



2022
Lleida

27·1
junio · juny
julio · juliol

Cataluña
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022
ISBN 978-84-941695-6-4
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



El patógeno *Diplodia sapinea* en pinares de Cataluña: efectos sobre el arbolado y regenerado, y estrategias de gestión

CABALLOL, M. ^{1,2}, COLL, LI. ^{1,2}, SERRADÓ, F. ^{1,2}, MÉNDEZ, A.L. ^{1,2}, CAMARERO, J.J. ³, COLANGELO, M. ³, REDONDO, M.Á. ⁴ y OLIVA, J. ^{1,2}

¹ Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal, Universidad de Lleida.

² JRU CTFC – Agrotecnio.

³ IPE-CSIC.

⁴ Swedish University of Agricultural Sciences.

Resumen

Diplodia sapinea es un hongo endófito que se vuelve patógeno y causa necrosis en los brotes del pino en condiciones de estrés por sequía o cuando sufre daños por granizo. En Cataluña ha habido un aumento de los ataques de este hongo y se han desarrollado una serie de experimentos en campo para poder gestionar su impacto. Hemos estudiado los efectos del patógeno sobre el regenerado y sobre el arbolado adulto en diferentes especies de pino, así como su distribución regional en un gradiente climático y su relación con variables de masa. También, hemos estudiado la relación del microbioma con el desarrollo de síntomas. Nuestros resultados muestran como la distribución del patógeno no es aleatoria y que existen variables de masa y de árbol que determinan su severidad. Se proponen diferentes estrategias de gestión para minimizar su impacto y se discuten los aspectos de la enfermedad que aún están por estudiar.

Palabras clave

Cambio climático, *Pinus sylvestris*, sequía, granizo.

1. Introducción

Diplodia sapinea es un hongo endófito que habita los tejidos leñosos de la mayoría de pinos de la península (ZLATKOVIĆ et al., 2017). Como patógeno facultativo, aprovecha la debilidad del árbol para causar daño. En condiciones de estrés por sequía o después de una tormenta de granizo, *D. sapinea* causa necrosis en los brotes tiernos del año (BRODDE et al., 2019; OLIVA et al., 2021). La necrosis puede extenderse hacia partes de las ramas más viejas y, en determinados casos, atacar la totalidad de la copa. Debido a la necrosis, las acículas se secan y mueren, pero se mantienen en la copa durante un tiempo. Los daños aparecen rápido, y en un par de semanas, las copas de pinar se vuelven de color marrón (OLIVA et al., 2021). El hongo fructifica rápido en los tejidos afectados. Las esporas de este hongo se dispersan por salpicaduras de lluvia a poca distancia debido a su gran tamaño (BRODDE et al., 2019). Dependiendo de la severidad, esta enfermedad puede causar pérdidas económicas y ecológicas notables. Los árboles afectados pierden crecimiento y debido a que el hongo ataca los brotes nuevos, pierden la guía principal afectando a la rectitud del tronco. En caso de sufrir ataques severos, los árboles pueden morir.

Diplodia sapinea es un patógeno que ha despertado un fuerte interés debido a su reciente expansión a zonas frías del continente europeo (BRODDE et al., 2019; TERHONEN et al., 2021). En los últimos años se ha detectado la presencia del hongo en países donde no había sido reportado con anterioridad como Suecia, Estonia o Finlandia. En 2016, un gran ataque causado por *D. sapinea* cerca de Estocolmo mostró por primera vez que no solo el patógeno se había conseguido establecer en zonas frías, sino que además era capaz de causar daños importantes sobre *Pinus sylvestris*, especie principal de los bosques boreales (BRODDE et al., 2019). *Diplodia sapinea* es un patógeno

sensible al frío, y por tanto un candidato claro a expandir su rango y su severidad en un contexto de cambio climático (STENLID & OLIVA, 2016).

