

**Hongos asociados al decaimiento de masas mixtas de
Pinus pinaster en la Comunidad de Madrid**



Universidad de Valladolid

Autora: Sara García Garrido

Tutores: Rosa Raposo Llobet y Julio J. Díez Casero

Máster de Investigación en Conservación y Uso Sostenible de Sistemas Forestales

Julio 2017

Hongos asociados al decaimiento de masas mixtas de *Pinus pinaster* en la Comunidad de Madrid

Autora: Sara García Garrido
g.garrido.sara@gmail.com

Tutores: Dr. Rosa Raposo Llobet raposo@inia.es
Instituto de Investigación Forestal Sostenible
Universidad de Valladolid-INIA (CIFOR)
Departamento Selvicultura y Gestión de Sistemas Forestales.
Ctra. Coruña Km. 7,5; 28040 Madrid, España

Dr. Julio Javier Díez Casero jdcasero@pvs.uva.es
Instituto de Investigación Forestal Sostenible
Universidad de Valladolid-INIA
Departamento de Producción Vegetal y Silvopascicultura.
Av. Madrid 44, Edificio E, 34004 Palencia, España

Máster de Investigación en Conservación y Uso Sostenible de Sistemas Forestales

Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Palencia. 2017

ÍNDICE

Resumen.....	5
Antecedentes.....	7
Objetivos.....	10
Material y métodos.....	11
Descripción de la zona de estudio.....	11
Metodología de muestreo.....	12
Análisis de la muestras en laboratorio.....	18
Identificación de aislados.....	19
Análisis estadístico.....	19
Resultados.....	20
Discusión.....	24
Conclusiones.....	27
Agradecimientos.....	27
Bibliografía.....	28

Resumen

El cambio global puede provocar un aumento en la vulnerabilidad de ciertas especies. Por ello es necesario estudiar cómo los diferentes agentes bióticos y abióticos pueden provocar decaimiento forestal. En el presente estudio se evalúa la incidencia de agentes bióticos en el proceso de decaimiento de *Pinus pinaster* Ait., haciendo especial referencia al impacto de hongos patógenos. El pino resinero es una de las especies más importantes de la Península Ibérica tanto por su carácter protector como por su producción de resina y madera. Además, ocupa gran parte del territorio forestal del país. En nuestro estudio, se definieron varias parcelas de 10 m. de radio en la Comunidad de Madrid incluyendo árboles con decaimiento, sanos y muertos. En cada una de estas áreas se describió el estado sanitario general de la masa forestal así como la caracterización dasométrica de cada pie seleccionado; de esta manera se estimó el porcentaje de defoliación, decoloración, la incidencia de muérdago e insectos barrenadores. Se tomaron muestras de árboles con y sin síntomas de decaimiento. Concretamente se cogieron ramillos para detectar los agentes defoliadores, se describió la posible presencia de chancros y se tomaron barrenas del cuello y de las raíces del árbol. Una vez en el laboratorio se procedió al aislamiento de hongos de los canutillos, mediante crecimiento en medios de cultivo, y finalmente, a la identificación de los hongos por análisis morfológico y extracción de ADN.

Palabras clave: hongos patógenos, defoliación, muérdago, pino resinero

Abstract

Climate change can lead to an increase in vulnerability of some species. Thus, it is necessary to study how both abiotic and biotic factors can cause forest decline. The main objective of this work was to gain a better understanding of the influence of biotic agents in the process of *Pinus pinaster* Ait. decline, especially the impact of fungal pathogens. Maritime pine is one of the most important forest species in the Iberian Peninsula taking into account both the protection it provides and the timber it produces since it is the main conifer species growing in Spain. In this study, we defined plots of 10 meters radius in Valdemaqueda (Madrid), which included decay trees, healthy trees and dead trees. In every plot, we described health condition of forest stand and forest mensuration of trees individually. We also measured foliage defoliation, discoloration, amount of mistletoe and presence of damage agents. We took samples with symptoms of decay and without symptoms. Specifically, we looked for signs and symptoms of defoliator agents on branches and wood cankers. We sampled cores of root and collar region of trees. In the laboratory, we will isolate the potential fungi by growing cores on medium and finally we will identify them based on for their morphological characteristics and on the sequence of ITS region.

Keywords: *fungal pathogens, defoliation, mistletoe, maritime pine*

Antecedentes

Los escenarios del cambio climático causados por emisiones antropogénicas predicen que en el futuro el clima global se desviará de forma significativa de su comportamiento natural (Crutzen, 2002). La sequía va en aumento como consecuencia del cambio climático y podría alterar fundamentalmente la composición, estructura y biogeografía de los bosques en muchas regiones (IPCC, 2013). Así por ejemplo, se ha sugerido que el calentamiento global es el responsable de las tasas de migración de algunas plantas de Los Andes, desplazando ladera arriba a determinados géneros entorno a 2,5 m. al año (Feeley y Silman, 2010; Kolbert, 2015). El cambio climático ha favorecido las altas temperaturas y las tendencias de desertificación, que hacen pensar en un incremento de las sequías a escala regional y tasas de mortalidad con retroalimentación positiva a causa de la reducción de los sumideros de carbono, la cubierta arbórea y la pérdida de ecosistemas (Camarero et al., 2015). La sequía induce al cierre estomático, llevando a una reducción de la fotosíntesis y al agotamiento del carbono.

El decaimiento del bosque se caracteriza por un incremento del estrés, una rápida defoliación, reducciones del crecimiento y elevadas tasas de mortalidad poblacional (Martínez-Vilalta et al., 2012). Este tipo de perturbaciones tiene profundas implicaciones demográficas para los bosques con el potencial de alterar la distribución de las especies e inducir cambios en la vegetación a medio y/o largo plazo (Allen et al., 2010). El decaimiento forestal se define como el conjunto de impactos que pueden afectar a individuos de especies arbóreas en ecosistemas forestales debido a factores climáticos, bióticos, edáficos o su interacción (Herrero y Zavala, 2015). Por ello, es necesario estudiar cómo diferentes agentes bióticos y abióticos provocan decaimiento forestal. El decaimiento está caracterizado por una gradual pérdida de vigor y muerte progresiva de las especies forestales. De esta manera, Manion (1981) considera tres tipos de factores para explicar el proceso de decaimiento: (1) los factores de predisposición, que son aquellos que exponen al árbol a una situación de estrés y vulnerabilidad a largo plazo, como son unas condiciones pobres de suelo y/o una elevada densidad de árboles; (2) factores de incitación, que aceleran el declive del árbol a corto plazo, como son episodios extremos de sequía; y (3) factores de contribución como pueden ser patógenos oportunistas, ataques de insectos y/o episodios de sequía adicionales, que acaban matando el árbol previamente debilitado afectando a la masa con poca capacidad de resiliencia. Los patrones espaciales de decaimiento también pueden dar pistas sobre sus posibles causas. Por otro lado, patrones espaciales más localizados pueden indicar ataques puntuales de patógenos o apuntar disponibilidad hídrica en el suelo a una escala local, como son la topografía y las propiedades del suelo (Western et al., 2002).

En los bosques mediterráneos, el cambio climático se acentúa de manera más notable que en otras zonas del continente europeo (FAO, 2012). Concretamente, el aumento de la temperatura media y la disminución de la precipitación anual en el sur de Europa está afectando la defoliación de los árboles y registrándose una mortalidad prematura en determinadas localizaciones (Allen et al., 2010). Autores como Guada et al. (2016) sugieren que en los bosques mediterráneos de coníferas propensos a la sequía, se produce una disminución del crecimiento de los mismos causada por condiciones acentuadas de calor. Por otro lado, la defoliación reduce la absorción de carbono y se ve restringido el crecimiento de la copa del árbol (Aguadé et al., 2015). Por lo tanto, es conveniente determinar si el crecimiento del bosque mediterráneo se recupera después de sequías severas o sucesivas y si esta respuesta puede causar una pérdida de resiliencia (Guada et al., 2016).

