6º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

6CFE01-384

Montes: Servicios y desarrollo rural
10-14 junio 2013
Vitoria-Gasteiz

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Vitoria-Gasteiz, 10-14 junio de 2013
ISBN: 978-84-937964-9-5
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Hongos asociados al decaimiento de *Pinus halepensis* Mill. En España

BOTELLA L.[1,3], SANTAMARÍA O.[2] y DIEZ CASERO, J.J. [3]

[1] Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible, Universidad de Valladolid-INIA, Avda. Madrid 44, Edificio E, 34004 Palencia, España

[2] Dpt. Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal, Universidad de Extremadura, Ctra. Cáceres s/n., 06071 Badajoz, Spain

[3] Dpt. Forest Protection and Wildlife Management, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University, Zemedelska 3, 61300, Brno, Czech Republic.
E-mail: leticia.sanchez@mendelu.cz

Resumen

La riqueza y composición de especies fúngicas de acículas y ramillos fueron estudiadas en 55 masas de *Pinus halepensis* distribuidas por toda la Península Ibérica. El objetivo principal fue evaluar la relación existente entre las comunidades de hongos y las variables ambientales locales para así determinar las causas potenciales de la actual situación de decaimiento del pino carrasco en nuestro país. Un total de 35 taxones fueron aislados de 1980 cámaras húmedas. *Alternaria* complex fue el taxón más abundante, seguido de *Leptostroma pinastri, Aspergillus niger, Diplodia pinea* y *Phomopsis* sp. A nivel de árbol, el tejido resultó ser una variable respuesta significativa y la riqueza de especies fue mayor en acículas que ramillos. Por otro lado, el análisis multivariante demostró que las variables ambientales "edad", "elevación", "temperatura media", "iluminación y "disponibilidad de agua" influían significativamente sobre la composición de especies. Concretamente, la "temperatura media" resultó estar implicada en el debilitamiento de esta especie, apareciendo inversamente relacionada con la aparición de hongos fitopatógenos como *Brunchorstia pinea*, *Diplodia pinea*, *Naemacyclus niveus*, *Pestalotiopsis stevensonii* y *Sclerophoma pythiophila*. Este estudio demuestra un posible efecto combinado de estrés abiótico y biótico como causa principal del debilitamiento del pino carrasco en España.

Palabras clave

Estrés abiótico, *Pinus halepensis*, Patógenos forestales, Hongos, decaimiento

1. Introducción

El pino carrasco (*Pinus halepensis* Mill.) es una especie originaria de la región mediterránea, especialmente abundante en la parte occidental, entre España y Argelia. En nuestro país se encuentra ampliamente distribuido de forma natural a lo largo de la costa mediterránea e Islas Baleares, y en forma de repoblaciones en numerosos lugares de Castilla y León, como las comarcas orientales de Valladolid y las meridionales de Palencia, principalmente sobre cuestas con margas y yesos del Cerrato y Tierra de Campos. También aparece en las comarcas sorianas de Arcos de Jalón, Santa María de Huerta y San Esteban de Gormaz, etc. (ORIA DE RUEDA, 2002). El pino carrasco es una planta colonizadora con una

gran capacidad de expansión, por ello, es una de las especies con las que más se ha repoblado en los últimos decenios en toda la región mediterránea, ya que su rusticidad y sobriedad le permiten ser instalado en las condiciones más adversas. En este sentido, en la provincia de Palencia se repobló con pino carrasco durante el periodo de 1940-1980 una superficie de 2287 hectáreas, incluyendo únicamente las realizadas por el Patrimonio Forestal y por el antiguo ICONA (ABELLÓ, 1998).

A pesar de su resistencia a condiciones adversas, *Pinus halepensis* Mill. está sufriendo un debilitamiento generalizado en toda la Península Ibérica, tanto en masas naturales como en repoblaciones. Según los muestreos realizados en 1998 por la Dirección General para la Conservación de la Naturaleza o DGCONA bajo el marco del programa de la "Red Europea de Seguimiento de Daños en los Bosques (Nivel I)" los daños, lejos de estar localizados, se estaban manifestando en muchos puntos del país. No se conoce con seguridad la causa desencadenante de esta nueva patología aunque podría estar ligada a factores abióticos desfavorables que condicionan la salud de los bosques y predisponen a los árboles a desarrollar enfermedades provocadas por microorganismos (SPCAN, 1998).

Diversas especies de hongos se han asociado con el decaimiento del pino carrasco en España (SANTAMARÍA et al., 2007). Entre ellos, *Sirococcus strobilinus*, llamado en un principio *Fusarium strobilinum*, es una especie de hongo descrita en los últimos años y que ha sido relacionado con defoliaciones severas en España (MUÑOZ LÓPEZ, 1997). Otros hongos aislados frecuentemente de *Pinus halepensis* como *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. o *Ulocladium* spp. se describen frecuentemente como patógenos tanto de plantas leñosas como herbáceas (SOLDEVILLA, 1995). Por otra parte, *Aureobasidium* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* sp., *Trichoderma* spp. o *Trichotecium* spp. están descritos como saprófitos de *Pinus* spp. (BUTIN, 1995).

