



Foto 1. Encina con numerosas ramillas secas causadas por *Diplodia corticola*.

Ángel Pintos¹, Marc Mascaró¹, Juan Planas², Luis Núñez³

¹Interdisciplinary Ecology Group, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca.

²Palma de Mallorca.

³Servei de Sanitat Forestal, Conselleria de Agricultura pesca y medio Ambiente, Govern de les Illes Balears, Palma de Mallorca.

Decaimiento de la encina *Quercus ilex* causado por *Diplodia corticola* en los encinares de Menorca

El decaimiento severo de las encinas (*Quercus ilex* L.) y robles (*Quercus suber* L.) en la cuenca del Mediterráneo ha sido atribuido a factores abióticos como la sequía y bióticos como los hongos patógenos y los insectos perforadores. Este estudio tuvo como objetivo identificar el agente causante de los síntomas de marchitamiento en cuatro encinares de Menorca, caracterizados por chancros externos, lesiones necróticas, muerte regresiva, hojas marrones adheridas a las ramas durante meses. Se realizaron análisis moleculares (ITS nrDNA, tef1, tub2) que permitieron identificar consistentemente a *Diplodia corticola* como el principal patógeno. Este es la primera cita de *D. corticola* en las encinas de las Islas Baleares, lo que resalta su importancia como agente patógeno en los encinares de la región. Este hallazgo confirma que la enfermedad del chancro causada por *D. corticola* es la especie más ampliamente distribuida y la más virulenta de los encinares del mediterráneo.

Palabras clave: encinas, *Botryosphaerales*, *Diplodia corticola*, PCR, ITS, tef1 y tub2

La isla de Menorca se encuentra en el archipiélago Balear, situada en el centro del Mediterráneo Occidental, donde se canaliza fuertes vientos provenientes de Europa. El clima es considerado mediterráneo subhúmedo con una temperatura media anual de 16,7°C y una pluviometría anual de 549 L/m². se caracteriza por tener una sequía estival importante, inviernos suaves e inestabilidad otoñal creada por las tormentas de final de verano. El cambio climático que venimos sufriendo desde hace unas décadas ha provocado en Menorca un aumento de la temperatura media anual de más de un grado en los últimos 40 años, el aumento de temperatura se ha dado especialmente en los meses de primavera y en octubre. No se ha observado una tendencia clara en la disminución de las precipitaciones anuales, pero sí se ha visto que las lluvias importantes se retrasan de octubre a noviembre, con lo que se alarga el periodo de sequía estival, el periodo seco y caliente más largo provoca un mayor déficit de agua en los ecosistemas con las consecuencias de debilidad para la fauna y la flora¹.

La mayor parte de la superficie forestal de la Isla de Menorca son bosques, las principales formaciones boscosas son las maquias de acebuche *Olea europaea* (var *sylvestris*) L., encinar *Quercus ilex* L. y los bosques mixtos de Pino *Pinus halepensis* Miller y encina. Según el mapa de hábitats forestal de 2007 de Menorca, cuenta con una superficie de 1.837,52 ha de encinar puro y 5.360 ha de bosque mixto con una o más especies arborescentes. En total, la superficie forestal con presencia de encina es de 7.197 ha, ocupa las zonas más sombrías y húmedas del centro de la isla. El sotobosque de los encinares lo forman *Smilax aspera*, *Arbutus unedo* L., *Cyclamen balearicum*, *Asplenium communis*, *Viburnum tinus*, *Myrtus communis*, *Phyllirea media*, *Paeonia cambessedesii*, *Pistacia lentiscus*. A finales del siglo pasado en las encinas *Quercus ilex* se reconoció un serio problema de decaimiento en la Península Ibérica y en la cuenca del Mediterráneo. Varios factores, entre ellos las sucesivas sequías graves, los insectos perforadores de la

