



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-502

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Estudio de la presencia y distribución de *Gremmeniella abietina* en Castilla y León a través de evaluación en campo e imágenes de satélite

ROMERALO, C.¹, CÔTÉ C.², LAFLAMME G.², SANTAMARÍA, O.³, PAREDES V.⁴, DIEZ, J.J.¹

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

² Laurentian Forestry Centre, Natural Resources Canada, 1055 Rue du P.E.P.S., G1V 4C7, Quebec, QC, Canada.

³ Instituto Universitario de Investigación de la Dehesa (INDEHESA), Universidad de Extremadura. Avda. Adolfo Suárez, s/n. 06007 Badajoz, España.

⁴ Universidad de Valladolid, Valladolid, España

Gremmeniella abietina es un hongo patógeno que produce daños severos en bosques de coníferas en el hemisferio norte. En España, se aisló en 2001 de pies sintomáticos de pino carrasco. En ese año, se evaluaron 37 masas en los alrededores de la zona de detección para conocer la distribución del patógeno. Se encontraron cuerpos de fructificación en 5 parcelas aunque 25 de ellas presentaron síntomas típicos de infección. En 2012, las mismas masas fueron revisadas y además de la inspección visual, se tomaron muestras para conocer en laboratorio si *G. abietina* era el hongo responsable de estos daños. Por último, para comprobar si el uso de índices de vegetación podría ser una buena estimación del estado fitosanitario en nuestras masas, se calculó el índice de vegetación normalizado (NDVI) de imágenes del Landsat 7 ETM+ y se comparó con los datos de campo. Los resultados mostraron que 11 años después de su detección había cuerpos de fructificación en 3 de las 37 parcelas muestreadas, mientras que los resultados de laboratorio mostraron presencia de ADN de *G. abietina* en 10 parcelas. La mayoría de las masas mostraron síntomas de decaimiento, sugiriendo otros posibles factores, o la combinación de varios, como responsables de estos síntomas.

Palabras clave

Defoliación, decoloración, decaimiento, hongos patógenos, imágenes Landsat.

1. Introducción

El patógeno *G. abietina* es un hongo ascomicete (anamorfo *Brunchorstia pinea* (P. Karst) v Höhn) que es el responsable de la destrucción de muchas plantaciones y bosques naturales de

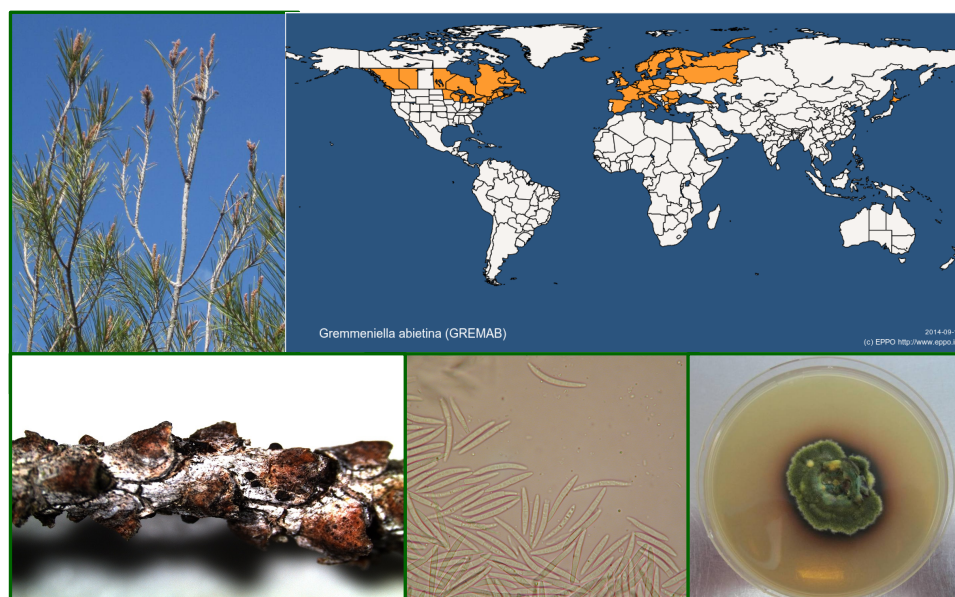


Figura1. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: pintisecado, distribución mundial de *Gremmeniella abietina*, cuerpos de fructificación asexual (picnidios), esporas sexuales (conidios) y el patógeno en cultivo puro.