Se sabe poco de esta enfermedad en la península Ibérica. Salvo trabajos en el País Vasco (ITURRITXA et al., 2015) y Castilla León (BOTELLA & DIEZ, 2011), existe poca información de la epidemiología de esta enfermedad, de sus impactos sobre el arbolado y sobre la regeneración y de cómo el cambio climático puede afectar a su capacidad de generar daño. En Cataluña, esta enfermedad cobró cierta importancia cuando unas graves defoliaciones afectaron una zona de pinares en la zona norte de Barcelona en 2018 después de un periodo de tormentas de granizo. En este trabajo de síntesis explicamos los resultados de diferentes estudios realizados en Cataluña y que tienen relevancia para la gestión de riesgos vinculados al cambio global. Concretamente, los trabajos OLIVA et al. (2021), CABALLOL et al. (2022) y CABALLOL et al. (in prep.).

En el primer trabajo estudiamos la comunidad microbiana de pinos afectados por *D. sapinea* después de una tormenta de granizo en la localidad de Oristà (Barcelona). Escogimos una zona de estudio donde cuatro especies de pino estaban creciendo de manera entremezclada: *P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. pinea* y *P. halepensis*. En campo vimos que había una variabilidad importante en cuanto a sintomatología dentro y entre especies de pino. Nos planteamos la posibilidad de que la diferencia de síntomas pudiera estar asociada al hecho de que algunos pinos tuvieran una comunidad de hongos endófito diferente. La principal hipótesis era que una comunidad capaz de obtener N o compuestos ricos en nitrógenos como prolina podría impedir la expansión de *D. sapinea* en los brotes de los pinos y por tanto su capacidad de causar daño. En el segundo trabajo, evaluamos la supervivencia de diferentes especies de pino al ataque de *D. sapinea*. La principal hipótesis es que la supervivencia iba a depender de la cantidad de copa afectada por el ataque. Mediante dendrocronología evaluamos si el vigor de los árboles antes del ataque podía afectar a la supervivencia. En el tercer trabajo ampliamos la zona de estudio a todo el pre-pirineo catalán. En este estudio, evaluamos la distribución altitudinal de la presencia y los daños causados por *D. sapinea* tanto en arbolado adulto como en la regeneración de *P. nigra*. Nuestra hipótesis era que la presencia y severidad de los daños causados por *D. sapinea*, serían menores a mayor altitud debido a las condiciones de frío que se experimentan en invierno.

2. Objetivos

En esta síntesis se resumen los resultados de diferentes trabajos cuyos objetivos fueron: (i) estudiar el papel del microbioma de los árboles en el desarrollo de síntomas de la enfermedad de los brotes causada por *D. sapinea*, (ii) evaluar qué factores afectan la supervivencia de los árboles frente a un ataque de *D. sapinea* y (iii) describir la relación entre el clima y los daños causados por *D. sapinea* en pinares sub-mediterráneos.

3. Metodología

Describimos de manera breve la metodología seguida en cada uno de los estudios. En el primer estudio se analizó la comunidad fúngica endófito de los brotes de los pinos mediante técnicas de secuenciación masiva (LINDAHL et al., 2013). Se analizaron muestras de pinos sintomáticos y asintomáticos de dentro y fuera de la zona afectada por granizo. También se analizó las respuestas de diferentes hongos a sustratos ricos en N o C y prolina, mediante mediciones de su crecimiento en placas de Petri. Los datos de crecimiento se utilizaron para la anotación funcional de la comunidad de hongos en base a la abundancia relativa obtenida por metabarcoding. En el segundo estudio se marcaron árboles con distintos grados de afectación y se hizo un seguimiento de su mortalidad durante 2 años después del ataque por *D. sapinea*. En 2021, se hicieron mediciones de dendrocronología para entender hasta qué punto la mortalidad o la capacidad de restablecer la copa estaba relacionada con la sequía. En el tercer estudio, se midió la afectación por

D. sapinea en arbolado adulto y regenerado de *P. nigra* en 70 parcelas distribuidas a lo largo un gradiente altitudinal. Se hicieron medidas de la cantidad de esporas y de la viabilidad. Para correlacionar daños con temperatura entre parcelas y dentro de la masa se simuló la temperatura del arbolado a distintas alturas. En los tres estudios se cuantificó el patógeno mediante PCR a tiempo real con el protocolo de LUCHI *et al.* (2005).