Un hongo a destacar es *Gremmeniella abietina*, ascomicete que causa chancros en tronco y ramas de muchas especies de coníferas de Norteamérica, Centro-Norte de Europa y Este de Asia (YOKOTA et al., 1974; DORWORTH, 1972; KAITERA et al., 1994) y cuya fase anamórfica denominada *Brunchorstia pinea* fue detectada por primera vez en España en 1929 (MARTÍNEZ, 1929) aunque no fue hasta 1999 cuando se aisló en masas reforestadas de *Pinus halepensis* en las provincias de Valladolid y Palencia, concretamente en las comarcas de Cerrato y Tierra de Campos (SANTAMARÍA et al., 2003).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo consistió en (i) identificar la composición de especies fúngicas en pies sintomáticos de *Pinus halepensis* distribuidos por toda la Península Ibérica, y (ii) determinar la relación existente entre la frecuencia de aparición de dichas especies con diferentes variables ambientales.

3. Metodología

3.1. Muestreo

Se eligieron 55 parcelas de *Pinus halepensis* procedentes de la "Red Europea de Seguimiento de Daños a Los Bosques (Nivel I)" repartidas por todo el área de distribución del pino carrasco en España. Las parcelas se visitaron durante los meses de Julio y Agosto de 2006, tomando tres muestras (tres ramas) de material vegetal correspondientes a tres árboles diferentes que presentaran síntomas de decaimiento (Figura 1). Un total de 165 árboles fueros muestreados (BOTELLA et al., 2010).

Para el estudio de la micoflora asociada a estas parcelas se seleccionaron una serie de las variables ambientales tomadas de la base de datos de la "Red Europea de Seguimiento de Daños a Los Bosques (Nivel I)" y del Atlas climático NIYEROLA et al. (2005).

3.2. Aislamiento fúngico e Identificación morfológica

De cada árbol se seleccionaron seis acículas y seis trozos de ramillo (0,5 cm diam., 0,5–1 cm largo, incluyendo la corteza) atendiendo a la presencia de síntomas causados por hongos. Este material fue procesado mediante cámara húmedas (SANTAMARIA & DIEZ 2005; ZAMORA et al., 2008). Este método consiste en incubar el material vegetal en placas Petri que contenían papel mojado, a temperatura ambiente (22 °C ± 2 °C) y con luz difusa. Las muestras utilizadas en este método no se esterilizaron superficialmente con el fin de encontrar tanto hongos endófitos como epífitos. Las cámaras húmedas se prepararon en una campana de flujo laminar, habiendo almacenado el material vegetal en bolsas para evitar contaminaciones tanto como fuera posible, ya que las muestras no fueron esterilizadas en superficie.

La identificación se llevó a cabo de acuerdo con características morfológicas, tales como tamaño, forma y color de las esporas, y de otras estructuras reproductivas. Diferentes claves taxonómicas fueron utilizadas para la identificación de hongos (HANLIN, 1998; GOIDANICH, 1990, SUTTON, 1980; KIFFER & MORELET, 1999).

Figura 1. *Distribución de las parcelas de la Red Europea de Seguimiento de Daños a Los Bosques (Nivel I) muestreadas.*

3.3. Análisis estadísticos

Estadística paramétrica con la Riqueza de Especies (RE)

A nivel de árbol, se hizo una ANOVA de 2 entradas con 'parcela', 'tejido vegetal' y su interacción como variables explicativas y la RE como variable respuesta. Se hizo la transformación Ln (x+1) para estabilizar la varianza residual. Para ello se utilizó SAS (Statistical Analysis Software v. 9.1.3) (Anonymous 1989).

Estadística multivariante con la distribución de especies

Se hizo un análisis canónico de correspondencias para ver la influencia de todas las variables edafoclimáticas disponibles sobre la distribución de especies fúngicas registradas. Se hizo una 'forward selection' usando el test de Monte Carlo para ver cuales de las variables

tenían un efecto significativo, con 499 permutaciones para los análisis exploratorios. Con las seis variables significativas, se hizo otro test de Monte Carlo pero con 999 permutaciones. Para ello se utilizó CANOCO para Windows versión 4.5 (Ter Braak and Smilauer 2002).

4. Resultados

4.1. Composición fúngica encontrada en las parcelas de la Red de Daños "Nivel 2".

La variable tejido claramente afectó a la riqueza específica registrada (BOTELLA et al., 2010), siendo ésta significativamente mayor en las acículas que en los ramillos. Se han identificado 35 especies diferentes de hongos asociados a acículas y ramillos de pino carrasco (Tabla1).

Tabla 1. Especies fúngicas, parcelas donde se encontraron y tejido.