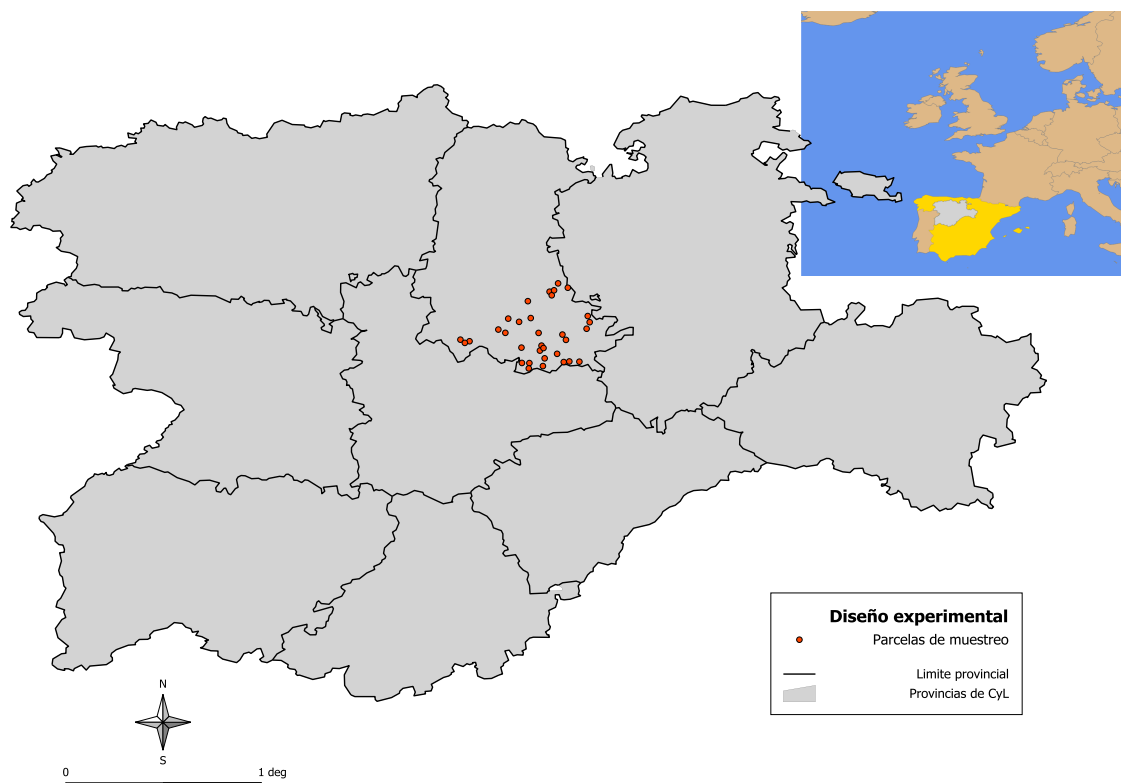


Figura 2. Distribución de las parcelas de muestreo

coníferas por todo el Hemisferio Norte, como el norte y centro de Europa, Norteamérica y Japón (Figura 1) (DORWORTH, 1979; KAITERA AND JALKANEN, 1992). El patógeno ataca principalmente a árboles del género *Abies*, *Larix*, *Picea* y *Pinus*. El hongo produce la muerte de brotes, chancros y daño en la corteza que pueden conducir a la muerte de los árboles, aunque la extensión del daño depende de la variedad (raza y biotipo), el hospedaste y las condiciones ambientales (BUTIN, 1995). En España, el hongo fue detectado por primera vez en 1929 en masas de *Pinus pinaster* en el norte del país (MARTÍNEZ, 1933). Sin embargo, el estado asexual del hongo fue aislado en 1999 en masas de *P. halepensis* produciendo síntomas de distorsión de brotes terminales, defoliación y la muerte de algunos árboles (Figura 1) (SANTAMARÍA ET AL., 2003).