4. Resultados

En el primer estudio vimos que después de sufrir la misma tormenta de granizo había diferencias de severidad importantes entre especies de pino (**Tabla 1**). Los daños se concentraron de manera mayoritaria en *P. pinea* y *P. sylvestris*, mientras que en *P. nigra* y *P. halepensis* la afectación fue menor. En cuanto a la cantidad de patógeno presente en el tejido, vimos que *P. sylvestris* era la especie que tenía una mayor cantidad de *D. sapinea* de manera endófito. Dentro de cada especie, los árboles sintomáticos eran los que mostraban más cantidad de patógeno en sus tejidos. Los árboles asintomáticos de dentro de la zona de granizo tenían una cantidad menor de *D. sapinea* que los que tenían síntomas, pero mayor que la que encontrábamos en los árboles asintomáticos fuera de la zona de granizo. Para entender porque en árboles que habían sufrido granizo, *D. sapinea* no había podido crecer, analizamos la comunidad fúngica para ver si era diferente, no solo a nivel de número de especies, sino a nivel funcional. Descubrimos que mientras en los árboles asintomáticos la comunidad estaba altamente segregada, eso no ocurría en los árboles sintomáticos indicando la posibilidad de que en los árboles asintomáticos estuviera habiendo un proceso de competición entre hongos. Esa competición no aparecía en árboles sintomáticos. En árboles asintomáticos detectamos un clúster de endófitos que estaba negativamente asociado a la cantidad de *D. sapinea*. Los árboles con este clúster tenían endófitos con una capacidad de capturar N más alta que *D. sapinea* y por lo tanto con el potencial de bloquear su crecimiento.

Tabla 1. Severidad media de daños causados por *D. sapinea* después de una tormenta de granizo en diferentes especies de pino. Abundancia de *D. sapinea* según PCR a tiempo real.

Especie	Severidad de daños (% de copa afectada)	Abundancia de <i>D. sapinea</i> (número de copias)
<i>Pinus sylvestris</i>	43,3 ab	1792 a
<i>Pinus nigra</i>	42,4 b	848 ab
<i>Pinus pinea</i>	52,8 a	808 a
<i>Pinus halepensis</i>	24,4 c	148 b

En el segundo estudio vimos que el factor más determinante a la hora de predecir la supervivencia a un ataque de *D. sapinea* después de una tormenta de granizo, era la especie de pino (**Tabla 2**). La especie *P. sylvestris* mostró una mortalidad mucho mayor que la de las otras especies de pino. No encontramos una asociación entre la probabilidad de morir y el crecimiento anterior. Pinos con un crecimiento vigoroso antes de la tormenta de granizo tenían las mismas probabilidades de morir que árboles con un crecimiento bajo si habían sufrido el mismo grado de defoliación. Al reconstruir la dendrocronología de los árboles afectados vimos que la muerte estaba asociada a una pérdida de crecimiento los años posteriores a la tormenta de granizo. De entre los árboles supervivientes vimos que la capacidad de recuperar la copa también dependía de la especie de pino. *Pinus halepensis* fue la única especie que recuperó la copa, mientras que las otras especies se quedaron como estaban o empeoraban (**Tabla 2, Figura 1**).

Tabla 2. Mortalidad de diferentes especies de pino en el primer año después de sufrir un ataque de *D. sapinea* fruto de una tormenta de granizo. Se muestra también si los árboles supervivientes fueron capaces de recuperar la copa perdida en un plazo de años.

Especie	Severidad de daño (% afectación copa)	Evolución de daño en copa al cabo de 2 años	Probabilidad de mortalidad (1 año)
<i>Pinus sylvestris</i>	Alta (> 70%)	Sigue igual	0,30
	Media (70-30%)		0,01
	Baja (<30%)		0,01
<i>Pinus nigra</i>	Alta (> 70%)	Sigue igual	0,02
	Media (70-30%)		0
	Baja (<30%)		0
<i>Pinus pinea</i>	Alta (> 70%)	Empeora	0,01
	Media (70-30%)		0
	Baja (<30%)		0
<i>Pinus halepensis</i>	Alta (> 70%)	Mejora	0,03
	Media (70-30%)		0
	Baja (<30%)		0



Figura 1. Ejemplo de ataque de *Diplodia sapinea* en una masa de *Pinus nigra* semanas después de una tormenta de granizo (imagen derecha). Las acículas de los brotes afectados se secan y se caen. Ejemplo del aspecto de un rodal de *Pinus nigra*, 2 años después de un ataque de *D. sapinea* donde los árboles no han sido capaces de recuperar la copa (imagen izquierda).