madera y enfermedades han estado implicados en el decaimiento de las encinas. Los chancros y la muerte regresiva se consideraron factores importantes (Luque, 2001). el hongo del suelo *Phytophthora cinnamomi* fue el primer hongo que se demostró como agente causal del marchitamiento de *Quercus* spp. (Brasier, 1992, 1996; Muñoz y col., 1996). En las Islas Baleares aún no se ha encontrado *Phytophthora cinnamomi* asociado a las encinas, seguramente asociado a las bajas humedades del suelo. En Menorca las encinas enfermas muestran una variedad de síntomas que incluyen muerte regresiva, muerte de los brotes jóvenes, chancros que producen exudados en troncos, ramas y tallos, escaldado de las hojas que adquieren un color marrón rojizo en que las hojas a menudo permanecen en las ramas durante meses, síntomas que tradicionalmente se han asociado a algunas especies de *Botryosphaeria*-ceae Theiss. y Syd. con hongos anamórficos relacionado con las encinas (Sinclair y Lyon, 2005).

Biscogniauxia mediterranea es responsable de causar chancros carbonosos en la corteza de robles y encinas, fue mencionada por Malençon y Marion (1952), Torres Juan (1972) y Oliva y Molinas (1984). En 1986, Oliva y Molinas hicieron referencia a hongos del género *Diplodia* como causantes de chancros y decaimientos en ramas y troncos de árboles debilitados en los robledales de Girona. Vajna (1986) citó a *Diplodia mutila* sobre *Q. pétreea* en Hungría. Luque y colaboradores (1989) informaron que, tras el descorche, *Botryosphaeria stevensii* y su anamorfo *D. mutila* invaden los troncos expuestos, provocando el marchitamiento y la muerte de *Q. suber* en el noroeste de España.

Sutton (1980) y Vajna (1986) comentan que el estatus taxonómico de *D. mutila* es controvertido, debido a la gran variación en la formación de picnidios y conidios. En sus aislados, observaron un tamaño mayor de los conidios en comparación con los estudios de Shoemaker (1964) y Sutton (1980), lo que atribuyeron a la variabilidad natural de las especies.

Es posible que algunas colecciones de *Botryosphaeria stevensii* y *D. mutila* cultivadas a partir de chancros obtenidos de ramas de *Quercus* spp., fueran erróneamente identificadas.

Alves y col. (2004), basándose en colecciones encontradas en Portugal, Italia y España sobre ramas muertas y chancros de *Q. ilex* y *Q. suber*, describieron *B. corticola*, así como su anamorfo *D. corticola*. Estos hallazgos, respaldados por la micro-morfología y el análisis de datos de secuencias de ITS se utilizaron para distinguir especies morfológicamente similares dentro del género.

Phillips y col. (2013) clarificaron el estatus taxonómico de *D. mutila*, sugiriendo que muchas de las primeras citas podrían haber sido erróneamente identificadas, como se menciona en los trabajos de Alves y col. (2004) y Lazzizzera y col. (2008). Además, confirmaron los hospederos de *D. mutila* que incluyen *Chamaecyparis lawsoniana*, *Fraxinus*, *Malus*, *Populus*, *Taxus baccata* y *Vitis vinifera*, con una distribución geográfica que abarca Inglaterra, Francia, Italia, Portugal, Sudáfrica y Estados Unidos.

Al mismo tiempo, Phillips y col. (2013) aclaran que *D. corticola* es la especie responsable del decaimiento, muerte regresiva y chancros en *Q. suber* y *Q. ilex*, contribuyendo al decaimiento general de las encinas y robles en la Península Ibérica y otras regiones del Mediterráneo.

El objetivo de este estudio es identificar, tanto morfológica como genéticamente, el organismo que provoca el decaimiento en las encinas de Menorca y evidenciar el problema de decaimiento que afecta a los encinares de la isla.