Hongos[1]	Abrv. [2]	S[3]	R/A[4]	Parcelas donde fueron aislados y frecuencia de aislamiento en cada parcela (números entre paréntesis)[5]
Alternaria alternata complex* (Fr.:Fr.)Keissl.	*Ala*	39	16/62	4-ALB (2), 5-ZUJ (4), 7-BEN (2), 8-PUE (2), 9-YES (3), 10-MOG (3), 11-AMA (2), 14-ALM (2) 15-SAB (3), 16-FOR (2), 20-COF (1), 21-POR (2), 22-BUÑ (1), 24-AND (2), 29-NER (2), 27-REQ (3), 28-SIN (1), 32-ALA (3), 33-MIN (2), 34-FUE (1), 35-ARI (1), 36-MEQ (2), 37-CAS (2), 38-NON (5), 39-ANR (2), 40-BEL (2), 41-MAE (2), 42-MON (1), 45-HOR (2), 43-MUS (4), 44-BAT (1), 46-NAV (1), 47-SUR (3), 48-SAR (3), 50-CER (1), 51-MAI (1), 52-MOC (1), 53-LLI (1), 55-CEN (3).
Arthrinium caricicola Kunze ex Fr.	*Arc*	*4*	0/4	7-BEN (1), 17-CIE (1), 23-CHE (1), 32-ALA (1).
Arthrobotrys dactyloides Drechsler	*Ard*	*1*	1/0	12-VVA (1).
*Aspergillus niger*** Van Tieghem.	*Asn*	*24*	15/21	4-ALB (2), 5-ZUJ (3), 6-BAZ (1), 8-PUE (1), 10-MOG (1), 17-CIE (1) , 21-POR (1), 22-BUÑ (1), 24-AND (3), 29-NER (1), 27-REQ (1), 30-PAR (1), 33-MIN (1), 34-FUE (3), 31-0LA (1), 40-BEL (3), 39-ANR (2), 36-MEQ (1), 43-MUS (1), 46-NAV (1), 49-GRA (2), 50-CER (1), 51-MAI (2), 54-BAN (1).
Brunchorstia pinea (Karst.) Höhn	*Brp*	*1*	1/0	1-TOR (1).
Chaetomiun globosum Kunze ex Fries	*Chg*	*1*	1/0	17-CIE (1).
Chaetomium cochliodes Palliser.	*Chc*	*2*	2/1	22-BUÑ (1), 25-UTI (1).
Chaetomium atrobruneum Ames.	*Cha*	*2*	2/0	2-ARG (1), 13-MOR (1).
Chaetomium fusiforme Chivers.	*Chf*	*8*	5/5	5-ZUJ (2), 7-BEN (1), 17-CIE (2), 19-ELC (1), 22-BUÑ (1), 29-NER (1), 42-MON (1), 47-SUR (1).
Cladosporium herbarum (Pers.) Links. ex S. F. Gray	*Clh*	*11*	5/9	4-ALB (1), 13-MOR (1), 14-ALM (1), 18-VILL (1), 21-POR (1), 27-REQ (1), 43-MUS (2), 45-HOR (1), 53-LLI (1), 54-BAN (2), 55-CEN (2).
Camarosporium propinquum (Sacc.) Sacc.	*Cap*	*3*	1/2	32-ALA (1), 35-ARI (1), 45-HOR (1).
Cytospora sp. Ehrenb. ex Fr.	*Cy*	*8*	4/5	7-BEN (1), 10-MOG (1), 11-AMA (1), 28-SIN (1), 37-CAS (1), 42-MON (1), 47-SUR (2), 54-BAN (1).
Dichomera sp. Cooke.	*Di*	*6*	7/0	5-ZUJ (1), 10-MOG (1), 13-MOR (2), 26-TUE (1), 28-SIN (1), 45-HOR (1).
Diplodia pinea (Desm.) Kickx	*Dip*	*14*	27/11	1-TOR (1), 2-ARG (4), 10-MOG (1), 16-FOR (1), 19-ELC (2), 21-POR (2), 23-CHE (1), 25-UTI (1), 35-ARI (2), 46-NAV (2), 47-SUR (6), 52-MOC (8), 53-LLI (5), 55-CEN (2).

[1]Nomenclatura de las especies de hongos identificadas según el Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.NCBI.nlm.nih.gov). [2]Abreviaturas de los gráficos. [3]Número de parcelas donde se encontró dicho hongo. [4]Número de veces que se encontró el hongo en Ramillos (R) y Acículas (A). [5]Parcelas abreviadas. El nombre completo de las parcelas se puede encontrar en BOTELLA et al., 2010. * Taxón más probable determinado según las características analizadas. ** Posible contaminante de laboratorio.

Tabla 1 (Continuación). Especies fúngicas, parcelas donde se encontraron y tejido.

