

III. OTRAS DISPOSICIONES

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

- 9317** *Resolución de 27 de mayo de 2009, de la Subsecretaría, por la que se dispone la publicación del Acuerdo de encomienda de gestión entre la Secretaría General de Medio Rural y el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, para la realización del proyecto Etiología, epidemiología y control de «Fusarium circinatum».*

La Secretaria General de Medio Rural, del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y el Presidente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, del Ministerio de Ciencia e Innovación han suscrito, con fecha 30 de diciembre de 2008, un Acuerdo de encomienda de gestión para la realización del proyecto Etiología, epidemiología y control de «Fusarium circinatum».

Para general conocimiento, se dispone su publicación como anejo a la presente Resolución.

Madrid, 27 de mayo de 2009.—El Subsecretario de la Presidencia, Luis Herrero Juan.

ANEJO

Encomienda de Gestión entre el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino y el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria para la realización del proyecto Etiología, epidemiología y control de «Fusarium circinatum».

En Madrid, a 30 de diciembre de 2008.

REUNIDOS

De una parte, la señora doña Alicia Villauriz Iglesias, Secretaria General de Medio Rural, del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (MARM), en virtud del Real Decreto 576/2008, de 21 de abril («BOE» de 22 de abril), por el que se dispone su nombramiento.

Y de otra, el señor don Carlos Martínez Alonso Presidente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (en lo sucesivo INIA), con CIF Q-2821013-F, con sede en Madrid, Cra. de La Coruña, km 7,5, en representación del mismo, en virtud del Real Decreto 515/2008, por el que se dispone su nombramiento y actuando conforme a las atribuciones que le confiere el artículo 9 del Estatuto del INIA, aprobado por el Real Decreto 1951/2000, de 1 de diciembre.

Ambas partes se reconocen entre sí la capacidad legal suficiente para obligarse en este acto, y a tal efecto:

EXPONEN

Primero.—Que la Secretaría General de Medio Rural, del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, actúa conforme al artículo 149.1.13ª de la Constitución, por el que se reserva al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación de la planificación general de la actividad económica.

Segundo.—Que el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino asume las competencias atribuidas al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y al Ministerio de Medio Ambiente, en virtud del Real Decreto 432/2008, de 12 de abril, por el que se reestructuran los departamentos ministeriales.

Tercero.—Que el INIA, organismo autónomo adscrito al Ministerio de Ciencia e Innovación por el Real Decreto 432/2008, de 12 de abril, de reestructuración de los Departamentos ministeriales, actúa conforme a lo establecido en el Real Decreto 1951/2000, de 1 de diciembre, por el que se aprueba el Estatuto del Organismo y de acuerdo con el artículo 15 de la Ley 13/1986, de 14 de abril, de Fomento y Coordinación General de la Investigación Científica y Técnica, en virtud de la cual pueden celebrar Encomiendas de Gestión los Organismos Públicos de Investigación.

Cuarto.—Que forman parte de la Secretaría General de Medio Rural, del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino los siguientes organismos:

La Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos, en lo sucesivo DGRAG, que asume las funciones de la antigua Dirección General de Agricultura por el Real Decreto 438/2008, y por tanto es autoridad competente en materia de sanidad vegetal en virtud de lo establecido en la Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de Sanidad Vegetal y, aunque no cuenta con los recursos científicos necesarios para la realización de determinados trabajos relacionados con la investigación en este ámbito, dispone de crédito en el presupuesto para financiar la ejecución de los mismos.

La Dirección General de Medio Natural y Política Forestal, en lo sucesivo DGMNPF, que asume las funciones de la antigua Dirección General para la Biodiversidad por Real Decreto 438/2008, es el órgano competente en el desarrollo de la Ley de Montes en materia de sanidad forestal, en colaboración con el órgano competente (DGRAG citada en el párrafo anterior), de acuerdo con lo establecido en el artículo 7-d y 16 de dicha Ley y, aunque no cuenta con los recursos científicos necesarios para la realización de determinados trabajos relacionados con la investigación en este ámbito, dispone de crédito en el presupuesto para financiar parte de la ejecución de los mismos.

Quinto.—Que la enfermedad del chancro resinoso de los pinos causada por el hongo «*Fusarium circinatum*» en España se conoce desde mediados de los 90, aunque la primera cita se realiza tras la aparición de la enfermedad en viveros en Asturias y en una masa forestal en Cantabria en 2004 (Landeras «et al.», 2005) siendo ésta la primera referencia oficial de su detección en Europa, comunicándose a la Comisión Europea y a los demás Estados miembros, en aplicación del artículo 16.2 de la Directiva 2000/29/CE.

Sexto.—Que al tratarse de un organismo nocivo de cuarentena en la Unión Europea, fue necesario adoptar medidas de salvaguarda de conformidad con lo establecido en el artículo 16.2 del Real Decreto 58/2005 de 21 de enero por el que se adoptan medidas contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.

Séptimo.—Que estas medidas se han desarrollado en el Real Decreto 637/2006 de 26 de mayo («BOE» n.º 137 del 9 de junio) por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del hongo «*Fusarium circinatum*» Nirenberg et O'Donnell que en síntesis establece medidas de armonización y coordinación de actuaciones para localizar y erradicar al patógeno y eliminar cualquier riesgo de propagación.

Por todo lo expuesto, la Secretaría General de Medio Rural, del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino y el INIA acuerdan suscribir la presente Encomienda de Gestión que se regirá de conformidad con las siguientes

CLÁUSULAS

Primera. *Objeto de la encomienda de gestión y organización de los trabajos.*—El objeto de la presente Encomienda es establecer la financiación y ejecución de las actuaciones correspondientes al MARM y al INIA del Proyecto denominado Etiología, Epidemiología, y control de *Fusarium circinatum* en el que se pretende abordar diferentes aspectos relacionados con la etiología, la epidemiología y el control del chancro resinoso del pino, enfermedad de reciente aparición en España.

Segunda. *Desarrollo del proyecto.*—Debido a la amplia temática abordada por este proyecto, será desarrollado de forma coordinada por cinco grupos de investigación y dos grupos de apoyo que se señalan a continuación.

Grupos de investigación:

1. Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia, en adelante IAM-UPV.
2. Estación Fitopatológica do Areeiro (Diputación de Pontevedra), en adelante EFA.
3. Neiker (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo) (País Vasco) en adelante NEIKER.
4. Unidad de Entomología y Patología Forestales (Universidad de Valladolid-Palencia), en adelante EPF-UVA.
5. Laboratorio de Patología Forestal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria-Centro de Investigación Forestal, en adelante (INIA-CIFOR Madrid).

Grupos de apoyo en la investigación:

- A1. Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos (Junta de Castilla y León) (CSFC).
- A2. Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias (SVPA).

Tercera. *Financiación y forma de pago.*—El coste del proyecto para los tres años de duración se ha estimado en novecientos cincuenta mil euros (950.000 €) basándose en la memoria técnica que se adjunta presentada por los grupos de investigación, de los cuales el INIA aportará en total la cantidad de 200.000 €.

Las partes acuerdan contribuir a la financiación del citado proyecto de acuerdo con la siguiente distribución:

La Secretaría General del Medio Rural aportará las siguientes cantidades a través de sus dos órganos directivos:

DGRAG: 375.000 €.

DGMNPF: 375.000 €.

Por su parte, el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria aportará los citados 200.000 €.

Cuarta. *Evaluación económica y forma de pago.*—En el cuadro adjunto se expresa la distribución por anualidades de las aportaciones por las partes.

Organismo	Anualidades			
	2009	2010	2011	Total
DGRAG	125.000	125.000	125.000	375.000
DGMNPF	125.000	125.000	125.000	375.000
INIA	66.600	66.600	66.800	200.000
TOTAL	316.600	316.600	316.800	950.000

Las cantidades correspondientes a la DGRAG serán con cargo a la aplicación presupuestaria 21.21.412A.640.00 de los Presupuestos Generales del Estado correspondientes a las tres anualidades previstas. Estas cantidades serán ingresadas por la DGRAG al INIA mediante transferencia bancaria, a la firma del Acuerdo de Encomienda de Gestión la primera anualidad, y las siguientes en los años sucesivos de acuerdo con los informes sobre la ejecución del proyecto presentado a la Comisión de seguimiento de la Encomienda.

Del mismo modo las cantidades correspondientes a la DGMNPF serán cargadas a la aplicación presupuestaria 23.09.456C.640 de los Presupuestos Generales del Estado correspondientes a las tres anualidades previstas en la misma forma propuesta para la DGRAG.

De igual forma la cantidad correspondiente al INIA será con cargo a la aplicación presupuestaria 18.204.467D.640 de los Presupuestos Generales del Estado.

Las cantidades correspondientes a la DGRAG y la DGMNPF se abonarán mediante transferencia a la cuenta n.º 0182-2370-46-0200203535, en el Banco Bilbao Vizcaya Argentaria, C/ Alcalá 16, 28014, Madrid, a nombre del INIA.