³ <https://adaptecca.es/sites/default/files/documentos/canvi-climatic-menorca>

Materiales y métodos

Este estudio se llevó a cabo en los encinares de Menorca, específicamente en cuatro encinares de *Quercus ilex* L. que presentaban síntomas de decaimiento. Durante la fase de campo, se recolectaron muestras de tres encinas, separadas entre sí por 50 metros, de cada bosque. Se seleccionaron tallos y ramas con chancros y con clara presencia de banderolas y fogonazos Torres y col. (2019). Las muestras se colocaron en bolsas de plástico con cierre y se marcaron adecuadamente.

En el laboratorio, se utilizaron bisturís previamente desinfectados y pasados por la llama para realizar cortes en trozos de rama o tallo de 5 mm², obtenidos de la zona de avance de la infección. Estos trozos se desinfectaron con etanol al 70% durante 2 minutos (Pintos y col., 2021) y se lavaron varias veces con agua destilada autoclavada. Una vez secos, se sembraron en placas de Petri de 90 mm que contenían medio de Agar Malta y agua, suplementado con 500 mg/litro de cloranfenicol (MEA 2% + Cl).

En cada placa de Petri, se sembraron tres trozos a 25°C, y las placas se sellaron con parafilm de laboratorio. Se revisaron diariamente para observar el crecimiento de las hifas. Los aislamientos para cultivo puro se obtuvieron a partir del crecimiento activo del ápice de una hifa, que se sembró en MEA 2% a 25°C. Además, varios cultivos se sembraron en Agar agua al 1,5%, añadiendo tres trozos de 1,5 cm de acícula de pino, autoclavados dos veces, sobre la superficie del medio PNA (Pine Needle Agar) para inducir la formación de picnidios en algunas especies de *Botryosphaeria*-ceae (Crous y col., 2006).

Identificación morfológica

Las descripciones morfológicas fueron hechas de aislados creciendo en el medio de 2% Agar Malta (MEA 2%) para la colonia y de los picnidios que crecieron sobre PNA para una temperatura de 25 ° C. Las muestras se estudiaron con un microscopio Zeiss Axioscope con contraste de interferencia diferencial (DIC). Las preparaciones para el microscopio se realizaron en un montaje con agua destilada. Las imágenes

del microscopio se obtuvieron con una cámara FLIR utilizando el software Microscopia Oberta A. Coloma. Las medi-

ciones fueron tomadas con el software FIJI win64 y reportadas como: valor máximo y mínimo entre paréntesis.



Foto 2. Hojas secas adheridas al árbol causado por *Diplodia corticola*.



Fotos 3. Encinas atacadas por *Diplodia corticola*.

Taxonomía

Diplodia corticola A. J. L. Philips, Alves & Luque. Fase sexual: no vista en este estudio. Fase asexual: Conidioma estromático, inmerso, parcialmente erumpente al madurar, de color marrón oscuro a negro, circular de más de 1mm de diámetro, multiloculado, lóculos de 270-325mm de diámetro, pared del peridio compuesta de varias capas de células finas, las células externas del peridio de marrones a hialinas en el interior. Ostiolo central, circular, papilado. Células conidiógenas de 11-20 X 4-7mm, holoblasticas, discretas, cilíndricas, hialinas, proliferando en el mismo nivel dando lugar a engrosamientos periclinales. Conidios hialinos, gutulados con contenido granular, pared gruesa, cilíndricos, oblongos, aseptados cuando son inmaduros, en ocasiones volviéndose marrón y septados al madurar. (24-45µm X 10-20µm). Las colonias en una semana crecen entre 30 y 50 mm en MEA a 25° C.