Hongos[1]	**Abrv. [2]**	**S[3]**	**R/A[4]**	**Parcelas donde fueron aislados y frecuencia de aislamiento en cada parcela (números entre paréntesis)[5]**
Diatripella sp. (Ces. & de Not) de Not.	*Di*	*3*	2/1	16-FOR (1), 22-BUÑ (1), 29-NER (1).
*Epicoccum nigrum*** Link.	*Epn*	*9*	5/5	2-ARG (1), 7-BEN (1), 10-MOG (2), 18-VILL (1), 19-ELC (1), 21-POR (1), 24-AND (1), 27-REQ (1), 46-NAV (1).
Gliocephalis sp.* Matr.	*Gl*	*1*	0/1	1-TOR (1).
Hendersoria acicola Münch et Tub.	*Hea*	*5*	5/1	1-TOR (1), 2-ARG (1), 3-COL (1), 4-ALB (1), 10-MOG (2).
Leptostroma pinastri (Desm.)	*Lep*	*32*	0/57	1-TOR (1), 2-ARG (2), 4-ALB (1) 5-ZUJ (2), 8-PUE (1), 9-YES (3), 10-MOG (3), 11-AMA (2), 13-MOR (2), 15-SAB (2), 18-VILL (1), 19-ELC (1), 20-COF (3), 22-BUÑ (2), 23-CHE (3), 29-NER (3), 25-UTI (2), 27-REQ (1), 30-PAR (1), 35-ARI (2), 32-ALA (2), 37-CAS (1), 39-ANR (2), 40-BEL (2), 41-MAE (1), 42-MON (2), 43-MUS (1), 44-BAT (2), 45-HOR (2), 50-CER (1), 52-MOC (2), 53-LLI (2).
Melampsora sp.*	*Me*	*2*	1/2	10-MOG (1), 19-ELC (2).
Naemacyclus niveus (Pers. ex Fr.) Fuck. ex Sacc.	*Nan*	*4*	0/5	32-ALA (2), 34-FUE (1), 44-BAT (1), 52-MOC (1).
Nectria coccinea (Pers.: Fr.) Fr.	*Nec*	*2*	3/0	40-BEL (2), 2-ARG (1).
Pestalotiopsis stevensonii Peck	*Pes*	*11*	7/11	1-TOR (2), 2-ARG (2), 12-VVA (1), 24-AND (1), 35-ARI (5), 36-MEQ (1), 37-CAS (2), 46-NAV (1), 51-MAI (1), 52-MOC (1), 55-CEN (1).
Penicillium sp.** *Link ex Fr.*	*Pe*	*12*	15/12	4-ALB (1), 6-BAZ (2), 11-AMA (3), 15-SAB (3), 20-COF (1), 22-BUÑ (2), 27-REQ (2), 36-MEQ(4), 37-CAS (1), 40-BEL (2), 48-SAR (1), 49-GRA (5).
Phoma sp. Sacc.	*Ph*	*10*	6/6	4-ALB (1), 10-MOG (1), 13-MOR (1), 15-SAB (1), 18-VILL (2), 20-COF (2), 45-HOR (1), 39-ANR (1), 40-BEL (1), 41-MAE (1).
Phomopsis sp. (Sacc.) Bubak.	*Pho*	*14*	9/8	7-BEN (1), 8-PUE (1), 10-MOG (1), 11-AMA (1), 14-ALM (3), 21-POR (1), 23-CHE (1), 24-AND (1), 26-TUE (1), 29-NER (1), 35-ARI (1), 42-MON (1), 46-NAV (1), 54-BAN (2).
Preussia sp. Fuckel	*Pr*	*1*	0/1	34-FUE (1).
*Rhyzopus stolonifer*** (Ehrenb. ex Fr.) Vuill.	*Rhs*	*6*	7/3	34-FUE (3), 39-ANR (2), 43-MUS (2), 44-BAT (1), 50-CER (1), 51-MAI (1).

Sclerophoma pithyophila (Corda.) Höhn	*Scp*	*11*	7/4	9-YES (1), 2-COL (1), 11-AMA (1), 22-BUÑ (1), 24-AND (1), 27-REQ (1), 28-SIN (1), 38-NON (1), 39-ANR (1), 40-BEL (1), 45-HOR (1).

[1]Nomenclatura de las especies de hongos identificadas según el Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.NCBI.nlm.nih.gov). [2]Abreviaturas de los gráficos. [3]Número de parcelas donde se encontró dicho hongo. [4]Número de veces que se encontró el hongo en Ramillos (R) y Acículas (A). [5]Parcelas abreviadas. El nombre completo de las parcelas se puede encontrar en BOTELLA et al., 2010. * Taxón más probable determinado según las características analizadas. ** Posible contaminante de laboratorio.

Tabla 1 (Continuación). Especies fúngicas, parcelas donde se encontraron y tejido.

Hongos[1]	**Abrv.[2]**	**S[3]**	**R/A[4]**	**Parcelas donde fueron aislados y frecuencia de aislamiento en cada parcela (números entre paréntesis)[5]**
Sordaria fimicola (Robergo ex Desmaz.)	*Sof*	*7*	6/1	4-ALB (1), 27-REQ (1), 29-NER (1), 37-CAS (1), 38-NON (1), 43-MUS (1), 49-GRA (1).
Spegazzinia sp.* Sacc.	*Sp*	*2*	0/2	5-ZUJ (1), 4-ALB (1).
Stachybotrys sp.* Cda	*St*	*10*	4/11	2-ARG (2), 6-BAZ (1), 7-BEN (2), 10-MOG (1), 12-VVA (1), 16-FOR (3), 17-CIE (1), 18-VILL (1), 19-ELC (1), 43-MUS (2).
Trichoderma viride Pers. ex S. F. Gray	*Trv*	*4*	0/4	1-TOR (1), 25-UTI (1), 31-OLA (1), 46-NAV (1).
Thyriopsis halepensis (Ck.) Thies & Syd.	*Thh*	*10*	0/14	13-MOR (1), 18-VILL (2), 16-FOR (2), 20-COF (1), 22-BUÑ (1), 23-CHE (1), 24-AND (2), 27-REQ (2), 39-ANR (1), 49-GRA (1).
Ulocladium sp. Preuss.	*Ul*	*6*	3/5	2-ARG (2), 4-ALB (1), 9-YES (2), 10-MOG (1), 16-FOR (1), 53-LLI (1).

[1]Nomenclatura de las especies de hongos identificadas según el Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.NCBI.nlm.nih.gov). [2]Abreviaturas de los gráficos. [3]Número de parcelas donde se encontró dicho hongo. [4]Número de veces que se encontró el hongo en Ramillos (R) y Acículas (A). [5]Parcelas abreviadas. El nombre completo de las parcelas se puede encontrar en BOTELLA et al., 2010. * Taxón más probable determinado según las características analizadas. ** Posible contaminante de laboratorio.