El INIA se encargará de distribuir los fondos aportados por las tres partes entre los grupos de investigación que participan en el proyecto tal como se expone en el anexo técnico del proyecto.

Quinta. *Comisión de Seguimiento.*—Para el seguimiento de la presente Encomienda de Gestión se establecerá una Comisión que estará formada por un representante de cada una de las partes financiadoras nombrado por las mismas y el coordinador del proyecto.

La Comisión se reunirá como mínimo una vez al año, y siempre que se considere necesario por alguna de las partes. Será su función analizar el avance de los trabajos, los informes presentados, y decidir si se van cumpliendo los objetivos previstos, como paso previo a proponer el pago de la correspondiente anualidad. También adoptará las decisiones pertinentes en cuanto a examinar y autorizar la publicación de resultados que emanen de la presente Encomienda de Gestión, durante la vigencia de la misma.

Sexta. *Propiedad de los resultados.*—De los posibles derechos de propiedad industrial o intelectual, u otros de análoga naturaleza, que surjan de las actuaciones de la presente Encomienda de Gestión, serán cotitulares las partes en iguales proporciones.

Las partes signatarias se comprometen a que los resultados obtenidos sean publicados en revistas científicas o de divulgación, bien conjuntamente o, cuando menos, citando la labor de cooperación realizada por las otras.

Séptima. *Duración de la Encomienda de Gestión.*—La Encomienda de Gestión entrará en vigor el día siguiente de su firma y tendrá una duración de 3 años desde dicha fecha. Se prevé en caso de no finalización o retraso del conjunto de los trabajos la prórroga de la misma por el plazo de un año más, con el mismo aporte financiero anual de las instituciones involucradas que el previsto durante los años de duración de la Encomienda.

Octava. *Modificación y resolución.*—La presente Encomienda de Gestión podrá ser modificada o resuelta, de mutuo acuerdo entre las partes. No obstante, la resolución no afectará a la finalización de las actividades que estuvieran en ejecución.

Asimismo, cualquiera de las partes podrá resolver la presente Encomienda de Gestión, debido al incumplimiento de la otra, respecto a alguna de las cláusulas de la misma. El incumplimiento deberá ser comunicado a la parte incumplidora, mediante preaviso, de forma fehaciente, con al menos un mes de antelación, y previa audiencia de la misma. No obstante, esta resolución no afectará a la finalización de las actividades que estuvieran en ejecución.

Novena. *Naturaleza y jurisdicción.*—La presente Encomienda de Gestión tiene naturaleza administrativa y se formaliza de conformidad con lo dispuesto en el artículo 15 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre de Régimen jurídico de las Administraciones Públicas y Procedimiento Administrativo Común.

El conocimiento de las cuestiones litigiosas entre las partes corresponderá, en su caso, a los órganos competentes del orden jurisdiccional contencioso administrativo, de conformidad con la Ley 29/1998, de 13 de julio, reguladora de dicha jurisdicción.

La presente Encomienda de Gestión y su Resolución deberá ser publicada en el «Boletín Oficial del Estado».

En prueba de conformidad, así como para la debida constancia de lo convenido, ambas partes firman la presente Encomienda de Gestión, en triplicado ejemplar, en el lugar y fecha al principio indicados.—La Secretaria General de Medio Rural, Alicia Villauriz Iglesias.—El Presidente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Carlos Martínez Alonso.

ANEXO TÉCNICO

Proyecto «Etiología, epidemiología y control de *Fusarium Circinatum*»

Introducción

La enfermedad del chancro resinoso de los pinos está causada por el hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg et O'Donnell (teleomorfo: *Gibberella circinata* Nirenberg et O'Donnell). Fue citada por primera vez en Carolina del Norte en 1946 por Hepting y Roth. Desde entonces se han detectado focos en distintas áreas de Estados Unidos (Kuhlman et al., 1982; McCain et al., 1987), Japón (Muramoto y Dwinell, 1990), Méjico (Guerra-Santos, 1999), Sudáfrica (Viljoen et al., 1994), y Chile (Wingfield et al., 2002). Se trata de un hongo ascomiceto heterotálico con diferentes tipos de apareamiento, que bajo condiciones de laboratorio puede formar la facies *Gibberella* aunque ésta no se ha encontrado en la naturaleza.

La enfermedad afecta a diferentes especies de pino, siendo especialmente sensible *Pinus radiata*. También puede afectar a otras coníferas, como *Pseudotsuga menziesii*. *F. circinatum* puede afectar a los tejidos vegetativos y reproductivos de las plantas hospedantes independientemente de su estado de madurez: acículas, brotes, ramas, troncos, flores, piñas y semillas. Los síntomas de la enfermedad en árboles adultos se caracterizan por la presencia de chancros resinosos y muerte de ramas mientras que en semilleros y/o viveros se caracterizan por el amarilleamiento de las acículas basales, pudrición de cuello y raíces y, finalmente, la muerte de plántulas. Esta sintomatología no es específica de *F. circinatum* y puede ser confundida por la causada por otros hongos como *Sphaeropsis sapinea* o *Armillaria* spp. También puede confundirse con el daño causado por algunas plagas. De aquí la importancia del reconocimiento e identificación del patógeno en laboratorios con personal especializado en las técnicas morfológicas y moleculares necesarias para su identificación.

La infección de *F. circinatum* se produce a través de heridas naturales o provocadas por el hombre o por insectos. La dispersión se realiza por el viento, por insectos vectores, por semillas, por plántulas infectadas, por madera infectada y por el hombre. Los insectos que actúan frecuentemente como vectores pertenecen a los géneros *Ips*, *Pityophthorus*, *Conophthorus*, *Ernobius* y *Tomicus* (Romón et al., 2007).

No existen medidas de control eficaces para el control de *F. circinatum*. Mediante la utilización de técnicas culturales se puede intentar la reducción de la cantidad de inóculo presente en viveros y en masas forestales. Los focos afectados deben ser eliminados in situ. Entre otras medidas de control se encuentran: la desinfección de herramientas de poda, la poda de ramas afectadas (teniendo en cuenta que esta técnica puede reducir el avance de la enfermedad pero no la elimina), evitar la replantación con especies susceptibles en zonas afectadas, evitar recolección y transporte de semillas de zonas afectadas, control de insectos vectores, y desinfección de semillas. Hay que tener en cuenta que *F. circinatum* puede encontrarse de forma superficial en la semilla, de forma interna detectable con medios de cultivo selectivos y de forma interna no detectable (Storer et al. 1998).

Situación en España

Aunque la presencia de la enfermedad en España se conoce desde mediados de los 90, la primera cita de la enfermedad del chancro resinoso de los pinos se realiza tras la aparición de la enfermedad en viveros en Asturias y en una masa forestal en Cantabria en 2004 (Landeras et al., 2005). Esta fue la primera referencia oficial de su detección en Europa, siendo comunicado a la Comisión Europea y a los demás Estados miembros, en aplicación del artículo 16.2 de la Directiva 2000/29/CE.

Al tratarse de un organismo nocivo de cuarentena en la UE, fue necesario adoptar medidas de salvaguarda de conformidad con lo establecido en el art. 16.2 del RD 58/2005 de 21 de enero por el que se adoptan medidas contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.

Estas medidas, se han desarrollado en el Real Decreto 637/2006 de 26 de mayo («BOE» n.º 137 del 9 de junio de 2006) por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg et O'Donnell que en síntesis establece medidas de armonización y coordinación de actuaciones para localizar y erradicar al patógeno y eliminar cualquier riesgo de propagación.

Desde la detección del primer foco de la enfermedad en 2004, se han prospectado masas forestales y viveros para conocer la distribución del patógeno y los daños causados por la enfermedad. La enfermedad ha sido detectada en *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. sylvestris* y *P. nigra*. El hongo ha sido aislado de semillas, plántulas y plantas adultas.

La introducción de patógenos forestales en nuevas zonas puede suponer un impacto económico, ecológico y social (Wingfield et al. 2001). En este caso particular, la presencia de *F. circinatum* en España puede suponer una amenaza para la producción de pinos y para las industrias que dependen de ellos. La presencia del patógeno supone pérdidas en la producción, imposibilidad de exportación y altos costes para prospectar y controlar la enfermedad. Adicionalmente, los nuevos patógenos pueden presentar una diversidad genética o nuevos tipos de apareamientos que pueden ser tan devastadores como la introducción de un patógeno desconocido (Crous y Groenewald 2005). Por este motivo es necesario estudiar la situación de *F. circinatum* en España: zonas afectadas, caracterización del hongo, estudio de poblaciones, proceso infeccioso, hospedantes, insectos vectores, transmisión, supervivencia y diferentes medidas de control., aspectos que serán abordados en el presente Proyecto.

Debido a la amplia temática abordada este Proyecto será desarrollado de forma coordinada por cinco grupos de investigación y dos grupos de apoyo que se señalan a continuación. Se presentan también las siglas de cada uno de dichos grupos, que serán las utilizadas en la metodología para señalar los grupos implicados en cada uno de los objetivos del Proyecto.