Notas: Los conidios de *D. corticola* son más largos que los conidios de cualquier otra especie de *Diplodia*. Filogenéticamente *D. corticola* se agrupa con *D. gallae* y con *D. quercivora* en clados distintos. Estas especies son responsables de contribuir al decaimiento de las encinas

Discusión

Este estudio realizado en 2023 en los principales encinares de Menorca con el fin de conocer las especies que se encuentran causando los síntomas de pardeamiento de los brotes, el declive y chancros de las ramas, basado en la identificación morfológica en cultivo siguiendo las claves dadas por Phillips y col. (2013) y por los análisis filogenéticos basado en las secuencias del Espaciador Transcrito Interno de sus siglas en ingles ITS, Factor de Elongación *tef 1-α* y Beta Tubulina *tub2* mediante análisis de máxima verosimilitud ML e inferencia bayesiana BI mostraron que tales daños se debían a la infección de *D. corticola*, estando de acuerdo con Franceschini y col. (1999), Linaldeddu y col. (2009), Tsopeles y col. (2010), Linaldeddu y col. (2013) que *D. corticola* es la especie más ampliamente distribuida y la más virulenta en los bosques de

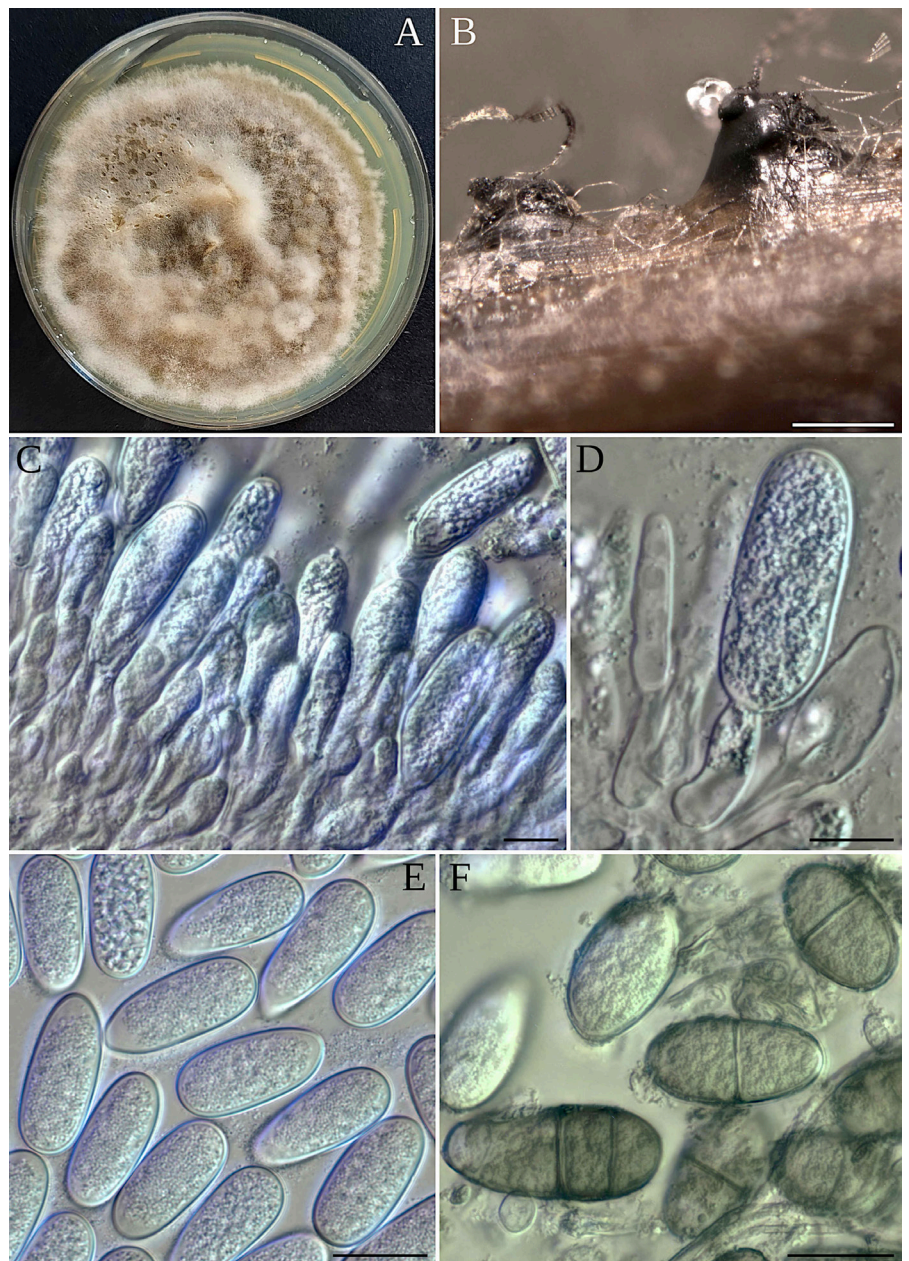