La sintomatología clave para incluir esta especie como decaída es su rápida defoliación y la cantidad de muérdago existente, llegando a ocupar gran parte de la copa. Otras características son la decoloración de las acículas y una acentuada microfilia. Todos estos síntomas, junto con la mortalidad prematura de la masa, nos llevan a indicar que la masa está en un proceso de decaimiento. Estudios llevados a cabo recientemente sobre el decaimiento del pino resinero, sugieren entre otros posibles agentes la falta de agua y la competencia que podrían ser factores de predisposición en *Pinus pinaster* (Prieto-Recio et al., 2015). Otros autores (Bravo-Oviedo y Montero, 2008) sugieren que la falta de agua es el principal factor contribuyente, ya que el *P. pinaster* está siendo reemplazado en algunas zonas por *Quercus ilex*. Trabajos realizados en otras coníferas como *Abies pinsapo* Boiss. (Linares et al., 2010) sugieren que hongos como *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen actúan como agentes que predisponen al decaimiento de la masa forestal y a las variaciones del clima como un factor contribuyente. En cambio, Sánchez-Salguero et al. (2012), expone que la competencia intraespecífica entre pinos mediterráneos y la disposición de plántulas en repoblación de masas de coníferas actúan como factores que predisponen al decaimiento y sugiere que la sequía es un factor contribuyente.

La mayoría de los autores han tratado por separado los casos de mortalidad forestal inducida por la sequía y los patógenos, pero según Sangüesa-Barreda et al. (2015) esta división es arbitraria ya que los patógenos suelen atacar árboles ya estresados por la sequía (McDowell et al., 2011). Por lo tanto, para entender cómo se desarrolla el decaimiento, debemos considerar cómo interactúan todos los factores implicados, como la sequía o los agentes bióticos y si están relacionados con las modificaciones humanas en el pasado (como cambios en la estructura de la masa o incendios forestales). Los agentes bióticos juegan un papel en los procesos de mortandad de los árboles, ya que pueden llegar a tener gran duración y magnitud en los efectos no inmediatos sobre la muerte de los árboles (Oliva

et al., 2016). Los patógenos fúngicos son uno de los factores de contribución más importantes en la fase final de la mortalidad por sequía (Oliva et al., 2014); sin embargo, a pesar de su importancia, poco se sabe sobre las enfermedades fúngicas que puedan ser causantes de decaimiento.

También hay otros agentes bióticos que pueden contribuir al decaimiento, como insectos perforadores. En el caso del estudio de Prieto-Recio (2015) no se encontraron daños por perforadores en sus parcelas de estudio de pino resinero que afecten a su estado de salud, a diferencia de otros trabajos (Bueno et al., 2010), en los que vectores como *Ips sexdentatus* Böern se encargan de transportar al hongo *Ophiostoma ips*.

En estudios sobre el abeto europeo (*Abies alba* Mill.) en los Pirineos (Oliva y Colinas, 2007) se ha visto una relación entre el decaimiento en coníferas y la presencia de la fanerógama semiparásita *Viscum album* L. El muérdago (*Viscum album*), afecta a especies arbóreas de toda Europa en mayor o menor medida (Zuber, 2004).

La sintomatología de una masa en decaimiento es fundamentalmente la falta de densidad en la copa de los árboles (transparencia de copa). La presencia de defoliación, decoloración y un bajo crecimiento diametral, nos hacen pensar en una masa decaída. Este estado, es particularmente visible en las masas de coníferas, con una gran importancia en la Península Ibérica ya que hay diversas especies afectadas por los procesos de decaimiento, que pueden disminuir la superficie arbórea existente. Uno de los decaimientos más graves en la actualidad lo sufren las masas de pino resinero que poseen un gran interés tanto por su valor protector como por su carácter productor de resina. Podemos ver un ejemplo en el Monte de estudio de un aprovechamiento actual (Figura 1).



Figura 1. Fotografía en el Monte de estudio donde podemos ver el aprovechamiento de resina que se está llevando en la actualidad.

Otros factores que pueden influir en el decaimiento de la masa es la posibilidad de incendios acaecidos en la zona de estudio. Se tiene constancia de que los incendios son frecuentes, en los últimos diez años la zona se ha visto afectada por 24 incendios de 155 Ha. de superficie media (Figura 2). Los incendios, de origen natural o provocado, suponen una importante amenaza para los valores naturales de la masa, siendo en 2012 el más reciente. Dicho incendio afectó a 1546 Ha. (Dirección General de Medio Ambiente CAM, 2016) pero no avanzó hasta la zona de muestreo. También, puede darse el caso de la existencia de patógenos que se activan y están asociados a incendios forestales como es el caso del hongo *Rhizinia undulata* Fr.:Fr (Hansen y Lewis, 1997).

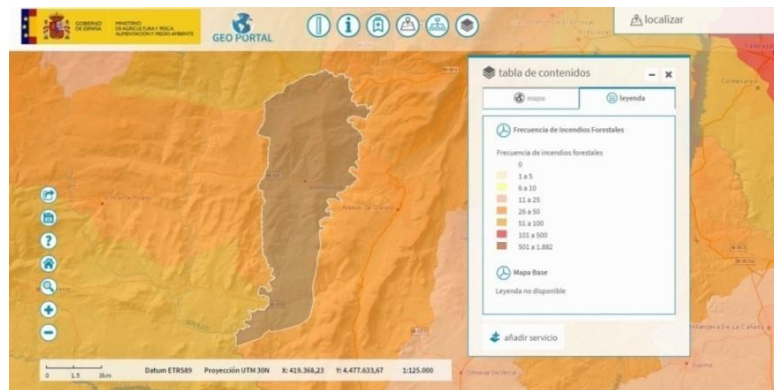


Figura 2. Mapa de frecuencia de incendios forestales por término municipal, para Valdemaqueda entre el periodo de 2001 y 2010. (MAPAMA, 2017).

El decaimiento en el Monte de Valdemaqueda es un problema serio, pero poco se sabe de los factores implicados en el mismo. Los síntomas son patentes en la masa de estudio por lo que se hace necesario un estudio los hongos asociados al pino resinero para ver cómo llegan a influir en el desarrollo de la enfermedad.

Objetivos

Teniendo en cuenta su valor protector, así como por la importancia económica de las futuras explotaciones de resinación que puedan llevarse a cabo en la Meseta Central se hace necesario un estudio que aborde las causas que provocan el decaimiento de masas de *Pinus pinaster*. El objetivo principal de este estudio es determinar los hongos asociados al decaimiento de masas mixtas de *Pinus pinaster* en la Comunidad de Madrid. Los objetivos específicos son: (1) caracterizar el proceso de mortalidad de pino resinero en la Sierra de Guadarrama, (2) evaluar la posible implicación de agentes bióticos en el proceso de decaimiento, haciendo especial referencia al impacto de hongos patógenos, (3) conocer los hongos asociados a los tejidos internos de los pies muestreados.

Material y métodos

Descripción de la zona de estudio

El estudio se ha realizado en el Monte de Utilidad Pública (MUP) número 185 de la Comunidad Autónoma de Madrid. El Monte de Valdemaqueda, se encuentra en la zona oeste de la Comunidad. La zona de muestreo pertenece a la región de procedencia número 7 de la Sierra de Guadarrama (Figura 3).

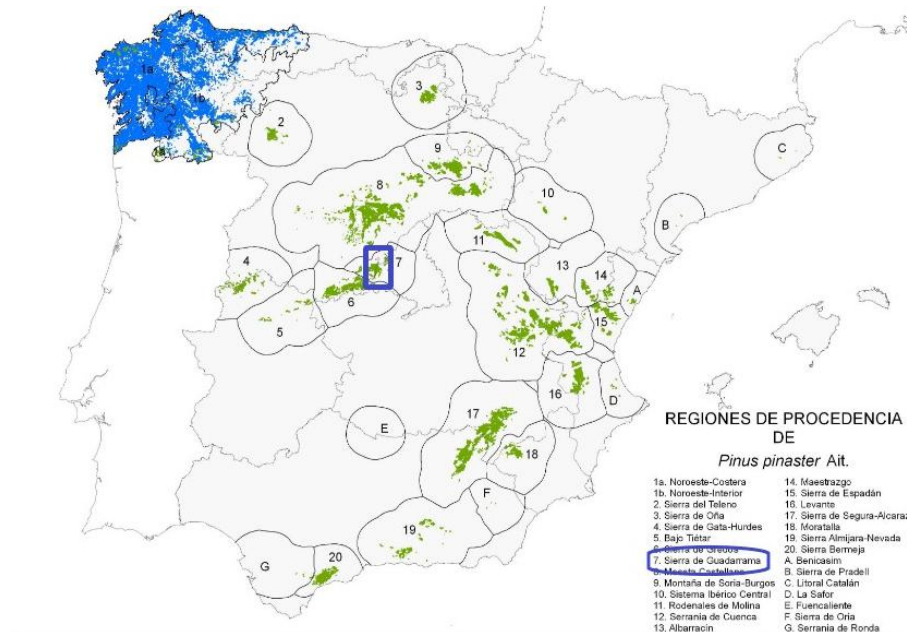


Figura 3. Mapa de las Regiones de procedencia para *Pinus pinaster* Ait. En azul se muestra la subespecie *atlántica* y en verde la subespecie *hamiltonii* (Alía et al., 1996).