4.2. Presencia de especies fúngicas según la influencia de ciertas variables edafoclimáticas

La representación gráfica y la correspondiente explicación de estos resultados se puede observar en la figura 2. Las variables "temperatura media", "disponibilidad de agua" e "iluminación" parecen tener la mayor influencia sobre la distribución de las especies. El Eje 1 parece estar estrechamente relacionado con la temperatura media, la cual está directamente vinculada con la aparición de *Arthrobotrys dactyloides*, *Melampsora* sp., *Globosum* sp., *Chaetomium* sp., *Chaetomiun fusiforme*, *Spegazzinia* sp., *Hendersoria acicola* y *Aspergillus niger*, e inversamente relacionada con *Gliocephalis* sp., *Brunchorstia pinea*, *Cytospora* sp., *Diplodia pinea*, *Naemacyclus niveus* y *Pestalotiopsis stevensonii*. Asimismo, la variable "iluminación" se correlacionó positivamente con la variable "temperatura media" e inversamente con la variable "sombra". *Spegazzinia* sp., *Aspergillus niger* y *Hendersoria acicola* aparecen influenciados positivamente por la "exposición a la luz 'y *A. dactyloides* fue influenciado positivamente por la variable "sombra". Además, *Spegazzinia* sp. también fue influenciada por la altitud. Por otro lado, cuanto mayor es la pendiente, *Nectria coccinea*, *Phoma* sp., *Penicillium* sp., *Sordaria fimicola*, *Leptostroma pinastri* y *Thyriopsis halepensis* aparecen con más frecuencia. Por último, la "disponibilidad de agua" determina positivamente la aparición de *Nectria coccinea*, *Diplodia pinea* y *Naemacyclus niveus*.

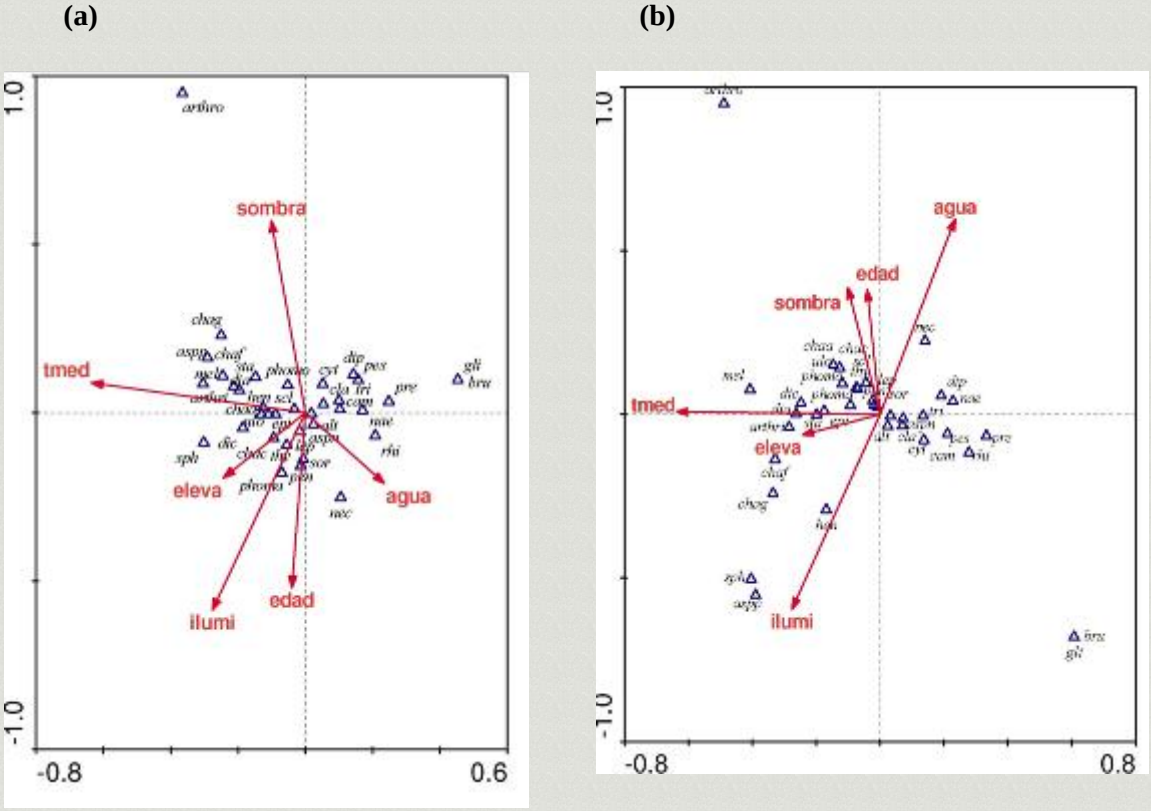

Figura 2. (a) Primer y segundo ejes, El eje explica el 27,5 % de la varianza y el eje 2 el 20,2% (b) Primer y tercer ejes para el Análisis de Correlación Canónica (CCA), El eje 1 explica el 27,5 % de la varianza y el eje 3 el 15,8%. Se demuestra una influencia significativa en la distribución de las especies. El nombre completo de las especies se puede observar en la tabla 1.