Grupos de investigación:

1. Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia (IAM-UPV).
2. Estación Fitopatológica do Areeiro (Deputación de Pontevedra) (EFA).
3. Neiker (País Vasco) (NEIKER).
4. Unidad de Entomología y Patología Forestales (Universidad de Valladolid-Palencia) (EPF-UVA).
5. Laboratorio de Patología Forestal, CIFOR-INIA (Madrid) (CIFOR-INIA).

Grupos de apoyo en la investigación:

- A1. Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos (Junta de Castilla y León) (CSFC).
- A2. Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias (SVPA).

Objetivos

En el presente proyecto de investigación se pretende abordar diferentes aspectos relacionados con la etiología, la epidemiología y el control del chancro resinoso del pino, enfermedad de reciente aparición en España. En concreto los objetivos que se pretende abordar en el proyecto y que serán abordados en profundidad en el apartado de metodología y plan de trabajo son los siguientes:

Etiología.

Diagnóstico: Puesta a punto de un método molecular de detección y diagnóstico de *F. circinatum* en semillas, plantas y madera.

Caracterización de *F. circinatum*.

Estudio del proceso infeccioso de *F. circinatum* en piñas.

Comportamiento de diferentes especies de coníferas frente a *F. circinatum*.

Epidemiología.

Determinación de la presión de inóculo de *F. circinatum* presente en masas forestales afectadas.

Seguimiento de la enfermedad en masas forestales.

Estudio de la transmisión de *F. circinatum* mediante insectos vectores.

Supervivencia del inóculo de *F. circinatum* en suelo y madera.

Control.

Desarrollo de un método de control de *F. circinatum* en semillas mediante termoterapia con agua caliente.

Estudio de la efectividad de los tratamientos químicos en el control de la enfermedad.

Desarrollo de métodos de control biológico.

Estudio de la efectividad de distintos métodos selvícolas en la erradicación de *F. circinatum* en parcelas afectadas.

Elaboración de una propuesta de actuaciones para el manejo del material vegetal y el control de *F. circinatum*.

Metodología y plan de trabajo

1. Etiología.

1.1 Puesta a punto de un método molecular de detección y diagnóstico de *F. circinatum* en semillas, plantas y madera.

Este estudio se llevará a cabo por los grupos 2 (EFA) para semillas y plantas y 5 (CIFOR-INIA) en el estudio de madera.

Semillas y plantas.

La metodología actual de detección de *F. circinatum* en planta y, sobre todo, en semilla tiene, entre otros, el inconveniente de ser un proceso largo y costoso. Por tal motivo se pretende desarrollar y poner a punto un protocolo rápido y fiable para la detección e identificación de este hongo en semillas y plantas basado en técnicas moleculares mediante la utilización de primers específicos de la región IGS del ADN ribosomal en PCR convencional y en tiempo real.

Se diseñará un método de extracción que permita obtener un ADN óptimo directamente de la parte aérea de plantas y semillas de *Pinus pinaster* afectadas naturalmente por el patógeno sin necesidad de obtener el micelio aislado en medio agarizado. El método deberá permitir el diagnóstico de *F. circinatum* a partir de poca o de gran cantidad de muestra (0,1-100 g). Tras la homogeneización del material vegetal de partida se aplicarán los correspondientes protocolos de los métodos de extracción seleccionados hasta obtener una solución de ADN de gran pureza y libre de inhibidores que pueda ser utilizada para llevar a cabo las posteriores técnicas moleculares.

La concentración y pureza del ADN extraído se calculará mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm. Se realizarán pruebas de sensibilidad con diluciones seriadas del ADN genómico para establecer el rango de detección de la técnica. Las amplificaciones por PCR convencional y en tiempo real se llevarán a cabo utilizando la pareja de primers CIRC1A-CIRC4A según las condiciones propuestas por Schweigkofler et al. (2004). Estos primers están ubicados en la región IGS del rDNA y ya han sido validados para identificar aislados españoles (Pérez-Sierra et al., 2007).

Los experimentos de PCR en tiempo real se efectuarán en un termociclador Icyler (Bio-Rad) utilizando como fluorescente SYBR-Green.

Madera.

Una de las consecuencias más graves de la infección de coníferas por *F. circinatum* es la limitación que se impone a la libre circulación geográfica de la madera (en trozas o aserrada). Por esta razón se plantea poner a punto un método sensible de detección del hongo en la madera, que permita determinar su presencia con rapidez y fiabilidad. Se desarrollará un método de detección de *F. circinatum* directamente en madera, basado en técnicas moleculares mediante la PCR, usando los primers CIRC1A y CIRC4A.

En árboles infectados se tomarán muestras de ramas de hasta 10 cm de diámetro y 20 cm de longitud. Se empaquetarán cuidadosamente en bolsas precintadas para su transporte al laboratorio, donde serán procesadas. En el laboratorio se tomarán secciones de las ramas (incluyendo o no la corteza). Una mitad de la rama se procesará para su detección en medio de cultivo, mientras que la otra mitad será usada para poner a punto distintos medios de extracción de ADN y detección por PCR. Se probarán distintos kits comerciales de extracción para determinar el de mayor sensibilidad. Una vez puesta a punto las condiciones de PCR para muestra de madera se comparará el resultado con la detección por medios convencionales de crecimiento del hongo en medio de cultivo.

Del mismo modo se procederá para determinar el método más sensible de extracción de mRNA. Una vez determinado, se usará para detectar el hongo en madera aserrada (en este caso, tableros de madera aserrada de 1,5 m longitud y 5 cm de ancho) sometida a distintos grados de temperatura y duración, para poder conocer la viabilidad del hongo en los productos transformados procedentes de madera infectada. En el CIFOR se cuenta con un secadero adecuado para el secado de maderas, que permite medir la temperatura alcanzada en el centro de una probeta de madera. La detección del hongo vivo se realizará mediante la técnica de PCR a tiempo real usando mRNA primeramente en una RT-PCR (retrotranscriptasa PCR).

Toda la madera que se maneje infectada será quemada para garantizar la destrucción del hongo.

1.2 Caracterización de *F. circinatum*.

Se estudiará la variabilidad morfológica, genética y molecular de *F. circinatum*. Los grupos 1 (IAM-UPV) y 3 (NEIKER) realizarán este estudio a partir de una colección amplia de aislados españoles representativos de diferentes orígenes geográficos, hospedantes y materiales de origen (semillas, plántulas, plantas adultas) junto con aislados de referencia procedentes de colecciones de otros países. El grupo 2 (EFA) se centrará en el análisis particular y exhaustivo de aislados procedentes de plantas adultas en plantaciones establecidas de *P. pinaster* distribuidas por la provincia de Pontevedra, tanto de madera como de semillas procedentes de piñas recogidas de la parte aérea de estos árboles, así como de plántulas de *P. pinaster* procedentes de los viveros oficiales de Galicia.

De los apartados siguientes, la caracterización morfológica y molecular será abordada por los grupos 1 (IAM-UPV) y 2 (EFA), a excepción de los estudios de secuencias conservadas de ADN, los análisis de marcadores basados en secuencias polimórficas y el análisis de marcadores moleculares AFLP, que serán estudiados únicamente por el grupo 1 (IAM-UPV). Por su parte, el estudio de análisis de VCG será abordado exclusivamente por el grupo 3 (NEIKER).

Caracterización morfológica.

La caracterización morfológica se realizará partiendo de aislados monospóricos del patógeno, los cuales se harán crecer en dos medios: PDA y SNA. En SNA se estudiará el desarrollo de las células conidiogénicas en mono y polifialidas, la forma, tamaño y septos de los conidios y la presencia y forma de las hifas estériles características de esta especie. En PDA se estudiará el color y la velocidad de crecimiento de la colonia. Se tratará de establecer si existen diferencias morfológicas entre los aislados MAT-1 y MAT-2 los cuales serán identificados molecularmente como se detalla a continuación.

Caracterización molecular.

La caracterización molecular de *F. circinatum* se realizará mediante la extracción de ADN a partir de micelio aislado en cultivo. La amplificación se llevará a cabo con los primers CIRC1A-CIRC4A según las condiciones propuestas por Schweigkofler et al. (2004). Los aislados de *F. circinatum* tienen que presentar un amplicón con un tamaño de 360 pares de bases.

Se determinarán los idiomorfos MAT-1 y MAT-2 a partir de los aislados monospóricos de *F. circinatum*. La determinación de los «mating types» se realizará por técnicas

moleculares utilizando primers específicos para cada uno de los MAT siguiendo el protocolo propuesto por Wallace y Covert (2000).

La extracción del ADN se llevará a cabo a partir de micelio fresco en placa utilizando el EZNA Fungal DNA Miniprep kit (Omega Bio-Tek). La reacción de múltiplex PCR se realizará en PCR convencional (Wallace y Covert, 2000) y en PCR en tiempo real (Schweigkofler et al, 2004).

