





Elaboració: Coordinador: Carlos Colinas
Col·laboren: Adrià Regué
Ludovic Bassié

ÍNDEX

Distribució i caracterització de les estacions de castanyer d'alt risc al Roig al Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny	4
Introducció	4
Objectius	6
1. Mètode de detecció precoç	6
2. Caracterització d'estacions vulnerables	6
Materials i Mètodes	6
Establiment de l'estudi	6
Presa de dades a camp	8
Variables topogràfiques, climàtiques i silvícoles	10
Preparació de mostres	11
Extracció de DNA	11
Disseny d'encebadors	12
Quantificació de DNA	12
Amplificació de DNA	12
Anàlisi de dades	13
Resultats i Discussió	14
Seqüències dels primers	14
Infecció per <i>Collophora hispanica</i>	14
Infecció per <i>Fistulina hepatica</i>	15
Ubicació de la infecció a l'arbre	15
Efecte del tipus de regeneració	15
Relació de la malaltia amb les característiques de la estació	15
Modelització de la malaltia	16
Conclusions	18
Agraïments	19
Referències	19



Distribució i caracterització de les estacions de castanyer d'alt risc al Roig al Parc Natural i Reserva de la Biosfera del Montseny. Proposta de actuacions.

Introducció

La incidència i severitat dels patògens en ecosistemes forestals és el resultat de complexos factors biòtics i abiòtics (Castello, Leopold and Smallidge, 1995). S'espera també que el canvi climàtic generi canvis en les condicions ambientals que, en conseqüència, modifiquin el comportament dels patògens forestals, els hostes i la seva manera de interaccionar (Sturrock *et al.*, 2011). És important saber quins factors són més rellevants en la patogenicitat per poder gestionar més eficaçment els recursos forestals. Varis estudis han investigat els efectes ambientals sobre diversos patògens forestals i la seva incidència i patogenicitat (Kearns and Jacobi, 2007; Kim, Klopfenstein and McDonald, 2010) però cap d'ells ha aportat llum sobre el podriment del duramen.

Estudis anteriors centrats en podriment estan enfocats en determinar el volum de carboni perdut en els arbres degut a troncs buits (Nogueira, Nelson and Fearnside, 2006) i en detectar presència de podriment en varies espècies d'arbres cultivats i silvestres (Sudin and Harun, 1991). Un patró que trobem a l'observar aquests estudis és que els arbres de major diàmetre solen mostrar major grau de podriment, però cap dels dos estudis va aprofundir en la resta de factors ambientals i silviculturals que podien estar influint en aquest podriment. A Catalunya el castanyer (*Castanea sativa* Mill.) és una important espècie, present en boscos naturals i plantacions per fusta, i sol ser cultivat en sistemes de rotació curta. Aquesta espècie es veu afectada per un tipus de patologia anomenada Roig, consistent en vetes vermelles en els anells de la fusta (Figura 1).

El Roig és una malaltia fúngica del castanyer que altera la coloració del duramen i provoca que la indústria rebutgi aquesta fusta implicant pèrdues de fins al 70% als propietaris forestals en parcel·les afectades (Figura 2). Degut a que la indústria demanda diàmetres cada vegada majors, els propietaris es veuen forçats a allargar els torns patint pèrdues econòmiques significatives.

Un estudi anterior ha determinat que possiblement el causant d'aquestes vetes sigui el fong *Fistulina hepatica* (Yurkewich, Castaño and Colinas, 2017). Un segon fong, *Collophora hispanica*, va ser identificat també en els arbres afectats de Roig, però es va detectar a la perifèria dels arbres. El Roig no suposa cap modificació en les propietats físiques i

estructurals de la fusta (Mòdol, 2013), almenys en estadis primerencs, però suposa un dèficit econòmic pels silvicultors, que tenen problemes per vendre-la a un preu competitiu.

FIGURA 2 TRONCS DE CASTANYER EN SERRADORA. DIFERENTS PATRONS DE ROIG.



FIGURA 1 VETES TÍPIQUES DEL ROIG



Objectius

1. Mètode de detecció precoç

En aquest objectiu proposem optimitzar el mètode parcialment desenvolupat en la fase anterior per la detecció de la presència del Roig en mostres de duramen dels arbres obtingudes mitjançant una barrina de Pressler.