Los resultados del modelo fueron una F-ratio de 1,757 con un p-valor de 0,0010. Los autovalores (eighenvalues) de los ejes que se forman son los siguientes: eje 1 l=0,275; eje 2

l=0,202; eje 3 l=0,158; eje 4 l=0,124. Suma de todos los eighenvalues=4,99479.

5. Discusión

En los últimos años multitud de publicaciones han tratado de analizar los efectos del cambio climático sobre la salud de los bosques (THOMAS et al., 2002; ARNOLD, 2007; SIEBER, 2007; LA PORTA et al., 2008; GONTHIER et al., 2009; SPEER et al., 2009), incluyendo el efecto del calentamiento global sobre la aparición de nuevas enfermedades causadas por hongos que anteriormente no provocaban problemas serios. Los cambios abióticos pueden causar alteraciones fisiológicas en los árboles que pueden favorecer la propagación de patógenos y fomentar el desarrollo de enfermedades (BRANDT et al., 2003; DESPREZ-LOUSTAU et al., 2006; GONTHIER et al., 2006, 2009). En este sentido, las masas naturales de *Pinus halepensis* en España son altamente susceptibles a ciertos tipos de estrés abiótico, como la desertificación (LE HOUÉROU, 1992) o el aumento de la contaminación atmosférica (GIMENO et al., 1995; BUSSOTI & FERRETTI, 1998). Además, debido al carácter termófilo de esta especie, muchas de las repoblaciones del norte de la Península Ibérica que están fuera de su área de distribución natural se ven amenazadas por las frecuentes heladas (THOMSEN, 2009). Ante esta situación, muchas especies de hongos secundarios u oportunistas podrían formar parte del decaimiento generalizado del pino carrasco en España.

La mayoría de los hongos registrados en este estudio ya se habían descrito en otras coníferas (DANTI et al., 2002; MARTÍN et al., 2004; SANTAMARÍA & DIEZ, 2005; ZAMORA et al., 2008). Los hallazgos más interesantes, por su posible implicación en el decaimiento de *Pinus halepensis* fueron *Brunchorstia pinea*, *Cytospora* sp., *Diplodia pinea* (sin. Sphaeropsis sapinea Dyko y Sutton), *Hendersoria acicola*, *Leptostroma pinastri*, *Naemaclyclus niveus*, *Pestalotiopsis stevensonii*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Sclerophoma pythiophila* y *Thyriopsis halepensis*, y requieren un análisis más exhaustivo debido a su frecuencia de aparición en relación a las variables ambientales.

Leptostroma pinastri y *Thyriopsis halepensis*, que se han descrito anteriormente como patógenos de acículas (SIEBERCANAVESI et al., 1991; PHILLIPS & BURDEKIN, 1992) aparecieron relacionados con la edad. Cuanto más vieja era la masa, más frecuente era su presencia (LEHTIJÄRVI & BARKLUND, 2000; ARNOLD & HERRE, 2003). *Diplodia pinea*, *Naemacyclus niveus*, *Pestalotiopsis stevensonii*, *Cytospora* sp. y *Brunchorstia pinea* (anamorfo de *Gremmeniella abietina*) se asociaron negativamente con la temperatura media. Para explicar este hecho, es importante comprender que la temperatura constituye el factor limitante de la distribución natural de pino carrasco. Debido a su floración temprana es muy sensible a las bajas temperaturas, por lo tanto, su hábitat natural se distribuye generalmente por regiones templadas (temperatura media del mes más frío superior a -3 ºC) (GIL et al., 1996). En condiciones más frías, a pesar de desencadenar mecanismos de adaptación como retrasar la formación de acículas secundarias (CLIMENT et al., 2009), el árbol puede llegar a ser más débil y, por consiguiente, ser más susceptible a la infección de patógenos oportunistas. En particular, *Brunchorstia pinea* (SANTAMARÍA et al., 2003) es un hongo que crece a temperaturas más frías (THOMSEN, 2009), como ocurre en Tordehumos (1-TOR), Valladolid, donde a pesar de que la nieve es poco frecuente los inviernos son suficientemente fríos (alrededor de 60 días de helada por año).

Pestalotiopsis stevensonii y *Naemacyclus niveus*, que también han sido considerados patógenos secundarios de las acículas de pino (LANIER et al., 1978;. PHILLIPS & BURDEKIN, 1992), aparecieron asociados con *Diplodia pinea*, uno de los patógenos de pino

(STANOSZ et al., 2007) y de otras coníferas (PUNITHALINGAM & WATERSTON, 1970; FARR et al., 1989) más extendidos. *Diplodia pinea* parece estar ligeramente ligado a zonas con mayor disponibilidad de agua, lo que contrasta con estudios previos de *P. halepensis* (PAOLETTI et al., 2001.) y otras coníferas (BACHI & PETERSON, 1985; JOHNSON et al., 1997; STANOSZ et al., 2001). En tales estudios, ocurría un aumento de la susceptibilidad del árbol en condiciones deficientes de agua. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos por PAOLETTI et al., (2001), aunque el estrés de agua pueda favorecer el daño causado por *D. pinea*, no es un requisito previo necesario para que se produzca la colonización.