El pino carrasco es una especie naturalmente presente en todos los países de la costa mediterránea con un área de ocupación estimada en 3 millones de ha. Su distribución es fundamentalmente costera, aunque en Marruecos y España también crece en el interior (RUIZ DE LA TORRE, 1979). Los bosques de pino carrasco pueden crecer desde el nivel del mar hasta los 1000 m por encima del nivel del mar aunque encuentran su óptimo alrededor de los 800 m. Esta especie se ha descrito como termófila, xerófila y calcícola aunque tolerar condiciones muy desfavorables, substratos ácidos y amplias variaciones térmicas. Sin embargo, su característica más distintiva es su tolerancia a la sequía y al calor (GIL ET AL., 1996).

Un índice de vegetación puede ser definido como un parámetro calculado a partir de los valores de la reflectancia a distintas longitudes de onda, y es particularmente sensible a la cubierta vegetal, (GILBERT ET AL. 1997). Una cubierta vegetal en buen estado de salud, tiene una firma espectral que se caracteriza por el contraste entre la banda del rojo (entre 0,6 y 0,7 μm .), la cual es absorbida en

gran parte por las hojas, y el infrarrojo cercano (entre 0,7 y 1,1 μm .), que es reflejada en su mayoría. Esta cualidad de la vegetación permite la realización de su valoración cualitativa.

2. Objetivos

El principal objetivo del trabajo fue estudiar la distribución actual del hongo *G. abietina* en masas de repoblación de pino carrasco de Palencia y Valladolid, evaluar los síntomas asociados a su infección y caracterizar las masas evaluadas. Además se emplearon imágenes satelitales para comprobar si eran un buen indicador del estado de las masas.

3. Metodología

El área de estudio fueron 35 masas de repoblación de pino carrasco y pino piñonero en las provincias de Palencia y Valladolid (Figura 2). Estas plantaciones se realizaron a mediados de los años 60 con el objetivo de prevenir la erosión. Las masas fueron evaluadas en el año 2001 y revisadas de nuevo en agosto de 2012, y eran masas puras o mezcladas con otras especies de coníferas o frondosas (*Quercus ilex*). Dentro de las masas, se establecieron parcelas circulares de 15 m de radio de forma aleatoria en zonas que presentaron síntomas. Una vez establecido el centro, todos los árboles con diámetro normal superior a 7cm fueron medidos y evaluados. Los siguientes parámetros fueron evaluados para todos los árboles: especie, diámetro normal (cm), altura (m), defoliación (%), puntisecado (si/no), acículas en bandera (si/no), exudaciones en las yemas (si/no), distorsión de ramillos terminales (si/no), chancros (si/no), presencia de picnidios de *G. abietina* (si/no). Además se anotaron varias características de las masas: Coordenadas UTM, altitud, especie dominante, orientación, tipo de suelo y pendiente. También se realizaron unos transectos rectangulares de 20m de largo y 15 de ancho, en los que se evaluaron los árboles del perímetro. Estos datos se analizaron a través de un modelo logístico en el programa estadístico R, para ver la probabilidad de encontrar *G. abietina* en función de las características de la masa.