Foto 4. Micro morfología de *Diplodia corticola*. A: Colonia en MEA2%. B: Picnidio sobre acícula de pino PNA. C-D: Células conidiógenas formando conidios. E: Conidios hialinos jóvenes aseptados. F: Conidios maduros pigmentado septados. Barra de escala: B 200µm, C-D 10µm, E-F 20µm.

robles y encinas. La confirmación de la identidad de las cepas halladas en los encinares de Menorca amplía el rango de expansión geográfica de *D. corticola*. Linaldeddu (2013) reveló la existencia de dos linajes evolutivos distintos dentro de *D. corticola* con una distribución geográfica distinta, La presencia del linaje A predomina en el Oeste de Argelia y el linaje B predomina en los bosques del Este. Nuestros aislados de *D. corticola* se incluyen en el linaje A junto la especie tipo del género encontrada en Portugal y con aislados encontrados en Italia, Estados Unidos y España. Se ha evidenciado que existen diferen-

tes niveles de virulencia entre cepas de *D. corticola* (Félix y col., 2017) y otras especies de *Botryosphaeriaceae* como *D. sapinea* (Elena y col., 2015). Los distintos niveles de agresividad de las cepas no están asociadas a un linaje determinado. Dicha virulencia se ha asociado a la producción de esfero-psidinas; se observó que la cepa más virulenta es la cepa que más esfero-psidinas produce (Salvatore y col., 2023). Se hacen necesarios estudios posteriores que ayuden a conocer la incidencia de *D. corticola* en los encinares de Menorca.