Adicionalmente, se estudiará la estructura genética de las poblaciones españolas correspondientes a cada región geográfica. Para ello, se analizarán las posibles relaciones filogenéticas entre los aislados de ambos MATs pertenecientes a las diferentes poblaciones y aislados procedentes de colecciones internacionales mediante tres aproximaciones:

1. Secuencias conservadas de ADN. Se analizarán los intrones del gen del factor de elongación de la transcripción 1 α (Geiser et al., 2004) y la región completa de la IGS de los genes nucleares del ARN ribosómico (Schweigkofler et al., 2004). Este tipo de análisis han demostrado ser de gran utilidad para determinar relaciones evolutivas en hongos fitopatógenos.

2. Análisis de marcadores basados en secuencias polimórficas. Estos marcadores, descritos por Britz et al. (2002), se han utilizado recientemente con éxito para analizar la diversidad genética de poblaciones de *F. circinatum* en Sudáfrica (Britz et al., 2005).

3. Análisis de marcadores moleculares AFLP. Los marcadores AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) se utilizan cada vez más, sobre todo en situaciones en las que no es posible resolver relaciones filogenéticas a partir de comparación de secuencias de ADN o cuando se pretende detectar eventos de divergencia evolutiva reciente (Deprés et al., 2003). Basándose en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción digeridos a partir del ADN genómico total, se realizarán AFLPs en agarosa siguiendo el protocolo descrito por Mueller et al. (1996).

Grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs).

La formación de heterocariontes es un componente fundamental en muchos ciclos de vida fúngicos, actúa como primer paso en los ciclos parasexuales e interviene en la transmisión de factores de hipovirulencia (Leslie, 1993).

Los grupos de compatibilidad vegetativa en *F. circinatum* se determinarán utilizando auxótrofos de la ruta de asimilación del nitrato (Correll et al., 1987; Katan et al, 1994; Mpfu y Rashid, 2001). Se estudiará una colección de aislados seleccionados en función de su distribución espacial, hospedante y edad de la planta. Esta selección incluirá una representación de los MAT's detectados y aquellos aislados en los que se haya apreciado alguna peculiaridad morfológica.

1.3 Estudio del proceso infectivo de *F. circinatum* en piñas.

Este apartado será abordado por el grupo 2 (EFA), por disponer de plantaciones de *P. pinaster* infectadas naturalmente en la provincia de Pontevedra.

Se seleccionarán dos parcelas en plantaciones establecidas de *P. pinaster* donde previamente se halla determinado la presencia del patógeno, una situada próxima a la costa y otra a mayor altitud, en el interior.

Se recogerán muestras de flores femeninas, piñas en distintas fases de desarrollo y piñas adultas de las que se extraerán las semillas. Se detallará la presencia de algún tipo de daños en el material vegetal recogido. Este material vegetal se sembrará en medio Komada repicándose los aislados positivos de *Fusarium* a medio SNA para obtener cultivos monospóricos. Estos cultivos serán caracterizados morfológica y molecularmente determinándose los «mating types» para cada uno de ellos. Se determinará cuánto del porcentaje de contaminación aparecido en las semillas es superficial y cuánto es interno desinfectándolas con H₂O₂ al 30 % y volviéndolas a sembrar en medios selectivos. Se determinará el porcentaje de germinación de dichas semillas.

Se determinará la presencia de insectos vectores en el material recogido para ello alguna de las trampas para la recogida de transmisores serán colocadas en estas parcelas

lo cual permitirá establecer algún tipo de correlación entre su presencia y los daños observados (ver objetivo 2.3).

1.4 Comportamiento de diferentes especies de coníferas frente a *F. circinatum*.

Los trabajos a realizar en este apartado se dividirán en tres partes. El grupo 2 (EFA) evaluará clones gallegos de *P. pinaster*, mientras que el grupo 3 (NEIKER) abordará el estudio del comportamiento de diferentes especies de coníferas y este mismo grupo 3, conjuntamente con el 5 (CIFOR-INIA) evaluarán un banco de poblaciones clonales de *P. pinaster* mantenidos en el CIFOR y de *P. radiata* mantenido en NEIKER. En todos los casos se trabajará con aislados representativos de la variabilidad poblacional del patógeno (apartado 1.2).

Comportamiento de clones gallegos de *P. pinaster*.

Se realizarán ensayos de pre- y postemergencia temprana con semilla certificada de *P. pinaster* de dos procedencias. La semilla será desinfectada previamente con H₂O₂ al 30 % durante cinco minutos y se comprobará el poder germinativo de la misma. El inóculo se preparará infectando granos de maíz o de trigo con los aislados seleccionados del patógeno e incorporándolos al sustrato esterilizado, al 4% en volumen, el mismo día de la siembra de las semillas. Los controles se establecerán de la misma forma añadiéndole al sustrato granos de trigo sin inocular.

El ensayo se llevará a cabo en pots sembrando dos semillas por pot. El ensayo se mantendrá en cámara climatizada a 22°C con un 80-90% de humedad relativa y con un fotoperíodo de 12 h luz durante tres meses. A las cuatro semanas se determinará el tanto por ciento de germinación de las semillas inoculadas frente a los testigos y se comprobará si existen diferencias significativas entre los clones y entre los aislados utilizados.

Con las plantas germinadas a las cuatro semanas se continuará el ensayo hasta los tres meses determinándose el tanto por ciento de mortalidad de las mismas al final del periodo lo que informará sobre el «damping-off» de postemergencia.

Para estudiar el «damping-off» tardío se utilizarán plantas de dos años de clones gallegos de *P. pinaster*, que serán inoculadas con los aislados seleccionados, haciendo una herida en el tallo principal en la que se introducirá la suspensión de esporas, ajustada a una dosis final de 50000 esporas por mL (Gordon et al., 1998) o el micelio del patógeno, sellándose posteriormente con parafilm. El ensayo se mantendrá en cámara climatizada (con las mismas condiciones detalladas anteriormente) examinándose las plantas semanalmente. Se establecerá una escala de daños que permita determinar si existen diferencias en la susceptibilidad entre los distintos clones y aislados.

En todos los casos se procederá al reaislamiento del patógeno para cumplir los postulados de Koch.

Comportamiento de diferentes coníferas.

El ensayo se realizará en distintas especies de coníferas consideradas de riesgo o alternativas a las especies de riesgo. Los ensayos se realizarán en invernadero de alta seguridad preparado especialmente para trabajar con organismos de cuarentena tipo P2 y condiciones controladas de temperatura y humedad.

Se realizarán ensayos de pre- y postemergencia temprana con semilla certificada de *Sequoiadendron giganteum*, *Sequoia sempervirens*, *Cryptomeria japonica*, *Picea* spp, *Larix* spp, *Pinus* spp (con la excepción de *P. radiata* y *P. pinaster*, que son abordados exhaustivamente en los apartados anterior y posterior al presente), especies de coníferas utilizadas en España y otras con un interés potencial como alternativas a las utilizadas actualmente no pertenecientes al género *Pinus* dadas las restricciones indicadas en el Decreto para zonas en las que exista riesgo de infección por *F. circinatum*.

La metodología será idéntica a la descrita en el apartado anterior.

Evaluación de un banco de poblaciones clonales de *P. pinaster* mantenidas en el CIFOR y de poblaciones clonales de *P. radiata* de NEIKER.

Se propone evaluar cinco poblaciones clonales de *P. pinaster* (una de Asturias, una de Galicia, una de Marruecos, una de Almería y una de Coca) de las que se cuenta con cinco familias por población y cinco clones por familia. Una vez evaluada la variabilidad genética de este carácter y analizada su heredabilidad se procederá a la evaluación de un número de clones más elevado. También se evaluarán cinco familias procedentes de árboles plus y polinización abierta de *P. radiata* (100 individuos por familia).

Los ensayos se realizarán en invernadero de alta seguridad preparado especialmente para trabajar con organismos de cuarentena tipo P2 y condiciones controladas de temperatura y humedad. La metodología será idéntica a la descrita anteriormente.

2. Epidemiología.

2.1 Determinación de la presión de inóculo de *F. circinatum* presente en masas forestales afectadas.

Este estudio se llevará a cabo por el grupo 2 (EFA) en masas forestales afectadas por la enfermedad en Galicia.

La detección y cuantificación de la cantidad de esporas en el aire así como su evolución temporal se llevará a cabo, durante dos años, en dos parcelas de *P. pinaster* de la provincia de Pontevedra donde se haya detectado la presencia del patógeno. Para la captura de esporas se colocarán trampas con medios de cultivo semiselectivos (Komada y SNA) o con papel de filtro y se hará un estudio comparativo de los diferentes métodos de captura. La determinación del inóculo se hará de la siguiente manera:

Trampas con medios selectivos. Las trampas recogidas en campo se cultivarán a temperatura ambiente durante dos semanas. Posteriormente se examinarán e identificarán las colonias por morfología y técnicas moleculares. Con las colonias se hará una extracción de ADN fúngico que se amplificará y cuantificará por PCR a tiempo real utilizando los cebadores específicos de *F. circinatum* (CIRC1A-CIRC4A) aplicando el protocolo de Schweigkofler et al (2004). También se hará un conteo de colonias que se expresará como cantidad de esporas por m².