El MUP 185, es un Monte Preservado, según la ley 16/1995, incluido en las zonas declaradas de especial protección para las aves (ZEPAS) y perteneciente a la Comarca Forestal de Robledo de Chavela (Subdirección General de Conservación del Medio Natural, 2017). Todo el término municipal de Valdemaqueda se encuentra dentro del espacio protegido Red Natura 2000. Concretamente, la zona ZEPA ES0000056 “Encinares del río Alberche y río Cofio” de 82.999 Ha. comprende la zona ZEC ES3110007, “Cuencas de los ríos Alberche y Cofio” de 82.857 Ha. Esta región de la Red Natura 2000 posee un Plan de gestión (Subdirección General de Conservación del Medio Natural, 2016) que incluye espacios naturales de interés por sus valores florísticos, faunísticos, geomorfológicos o paisajísticos como son los pinares de Robledo de Chavela o Valdemaqueda. Como zona ZEPA cabe destacar su gran valor como elemento de conectividad ecológica y territorial con amplios sectores del Sistema Central, como las colindantes Sierras de Malagón y de

Guadarrama. Por este motivo, la zona de muestreo tiene un alto valor protector ya que se debe fomentar la conservación de la masa forestal para que sirva de hábitat para especies vulnerables, casi amenazadas, en peligro de extinción y endémicas de aves del entorno. De aquí la importancia del estudio de decaimiento de *P. pinaster* en la zona.

El medio físico de este espacio se caracteriza por tener un clima mediterráneo templado, con escasas precipitaciones y sequía estival, y se desarrolla mayoritariamente sobre rocas graníticas y suelos arenosos procedentes de la alteración de estas, y rocas metamórficas constituidas por gneis. El tipo de suelo es un cambisol dístico (Arcgis, 2017), es decir, no retiene demasiada agua puesto que la primera capa de suelo se compone principalmente de arenas. Las precipitaciones percolan y pasan a la capa inferior, por lo que queda poca cantidad de agua disponible para las plantas.

Las principales formaciones vegetales que caracterizan este territorio se distribuyen por zonas claramente diferenciadas, constituyendo los encinares y los pinares, de piñonero (*Pinus pinea* L.) y resinero (*Pinus pinaster* Ait.). Estos pinares pueden constituir masas monoespecíficas o mixtas, en cuyo caso ambas especies de pinos pueden mezclarse entre sí o con encinas (*Quercus ilex* subsp. *Ballota* (Desf.) Samp.) o enebros (*Juniperus oxycedrus* L.). Además, del matorral asociado de jara (*Cistus ladanifer* L.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y torvisco (*Daphne gnidium* L.). En las parcelas de muestreo, se dan masas mixtas de *P. pinaster* y *P. pinea* centrando el estudio en *Pinus pinaster* subsp. *hamiltonii* (Ten.) Villar.

Metodología de muestreo

Las muestras fueron recogidas entre el otoño 2016 y la primavera 2017, concretamente entre los meses de octubre a marzo. La posición central del muestreo en el Monte de Valdemaqueda son 40°30'38" N 4°18'53" W (Tabla 1). Para el estudio se realizó un muestreo dirigido a lo largo de gradientes altitudinales en el que se seleccionaron en la medida de lo posible parcelas que incluyesen árboles con decaimiento y sin decaimiento (Tabla 1). Todas las parcelas del estudio se establecieron entre los 800 y 1.180 m, incluyendo el límite inferior altitudinal de distribución de la especie en la zona de estudio (Figura 4).

Tabla 1. Posición geográfica de las parcelas de muestreo.

Parcela	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Pendiente (°)	Orientación
1	40,508279	- 4,325034	800,00	26,3	Umbría
2	40,508290	- 4,324869	820,00	9,1	Solana
3	40,508470	- 4,324884	820,00	9,1	Solana
4	40,494777	- 4,316201	811,00	9	Indiferente
5	40,512934	- 4,324441	852,00	5,1	Umbría
6	40,507302	- 4,328484	854,00	9,8	Umbría
7	40,511120	- 4,321561	878,00	21,1	Umbría
8	40,507734	- 4,319889	794,00	10,7	Solana
9	40,508503	- 4,318795	818,00	8,5	Umbría
10	40,508522	- 4,318771	820,00	8,5	Umbría
11	40,508429	- 4,318179	838,00	5	Umbría
12	40,508674	- 4,316496	884,00	16,1	Umbría
13	40,507399	- 4,318454	858,00	16,2	Umbría
14	40,486044	- 4,335799	984,72	8,9	Umbría
15	40,486044	- 4,335799	984,72	8,9	Umbría
16	40,486848	- 4,336376	963,93	12,6	Umbría
17	40,495773	- 4,324236	812,11	31,1	Umbría
18	40,495890	- 4,324033	820,29	24,7	Indiferente
19	40,508724	- 4,319457	902,00	4	Umbría
20	40,509078	- 4,319731	898,05	12,2	Solana
21	40,509926	- 4,318777	915,18	6,8	Umbría
22	40,519479	- 4,307692	1.013,35	11,8	Solana
23	40,519619	- 4,307286	1.006,56	11,8	Solana
24	40,519960	- 4,306498	1.023,43	11,8	Solana
25	40,520119	- 4,306019	1.023,39	8,2	Solana
26	40,522950	- 4,310294	1.108,59	23	Solana
27	40,525309	- 4,305172	1.158,63	20,2	Solana
28	40,526486	- 4,305089	1.179,71	26,4	Solana
29	40,526935	- 4,304879	1.184,72	26,4	Solana
30	40,534042	- 4,318618	988,18	1	Indiferente
31	40,534430	- 4,319046	991,40	1	Indiferente
32	40,531896	- 4,319401	989,13	8	Umbría
33	40,522626	- 4,320627	942,46	21,8	Solana
34	40,522026	- 4,320827	942,00	21,8	Solana
35	40,519617	- 4,321515	908,10	6,2	Solana
36	40,519144	- 4,322499	918,22	6,2	Solana
37	40,519155	- 4,323346	922,00	6,2	Solana
38	40,519029	- 4,323233	917,20	2,4	Solana
39	40,517593	- 4,320263	912,98	26	Solana
40	40,534227	- 4,319729	995,00	0	Indiferente
41	40,534241	- 4,320211	992,64	0	Indiferente
42	40,530788	- 4,322193	1.028,62	14,7	Solana
43	40,528987	- 4,320348	969,57	4,9	Solana
44	40,509883	- 4,315095	940,94	8,4	Solana
45	40,500912	- 4,314617	1.034,78	11,3	Solana

La tabla nos da información acerca de las posiciones del centro de parcela con las coordenadas geográficas en el sistema WGS84, altitud en metros, pendiente en grados y orientación.

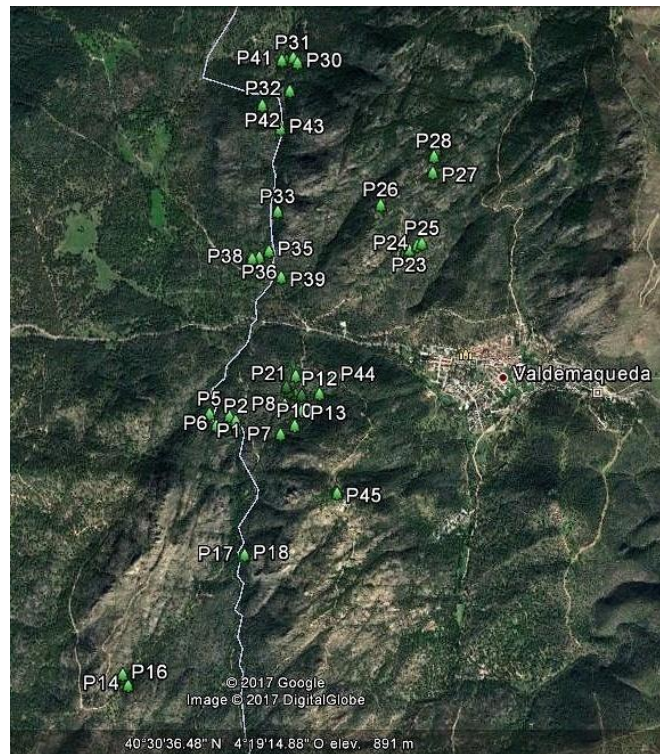


Figura 4. Mapa con las parcelas de muestreo.