Bibliografía

- ! Alves, A., Correia, A., Luque, J., & Phillips, A. (2004). *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and Description of *Botryosphaeria stenvensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia*, 96, 598–613
- Angel Pintos Amengual, Alberto Miguel Stchigel & Jose Cano. (2021) First Report of *Sardiniella urbana* (*Botryosphaeria*-*ceae*) Causing Decline of *Celtis australis* in mallorca Island (Balearic Islands, Spain). *Plant Disease* 105 (11).
- Anselmi, N.; Cellerino, G. P.; Franceschini, A.; Granata, G.; Luisi, N.; Marras, F.; Mazzaglia, A.; Mutto Accordi, S.; Ragazzi, A., 2004: Geographic distribution of fungal endophytes of *Quercus* sp. in Italy. In: *Endophytism in Forest Trees*. Ed. By Ragazzi, A., Moricca, S., Dellavalle, I. Firenze: academia Italiana di Scienze Forestali, pp. 73–89
- Brasier CM. 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature* 360: 539.
- Brasier CM. 1996 (1996). *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann Sci For* 53:347–358.
- Crous P, Slippers B, Wingfield M, Rheeder J, Marasas W, Philips A, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald J. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies Mycol.* 55:235–253.
- Félix C, Pinto G, Amaral J, Fernandes I et al.. 2017 – Strain-related pathogenicity in *Diplodia corticola*. *Forest Pathology* e12366. <https://doi.org/10.1111/efp.12366>
- Franceschini A, Corda P, Maddau L, Marras F. 1999. Observations sur *Diplodia mutila*, pathogene du che'ne-lie'ge en Sardaigne. *IOBC/wprs Bull* 22:5–12.
- Franceschini, A.; Linaldeddu, B.T.; Pisanu, P.; Pisanu, S., 2004: Effects of water stress on endophytic incidence of *Biscogniauxia mediterranea* in cork oak trees. *J. Plant Pathol.* 86, 319–320
- Lazzizzera C, Frisullo S, Alves A, Lopes J, Phillips AJL (2008). Phylogeny and morphology of *Diplodia* species on olives in southern Italy and description of *Diplodia olivarum* sp. nov. *Fungal Diversity* 31: 63–71.
- Linaldeddu BT, Circa C, Spano D, Franceschini A. 2009. Physiological responses of cork oak and holm oak to infection by pathogens involved in oak decline. *For Path* 39:232– 238, doi
- Linaldeddu B.T., Alves Artur, Phillips A.J:L, (2013) *Diplodia quercivora* sp. nov.: a new species found on declining *Quercus canariensis* trees in Tunisia. *Mycologia*, 105 (5). Pp. 1266-1274.
- Luque J, Girbal J. 1989. Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stenvensii*. *Eur J For Path* 19:7–13.
- Luque J, Parlade' J, Pera J. 2000. Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain). *For Pathol* 30:247–263,
- Luque J, Parlade' J, Pera J. 2001. El decaimiento del alcornoque en Cataluña: síntomas y hongos asociados. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 10: 271–289.
- Malençon G, Marion J., 1952. *Hypoxyon mediterraneum* (De Not.) Ces. Et De Not. Et son comportement épiphytique dans les cheines nordafricanes. *Rev. Mycol.* 17, suppl. Colon 2, 49-73.
- Muñoz MC, Cobos P, Martínez G, Soldevilla C, Dí'az M. 1996. *Micoflora y patología del alcornoque (Quercus suber L.) 1996* Madrid (Spain): Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA). 328 p.
- Oliva, M., Molinas, M. LL., 1984. Incidencia de *Hypoxyton mediterraneum* en los alcornocales gerundenses. *Boletín de la Estación Central de Ecología ICONA* 13, 9-16.
- Oliva, M., Molinas, M. LL., 1986. Participación de *Diplodia* sp. en el escaldado del alcornoque. *Scenia G* 12, 123-130.erundensis.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51– 167
- Salvatore, M.M.; Russo, M.T.; Nicoletti, R.; Mahamedi, A.E.; Berraf-Tebbal, A.; Cimmino, A.; Masi, M.; Andolfi, A. Comparative Analysis of Secondary Metabolites in *Diplodia corticola* Strains with Different Virulence Degrees Associated with Canker and Dieback of *Quercus* spp. *Molecules* 2023, 28, 6302.
- Sánchez, M. E., Venegas, J., Romero, M. A., Phillips, A. J. L., and Trapero, A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Dis.* 87:1515-1521.
- Shoemaker RA (1964). Conidia states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. *Canadian Journal of Botany* 42: 1297–1301.
- Sinclair, W. A., & Lyon, H. H. (2005). *Diseases of Trees and Shrubs* (p. 660). Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Sutton, B.C., 1980. *The Coelomycetes*. Kew. Commonwealth Mycol. Inst.
- Torres Juan, J., 1975. Principales enfermedades de nuestras especies forestales. Madrid: Escuela Técnica Superior Ingenieros de Montes.
- Torres, V. L.M., Echave, S. C., Mendiola, D. J., Moral, G.F. (2019) mapping oak shoot browning in SW Spain using online imagery as virtual prospecting tool. *Annals of Forest Science* 76:32.
- Tsopelas P, Slippers B, Gonou-Zagou Z, Wingfield MJ. 2010. First report of *Diplodia corticola* in Greece on kermes oak (*Quercus coccifera*). *Plant Pathol* 59:805