Trampas con papel de filtro: Una parte del papel de filtro utilizado como trampa se seccionará en partes que se colocarán en placas Petri con medios de cultivo selectivos. Las placas se incubarán durante dos semanas a temperatura ambiente. Se analizarán las colonias por morfología y técnicas moleculares. Con la otra parte del papel de filtro se recogerán las esporas mediante un tampón. Con este material se hará una extracción de ADN fúngico que se amplificará y cuantificará por PCR a tiempo real utilizando los cebadores específicos de *F. circinatum* (CIRC1A-CIRC4A) aplicando el protocolo de Schweigkofler et al (2004). Al igual que en el apartado anterior se hará un conteo de colonias que se expresará como cantidad de esporas por m².

2.2 Seguimiento de la enfermedad en masas forestales.

Se realizará el seguimiento de masas forestales afectadas en Galicia y Cantabria. Este estudio será abordado por el grupo 2 (EFA) en Galicia y el grupo 4 (EPF-UVA) apoyado por el grupo A1 (CSFC) en Cantabria.

El objetivo general del presente apartado es conocer los factores que influyen en la dispersión de la enfermedad del chancro resinoso del pino con la intención de predecir la evolución de la enfermedad y utilizar esta información en los programas de manejo integrado de esta especie. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

Determinar los factores climáticos implicados en la dispersión de *F. circinatum*.

Conocer los factores del árbol (edad, altura, área basimétrica...), relacionados con la enfermedad del chancro resinoso del pino.

Identificar los factores del rodal (suelo, pendiente, altitud...), implicados en la aparición de la enfermedad.

Para conocer la influencia de los factores climáticos en la aparición de la enfermedad se estudiará la distribución y afección de las áreas afectadas por *F. circinatum* relacionándose con los factores climáticos que pueden influir en su dispersión. Para ello, se realizarán muestreos sistemáticos en las masas de pino siguiendo una cuadrícula, de 5 x 5 km. Se establecerá una escala de daño, acorde con la metodología de la Red de Daños, que será aplicada a las masas de muestreo con el objetivo de establecer diferentes niveles en función de la sintomatología observada y de la confirmación de la presencia del patógeno. El número máximo de parcelas a muestrear se establecerá en 150, tamaño muestral suficiente para determinar la distribución actual de la enfermedad, la sintomatología y epidemiología de la enfermedad, como ya han detallado diversos autores (Barnard y Blakeslee, 1987; Gordon et al., 2001). En los puntos muestreados se recopilará la información necesaria para el análisis mediante una ficha diseñada al efecto, a partir de modelos previos (SPCAN-DGCN, 2002; Adams, 1989; Storer et al., 2002) donde, entre otros datos se registrará la categoría del nivel de infección, y otra información adicional asociada a cada foco infectado, (litología, temperatura media, máxima y mínima, precipitación media máxima y mínima, fenómenos meteorológicos, actividades forestales).

Un 10% de las parcelas muestreadas en el ensayo (15 parcelas) se mantendrán como parcelas permanentes. Sobre estas parcelas se llevará a cabo un seguimiento continuo de la evolución de las masas, así como un muestreo más intensivo. Con los resultados obtenidos se realizará un análisis espacial de la información obtenida en estos dos subapartados, y se estudiará la evolución temporal en el período de duración del proyecto.

Esta actividad se compaginará con los apartados de diagnóstico, por lo que se recogerán muestras de piñas en plantas con y sin síntomas y muestras sintomáticas de madera (chancros) y ramas, que se trasladarán al laboratorio donde se realizará la determinación de las especies de *Fusarium* presentes tanto morfológicamente como por técnicas moleculares.

Con la intención de conocer los factores del árbol, climáticos y de rodal, implicados en la aparición de la enfermedad del chancro resinoso del pino, los datos obtenidos en este apartado se analizarán mediante técnicas de análisis multivariante, utilizando el programa CANOCO versión 4.5.

2.3 Estudio de la transmisión de *F. circinatum* mediante insectos vectores.

Este apartado será abordado por el grupo 2 (EFA), que realizará los estudios en parcelas de árboles adultos en Galicia y por el grupo 4 (EPF-UVA) apoyado por el grupo A1 (CSFC) que estudiará parcelas de Cantabria.

Básicamente, los objetivos que se persiguen en este apartado son los siguientes:

Determinar la acción forética de esporas de *F. circinatum* de insectos xilófagos asociados a los pinos: tasa forética y carga de esporas.

Variación espacial.

Variación estacional.

Variación biológica: insectos colonizadores, emergentes y en dispersión.

Determinar la capacidad infectiva de especies portadoras: tasa de infección.

Variación entre especies de pinos.

Influencia de la carga esporal en la tasa de infección y en el tamaño de la lesión.

Determinar la biología y ciclo infectivo de los vectores más efectivos.

Evaluación de su uso en el seguimiento del patógeno (centinelas de esporas).

Seguimiento poblacional.

Acción forética de insectos vectores. Se obtendrán insectos adultos asociados a pinos utilizando dos tipos de métodos: trozas cebo y trampas cebadas con cebos atrayentes.

Árboles cebo: trozas de pino de 1,5 m de longitud y diámetro disponible en la masa. Cada punto costará al menos de 5 trozas que se dispondrán semiinclinadas con el ramaje cercano. Las trozas procederán de árboles sanos y, si estuviesen disponibles, de árboles infectados por el chancro resinoso.

Trampas con atrayentes: se utilizarán trampas Lindgren de embudos múltiples a 2 m sobre el suelo para los insectos del tronco y trampas de intercepción a mayor altura para los insectos de ramas y ramillas. Las trampas se cebarán con distintas combinaciones de atrayentes cairomonales y feromonales: α -pineno, etanol, ipsdienol, ipsenol, cis-verbenol, metil-butenol pityol, trans-conophtorin, verbenona.

Los insectos obtenidos tanto de las galerías en las trozas cebo como de las trampas serán contados y un porcentaje de ellos (mínimo 15 insectos/especie/trampa o troza) será cultivado en medio agarizado selectivo para *Fusarium* spp (Correll et al., 1991; con modificación de Storer et al., 2004), identificándose las colonias a nivel de especie.

Los experimentos se instalarán en masas dónde se haya confirmado la presencia de *F. circinatum*. La variación espacial será recogida muestreando en diversas masas y la variación estacional muestreando a lo largo del periodo de vuelo de los insectos asociados al floema/xilema de los pinos (primavera y verano). La variación asociada al ciclo biológico de los vectores será reflejada por la distinta procedencia de los insectos: colonizadores de trozas, emergentes de trozas y en vuelo de dispersión. La significación de las tasas de foresía y carga esporal se evaluará mediante tests G (Storer et al., 2004).

Capacidad infectiva de especies portadoras. Adultos de las especies identificadas como principales portadoras (2 ó 3 con mayores tasas de foresía y carga de esporas) serán evaluados en experimentos de transmisión. La influencia de la carga esporal será contemplada tratando a los insectos con diferentes dosis.

El experimento consistirá en tratar a insectos con una suspensión de esporas de *F. circinatum* y encerrarlos individualmente con una planta de pino de 2-3 años durante 7-10 días. Se utilizará un insecto/rama. Tratamientos: insecto con dosis baja, media y alta de esporas de la cepa más agresiva disponible de *F. circinatum*, inoculación con *F. circinatum*, inoculación con medio estéril y control (20 repeticiones) (Gordon et al., 1998; Erbilgin et al., 2005). El porcentaje de transmisión y la longitud de la lesión se determinarán al cabo de tres meses.

Inicialmente el estudio será realizado sobre *P. radiata* y posteriormente sobre las especies nativas *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. sylvestris*, *P. pinea* y *P. nigra*., utilizando el vector más efectivo.

En el caso concreto de Galicia, para determinar el papel de los escolítidos recogidos en la epidemiología del patógeno, se realizarán experimentos controlados de campo sobre árboles de *P. pinaster* susceptibles contaminando artificialmente escolítidos de las especies principales con inóculo del hongo obtenido en laboratorio. Se evaluará en estos experimentos si existe una cantidad mínima de inóculo para la infección, y la relación entre la carga de esporas y la dimensión de la lesión producida.

Biología y ciclo infectivo de los vectores más efectivos. A partir de los resultados de los objetivos anteriores se procederá a estudiar la biología de las especies consideradas más implicadas en la transmisión de la enfermedad. El seguimiento de su ciclo vital dependerá de la especie y de su hábito xilófago concreto. En el caso probable de que éstas sean especies de escolítidos (Romón et al., 2007), el seguimiento anual de su ciclo infectivo se estudiará en masas afectadas mediante árboles cebo y trampas de feromona/cairomona. Igualmente se estudiará la respuesta y el impacto ejercido en su reproducción por sus principales enemigos naturales (i.e. depredadores cléridos y trogossítidos).