Phomopsis sp. y *Sclerophoma pythiophila* se identificaron con frecuencia en varias masas repartidas en toda la península (25,45% y 20%, respectivamente) y no parecen responder fuertemente a ninguna variable. Esto puede significar que son especies ubicuas, capaces de adaptarse a diferentes condiciones ambientales. De hecho, están descritas en multitud de hospedantes de todo el mundo (SUTTON & WATERSON, 1970). En España, se ha detectado en *Pinus halepensis* frecuentemente asociado a ramas sintomáticas donde también se encontraba *Gremmeniella abietina* (SANTAMARÍA et al., 2007, 2008). Sin embargo, en este estudio *Sclerophoma pythiophila* y *Gremmeniella abietina* no aparecen en la misma masa.

6. Conclusiones

En este estudio se identificaron 35 especies de hongos aislados de *P. halepensis* con síntomas de decadencia. Entre ellas diez especies tienen importancia fitopatológica. Sin embargo, de acuerdo con los daños observados, su patogenicidad no es lo suficientemente grave como para ser la única causa del estado actual de las masas de *P. halepensis*. Varias variables edafoclimáticas, tales como "la disponibilidad de agua", "sombra", "exposición a la luz", "edad", "elevación" y "temperatura media" parecen influir significativamente en la riqueza de especies y en la composición fúngica del pino Alepo; en particular, las bajas temperaturas, que son el factor limitante de la distribución natural del pino carrasco. Por lo tanto, la situación actual de *Pinus halepensis* en España podría ser causada por una acción combinada de factores abióticos, que predisponen la salud de los árboles y, consecuentemente, aumentan la presencia de hongos patógenos tradicionalmente conocidos como patógenos secundarios.

7. Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) en colaboración con la Universidad de Valladolid (UVA). Agradecer también al Centro de Datos del Servicio de Protección de Agentes Nocivos (CENDANA) el habernos proporcionado los datos edafoclimáticos utilizados en el análisis, y las coordenadas de las parcelas.

8. Bibliografía

ABELLÓ, M.A. (1998) Historia y Evolución de las Repoblaciones Forestales en España, pp. 749. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

ANONYMOUS (1989) SAS/STAT user´s guide, vol 1–2, 4th edn. SAS Institute, Cary.

ARNOLD, A.E. (2007) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biology Reviews 21: 51-66.

ARNOLD, A.E. and HERRE E.A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological patterns and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). Mycologia 95: 388-398.

BACHI, P.R., Peterson, J.L. (1985). Enhancement of *Sphaeropsis sapinea* stem invasion of pines by water deficits. Plant Disease 69: 798-799.
BOTELLA, L., Santamaría O. and DIEZ J.J. (2010) Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. Fungal Diversity 40: 1-11
BRANDT, J.P., CEREZKE, H.F., MALLETT, K.I., VOLNEY, W.J.A. and WEBER, J.D. (2003). Factors affecting trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) health in the boreal forest of Alberta, Saskatchewan, and Manitoba, Canada. Forest Ecology and Management 178: 287-300.
BUSSOTI, F. and FERRETI, M. (1998). Air pollution, forest condition and forest decline in Southern Europe: an overview. Environmental Pollution 101: 49-65.
CALAMASSI, R., PAOLETTI, E. and STRATI, S. (2001). Frost hardening and resistance in three Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) provenances. Israel Journal of Plant Sciences 49: 179-186.
CLIMENT, J., COSTA E SILVA, F., CHAMBEL, M.R., PARDOS, M. and ALMEIDA, M.H. (2009). Freezing injury in primary and secondary needles of Mediterranean pine species of contrasting ecological niches. Annals of Forest Sciences 66: 407.
DANTI, R., SIEBER, T.N. and SANGUINETI, G. (2002). Endophytic mycobiota in bark of European beech (*Fagus sylvatica*) in the Apennines. Mycological Research 106, 1343-1348.
DESPREZ-LOUSTAU, M., L., MARÇAIS, B., NAGELEISEN, L.M., PIOU, D. and VANNINI, A. (2006). Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. Annals of Forest Sciences 63: 597-612.
FARR, D., BILLS, G., CHAMURIS, G. and ROSSMAN, A. (1989). Fungi on plants and plant products in the United States, St. Paul, MN.
GIL, L., DÍAZ-FERNÁNDEZ, P.M., JIMÉNEZ, M.P., ROLDÁN, M., ALÍA, R., AGÚNDEZ, D., DE MIGUEL, J., MARTÍN, S. and DE TUERTO, M. (1996). Las regiones de Procedencia del *Pinus halepensis* Mill., Madrid.
GIMENO, B.S., PEÑUELAS, L., PORCUNA, J.L. and REINERT, R.A. (1995). Biomonitoring ozone phytotoxicity in eastern Spain. Water Air and Soil Pollution 85: 1521-1526.
GOIDANICH, G. (1990). Manuale di patologia vegetale. Edizioni Agricole della Calderini, Bologna, pp. 1283.
GONTHIER, P., GENNARO, M. and NICOLOTTI, G. (2006). Effects of water stress on endophytic mycota of *Quercus robur*. Fungal Diversity 21: 69-80.
HANLIN, R.T. (1998). Illustrated Genera of Ascomycetes, vol. I and II. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota.
JOHNSON, J.W., GLEASON, M.L., PARKER, S.K., PROVIN, E.B. and ILES, J.K. (1997). Duration of water stress affects development of *Sphaeropsis* canker on Scots pine. Journal of Arboriculture 23: 73-76.
KIFFER, E. and MORELET, M. (1999). The Deuteromycetes. Mitosporic Fungi. Classification and Generic Keys. Science Publishers Inc., Enfield, NH.
LA PORTA, N., CAPRETTI, P., THOMSEN, I.M., KASANEN, R., HIETALA, A.M. AND VON WEISSENBERG, K. (2008). Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. Canadian Journal of Plant Pathology 30: 177-195.
LANIER, L., JOLY, P., BONODOUX, P. and BELLEMERE, A. (1978). Mycologie et pathologie forestieres, vol. 1. Paris: Masson.
LEHTIJÄRVI, A. and BARKLUND, P. (2000). Seasonal patterns of colonization of Norway spruce needles by *Lophodermium piceae*. Forest Pathology 30: 187-193.