Para comprobar si *G. abietina* era el hongo responsable de los síntomas observados en campo, cuatro árboles con síntomas de decaimiento (i.e. defoliados o con distorsión de ramillos terminales sin acículas) fueron muestreados en cada masa. Las muestras fueron recogidas de la parte más alta de la copa con la ayuda de una pértiga (4m como máximo). Los árboles muestreados pertenecían al estrato dominante o codominante, eran árboles adultos con diámetro normal superior a 20 cm y alturas en torno a 15 m. Todas las muestras fueron inspeccionadas en búsqueda de cuerpos de fructificación de *G. abietina*. Posteriormente, se cogió un trozo de 10 cm de la ramilla, conteniendo la zona de transición entre la parte verde y la necrosada. Las muestras se liofilizaron durante 24h y se molieron a polvo fino con bolas de tungsteno. El ADN se extrajo directamente del material vegetal, siguiendo el protocolo descrito por Hamelin et al 2000 ligeramente modificado. Para realizar las amplificaciones, se usaron diluciones 1:100 y 1:1000 en lugar de ADN. La PCR se realizó siguiendo las recomendaciones del proveedor de la polimerasa Phusion HF Taq (Thermofisher). Se realizó una PCR anidada con primers específicos para *G. abietina* para amplificar la región 18S (840pb) del ADN ribosómico. Las condiciones de la amplificación fueron las descritas por Zeng et al. (2005) con los primers específicos para *G. abietina*: NSGrem 3 (5'-AACCTGAACTTGTTGGTT-3'), NSGrem 4 (5'-TGTTGGAGTGTGCCACT-3') en la primera ronda, seguido de una segunda ronda de PCR con los primers NSGrem 5 (5'-CACTGATCCGACCGGT-3') y NSGrem 6 (5'-CCTTCGACAAGGAAGG-3'). Los productos de la PCR (5 μl) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en 1 \times TAE buffer. Los geles fueron teñidos con GelRed y visualizados con luz UV.

Las imágenes de satélite Landsat 7 ETM+ (resolución espacial de 30x30m) de las zonas de estudio pertenecientes a Agosto de 2012, se descargaron del Global Visualization Viewer (GloVis) del Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS). Las imágenes se procesaron con el programa QGIS v. 2.8. Con las bandas 3 y 4, que pertenecen al rojo y al infrarrojo próximo respectivamente, se calculó el Índice de Vegetación Diferencial Normalizado (NDVI) mediante la siguiente expresión:

$NDVI = ((IRC - R) / (IRC + R))$, donde: IRC es la reflexión en el infrarrojo cercano y R es la reflexión en el rojo.

4. Resultados

Los principales síntomas encontrados en las parcelas fueron puntisecado, distorsión de ramillos terminales y defoliación (Figura 3). Las parcelas presentaron variabilidad en densidad y área basimétrica (Tabla 1). La mayoría de las parcelas mostraron síntomas asociados con la infección del patógeno, sin embargo durante el muestreo de 2012, sólo se encontraron 3 parcelas con presencia de picnidios (cuerpos de fructificación asexual) de *G. abietina*, en comparación con las 5 parcelas de 2001. No obstante, la amplificación de ADN con los primers específicos del hongo, mostró presencia de *G. abietina* en 10 de las parcelas.



Figura 3. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Síntomas encontrados en las parcelas de campo: defoliación y distorsión de ramillos, picnidios, muestras y necrosis.

Tabla 1. Características de las parcelas de estudio.