Si la especie responde suficientemente a cebos con compuestos semioquímicos en trampas, se evaluará si el seguimiento estacional de la carga esporal de los adultos capturados se relaciona con el desarrollo epidemiológico en las masas (presencia e intensidad) como herramienta para el seguimiento epidemiológico.

2.4 Supervivencia del inóculo de *F. circinatum* en suelo y madera.

Este apartado será abordado por el grupo 5 (CIFOR-INIA).

El estudio de la supervivencia del inóculo en diferentes sustratos es importante para conocer el ciclo de la enfermedad y para establecer métodos eficaces de control (que podrán adoptarse en vivero, monte (más limitado) y aserradero). *F. circinatum* se transmite fundamentalmente por conidios, por lo que se estudiará la supervivencia de éstos en suelo.

También se estudiará la supervivencia del micelio en suelo y en madera (trozas y probetas).

La supervivencia de conidios se estudiará mediante inoculación de suelo (recogido en una zona declarada libre del hongo) con distintos contenidos en humedad y a diferentes temperaturas en condiciones controladas. Cada tratamiento de suelo se colocará en un envase cerrado del que se realizarán muestreos periódicos. Para cada muestreo se determinará el número de conidios viables por el método de las diluciones seriadas en medio de crecimiento semiselectivo para *F. circinatum*.

Para estudiar la supervivencia de micelio en suelo se procederá de manera similar inoculando éste con discos de agar colonizados por micelio del hongo. Éstos se introducirán en bolsitas de malla de tela y enterrados en el suelo a distintas temperaturas y contenido en agua en sus respectivos envases, de donde se muestrearán periódicamente. La viabilidad del micelio se determinará por crecimiento del hongo en agar.

La supervivencia en madera se estudiará en ramas de pino infectadas naturalmente. Se obtendrán fragmentos de estas ramas, manteniendo la corteza, de sección y longitud aproximadas y se colocarán en envases cerrados conteniendo suelo con un determinado contenido de humedad. Los fragmentos de rama se colocarán sobre el suelo o ligeramente enterrados y se muestrearán periódicamente para determinar su viabilidad por su capacidad de crecer en medio de cultivo. El ensayo se realizará de igual modo con madera de ramas infectadas a las que se haya quitado previamente la corteza.

3. Control.

3.1 Desarrollo de un método de control de *F. circinatum* en semillas mediante termoterapia con agua caliente.

Este apartado será abordado por el grupo 1 (IAM-UPV), apoyado, en los ensayos de siembra de material infectado por el grupo A2 (SVPA).

El trabajo se desarrollará en dos fases:

Sensibilidad de semillas de *Pinus* spp. y *Pseudotsuga menziessi* al tratamiento por termoterapia con agua caliente.

Dada la premura en encontrar un método de control de *F. circinatum* en el material de propagación, este apartado comenzará a abordarse dentro de un Convenio entre el grupo 1 (IAM-UPV) y el Ministerio de Medio Ambiente, en el que está previsto estudiar la supervivencia in vitro de *F. circinatum* a altas temperaturas y la sensibilidad de las semillas de especies de 8 especies de *Pinus* y *Pseudotsuga menziessi* a la aplicación de la termoterapia húmeda. De este modo, se determinará para cada especie la combinación temperatura-tiempo más alta compatible con la viabilidad y germinación de las semillas y que sea capaz de controlar *F. circinatum* en el exterior e interior de la semilla. Dentro ya del presente Proyecto se concluirá, en su caso, dicho estudio y se estudiará la evolución de la germinación de cada uno de los lotes tratados por termoterapia mediante muestreos cada seis meses para analizar si el tratamiento puede afectar a la viabilidad de las semillas en el tiempo.

Efectividad del tratamiento de termoterapia en partidas de semillas infectadas naturalmente.

Este ensayo se llevará a cabo sobre partidas de semillas de las diferentes especies de coníferas en las que, durante el desarrollo del Proyecto, los distintos grupos participantes (o de otros orígenes, como el Centro El Serranillo, del Ministerio de Medio Ambiente) detecten elevados porcentajes de infección por *F. circinatum*.

Estas partidas serán enviadas de forma precintada al laboratorio del grupo 1 (IAM-UPV) en forma de semillas o piñas. En este último caso, la partida se desecará en estufa para inducir la apertura de las piñas y se recolectarán las semillas. Para cada una de ellas se seleccionarán cuatro repeticiones de 200 semillas que serán sometidas al tratamiento por agua caliente en las condiciones determinadas en el apartado anterior y un número equivalente de semillas sin tratar que actuarán de control. De cada una de estas repeticiones

se separarán dos grupos de 100 semillas. El primero será sembrado en placas Petri con medio semiselectivo Komada para estudiar la supervivencia del patógeno en las semillas tratadas y comparándola con la presencia de éste en las no tratadas. El segundo grupo se enviará precintado al grupo A2 (SVPA) que realizará semilleros siguiendo la metodología habitual. En ellos, para evaluar la efectividad del tratamiento, se estudiará la emergencia de las plántulas y su desarrollo observando periódicamente la presencia y desarrollo de síntomas de la enfermedad que serán confirmados mediante el aislamiento del hongo en medio de cultivo.

3.2 Estudio de la efectividad de los tratamientos químicos en el control de la enfermedad.

Este estudio se desarrollará en dos fases: se realizará un estudio previo de la sensibilidad «in vitro» de *F. circinatum* frente a diversas materias activas fungicidas, que será abordado por el grupo 1 (IAM-UPV) y, a partir de los resultados obtenidos, se realizarán ensayos con material vegetal en lotes de semillas infectadas naturalmente y en estos mismos lotes en estado de plántula (que será abordado por el grupo A2-SVPA) y en condiciones de infección artificial en invernadero y de infección natural en campo (grupo 3-NEIKER).

Evaluación de la sensibilidad «in vitro» de *F. circinatum* frente a materias activas fungicidas.

Se estudiará en laboratorio el efecto de diversas materias activas fungicidas actualmente autorizadas en la Unión Europea sobre el crecimiento miceliar y la germinación de esporas de aislados representativos de la variabilidad poblacional obtenida en el apartado 1.2.

Para el estudio del crecimiento miceliar, los fungicidas se disolverán en agua y se añadirán a un medio de cultivo PDA previamente esterilizado y enfriado a 45-50 °C. Para cada fungicida se prepararán cinco concentraciones [0 (control), 0,1, 1, 10 y 100 mg m.a.-L-1]. El medio de cultivo con las concentraciones de fungicida se volcará en placas Petri de 90 mm de diámetro, donde se dejará solidificar. Finalmente, se dibujarán dos ejes diametrales perpendiculares sobre cada una de las placas.

A partir de las placas de PDA colonizadas se extraerán discos de 8 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocados. Estos discos de micelio se sembrarán en el centro de las placas de PDA toxicadas con las distintas concentraciones de fungicidas y el control, inoculándose cuatro placas por cada combinación aislado/fungicida/concentración. Una vez sembradas, las placas se incubarán a 25 °C. Tras el periodo de incubación, cuando las placas control muestren crecimiento aproximadamente en 2/3 de su superficie, se procederá a medir los dos diámetros de las colonias, tomando como referencia los ejes marcados en las placas. Con estos valores se determinará el crecimiento radial para cada aislado y concentración y el porcentaje de reducción del crecimiento miceliar respecto al control. A estos datos se les aplicará la transformación probit/logaritmo utilizando el programa informático «Polo», mediante el cual se calcularán los valores de DE50 de cada una de las combinaciones aislado/fungicida.

Asimismo se calculará la DE50 para la germinación de conidios. Para ello, los fungicidas se disolverán en agua destilada preparando cinco concentraciones: 0 (control), 0,1, 1, 10 y 100 mg de m.a. L-1.

A partir de la placa de PDA con cada aislado fúngico se obtendrá una suspensión de conidios mediante el raspado de la superficie de la colonia. Esta suspensión se ajustará mediante conteos con cámara Thoma a una concentración de 100.000 conidios / ml. La suspensión total se repartirá en volúmenes de 50 ml a los que se les agregarán las soluciones fungicidas a distintas concentraciones. Mediante pipetas Pasteur se colocarán dos gotas de la solución en portaobjetos (tres por concentración fungicida) y éstos se incubarán en cámara húmeda 25° C durante 2-3 días, al cabo de los cuales se realizará la lectura de conidios germinados cubriendo los portaobjetos con un cubreobjetos y realizando el conteo de conidios germinados y de no germinados utilizando un microscopio óptico. Se aceptarán como germinados aquéllos que tengan el tubo germinativo de una longitud superior a la del conidio.