NINYEROLA, M., PONS X., ROURE J.M. (2005) Altas Climático Digital de la Península Ibérica. In: Metodología y aplicaciones en bioclimatología y geobotánica (ed) Bellaterra. Universidad Autónoma de Barcelona.
MARTÍN, P., PAJARES, J.A., NANOS, N. and DIEZ, J.J. (2004). Site and seasonal influences on the fungal community on leaves and stems of *Pinus* and *Quercus* seedlings in forest nurseries. Sydowia 56: 23-47.
MARTÍNEZ, J. 1933. Una grave micosis del pino observada por primera vez en España. Boletín de la Sociedad Española de Historia Natural 33, 25-29
MUÑOZ LÓPEZ, C. (1997). Presencia en España del hongo *Sirococcus conigenus* Cannon & Minter responsable de la muerte de brotes en *Pinus halepensis* Mill. XIV Reunión del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines, 110-111.
PAOLETTI, E., DANTI, R. and STRATI, S. (2001). Pre- and post- inoculation water stress affects *Spaheropsis sapinea* canker length in *Pinus halepensis* seedlings. Forest Pathology 31: 209-218.
PHILLIPS, D.H. and BURDEKIN, D.A. (1992). Diseases of Forest and Ornamental Trees. London: The Macmillian Press Ltd.
PUNITHALINGAM, E. and WATERSON, J., ed (1970). *Diplodia pinea.* Pathogenic fungi and bacterial, vol. 2. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
SANTAMARIA, O., BOTELLA, L. and DIEZ, J.J. (2008). *Gremmeniella abietina* in North-western Spain: Distribution and associated mycoflora. Acta Silvatica and Lignaria Hungarica, Spec. Edition: 137-145.
SANTAMARIA, O. and DIEZ, J.J. (2005). Fungi in leaves, twigs and stem bark of *Populus tremula* from northern Spain. Forest Pathology 35: 95-104.
SANTAMARIA, O., PAJARES, J.A. and DIEZ, J.J. (2003). First report of *Gremmeniella abietina* on *Pinus halepensis* in Spain. Plant Pathology 52: 425-425.
SANTAMARIA, O., TEJERINA, L., PAJARES, J.A. and DIEZ, J.J. (2007). Effects of associated fungi *Sclerophoma pythiophila* and *Cenangium ferruginosum* on *Gremmeniella abietina* dieback in Spain. Forest Pathology 37: 121-128.
SIEBER, B. (2007). Endophytic fungi of forest trees: are they mutualists? Fungal Biology Reviews 21: 75-89.
SIEBERCANAVESI, F., PETRINI, O. and SIEBER, T.N. (1991). Endophytic *Leptostroma* species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea* - a Cultural, Biochemical, and Numerical Study. Mycologia 83: 89-96.
SPCAN (1998). Distribución de Daños Soflamado Observados en *Pinus halepensis.*
SPEER, J.H., GRISSINO-MAYER, H.D., ORVIS, K.H. and GREENBERG, C.H. (2009). Climate response of five oak species in the eastern deciduous forest of the southern Appalachian Mountains, USA. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 39: 507-518.
STANOSZ, G.R., BLODGETT, J.T., SMITH, D.R. and KRUGER, E.L. (2001). Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. New Phytologist 149: 531-538.
STANOSZ, G.R., SMITH, D.R. and LEISSO, R. (2007). *Diplodia* shoot blight and asymptomatic persistence of *Diplodia pinea* on or in stems of jack pine nursery seedlings. Forest Pathology 37: 145-154.
SUTTON, B. C. and WATERSTON, J. M. (1970). *Colletotrichum musae.* CMI Description of pathogenic fungi and bacteria. CMI. No. 222.
SUTTON, B.C. (1980). The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

TER BRAAK, C.J.F., and SMILAUER, P. (2002) CANOCO Reference Manual and CANODRAW for User´s Guide version 4.5. Ithaca, NY
THOMAS, F.M., BLANK, R. and HARTMANN, G. (2002). Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. Forest Pathology 32: 277-307.
THOMSEN, I.M. (2009). Precipitation and Temperature as factors in *Gremmeniella abietina* epidemics. Forest Pathology 39: 56-72.
ZAMORA, P., MARTINEZ-RUIZ, C. and DIEZ, J.J. (2008). Fungi in needles and twigs of pine plantations from northern Spain. Fungal Diversity 30: 171-184.