La sintomatología principal para incluirlos en la categoría de árboles decaídos fue la defoliación junto con la presencia de muérdago, incluyendo así en no decaídos a árboles cuya copa tuviese menos de un 50% de defoliación y una infestación de muérdago distribuido en menos del 25% de la copa. De esta manera, se completó una muestra de 20 árboles sanos, 20 decaídos y 20 muertos en todo el muestreo, escogiendo entre 1 y 3 árboles en cada parcela. Aunque solamente en 3 casos encontramos árboles totalmente sanos, es decir, siempre se observa cierto grado de defoliación comparado con un árbol tipo en masas sin decaimiento en la región (Figura 5).



Figura 5. Árbol tipo decaído del Monte de estudio.

Alrededor de cada árbol muestreado se caracterizó el rodal midiendo distancias, diámetros y alturas de los árboles incluidos en un radio de 10 metros. En el muestreo se usó un Vertex IV y el transponder T3, para medir las alturas de los árboles (Tabla 2). Además, dentro de cada parcela se evaluaron las características sanitarias siguientes (Tabla 3): defoliación, afecciones por daños bióticos, como muérdago, orificios o galerías de insectos barrenadores y chancros causados por hongos. En la caracterización selvícola se incluyeron datos como presencia de caras de resinación, evaluación de la vegetación acompañante y regeneración en cada parcela. El inventario de plántulas se hizo con un cuadrado de 1 m. de lado en el centro de la parcela y en los cuatro puntos cardinales.

Tabla 2. Características dasométricas de la zona de estudio.

Variables selvícolas	Unidades	Metodología o material	Valor medio para <i>P. pinaster</i>	Desviación típica para <i>P. pinaster</i>
Densidad	nº pies/Ha	Densidad de árboles por Ha.	233,41	-
Dm	cm.	Forcípula	30,31	13,11
Hm	m.	Dendrómetro Vertex IV	13,80	12,13
AB	m ² /Ha	Sumatorio de las secciones normales	19,90	1,24
Dg	cm.	Diámetro del árbol de área basimétrica media	32,95	12,91
Do	cm.	Diámetro medio de los 100 árboles más gruesos por Ha.	43,66	31,42
Ho	m.	Altura media de los 100 árboles más gruesos por Ha.	12,90	4,89

Tabla 3. Variables evaluadas en el estudio a nivel árbol.

Variables sanitarias por árbol	Tipo de variable	Escala	Observaciones
Defoliación	Categoría	0 - 4	1 < 25%, 2 = 25 – 50%, 3 = 50 – 75%, 4 > 75% de defoliación
Cantidad de muérdago	Categoría	0 - 4	1 < 25%, 2 = 25 – 50%, 3 = 50 – 75%, 4 > 75% presencia en copa
Presencia de chancros	Binaria	0 - 1	0 = ausencia 1 = presencia
Signos de barrenadores	Binaria	0 - 1	0 = ausencia 1 = presencia
Árbol resinado	Binaria	0 - 1	0 = ausencia 1 = presencia

Dentro de cada parcela, se seleccionaron entre 1 y 3 árboles para el muestreo de patógenos. De cada árbol muestra, se recogieron dos tipos de barrenas para analizar la presencia de agentes patógenos: una extracción del fuste a la altura del cuello de aproximadamente 12 cm. de longitud con la barrena de Pressler y otra en la raíz de 7 cm. de longitud, o en su defecto raíces finas cuando la raíz del árbol era muy profunda o pivotante,

ya que en ocasiones la excavación no era lo bastante profunda (Figura 6). Cuando la altura de la copa lo permitía, se muestrearon ramillos donde una vez en laboratorio, en estas muestras se examinaron los datos de forma visual: decoloración, daños por insectos, sintomatología de hongos presentes en acículas, así como el parámetro de microfília.



Figura 6. Toma de muestras en campo.

En la fotografía de la izquierda se toma un canutillo de la parte del cuello del árbol y a la derecha se toman ramillos para su posterior estudio en laboratorio.

Se tomaron de 2 a 3 ramillos por cada árbol, para evaluar otras características como (Tabla 4) el número de metidas, defoliación en cada metida, decoloración del ramillo, longitud media de las acículas, inventario de insectos chupadores o defoliadores y sintomatología en acículas. Estos ramillos (0,5 – 1 cm. de grosor) se recogieron con una pértiga extensible.

Tabla 4. Variables evaluadas en el estudio a nivel ramillo.

Variables por árbol	Tipo de variable	Escala	Observaciones
Retención de acículas	Discreta	Años	Número máximo de metidas en los ramillos recogidos por muestra
Longitud de las acículas	Discreta	Centímetros	Longitud media de las 10 acículas más representativas del ramillo
Insectos chupadores	Binaria	0 - 1	0 = ausencia 1 = presencia
Insectos defoliadores	Binaria	0 - 1	0 = ausencia 1 = presencia
Sintomatología de hongos en acículas	Binaria	0 - 1	0 = ausencia 1 = presencia

Decoloración	Categoría	0 - 4	0 = Nula, 1 = Ligera, 2 = Moderada, 3 = Grave, 4 = árbol seco (Manual Red de Nivel I, 2013)
Defoliación	Categoría	0 - 4	0 < 10%, 1 = 11-25%, 2 = 26-60%, 3 = 61-99%, 4 > 99 % (Manual Red de Nivel I, 2013)

Además, se recogieron piñas del año de cada parcela, ya que es una especie vecera (Zazo y Jiménez, 2000), se recogieron del conjunto de los pies existentes en la parcela y no sólo de los árboles muestreados, ya que no siempre se podían recoger de los árboles elegidos para el muestreo de patógenos.

Análisis de las muestras en laboratorio

Los canutillos muestreados están en proceso de análisis, por lo que probablemente se encontrarán más hongos asociados al pino resinero en esta zona. Las muestras tomadas se desinfectaron superficialmente por inmersión sucesiva en etanol al 70% y lejía comercial al 30% con Tween 20 al 0,1%. Después, se lavaron en agua estéril y se dejaron secar sobre papel de filtro, antes de colocarlas en placas petri de 90mm. de diámetro en dos medios semiselectivos: Hagem y BDS, en partes iguales.

El medio de cultivo BDS (Worrall y Harrington, 1992) es selectivo para hongos patógenos de raíces y el medio Hagem (Laiho, 1970) para hongos de pudrición de madera (Aguadé, et al. 2015). Para preparar el medio de cultivo BDS se mezclaron 4 ppm de benomilo, 0,1 g. de estreptomycin, 1,5% de extracto de malta y 1,5% de agar. Para el medio Hagem fueron necesarios 0,5% de glucosa, 0,5% de extracto de malta y 1,5% de agar. Las placas se mantuvieron en incubación a 18°C en oscuridad durante 3 meses y semanalmente se procedió al aislamiento de cada uno de los hongos que fueron creciendo.

Los ramillos recogidos se evaluaron visualmente para identificar insectos defoliadores y chupadores, sintomatología de hongos en nomófilos, decoloración y defoliación, además de otras observaciones. Dichos ramillos fueron observados con lupa, después fueron seleccionados 5 braquiblastos de diferentes longitudes para tomar representatividad de las longitudes de las acículas, midiendo así diez acículas de cada pie para evaluar la microfília. Además, fueron seleccionados diferentes tipos de daños producidos por hongos en acículas seleccionadas de dichos ramillos. De las acículas dañadas, se tomaron las muestras afectadas para ponerlas en placas petri con agar agua 2% (20 g. de agar y 1 l. de agua estéril).

Las piñas se analizaron también en laboratorio con lupa, para identificar posibles cuerpos de fructificación de *Diplodia sapinea* (Desm.) J.J.Kickx.

Identificación de aislados

La identificación de hongos aislados en cada placa se realizó por la morfología de la colonia y la forma de las esporas con un microscopio llegando a identificar a nivel de género. Por otra parte, se llevó a cabo análisis molecular con extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) pudiendo identificar la especie del hongo o aproximación al mismo. La extracción de ADN por choque térmico, se realizó tomando una pequeña parte del micelio crecido previamente (0,5-0,75 g) en PDA en un microtubo de 2 ml y se le añadió un volumen de 50 µl de agua ultra pura. Luego se agitó en vortex y posteriormente el sobrenadante se incubó a 95 °C durante quince minutos. Inmediatamente se mete en hielo durante 7 minutos y se centrifugó a 10.000 x g, durante diez minutos.