Parcela	n (pies)	Densidad (pies/ha)	Diámetro normal (cm)	Altura (m)	Área Basimétrica (m ² /ha)	Defoliación (%)	XUTM	YUTM	Especie dominante	Picnidios Ga (campo)	Presencia Ga ADN
00-VAL	25	354	16 (8)	7,2 (3,3)	7,1	30 (17,7)	387135	4639946	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
01-MEL	13	184	19 (5)	7,3 (1,5)	5,2	17,9 (5,5)	394693	4675217	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
02-SAN	28	396	12 (4)	5,5 (1,1)	4,5	27,5 (20)	390450	4674300	<i>Pinus halepensis</i>	No	Si
03-AST	49	693	19 (6)	12,6 (2,3)	19,7	23,5 (13,3)	398766	4672678	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
04-AST	41	580	12 (3)	5 (1,3)	6,6	33 (18)	391028	4670543	<i>Pinus halepensis</i>	Si	No
05-AST	29	410	17 (6)	8,9 (2,5)	9,3	19,1 (4,4)	391903	4668482	<i>Pinus halepensis</i>	No	Si
06-AST	37	523	15,5 (4,5)	7,4 (1,2)	9,9	21,5 (5,9)	392929	4671308	<i>Pinus halepensis</i>	Si	Si
07-PAL	43	608	15,7 (3,7)	8,5 (1,3)	11,8	22 (4,2)	373277	4655525	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
08-PAL	31	439	18,9 (6,2)	11,3 (2,8)	12,3	20,2 (4,9)	368975	4649392	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
10-AMU	38	538	13,2 (5,1)	7,2 (2,7)	7,4	18 (3,2)	381756	4665308	<i>P. halepensis y P. pinea</i>	No	No
14-VAL	35	495	10,6 (4,7)	4,9 (2,1)	4,4	18,9 (3,3)	382815	4655689	<i>P. halepensis y P. pinea</i>	No	No
15-VLB	31	439	14,6 (5,1)	6,3 (1,9)	7,3	22,4 (4,6)	377844	4653624	<i>Pinus halepensis</i>	No	Si
18-VLH	35	495	15,4 (6,6)	7,5 (3)	9,2	27,4 (11,4)	406969	4656476	<i>P. halepensis y P. pinea</i>	No	Si
19-TAB	50	707	10,4 (4,4)	6,2 (2,1)	6	30,8 (22)	407741	4652969	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
20-VLM	21	297	22,3 (5,3)	15,6 (2)	11,6	16,6 (3,7)	371911	4647477	<i>Pinus halepensis</i>	No	Si
21-TOR	37	523	16,6 (4,9)	10,8 (2,2)	11,3	22,6 (5,5)	352781	4643961	<i>Pinus halepensis</i>	No	Si
22-AMP	31	439	10,8 (6,7)	4,6 (2,3)	4	31 (11)	356630	4642986	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
23-VLM	23	325	22,3 (3,8)	10,7 (1,2)	12,7	20,7 (4,8)	371075	4642700	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
24-AMP	25	354	14,2 (4,6)	7 (2,3)	5,6	26,4 (15,9)	354622	4642098	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
27-REI	59	835	13,9 (3,3)	7,7 (1,4)	12,7	21,2 (3,9)	386007	4647190	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
28-BAL	53	750	15,8 (4,3)	11 (1,9)	14,7	24,7 (14,3)	396094	4646098	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
29-BAL	34	481	17,6 (7,6)	9,5 (3)	11,7	28 (15,1)	397548	4643057	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
30-TAR	37	523	13,2 (4,3)	7,3 (1,7)	7,2	20,4 (3,8)	378598	4638950	<i>P. halepensis y P. pinea</i>	No	No
31-GEV	30	424	18,7 (9,5)	9,9 (3,7)	11,7	25,7 (20,3)	386397	4637126	<i>P. halepensis y P. pinea</i>	Si	No
32-VAL	19	269	24,7 (7,6)	11,1 (3,4)	12,9	27,6 (25,7)	387950	4638555	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
33-CAS	30	424	18,7 (5,3)	9,3 (2)	11,7	17,8 (4,3)	393682	4635187	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
34-VER	38	538	11,2 (6,9)	6,2 (2,6)	5,3	27,2 (6,3)	388347	4632703	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
35-TAB	34	481	9,1 (4,1)	4,6 (1,9)	3,1	20,6 (5)	406393	4649264	<i>P. halepensis y P. pinea</i>	No	No
36-CUB	35	495	15,9 (3,8)	8,8 (1,4)	9,8	21,9 (3,8)	378653	4630238	<i>Pinus halepensis</i>	No	Si
37-POB	26	368	11,8 (4,4)	5,5 (1,7)	4	28,3 (5,2)	381819	4630118	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
38-ALB	29	410	16,7 (8,5)	8,9 (4,1)	9	23,4 (4,8)	387534	4628330	<i>P. halepensis y P. pinea</i>	No	No
40-VER	42	594	14,5 (4,6)	7,6 (1,5)	9,8	30,8 (22,5)	396423	4630478	<i>Pinus halepensis</i>	No	Si
41-HER	35	495	16 (4,9)	7,4 (1,3)	10	24,8 (3,9)	398805	4630773	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
42-POB	42	594	11 (4,8)	5,6 (1,7)	5,6	26,6 (13,5)	381506	4627083	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
44-HER	36	509	23,1 (9,3)	11,6 (4,8)	21,3	21,8 (5,1)	403079	4630583	<i>Pinus halepensis</i>	No	No
45-CAS	22	311	22,6 (5,7)	10,6 (2)	12,5	22 (4)	410800	4627575	<i>Pinus halepensis</i>	No	Si