A los datos de reducción de la germinación para cada combinación aislado/fungicida/concentración se les aplicará la transformación probit/logaritmo para la que se calcularán los valores de DE50 de cada una de las combinaciones aislado/fungicida. El experimento se repetirá dos veces.

Efectividad de los tratamientos químicos en lotes de semillas infectadas naturalmente y en estos mismos lotes en estado de plántula.

Este estudio se realizará en paralelo al de termoterapia (apartado 3.1), intentando comparar el efecto de la termoterapia de las semillas con el de tratamientos fungicidas y con ambos tratamientos conjuntamente. El tratamiento químico se realizará a las semillas y a las plántulas en sus primeros estados de desarrollo. Tal como se señaló en el apartado de termoterapia, el ensayo se realizará con 4 repeticiones de 100 semillas y/o plantas. En todos los casos, para evaluar la efectividad del tratamiento se estudiará la emergencia de las plántulas y su desarrollo observando periódicamente la presencia y desarrollo de síntomas de la enfermedad que serán confirmados mediante el aislamiento del hongo en medio de cultivo.

Efectividad de los tratamientos químicos en condiciones de invernadero y campo.

A partir de las materias activas más prometedoras de la fase anterior se plantearán ensayos en vivero y, en su caso, en terreno definitivo, a fin de controlar la enfermedad en plantas infestadas natural o artificialmente.

Los ensayos se realizan en condiciones controladas de invernadero (inoculaciones artificiales) y de campo (inoculaciones naturales), en parcelas afectadas o ubicadas en un entorno que favorezca las posibilidades de infección. Las materias activas y dosis estarán prefijadas por los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio «in vitro». El material vegetal sobre el que se ensayarán los diferentes fungicidas será semilla y planta joven y adulta del género *Pinus*.

Los tratamientos se aplicarán antes y después de la inoculación con *F. circinatum*. Los métodos de aplicación de sustancias serán por recubrimiento o inmersión en semilla (Huan y Kuhlman, 1990), mediante pulverización o spray, en sustrato y planta joven, e inyección en planta adulta (Old y Dudzinski, 1998; Tjosvold y McCain 1988; Miller et al., 2000).

Los tratamientos, incluidos controles, se aplicarán en bloques al azar, con al menos 4 bloques por tratamiento y unas 25 repeticiones por bloque en el caso de plántulas (dependiendo de la edad de la planta). En el caso de semillas se emplearán un total de 100 unidades por bloque. En condiciones de campo se aplicará un diseño similar al de invernadero condicionado por la disponibilidad de árboles y los gradientes de las parcelas de ensayo. La estimación de la eficacia de los tratamientos se realizará sobre la base de la disminución de los síntomas de la enfermedad con respecto a los controles sin tratamiento, adaptando la variables al tipo de material vegetal ensayado (semillas, plántulas o árboles adultos): % de germinación, mortalidad en post-emergencia, % de mortalidad, tejido infectado, % decoloración, % defoliaciones (Biovin et al, 2004; Tjosvold y McCain 1988; Viljoen y Wingfield, 1994).

3.3 Desarrollo de métodos de control biológico.

Este apartado será abordado por los grupos 3 (NEIKER) en el estudio del control mediante organismos micorrizogénicos y 4 (EPF-UVA) para el estudio de hongos endofitos, apoyados en este último caso por el grupo A1 (CSFC).

El objetivo general de este apartado es estudiar las posibilidades del control biológico de *F. circinatum* mediante hongos endofitos y micorrizogénicos.

Este estudio se realizará con los mismos aislados utilizados en el apartado 3.2 (control químico), representativos de la variabilidad poblacional obtenida en el apartado 1.2.

Control mediante organismos antagonistas endositos.

Los hongos endofitos que se utilizarán en este ensayo habrán sido aislados, siguiendo la metodología de Ranta et al. (1995), de material vegetal sano de *P. radiata* con la finalidad de que éstos puedan ser utilizados como agentes de control biológico, ya que no deben causar daño a la planta. Para ello, se procederá a esterilizar superficialmente el material

vegetal mediante inmersión sucesiva en etanol 96 %, hipoclorito sódico 6%, etanol 70% y agua destilada estéril. Posteriormente, dicho material se dispondrá en placas Petri con medio de cultivo PDA, manteniéndose éstas en bancada de laboratorio a 20 °C hasta la emergencia del micelio, momento en el cual será aislado en placas nuevas.

Estudios «in vitro»: influencia sobre la germinación de esporas.

Para la obtención de los filtrados, se procederá al cultivo de los hongos endofitos en medio líquido Komada durante una semana, y al filtrado de ese medio con las posibles sustancias antagonistas producidas por el endofito. Una vez realizada la confrontación de esos filtrados con los conidios de *F. circinatum* en tubos Eppendorf, se almacenarán en cámara de incubación a 18 °C en oscuridad. Posteriormente, a las 6, 12 y 24 horas se contabilizarán los conidios germinados de un total de 200 mediante el análisis al microscopio óptico de una gota de la mezcla situada en la cámara Thoma (Martín-Pinto, 2004). El estudio estadístico de estos datos consistirá en un análisis de la varianza de medidas repetidas (ANOVA) con tres factores intersujetos (aislamiento de *F. circinatum* y endófito) y un factor intrasujeto de medidas repetidas (horas). El valor de estas medidas repetidas coincidirá con el porcentaje de conidios germinados a las 6, 12 y 24 horas.

Estudios «in vitro»: influencia sobre el crecimiento micelial.

El efecto que los hongos endofitos seleccionados tendrán sobre el crecimiento micelial de *F. circinatum* será evaluado sobre placas Petri con medio Komada. En la parte posterior de las placas, se señalará un eje con dos puntos equidistantes del centro, a una distancia de éste de 2 cm. Sobre estos puntos, se colocarán posteriormente trozos de micelio de 4 mm de diámetro del patógeno y del endofito correspondiente (Santamaría et al., 2007). Las placas se sellarán con Parafilm® y se mantendrán en oscuridad a 18°C. Los crecimientos de ambas colonias se evaluarán semanalmente, obteniéndose el valor de sus áreas.

Con los datos del área de las colonias se realizará un análisis de la varianza de dos factores (aislado de *F. circinatum* y especie de hongo endófito) y su interacción. Estas áreas serán comparadas mediante el test de Tukey y también se realizará el análisis de medidas repetidas para comprobar el efecto del tiempo en dichos crecimientos.

Control en plántulas de vivero.

Los ensayos se realizarán en invernadero de alta seguridad preparado especialmente para trabajar con organismos de cuarentena tipo P2 y condiciones controladas de temperatura y humedad.

Con la suficiente antelación se obtendrá el inóculo de *F. circinatum* necesario para la realización de este ensayo. Para ello, los aislados seleccionados, que serán los mismos que los utilizados en los ensayos in vitro, así como las especies de hongos endofitos que mejor hayan funcionado en el ensayo in vitro serán subcultivados en medio de cultivo Komada.

Las inoculaciones se llevarán a cabo mediante la realización de una herida en la planta con un bisturí estéril a unos 7-10 cm del ápice de la plántula, previa eliminación de las acículas de esa zona. A continuación, se pondrá un tratamiento con un trozo de micelio del patógeno de 4 mm de diámetro en la herida y otro tratamiento inoculado con esporas (106), y se tapanán con parafilm® con el fin de evitar su desecación. Para el hongo endófito se procederá de manera similar pero situándolo a unos 4 cm del punto de inoculación con *Fusarium* y a unos 3-6 cm del ápice de la plántula, todo ello siguiendo la metodología propuesta por Petäistö y Kurkela (1993). El hongo endofito será situado en la parte superior de la plántula y por encima de *Fusarium* (Santamaría et al., 2007).

Durante el transcurso del ensayo, se realizarán mediciones semanales del grado de afección de cada plántula. A la finalización del ensayo, que dependerá del grado de afección de las plántulas, éstas serán cortadas a la altura del cuello de la raíz y llevadas al laboratorio, en donde se eliminarán las acículas, serán seccionadas longitudinalmente y se medirá la longitud de la necrosis que haya provocado *F. circinatum* (Santamaría et al., 2006). Estos dos parámetros (área que encierra las curvas de afección y longitud de la necrosis), después de comprobar que siguen las hipótesis de normalidad y

homocedasticidad, serán sujetos a un análisis de la varianza (cuyas variables serán 'aislado de Fusarium', 'aislado endófito' y su interacción) y a un test de comparaciones múltiples de Tukey cuando las diferencias en la ANOVA sean estadísticamente significativas. Una vez medidas las longitudes de las necrosis, se procederá al reaislamiento de los hongos implicados en medio de cultivo con el fin de comprobar su presencia.

Evaluación del efecto antagonista de hongos micorrizógenos sobre *F. circinatum*.