Posteriormente se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y se preparó una cantidad de “master mix” proporcional al número de muestras que queremos analizar, 20 µl por unidad analizada. Añadiremos por muestra 15,3 µl de agua; 2,5 µl del tampón 10X (Ecogen); 0,05 µl de dNTPs (Ecogen); 0,5 µl de cada cebador (Ecogen); 1 µl de MgCl₂ (Ecogen) y 0,15 µl de Taq polimerasa, por cada unidad de muestra a preparar. En la PCR se usaron los cebadores ITS1F / ITS4 (Gardes y Bruns, 1993).

Continuamos el proceso añadiendo a cada microtubo 20 µl de “master mix” y 5 µl de producto ADN preparado en el paso anterior. Después, se introdujeron las muestras en un termociclador (Veriti, Applied Biosystems) en que pasan por distintas condiciones que consisten en una primera fase de desnaturalización a 94°C durante 2,5 minutos y 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 53°C durante 30 seg., 72°C durante 90 seg. y una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Las muestras fueron verificadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Pronadisa), 2,5 µl de RedSafe (Ecogen) y 50 ml. de TBE 1X. La electroforesis se realizó a 95 V durante 30 minutos. El resultado se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta para comprobar las muestras válidas. Por último, se purificó el producto de la amplificación con un kit (Millipore) y se envió al Servicio de Secuenciación de la UCM (Universidad Complutense de Madrid) para la secuenciación del fragmento amplificado ITS1F / ITS4. La identificación de la especie se realizó por comparación de la secuencia con otros hongos de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el algoritmo nucleotide BLAST. Para la identificación positiva de una especie se exige un mínimo de solapamiento del amplificación del 90% con un porcentaje de identidad del 97%.

Análisis estadístico

Para explorar la posible relación entre las variables (tanto de campo como de laboratorio) se utilizó el método multivariante de análisis de correspondencias múltiple. Puesto que este

método sólo permite el uso de variables categóricas, se realizó una transformación a sus respectivas categorías de algunas variables (Tabla 4). Este análisis se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVI, versión 16.1.03. La interpretación del mapa de correspondencias múltiple está basada en los puntos de encuentro que tienen la misma dirección desde el origen o que tienen aproximadamente la misma región espacial. En cambio, las distancias entre puntos no tienen forma de interpretarse, por lo que no tienen ninguna relación aparente.

Tabla 4. Variables transformadas para el análisis estadístico de correspondencias.

Variable	Escala	Observaciones
Altitud	0-1	0 < 1000 m. y 1 > 1000 m.
Pendiente	1 -3	1 < 10%, 2 = 10-20%, 3 > 20%
Orientación	0 - 2	0 = Indiferente, 1 = Umbría, 2 = Solana
Defoliación	0 - 4	1 < 25%, 2 = 25 – 50%, 3 = 50 – 75%, 4 > 75% de defoliación
Cantidad de muérdago	0 - 4	1 < 25%, 2 = 25 – 50%, 3 = 50 – 75%, 4 > 75% presencia en copa

Resultados

En los pies muestreados, se han obtenido 300 aislados de las placas de cultivo que ha permitido identificar 26 hongos. Como suele ser normal en estos estudios, han aparecido diversos hongos saprófitos en las muestras de las tres zonas del árbol analizadas (Figura 7). No se ha encontrado ningún hongo patógeno radicular asociado a los árboles en proceso de decaimiento, como *Armillaria spp.* o *Heterobasidion annosum*, por lo que posiblemente estos hongos no estén implicados en el decaimiento de la masa.

En las muestras analizadas podemos encontrar los 26 hongos identificados en diferentes tejidos del árbol como son *Acremonium sp.*, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (1912), *Aspergillus sp.*, *Botrytis cinerea* Pers., *Chaetomium sp.*, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, (1816), *Eladia saccula* (E. Dale) G. Sm., *Endophragmia sp.*, *Fusarium sp.*, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Gliocladium sp.*, *Mucor sp.*, *Byssochlamys sp.*, *Penicillium sp.*, *Phoma sp.*, *Rhizopus sp.*, *Sarocladium sp.*, *Sarocladium zeae* (W. Gams & D. R. Sumner), *Sydowia sp.*, *Thyriopsis halepensis* (Cooke) Theiss. & Syd., *Torula sp.*, *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier, *Ulocladium sp.* y *Umbelopsis versiformis* Amos & H.L. Barnett.

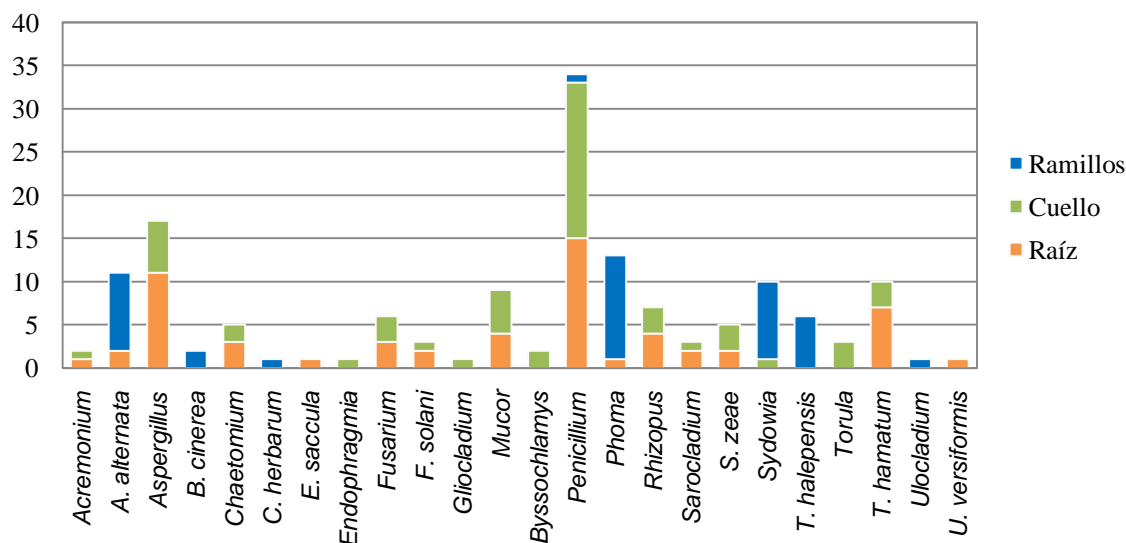


Figura 7. Hongos aislados de las diferentes partes de los pies muestreados.

En el gráfico se muestran los hongos encontrados en las diferentes muestras. El valor cuantifica la cantidad de muestras en las que ha aparecido dicha especie. Tanto en raíz, como en cuello, se cuantifican los hongos aparecidos en las barrenas recogidas en el muestreo, y en ramillos, se identifican los hongos aparecidos en las acículas de los mismos.

El patógeno *Thyriopsis halepensis* (Cooke) Theiss. & Syd., se ha encontrado en el 20% de las muestras recogidas tanto de árboles decaídos, como sanos, por lo que no es probable que tenga relación con los procesos de decaimiento. También se han encontrado otros géneros que podrían ser patógenos como *Phoma* sp., *Sydowia* sp., *Botrytis cinerea* que causan sintomatología en acículas y son un claro reflejo del estrés que está sufriendo la planta. Entre los hongos identificados molecularmente procedentes de los aislamientos de barrenas tomadas en cuello y raíz hemos encontrado *Fusarium solani*, *Acremonium* spp., *Sarocladium* spp., *Umbelopsis versiformis*, *Phoma herbarum*, *Eladía saccula* y *Trichoderma amatum*. Además de estos, hay otros aislados de hongos cuya secuencia de ITS no aparece en los bancos de datos con una similaridad superior al 97%. Este es el caso de *Graphilbum* cf. *rectangulosporium* (R.W. Davidson) Z.W. de Beer & M.J. Wingf aparecido en varias muestras tanto en el cuello como en la raíz, con una similaridad del 88%, por lo que no podemos afirmar que se trata de esta especie. Hay otros aislamientos que no aparecen con un solapamiento superior al 90%, siendo lo más cercano encontrado las especies *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Neonectria radicolica* Gerlach & Nilsson (1963), *Mortierella* spp. pero no se podría afirmar que los hongos aislados sean estas especies.