Se realizó un modelo logístico para estudiar la probabilidad de encontrar *G. abietina* en función de varios parámetros de la masa (defoliación, altura media, diámetro medio, área basimétrica, densidad, orientación y pendiente). Ninguno de los factores fueron significativos excepto la pendiente del terreno.

Además, se generaron las imágenes satelitales para el NDVI (Figura 4) para las masas de estudio y se observó que los índices de vegetación presentaron una buena correlación con la defoliación pero no con la presencia de *G. abietina*.

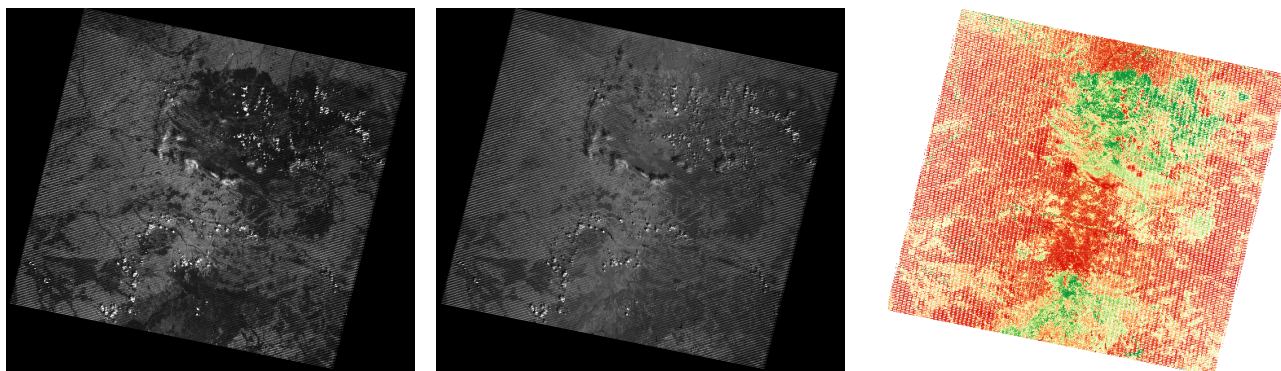


Figura 4. Banda 3 (Rojo) y Banda 4 (infrarrojo próximo) de una imagen satelital que incluye una de las masas de estudio (parcela 00-VAL) y el NDVI en falso color generado por QSIG.

5. Discusión

El pino carrasco durante la segunda mitad del siglo XX y gracias a su gran adaptabilidad, se ha usado para repoblaciones más allá de su distribución natural, especialmente en zonas áridas para prevenir la erosión del suelo, por razones socioeconómicas y en algunos casos para producción forestal (RUIZ DE LA TORRE, 1979; MAESTRE AND CORTINA, 2004). Los resultados de nuestro estudio mostraron que la mayoría de las masas presentaron síntomas como defoliación, puntisechado o distorsión de ramillos terminales. Ya que se trata de una especie termófila especialmente sensible a las heladas (GIL ET AL. 1996), es probable que estos síntomas sean el resultado de un estrés abiótico unido a que esta situación le hace más vulnerable a la infección por patógenos, algunos de ellos oportunistas, entre los que se encuentra *G. abietina* (WITZELL & KARLMAN, 2000).

El decaimiento generalizado que ha sufrido el pino carrasco en España, fue puesto de manifiesto en 1998 por la Dirección General de la Conservación de la Naturaleza (DGCN) (SPCAN 1998). El estudio de SANTAMARÍA ET AL. (2007) describió varias especies fúngicas, entre ellas *G. abietina*, como responsables del decaimiento de masas de pino carrasco en zonas de Castilla y León, mientras que BOTELLA ET AL (2010) concluyó que la combinación de factores abióticos, que predisponen a la masa, junto con la presencia de varias especies de hongos patógenos, podrían explicar la situación actual del pino carrasco en la península ibérica.