Se utilizarán los mismos aislados de *F. circinatum* del apartado anterior. Actualmente se dispone de aislados de las especies *Lactarius deliciosus*, *Suillus luteus*, *Rhizopogon luteolus*, *Scleroderma citrinum*. Estos aislados se cultivarán en placas Petri de medios de Hagem (Palmer, 1969), PDA y Melin-Norkrans (MNM) (Molina y Palmer, 1982). Las placas se incubarán a temperatura ambiente 20-25° C durante cuatro semanas.

Ensayos «in vitro».

Se evaluará el efecto antagonista mediante ensayos en placa Petri, cultivando los dos aislados, uno del hongo micorrizógeno en estudio y el otro de *F. circinatum*, con una separación entre si de un centímetro, evaluando la capacidad invasora y fungicida y/o fungistática, en base a la medición cada 4 días, del diámetro miceliar de ambos hongos y al estudio de la viabilidad de dichos aislados, tras un periodo de cuatro semanas, en las condiciones de crecimiento de los dos aislados enfrentados. La estimación de la viabilidad se realizará transfiriendo 4 fragmentos de los laterales y del centro de la zona de crecimiento de cada hongo, a un medio general de PDA y observando el crecimiento de los aislados por separado. Se realizará una selección de aislados sobre la base de sus características óptimas de colonización y antagonismo, evaluando estas propiedades a través de los resultados obtenidos, a partir del análisis estadístico de la variable de diámetro miceliar y la viabilidad final de los aislados tras ser sometidos al enfrentamiento de las cepas (Chu-Chou y Grace, 1977; Cerrato et al, 1993; Elad y Kapat, 1999).

Ensayos en invernadero.

Se realizará una desinfección de las semillas de *P. radiata* mediante su inmersión en una solución de H₂O₂ al 30 %. Las semillas se sembrarán en alveolos de 1,5 litros de volumen con sustrato de perlita y suelo autoclavado en una proporción de 1:4. Para la inoculación se sembrará el hongo en un tubo de ensayo, y cuando haya crecido se suspenderá de forma homogénea y se inoculará 5-10 ml en el sustrato donde crece la planta. Se dejará desarrollar la planta hasta una edad de un año y se procederá a la inoculación con *F. circinatum*, siguiendo la metodología definida en el apartado 1.4.

Se estimará la incidencia en la infección de los tratamientos de micorrización, con respecto al control sin micorrizar, mediante la medición de la lesión ocasionada por las cepas de *F. circinatum* y la eficacia de la micorrización determinando la densidad de raíces micorrizadas mediante el método de intersección de cuadrantes (Marsh, 1971).

Los ensayos se realizarán en invernadero de alta seguridad preparado especialmente para trabajar con organismos de cuarentena tipo P2 y condiciones controladas de temperatura y humedad.

3.4 Estudio de la efectividad de distintos métodos selvícolas en la erradicación de *F. circinatum* en parcelas afectadas.

Este apartado será abordado por el grupo 4 (EPF-UVA) con la colaboración del grupo A1 (CSFC).

Una buena selvicultura es esencial para evitar la aparición de plagas y enfermedades en el monte. Muchos de los problemas fitosanitarios actuales han sido causados por la realización de repoblaciones incorrectas (con respecto a la especie elegida, el sitio de plantación, etc.) o por malas prácticas selvícolas que hacen disminuir el vigor del arbolado, predisponiéndolo al ataque de insectos o patógenos. Otra medida que también ayuda a prevenir la aparición de daños en el monte es el control genético. La utilización de especies

o variedades resistentes puede reducir en gran medida la incidencia de una determinada plaga en una zona donde esta sea endémica.

Entre las medidas de control de carácter selvícola frente a patologías forestales, un método que se ha probado con un relativo éxito en el monte para la lucha frente a patógenos de brotes como *Gremmeniella abietina*, es la poda sistemática de ramas bajas (Laflamme, 1991). En tratamientos de este tipo efectuados sobre *P. resinosa* en Québec, se consiguió que el índice de incidencia de la enfermedad, que inicialmente era del 67%, se redujera al 22% (Laflamme 1999). Nada se conoce sobre la posible utilidad de las medidas de control selvícola en la enfermedad del chancro resinoso en nuestro país.

En este sentido, el objetivo general del presente apartado es conocer las posibilidades de control del chancro resinoso del pino mediante métodos selvícolas. Para ello se han planteado los siguientes objetivos parciales:

Determinar el efecto de la especie de pino utilizada en reforestación sobre la aparición de marras en zonas afectadas por el chancro resinoso del pino.

Para este ensayo se utilizarán las plántulas de pino de una savia de *P. radiata*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. sylvestris*. Las plantas serán dispuestas a un marco de plantación de 4 x 4 metros según un diseño experimental completamente aleatorio debido a la uniformidad en las condiciones del área de ensayo. Se utilizarán 200 plantas por cada especie.

Las inoculaciones se llevarán a cabo de forma natural, por la caída de esporas de los árboles infectados y/o por vectores, al situarse las plantas en zonas infectadas por *F. circinatum*. Para ello, se llevarán a cabo plantaciones en parcelas circulares rodeadas de pinos infectados por la enfermedad.

Durante el transcurso del ensayo, se realizarán mediciones mensuales del grado de afección de cada plántula según una escala confeccionada para tal fin que tomará valores de 1-5, siendo el 1 el valor que toma una planta completamente sana y el 5 el valor que toma una planta totalmente seca, los demás corresponderán a las situaciones intermedias. De tal forma, que a la finalización del ensayo tendremos para cada plántula una curva de afección a lo largo del tiempo, y se podrá utilizar el área que encierra dicha curva como parámetro estimatorio de la patogenicidad de *F. circinatum*. La finalización del ensayo dependerá de los niveles de afección alcanzados por las plántulas de tal forma que nos permita observar las máximas diferencias entre tratamientos. En ese momento, las plántulas serán cortadas a la altura del cuello de la raíz y llevadas al laboratorio. Las plantas serán seccionadas longitudinalmente y se medirá la longitud de la necrosis que haya provocado el hongo inoculado (Santamaría et al., 2006). Estos dos parámetros (área que encierra la curva de afección y longitud de la necrosis), después de comprobar que siguen las hipótesis de normalidad y homocedasticidad, serán sujetos a un análisis de la varianza (cuyas variables serán 'especie de pino', 'aislado fúngico' y su interacción) y a un test de comparaciones múltiples de Tukey cuando las diferencias en la ANOVA sean estadísticamente significativas. Una vez medidas las longitudes de las necrosis, se procederá, al reaislamiento del patógeno en medio de cultivo, con el fin de comprobar su presencia en la zona necrótica por técnicas de cultivo y técnicas moleculares.

Efecto de las podas, claras y cortas en la evolución de la enfermedad del chancro resinoso del pino en zonas infectadas por *F. circinatum*.

Las zonas elegidas para la realización del ensayo estarán situadas en la Comunidad de Cantabria, en áreas afectadas por la enfermedad. Para evaluar el efecto de los métodos selvícolas en el control de la enfermedad causada por *F. circinatum* se tomarán 3 parcelas (de un tamaño aproximado de 10 ha), con diverso grado de infección (severamente infectada, infección media y baja infección) en las que se evaluarán con la mayor precisión posible los daños en copa antes de iniciado el ensayo, siguiendo la metodología de la Red Europea de Daños a los Bosques, y mediante técnicas de análisis digital (Sanz et al, 2006). En cada una de las parcelas se realizarán 4 tipos de tratamientos (1) poda sistemática de ramas afectadas, (2) clareo sistemático, (3) corta a matarrasa y (4) quema controlada del rodal. Para ello, se

contará con la ayuda de la sección forestal de la Comunidad de Cantabria que localizará las parcelas de ensayo y organizará y llevará a cabo los tratamientos bajo nuestra supervisión.

Una vez llevados a cabo los diversos tratamientos, en cada uno de ellos se plantarán 200 plantas de *P. radiata* que servirán como testigo para conocer el nivel de inóculo y el poder infectivo de *F. circinatum*; una muestra de estas plantas se analizarán periódicamente durante el tiempo de desarrollo del Proyecto, siguiendo la metodología del apartado anterior. Al mismo tiempo se evaluará la evolución de los daños en el arbolado que quede en la parcela durante el tiempo del Proyecto, siguiendo las metodologías señaladas anteriormente. En ambos casos, la presencia de *F. circinatum* se determinará mediante técnicas de cultivo y métodos moleculares.

Los parámetros analizados (longitud de la necrosis en plantas, defoliación, y longitud de los chancros en los árboles de la parcela) después de comprobar que siguen las hipótesis de normalidad y homocedasticidad, serán sujetos a un análisis independientes de la varianza (cuyas variables serán grado de daño en la parcela, método selvícola y su interacción) y a un test de comparaciones múltiples de Tukey cuando las diferencias en la ANOVA sean estadísticamente significativas.

3.5 Elaboración de una propuesta de actuaciones para el manejo del material vegetal y el control de *F. circinatum*.

A partir de los resultados obtenidos en todos los apartados anteriores por los diferentes grupos participantes se propondrá un plan de actuaciones para un adecuado manejo y control de la enfermedad.