En los ramillos se apreció un aumento del estado de decoloración en función del estado sanitario (Figura 8). También disminuye la retención de acículas reteniendo ramillos incluso

de los 6 últimos años en los árboles sanos, mientras que en los decaídos tan sólo encontramos entre 3 y 4 metidas. La microfilia es otro dato a resaltar, ya que todos los árboles decaídos y muertos muestran microfilia notable con longitudes de menos de 7 cm. en algunas acículas.

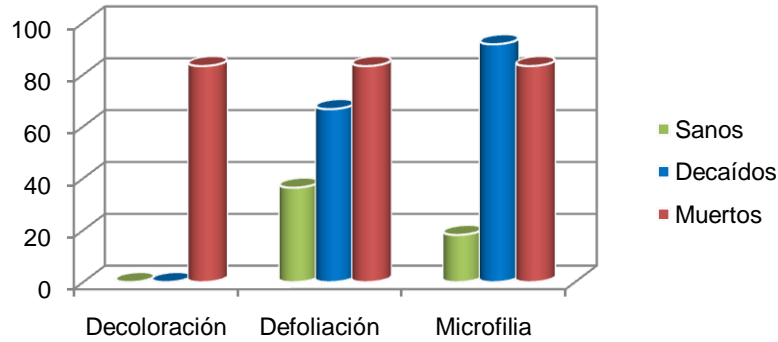


Figura 8. Gráfico de la afección de síntomas en los rodales de *Pinus pinaster* muestreados.

Con respecto a los insectos, o plagas presentes en los ramillos, podemos reflejar la presencia de especies de chupadores como *Leucaspis pini* (Hartig, 1839), y especies defoliadoras como *Brachyderes suturalis* (Graëlls, 1851), *Cryptocephalus pini* L. y *Thaumetopoea pityocampa* Denis & Schiffermüller, tanto en árboles decaídos como en sanos. El análisis de correspondencias múltiple (Figura 9), explica el 44% de la varianza en dos dimensiones y en las tres dimensiones un 60% (Tabla 5).

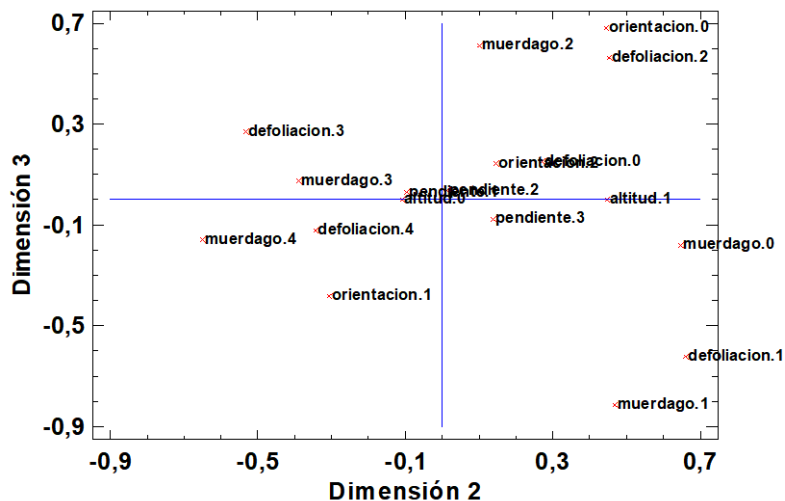


Figura 9. Mapa de correspondencias múltiple.

En este análisis se introducen las variables del estadillo de campo como son: altitud, pendiente, orientación, defoliación y presencia de muérdago en función de los árboles muestreados.

En el mapa de correspondencias podemos comprobar que la variable que está influyendo en menor medida es la altitud, que se encuentra en el eje del gráfico, en cambio, encontramos cierta relación entre el valor 1 para el muérdago y el valor 1 para defoliación que quiere decir que habitualmente un árbol con muérdago en el 25% de su copa, tenía en torno a un 33% de defoliación.

Tabla 5. Inercia y descomposición Chi-cuadrado.

Dimensión	Singular	Inercia	Chi-cuadrado	Porcentaje	Acumulativa	Histograma
1	0,4150	0,1722	262,6626	26,0215	26,0215	*****
2	0,3499	0,1224	186,7171	18,4977	44,5192	*****
3	0,3158	0,0997	152,0940	15,0677	59,5869	*****
4	0,2561	0,0656	100,0374	9,9105	69,4974	***
5	0,2194	0,0481	73,3849	7,2701	76,7675	***
6	0,1999	0,0400	60,9382	6,0370	82,8045	**
7	0,1843	0,0340	51,8074	5,1325	87,9370	**
8	0,1510	0,0228	34,7648	3,4441	91,3811	**
9	0,1357	0,0184	28,0803	2,7819	94,1629	*
10	0,1248	0,0156	23,7486	2,3527	96,5157	*
11	0,1157	0,0134	20,4136	2,0223	98,5380	*
12	0,0876	0,0077	11,6918	1,1583	99,6963	*
13	0,0448	0,0020	3,0657	0,3037	100,0000	*
TOTAL		0,6619	1009,406			

En esta tabla se muestra la inercia y el porcentaje acumulado del valor de Chi-cuadrado. Esta columna indica el porcentaje de la variabilidad total explicado por la primera dimensión, el primer par de dimensiones y así sucesivamente. En este caso, las primeras 3 dimensiones explican el 59,58% de la variabilidad.

En cuanto al muestreo en campo, es de destacar la presencia de pequeños rodales con nidos de procesionaria (*Thaumetopoea pityocampa*), al menos en dos de los rodales del muestreo. Dentro de nuestra zona de estudio es notable la gran presencia de muérdago presente en todos los pies muertos y decaídos. En cambio, tan sólo encontramos un árbol barrenado por escolítidos entre todos los estudiados, por lo que se hace notar la ausencia de insectos barrenadores.

También es importante la regeneración de pino resinero medida en la zona de estudio, es de destacar que solo han aparecido plántulas en una quinta parte de las parcelas estudiadas (Figura 10).

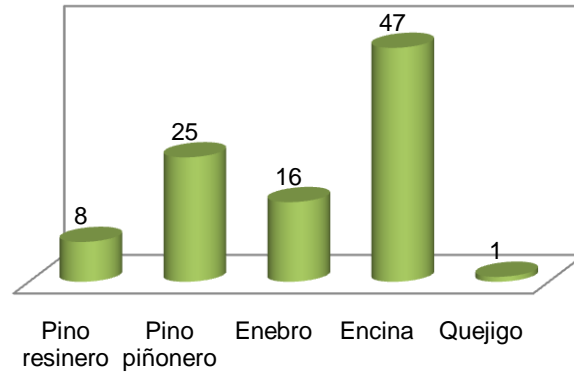


Figura 10. Gráfico que representa la frecuencia total de plántulas por especie encontradas en el muestreo.

Discusión

En Europa el abandono del uso tradicional de los bosques y el cambio de las políticas de conservación han contribuido al aumento de la cubierta arbórea, lo que lleva a una mayor competencia entre los árboles. Tal densificación podría aumentar la competencia por el agua entre los árboles vecinos en sitios másicos durante los períodos secos o en áreas propensas a la sequía, predisponiendo a una muerte regresiva de los árboles (Linares et al., 2010). Poco se sabe acerca de la participación de los agentes patógenos en los procesos de muerte a largo plazo. Por ejemplo, Manion (1981) consideró los patógenos fúngicos como factores oportunistas que afectan a los árboles previamente afectados; sin embargo, los patógenos también podrían actuar como conductores principales de muerte regresiva (Oliva et al., 2014).

En nuestro estudio, hemos intentado acercarnos al estudio de agentes patógenos asociados como posible factor de contribución al decaimiento. Anteriores estudios sobre el decaimiento en el pino resinero nos acercan al conocimiento de hongos patógenos asociados a las raíces como puede ser *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (Prieto-Recio et al., 2012). También, se han encontrado hongos ophiostomatales entre ellos *Ophiostoma minus* (Hedgcock) H. & P. (Álvarez et al., 2015) sobre en pies con decaimiento en la Meseta Norte, además de otros hongos relacionados con esta sintomatología. Este mismo patógeno, se encontró en los montes de El Escorial en Madrid (Soria et al., 2001), postulando que la mortalidad de la masa debida a *O. minus* aumenta en la época del solsticio de verano debido a la escasez de precipitaciones y a las altas temperaturas. En nuestro caso, hasta el momento no se han encontrado hongos ophiostomatales, pero no se puede descartar que aparezca en futuras prospecciones.