En el tercer estudio vimos como los daños por *D. sapinea* en rodales de *P. nigra* seguían un patrón altitudinal de acuerdo con nuestra hipótesis. Vimos que no solo la altitud afectaba sino también la apertura del bosque, indicando que masas más o menos cerradas tenían una capacidad de afectar a la temperatura de manera diferente (Tabla 3). En masas cerradas el efecto de la temperatura fue menor, mientras que en masas abiertas fue mayor. Vimos que la cantidad de *D. sapinea* en el regenerado estaba muy asociada a la cantidad de esporas viables de *D. sapinea* y daños en la cubierta. Esta asociación nos llevó a investigar hasta qué punto la temperatura de la cubierta podía estar afectando a la cantidad de daños en la regeneración. Encontramos que el

efecto de *D. sapinea* sobre la regeneración se podían explicar por un efecto indirecto de la temperatura en los árboles adultos. Las parcelas con más daños de *D. sapinea* eran aquellas donde había una mayor cantidad de regeneración de especies forestales del género *Quercus*.

Tabla 3. Predicción de la severidad de daños en función de la densidad en función de la altitud. Las altitudes de 500 m.s.n.m y 1000 m.s.n.m representan altitudes cercanas al límite inferior y al límite superior de distribución de *P. nigra*.

Altitud (m.s.n.m)	Densidad (pies/ha)	Severidad daños (% copa afectada)
500	300	9%
	1000	6%
	2500	3%
1000	300	4%
	1000	3%
	2500	2%

5. Discusión

Los estudios realizados en *D. sapinea* en Cataluña tienen relevancia para la gestión del riesgo que supone esta enfermedad y su vinculación al cambio global. *Diplodia sapinea* es un hongo termófilo que tiene potencial de aumentar su capacidad de causar daño en los pinares de la península. Los trabajos realizados aportan información relevante para la gestión de una masa de pinar afectada por el patógeno. Así, lo primero que tenemos que hacer es estimar la probabilidad de que los árboles que están afectados mueran. Mediante los modelos de mortalidad de CABALLOL et al. (2022) es posible estimar ese riesgo en el caso de cuatro especies de pino muy abundantes de nuestro ambiente. Sin duda, la especie más vulnerable es *P. sylvestris* y será en esta especie donde habrá que tomar las decisiones más drásticas.

En zonas muy afectadas puede ser recomendable no sacar todos los árboles y dejar en pie aquellos que muestran un estado más o menos saludable, dado que probablemente contengan un microbioma que los hace más resistentes a desarrollar la enfermedad (OLIVA et al. 2020). No sabemos si este microbioma en particular está determinado genéticamente, o hasta qué punto mantener esos árboles aumentará las posibilidades de que el nuevo arbolado que crezca en esa zona lo tengan. Sin embargo, en otras especies de coníferas sí que se han visto que el genotipo influye en el microbioma y que existe cierta estructura espacial del mismo en el bosque (REDONDO et al. 2022) y por lo tanto se puede considerar conservar esos árboles como una estrategia de refuerzo de la masa ante futuros ataques.

La gestión de una zona afectada por *D. sapinea* debe considerar también aspectos epidemiológicos a nivel de rodal. En el estudio de CABALLOL et al. (in prep) hemos visto como masas más abiertas y situadas en altitudes menores son más vulnerables a ataques de *D. sapinea*. Es posible que ambas condiciones favorezcan un recalentamiento del bosque que beneficie a un patógeno de carácter termófilo como *D. sapinea*. Este aspecto puede ser importante a la hora de gestionar masas localizadas en el límite de distribución inferior de la especie y donde los efectos del calentamiento global serán mayores. Un mayor calentamiento no solo afectará a los árboles adultos, sino que puede afectar a la regeneración. En nuestros trabajos, hemos visto que una mayor temperatura del bosque está ligada a un aumento de la producción de esporas en las copas y a una mayor infección de los plantones que crecen debajo.

