroma Pini* Infection in *Pinus radiata* in Kaingaroa Forest". *Forest Pathology Report*, 39, pp. 1-21.
- Scott, C. W. (1961) "Pino insigne (*Pinus radiata* D. Don)". *FAO, Estudios sobre silvicultura y productos forestales*, 14, 340 pp.
- Setliff, E. C. y Patton, R. F. (1974) "Germination behaviour of *Scirrhia acicola* conidia on pine needles". *Phytopathology*, 64, pp. 1462-1464.
- Shaw, G. R. (1914) "The genus *Pinus*". *Publications of the Arnold Arboretum*, 5, 96 pp.
- Shearer, B. L y Crane C. E. (2009) "Influence of site and rate of low-volume aerial phosphite spray on lesion development of *Phytophthora cinnamomi* and phosphite persistence in *Lambertia inermis* var. *inermis* and *Banksia grandis*". *Australasian Plant Pathology*, 38, pp. 288-304.
- Siggers, P. V. (1944) "The brown spot needle blight of pine seedlings". *US Department of Agriculture, Washington, D.C. Technical Bulletin*, 870, pp. 1-36.
- Sinclair, W. A., y Lyon, H. H. (ed.) (2005). *Disease of trees and shrubs*. Michigan, USA: Comstock Publishing Associates, 616 pp.
- Skilling, D. D. y Nicholls, T. H. (1974) "Brown spot needle disease - biology and control in Scotch pine plantations". *Forest Service Research Paper*, 109, pp. 1-19.
- Solheim, H y Vuorinen, M. (2011) "First report of *Mycosphaerella pini* causing red band needle blight on Scots pine in Norway". *Plant Disease*, 95, pp. 875.
- Soto, A., Alvarado, G., Pavía, Y., Santos, M., Pérez, L., Celaya, M. y Fernandez-Pavia, S. (2017) "Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación* Isolation and diagnosis protocols of *Phytophthora* spp. applied research approach". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola*, 8, pp. 1867-1880.

- Stanosz, G. (1990) "Premature needle drop and symptoms associated with brown spot needle blight on *Pinus strobus* in Northcentral Pennsylvania" *Phytopathology*, 80, pp. 124.
- Suto, Y. (2002) "Seasonal development of symptoms and conidial production and dispersal of *Lecanosticta acicola* in *Pinus thunbergii*". *Sci*, 11.
- Svetlana, M. y Treigienė, A. (2009) "New data on invasive pathogenic fungus *Dothistroma septosporum* in Lithuania". *Botanica Lithuanica*, 15, pp. 41-45.
- Tainter, F. H. y Baker, F.A. (1996) "Brown spot". *Principles of Forest Pathology*. New York, USA.: Wiley-Blackwell, pp. 467-492.
- Themann, K., Werres, S., Lüttmann, R. Y Diener, H. A. (2002) "Observations of *Phytophthora* spp. in water recirculation systems in commercial hardy ornamental nursery stock". *Plant Pathology*, 108 (4), pp. 337-343.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2012) "Solutions to common sources of error in the quantitative PCR workflow". 5 pp.
- Thyr, B.D. y Shaw, C. G. (1964) "Identity of the fungus causing red band disease on pines". *Mycologia*, 56, pp. 103-109.
- Tjosvold, S., Chambers, D. y Blomquist, C. (2007) "Seasonal symptom expression, laboratory detection success, and sporulation potential of *Phytophthora ramorum* on *Rhododendron* and *Camellia*". *Proceedings of the Sudden Oak Death Third Science Symposium*, 101.
- Tooley, P. W. y Carras, M. M. (2011) "Enhanced recovery of *Phytophthora ramorum* from soil following 30 days of storage at 4°C". *J. Phytopathol.*, 159 (9), pp. 641-643.
- Torres, J. (1975) *Patología Forestal*. Madrid: Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. 256 pp.
- Trueba Hernaiz, D. (1956) "Estudio económico de la agricultura vizcaína". *Revista de estudios Agrosociales*, 14, pp. 7-44.
- Urkola Goenaga, A. (2017) "Situación actual de los pinares de la provincia de Gipuzkoa en relación a las enfermedades defoliadores (*Dothistromas*) y *Fusarium circinatum*". Bilbao, 26 de octubre de 2017.
- van der Nest, Ariska, Wingfield, M., Janoušek, J. y Barnes, I. (2019) "*Lecanosticta acicola*: A growing threat to expanding global pine forests and plantations". *Molecular Plant Pathology*. doi: 20. 10.1111/mpp.12853.
- van Halder, I. (Coord.) (2002) *Guía de plagas y enfermedades forestales del sur de Europa*. IEFIC-Institut Européen de la Forêt Cultivée.

- Waterhouse, G. M. (1963) *Key to the species of Phytophthora de Bary*. Commonw, UK: *Mycol Inst. Kew*, 92 p.
- Watt, S. M., Kriticos, J. D., Alcaraz, S., Brown, V. A. y Leriche, A. (2009) "The hosts and potential geographic range of dothistroma needle blight". *Forest Ecology and Management*, 257, pp. 1505-1519.
- Wilfinger, W., Mackey, K. y Chomczynski, P. (1997) "Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity". *BioTechniques*, 22, pp. 474-478.
- Wolf, F. A. y Barbour, W. J. (1941) "Brown-spot needle disease of pines". *Phytopathology*, 31, pp. 61-73.
- Woods, A. J., Coates, K. D. y Hamann, A. (2005) "Is an unprecedented *Dothistroma* needle blight epidemic related to climate change?" *Bioscience*, 55, pp. 761-769.
- Woods, A. J., Martín-García, J., Bulman, L., Vasconcelos, M. W., Boberg, J., La Porta, N., Peredo, H., Vergara, G., Ahumada, R., Brown, A y Diez, J. (2016) "*Dothistroma* needle blight, weather and possible climatic triggers for the disease's recent emergence". *Forest Pathology*, 46, pp. 443-452.
- Wyka, S. A., McIntire, C. D., Smith, C., Munck, I. A., Rock, B. N., Asbjornsen, H. y Broders, K. D. (2018) "Effect of climatic variables on abundance and dispersal of *Lecanosticta acicola* spores and their impact on defoliation on eastern white pine". *Phytopathology*, 108.
- Yang, B., Ye, J., Bao, H., Liu, J. y Dong, Z. (2002) "Studies on the phytotoxic activities of LA-I and LA-II production by brown spot needle blight fungus (*Lecanosticta acicola*)". *Science*, 38, pp. 84-88.
- Yang, B., Ye, J., Bao, H., Lui, J. y Dong, Z. (2005) "Separation and purification, structure of LA-I toxin produced by brown spot needle blight fungus (*Lecanosticta acicola*)". *Science*, 41, pp. 86-90.