En este trabajo se exponen los resultados preliminares del muestreo llevado a cabo en el Sistema Central para identificar los posibles agentes bióticos asociados al decaimiento de *Pinus pinaster*. Los principales patógenos que podrían estar causando estos síntomas, *Armillaria* spp. y *Heterobasidion annosum*, no se han encontrado. Sin embargo, la contribución de estos patógenos al decaimiento y muerte de los árboles es todavía objeto de debate (Aguadé et al., 2015, Oliva et al., 2016). Oliva & Colinas (2007) encontraron presencia abundante de *Armillaria* spp. y *Heterobasidion annosum* en los bosques de *Abies alba* Mill. de Pirineos, pero no pudieron establecer una correlación positiva con la cantidad de árboles con síntomas de decaimiento. Otros hongos aislados en masas de *P. sylvestris* L. en Aragón (Camarero et al., 2015) fueron *Umbelopsis isabellina* (Oudem.) W. Gams y *Acremonium strictum* W. Gams, no se consideran patógenos pero si se encontraron de manera abundante. En este estudio también han aparecido especies similares pero en menor abundancia.

De acuerdo con la teoría de Manion (1981) el decaimiento y muerte de los árboles tiene lugar después de la ocurrencia en el tiempo de factores de predisposición, incitación y contribución. Un análisis de los principales parámetros medidos en la Meseta Norte en cuanto al clima, propiedades físico-químicas del suelo y gestión de la masa sugiere que los principales factores de predisposición que intervienen en la aparición del decaimiento son el déficit hídrico y la competencia (Prieto-Recio et al., 2015). Los resultados obtenidos, sin haber detectado un patógeno virulento claramente asociado al decaimiento, sugieren que posiblemente estemos ante un proceso complejo de decaimiento, donde aparece una interacción de factores bióticos y abióticos que estén causando el decaimiento de los árboles de la zona. Otros agentes abióticos de predisposición como el clima o la historia de perturbaciones de los rodales podrían estar relacionados con el fenómeno de decaimiento. Por otro lado, hay que tener en cuenta el estudio de Prieto-Recio (2015) que donde señala que el pino resinero puede encontrarse en su umbral de tolerancia fisiológica, al situarse actualmente su ecotono sea a una mayor altitud sobre el nivel del mar por efecto del cambio climático.

Aguadé et al. (2015) propone a *Onnia* spp. P. Karst como patógeno (factor de contribución), ayudado por la sequía (factor de predisposición) y la disponibilidad de carbono (factor de incitación). Sugiere que la defoliación reduce la absorción de carbono y por lo tanto restringe el crecimiento de la copa del árbol. También Prieto-Recio et al. (2015) también sugiere que la sequía es un factor de predisposición al decaimiento.

En este sentido, también la gestión forestal pudiera ser un factor que llevara a algunos árboles a que entren en el proceso de decaimiento. Las masas de *P. pinaster* aclaradas poseen un mejor estado sanitario que en las que no se ha llevado a cabo ningún tipo de gestión (Prieto-Recio et al., 2015) aunque por otro lado los árboles remanentes en rodales

con mayor grado de gestión o perturbaciones antrópicas parecen morir antes (Camarero et al., 2011). En este sentido, el decaimiento del abeto en Pirineos está más localizado y avanzado en árboles madre que fueron preservados de las talas para usar como semilleros (Oliva y Colinas, 2007). En este caso, en nuestra zona de estudio, hay signos de antiguas resinaciones que indican que fue el aprovechamiento principal del monte. También hay árboles actualmente en resinación aunque ninguno de los pies muestreados son árboles resinados o con signos de ello. Álvarez et al. (2015) sugiere que no hay una relación clara entre los daños causados por resinación debidos a su anterior aprovechamiento y el grado de decaimiento de las masas actuales.

Con respecto a los incendios forestales, esta es una zona donde ocurren frecuentemente, y su incidencia en la estructura de rodal y efecto sobre el suelo podría estar relacionada con el decaimiento analizado. En los últimos diez años la frecuencia ha sido de 24 incendios en 155 Ha. de superficie media (MAPAMA, 2017). Existen patógenos que se activan y están asociados a incendios forestales como es el caso del hongo *Rhizinia undulata* o *Leptographium gallaeciae* Fern. Magán (1981) aunque no se han detectado en la zona de muestreo.

En el caso del muérdago, una de las posibles causas de su abundancia puede ser algún factor biótico de predisposición (clima o perturbaciones) unido a una estructura más o menos abierta por la transparencia de la copa o su microfilia que da lugar a una mayor entrada de luz en las copas que el muérdago aprovecha, ya que necesita grandes cantidades de luz para su germinación y crecimiento (Oliva y Colinas, 2007). Esto da lugar a árboles que pierden su vitalidad, se debilitan e incluso llegan a morir cuando están parasitados por muérdago, el cual parece ser un factor más incluido en el fenómeno de decaimiento (Oliva et al., 2014). Según Sangüesa-Barreda (2012) el muérdago puede llegar a reducir el crecimiento del árbol e incrementar su pérdida de agua por transpiración.

La escasez de regeneración de *P. pinaster* y la mayor presencia de otras especies en la zona, en principio más tolerantes a la sequía como encina o pino piñonero pudiera ser un buen indicador del cambio en las condiciones en la zona para el pino resinero. De hecho, Zazo y Jiménez (2000) definen al *P. pinaster* como una especie de fácil regeneración natural, situación muy diferente a la se pudo observar en la zona de estudio. Según Oliva y Colinas (2007), una de las razones de ésta falta de regeneración en el abeto del Pirineo pudiera ser la gran cantidad de *Cistus ladanifer* L. existente en la zona, cuyas hojas tienen efectos alelopáticos sobre el suelo, además de ocupar grandes extensiones de terreno sin vegetación. En nuestra zona de estudio era patente la abundancia de esta especie, llegando a ocupar hasta un 40% de las parcelas de estudio, por lo que quizás pudiera tener alguna relación con la falta de regeneración de *P. pinaster*.

Conclusiones

No se ha encontrado una relación directa entre los hongos asociados al pino resinero y el decaimiento de la masa. Si parece existir una asociación entre el muérdago y los síntomas de defoliación encontrados en los focos de mortalidad de pies en la zona. Aunque aún quedaría por establecer si es la causa, o el efecto del decaimiento del pino resinero en la zona.

Uno de los hongos encontrados pertenece a la familia de los ofiostomatales: *Graphilbum* cf. *rectangulosporium*. Existen varias especies de estos hongos, asociados a decaimientos en especies forestales en otras regiones, sin embargo los datos obtenidos en nuestro estudio, no han permitido establecer esta asociación. Son necesarios nuevos estudios sobre este grupo de hongos, así como de sus insectos vectores para poder descartar su posible efecto sobre esta patología.

Los resultados obtenidos, tampoco han permitido establecer ninguna relación entre los agentes bióticos y el estado de las masas de pino resinero, aunque el inventario realizado parece apuntar a una falta de adaptación en la zona. Pudiera ser que los pinares resiníferos no toleran las condiciones existentes en la zona, como pueden ser el déficit de agua o la falta de materia orgánica en el suelo, que si aguantaría tanto el pino piñonero como la encina, presentes en la zona. Las diferencias en regeneración visualizadas en la zona de estudio entre las distintas especies pudieran apoyar esta hipótesis. Sin embargo, habría que evaluar el déficit de agua disponible en el suelo en los distintos rodales con su estado actual para poder descartar definitivamente un efecto del componente hídrico en su estado.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer la colaboración entre el departamento de Selvicultura y Gestión de Sistemas Forestales del INIA-CIFOR y el Instituto de Gestión Forestal Sostenible de la Universidad de Valladolid, gracias a la misma ha sido posible la realización de este proyecto. Además, me gustaría agradecer el apoyo de Rosa, gran maestra que me ha ayudado a superar mi ignorancia frente a los hongos. A Julio, que desde la distancia siempre ha estado disponible para imprevistos. A Laura, que me ha ayudado en todos los pasos del laboratorio. A Maite y Marga, que siempre estaban ahí para cualquier duda.

También tengo que agradecer ayudas externas, a veces son imprescindibles para finalizar un proyecto o una etapa. A mis amigos de la universidad, Ana, Almudena, César, José, Raquel, Rebeca y Rafa que aunque no de manera presente, sé que me apoyan en la distancia. A mis compañeros del máster, sobre todo a Laura y Caty que me ayudaron con las asignaturas. A mis amigas, Sandra y Cristina que siempre están ahí. A mis padres, que sin sus consejos no hubiese siquiera empezado a estudiar en la universidad. Y sobre todo a

Javier, tanto por su ayuda en la recogida de muestras como en el apoyo moral ha sido imprescindible para llegar a este punto del camino.