6. Conclusiones

Nuestro trabajo muestra la importancia de conocer la biología del sistema de estudio y su interacción con variables susceptibles de variar en un contexto de cambio global como la

temperatura. Futuros estudios deben tratar de entender el porqué de la alta susceptibilidad de *P. sylvestris* a esta enfermedad. *Pinus sylvestris* es una especie forestal que cubre amplias áreas forestales de montaña donde el frío puede haber frenado hasta ahora la aparición de enfermedades. De acuerdo con nuestros resultados, *P. sylvestris* podría sufrir un incremento de daños importante por parte de *D. sapinea* en las próximas décadas.

7. Agradecimientos

Agradecemos a la Diputación de Barcelona por la financiación. J.O. fue financiado con el contrato 'Ramón y Cajal' RYC-2015-17459 del Ministerio. M.C. fue financiada con la beca AGAUR 2021FI_BO0223 de la Secretaría de Universidades e Investigación de la Generalidad de Cataluña y del Fondo Social Europeo.

8. Bibliografía

BOTELLA, L.; DIEZ, J.J.; 2011. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Divers.* 47 9-18.

BRODDE, L., ADAMSON, K.; CAMARERO, J.J.; CASTAÑO, C.; DRENKHAN, R.; LEHTIJÄRVI, A.; LUCHI, N.; MIGLIORINI, D.; SÁNCHEZ-MIRANDA, Á.; STENLID, J.; ÖZDAĞ, Ş.; OLIVA, J.; 2019. Diplodia tip blight on its way to the north: drivers of disease emergence in Northern Europe. *Front. Plant. Sci.* 9.

CABALLOL, M.; MÉNDEZ-CARTÍN, A. L.; SERRADÓ, F.; DE CÁCERES, M.; COLL, L.; OLIVA, J.; in prep. Linking temperature and pathogen spillover between canopy trees and regeneration in *Pinus nigra* forests in the Pyrenees. Manuscrito.

CABALLOL, M.; RIDLEY, M.; COLANGELO, M.; VALERIANO, C.; CAMARERO, J.J.; OLIVA, J.; 2022. Tree mortality caused by Diplodia shoot blight on *Pinus sylvestris* and other Mediterranean pines. *For. Ecol. Manag.* 505.

ITURRITXA, E.; MESANZA, N.; BRENNING, A.; 2015. Spatial analysis of the risk of major forest diseases in Monterey pine plantations. *Plant Pathol.* 64 880-889.

LINDAHL, B.D.; NILSSON, R.H.; TEDERSOO, L.; ABARENKOV, K.; CARLSEN, T.; KJØLLER, R.; KÖLJALG, U.; PENNANEN, T.; ROSENDAHL, S.; STENLID, J.; KAUSERUD, H.; 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide. *New Phytol.* 199 288-299.

LUCHI, N.; CAPRETTI, P.; SURICO, G.; ORLANDO, C.; PAZZAGLI, M.; PINZANI, P.; 2005. A real-time quantitative PCR assay for the detection of *Sphaeropsis sapinea* from inoculated *Pinus nigra* shoots. *J. Phytopathol.* 153 37-42.

OLIVA, J.; RIDLEY, M.; REDONDO, M.A.; CABALLOL, M.; 2021. Competitive exclusion amongst endophytes determines shoot blight severity on pine. *Funct. Ecol.* 35 239-254.

REDONDO, M.A.; OLIVA, J.; ELFSTRAND, M.; BOBERG, J.; CAPADOR, H.D.; KARLSSON, B.; BERLIN, A.; 2022. Host genotype interacts with aerial spore communities and influences the needle mycobiome of Norway spruce. *Environ. Microbiol.* in press

STENLID, J.; OLIVA, J.; 2016. Phenotypic interactions between tree hosts and invasive forest pathogens in the light of globalization and climate change. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 371.

TERHONEN, E.-L.; BABALOLA, J.; KASANEN, R.; JALKANEN, R.; BLUMENSTEIN, K.; 2021. *Sphaeropsis sapinea* found as symptomless endophyte in Finland. *Silva Fenn.* 55.

ZLATKOVIĆ, M.; KEČA, N.; WINGFIELD, M.J.; JAMI, F.; SLIPPERS, B.; 2017. New and unexpected host associations for *Diplodia sapinea* in the Western Balkans. *For. Pathol.* 47.