Nuestros resultados sugieren que el NDVI está correlacionado con la defoliación de las masas. Esto puede ser debido a que este índice es un buen estimador de la fracción de la radiación fotosintéticamente activa interceptada por la vegetación; está directamente relacionado con la

capacidad fotosintética y, por tanto, con la absorción de energía por la cobertura arbórea (SELLERS, 1985).

6. Conclusiones

La principal conclusión del estudio fueron que la mayoría de las masas mostraron síntomas de decaimiento, sugiriendo la combinación de varios factores como responsables de estos síntomas.

7. Agradecimientos

Este estudio fue financiado mediante el proyecto del Ministerio Control biológico de *Gremmeniella abietina* en España (AGL2008-03622).

8. Bibliografía

BOTELLA L, SANTAMARÍA O, DÍEZ JJ; 2010. Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. *Fungal Divers* 40:1–11

BUTIN, H. 1995. Tree Diseases and Disorders, Causes, Biology and Control in Forest and Amenity Trees. Oxford University Press. Oxford, pp. 252.

DORWORTH, C. E. 1979. Influence of inoculum concentration on infection of Red pine seedlings by *Gremmeniella abietina*. *Phytopathology* 69, 298-300.

GIL, L., DÍAZ, P., JIMÉNEZ, P.; ROLDÁN, M., ALÍA, R., AGÚNDEZ, D., DE MIGUEL, J., MARTÍN, S., TUERO, M., 1996. Las regiones de procedencia de *Pinus halepensis* Mill. en España. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.

GILABERT, M.A., GONZÁLEZ-PIQUERAS, J. AND GARCÍA-HARO, J. (1997): «Acerca de los Índices de Vegetación». *Revista de Teledetección*, No. 8.

HAMELIN, R. C., LECOURE, N., HANSSON, P., HELLGREN, M., LAFLAMME, G., 1996. Genetic differentiation within the European race of *Gremmeniella abietina*. *Mycological Research* 100, 49-56.

KAITERA, J., JALKANEN, R., 1992. Disease history of *Gremmeniella abietina* in a *Pinus sylvestris* Stand. *Eur. J. For. Pathol*, 22, 371-378.

MAESTRE, F.T., CORTINA, J., 2004. Are *Pinus halepensis* plantations useful as a restoration tool in semiarid Mediterranean areas? *For. Ecol. Manage.* 198, 303–317. doi:10.1016/j.foreco. 2004.05.040

MARTÍNEZ, J., 1933. Una grave micosis del pino observada por primera vez en España. *Bol Soc Española De Historia Natural* 33, 25-29.

RUIZ DE LA TORRE, J., 1979. Árboles y arbustos de la España peninsular. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. 512pp.

SANTAMARÍA, O., PAJARES, J.A., DIEZ, J.J., 2003. First report of *Gremmeniella abietina* on *Pinus halepensis* in Spain. *Plant Pathol.* 52, 425.

SANTAMARÍA O, BOTELLA L, DIEZ JJ; 2008. *Gremmeniella abietina* in North-western Spain: distribution and associated mycoflora. *Acta Silv Lign Hung, Spec. Edition*:137–145.

SELLERS, P. J.; 1985. Canopy reflectance, photosynthesis, and transpiration, *International Journal of Remote Sensing*, 6, 1335-1372.

SPCAN (1998) Distribución de Daños Soflamado Observados en *Pinus halepensis*.

WITZELL J, KARLMAN M, 2000. Importance of site type and tree species on disease incidence of *Gremmeniella abietina* in areas with a harsh climate in Northern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15, 202–9.

ZENG, Q.Y., HANSSON, P., WANG, X.R., 2005. Specific and sensitive detection of the conifer pathogen *Gremmeniella abietina* by nested PCR. *BMC Microbiol* 5, 65.