Bibliografía

Aguadé D, Poyatos R, Gómez M, Oliva J, Martínez-Vilalta J, 2015. The role of defoliation and root rot pathogen infection in driving the mode of drought-related physiological decline in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Physiology*, vol. 35, no. 3, pp. 229–242. ISSN 0829-318X. DOI 10.1093/treephys/tpv005.

Alía R, Martín S, De Miguel J, Galera R, Agúndez D, Gordo J, Salvador L, Catalán G, Gil L, 1996. Regiones de procedencia, *Pinus pinaster* Aiton. Ministerio de Medio Ambiente, Organismo Autónomo Parques Nacionales (DGCONA), Madrid.

Allen, CD, Macalady, AK, Chenchouni, H, Bachelet, D, McDowell, N, Vennetier, M, Kitzberger, T, Rigling, A, Breshears, DD, Hogg, EH (Ted) et al., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, vol. 259, no. 4, pp. 660–684. DOI 10.1016/j.foreco.2009.09.001.

Álvarez, G, Fernández, M and Díez, JJ, 2015. Ophiostomatoid fungi associated with declined *Pinus pinaster* stands in Spain. *Forest Systems*, vol. 24, no. 1, pp. 6. ISSN 2171-9845. DOI 10.5424/fs/2015241-05707.

Arcgis, 2017. Tipos de suelos de España. URL: <http://www.arcgis.com/home/webmap/>

Bravo A, Montero G, 2008. Descripción de los caracteres culturales de las principales especies forestales de España. Compendio de selvicultura aplicada en España. INIA, Madrid, pp.1039-1114.

Bueno A, Díez JJ, Fernández MM, 2010. Ophiostomatoid Fungi Transported by *Ips sexdentatus* (Coleoptera; Scolytidae) in *Pinus pinaster* in NW Spain. *Silva Fennica*, vol. 44. ISSN 0037-5330.

Camarero JJ, Gazol A, Sangüesa-Barreda G, Oliva J, Vicente-Serrano SM, 2015. To die or not to die: early warnings of tree dieback in response to a severe drought. *Journal of Ecology*, 103 (1), 44-57.

Crutzen, PJ, 2002. Geology of mankind. *Nature*, 415 (6867), 23-23.

Davydenko K, Vasaitis R, Menkis, A, 2017. Fungi associated with *Ips acuminatus* (Coleoptera: *Curculionidae*) in Ukraine with a special emphasis on pathogenicity of ophiostomatoid species. *European Journal of Entomology*, 114, 77.

FAO, 2012. Forest Management and Climate Change: a literature review. Rome.

Feeley KJ, Silman MR, 2010. Land-use and climate change effects on population size and extinction risk of Andean plants. *Global Change Biology*, 16 (12), 3215-3222.

Gardes M, Bruns, TD, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2 (2), 113-118.

Geoportal del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2017. URL: <http://sig.mapama.es/geoportal/visor.html>

Guada G, Camarero JJ, Sánchez-Salguero R, Cerrillo, RMN, 2016. Limited growth recovery after drought-induced forest dieback in very defoliated trees of two pine species. *Frontiers in plant science*, 7.

Hansen EM, & Lewis, K. J. (Eds.), 1997. *Compendium of conifer diseases*. St. Paul: APS Press.

Herrero A, Zavala MA, editores 2015. *Los Bosques y la Biodiversidad frente al Cambio Climático: Impactos, Vulnerabilidad y Adaptación en España*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid.

Kolbert E, 2014. *La sexta extinción: una historia nada natural*. Grupo Planeta (GBS).

Ley 16/1995, de 4 de mayo, Forestal y de Protección de la Naturaleza de la Comunidad de Madrid.

Laiho O, 1970. *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. *Acta Forestalia Fennica*, 106.

Linares JC, Camarero JJ, Bowker MA, Ochoa V, Carreira JA, 2010. Stand-structural effects on *Heterobasidion abietinum*-related mortality following drought events in *Abies pinsapo*. *Oecologia*, vol. 164, no. 4, pp. 1107–1119. DOI 10.1007/s00442-010-1770-6.

Manion PD, 1981. Tree disease concepts. Prentice-Hall, Inc.

Martínez-Vilalta J, Lloret F, Breshears DD, 2012. Drought-induced forest decline: causes, scope and implications. *Biology Letters* 8:689-691.

McDowell N, Beerling DJ, Breshears DD, Fisher RA, Raffa KF, Stitt M, 2011. The interdependence of mechanisms underlying climate-driven vegetation mortality. *Trends in Ecology and Evolution* 26:523-532.

Oliva J, Colinas C, 2007. Decline of silver fir (*Abies alba* Mill.) stands in the Spanish Pyrenees: Role of management, historic dynamics and pathogens. *Forest Ecology and Management*, vol. 252, no. 1, pp. 84–97. DOI 10.1016/j.foreco.2007.06.017.

Oliva, J, Stenlid, J, Martínez-Vilalta, J, 2014. The effect of fungal pathogens on the water and carbon economy of trees: implications for drought-induced mortality. *New Phytologist*, vol. 203, no. 4, pp. 1028–1035. ISSN 0028646X. DOI 10.1111/nph.12857.

Oliva J, Stenlid J, Grönkvist-Wichmann L, Wahlström K, Jonsson M, Drobyshev I, Stenström E, 2016. Pathogen-induced defoliation of *Pinus sylvestris* leads to tree decline and death from secondary biotic factors. *Forest Ecology and Management*, 379, 273-280.

Plan de Gestión de los espacios protegidos Red Natura 2000: Zona Especial de Conservación ES3110007 “Cuencas de los ríos Alberche y Cofio” y Zona de Especial Protección para las Aves ES0000056 “Encinares del río Alberche y río Cofio”, 2016. Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio. Dirección General de Medio Ambiente. Comunidad de Madrid.

Prieto-Recio C, Martín-García J, Bravo F, Díez, JJ, 2015. Unravelling the associations between climate, soil properties and forest management in *Pinus pinaster* decline in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management*, vol. 356, pp. 74–83. DOI 10.1016/j.foreco.2015.07.033.

Prieto-Recio C, Romeralo, C, Bezos D, Martín-García J, Martínez-Álvarez P, Botella L, Díez, JJ, 2012. First Report of *Heterobasidion annosum* on *Pinus pinaster* in Spain. Plant Disease, 96 (5), 770-770.

Sánchez-Salguero R, Navarro-Cerrillo RM, Camarero JJ, Fernández-Cancio A, 2012. Selective drought-induced decline of pine species in southeastern Spain. Climatic Change, vol. 113, no. 3–4, pp. 767–785. DOI 10.1007/s10584-011-0372-6.

Sangüesa-Barreda G, Camarero JJ, Oliva J, Montes F, Gazol A, 2015. Past logging, drought and pathogens interact and contribute to forest dieback. Agricultural and Forest Meteorology, 208, 85-94.

Sangüesa-Barreda G, Linares JC, Camarero JJ, 2012. Mistletoe effects on Scots pine decline following drought events: insights from within-tree spatial patterns, growth and carbohydrates. Tree physiology, 32 (5), 585-598.

Soria S, Saiz de Omeñaca JA, Rodríguez-Carmona MA, 2001. Estudio de las enfermedades que afectan a *Pinus pinaster* Ait. en montes de Patrimonio Nacional de El Escorial (Madrid) y determinación del agente o agente causales. Patrimonio Nacional. Servicio de Jardines y Montes. Madrid.

Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM, editores 2013. The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 33–115, doi:10.1017/CBO9781107415324.005

Superficie forestal de la comarca de Robledo de Chavela, 2017. Subdirección General de Conservación del Medio Natural. Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio. Comunidad de Madrid. URL: <http://gestionamadrid.org/desvan/desvan/AccionDatosUnaSerie.icm?codSerie=898191>

Western AW, Grayson RB, Blöschl G, 2002. Scaling of soil moisture: a hydraulic perspective. Annual Review of Earth and Planetary Sciences 30:149-180.

Worrall JJ, Harrington TC, 1992: *Heterobasidion*. In: Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. Ed. by Singleton L, Mihail J, Rush C St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press, pp. 86–90.

Zazo J, Jiménez JM, 2000. Revisión, actualización y contribución de los caracteres culturales y otras características de interés de las más importantes coníferas forestales españolas. E.U.I.T. Forestal. Madrid.

Zuber D, 2004. Biological flora of central Europe: *Viscum album* L. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 199 (3), 181-203.