2. Caracterització d'estacions vulnerables

En aquest objectiu proposem identificar les característiques de les parcel·les més atacades i desenvolupar un model que permeti estimar el risc d'afectació.

Materials i Mètodes

Establiment de l'estudi

Per contestar les preguntes plantejades es va dissenyar un estudi observacional prenent com a univers mostral tot l'habitat de castanyer del Parc del Montseny. Dins dels boscos de castanyer es van seleccionar unitats forestals que compleixen els criteris següents: (1) perxades pures de *C. sativa*; (2) més de 5 anys d'edat (per tant, tindrien una quantitat raonable de duramen); i (3) perxades gestionades amb documentació de la darrera tallada. Amb aquests criteris hem seleccionat 38 perxades a partir de la informació donada per el Centre de la Propietat Forestal. Tots eren bosc menut amb la majoria d'arbres provinents de rebrots de soca (Taula 1 i Figura 3).

TAULA 1 UBICACIÓ DE LES PARCEL·LES

Parcel·la	UTM X	UTM Y
1	454040	4622207
2	453542	4623104
3	451200	4632691
4	451434	4632863
5	450916	4631684
6	451802	4632258
7	451206	4631771
8	451997	4632266
9	452911	4632197
10	452248	4631782
11	453887	4623310
12	453299	4621418
13	453773	4621071
14	453583	4621651



15	462752	4625623
16	461213	4627661
17	449013	4631437
18	449270	4631202
19	449354	4630647
20	449507	4630976
21	449665	4630869
22	449677	4631134
23	449752	4630191
24	449805	4630121
25	449961	4630266
26	450167	4624619
27	450565	4624417
28	444270	4631927
29	446322	4633525
30	457893	4629193
31	456269	4629049
32	456877	4629298
33	454279	4631904
34	454308	4631506
35	455241	4631489
36	455208	4628834
37	459581	4626223
38	460996	4626490

FIGURA 3 PERXADA TIPUS AL MONTSENY



Presa de dades a camp

Al centre de cada un dels 38 perxades vam establir un transsecte de direcció aleatòria de 40 metres on vam mostrejar 3 arbres, 1 en el centre i 1 a cada extrem. També vam prendre una mostra d'un calcinal el més a prop possible de cadascun dels tres arbres del transsecte i de diàmetre i edat similars. Els calcinals eren molt escassos i, quan ningú no estava present a prop dels arbres dels transsectes, vam mostrejar 3 calcinals en qualsevol lloc de la perxada si n'hi havia. Tots els arbres mostrejats van ser marcats i identificats amb una etiqueta numerada (Figura 4iError! No se encuentra el origen de la referencia.).

Al centre de cadascuna de les parcel·les es van mesurar les coordenades (datum ETRS89), l'àrea basal (estimada amb un relascopi), i es va calcular la densitat d'arbres a partir de l'àrea basal i el diàmetre mitjà dels arbres mostrejats.

Per cada arbre seleccionat vam registrar les coordenades (datum ETRS89), el perímetre a l'altura del pit, l'alçada estimada amb relascopi, la posició de la copa (dominant, co-dominant, intermedi o suprimit) i si l'arbre s'havia originat a partir d'una llavor o a partir de brots de soca.

FIGURA 4 MARCATGE I ETIQUETATGE DELS ARBRES



Nuclis de fusta del tronc van ser recollits amb una barrina de Pressler de 5 mm a 0,4 m i 1,7 m d'alçada (Figura 5). Després de recollir cada mostra, la barrina es va tractar amb una solució d'etanol al 70% per evitar la contaminació creuada de mostres. Es van recollir nuclis fins més enllà del centre de la tija per assegurar material de duramen suficient, perquè el Roig és més prevalent en ell (Yurkewich, Castaño and Colinas, 2017). Les mostres es van col·locar després en bosses pre-etiquetades i es van portar al laboratori en una nevera a 5 °C on s'emmagatzemaren en un congelador a -20 °C fins a l'extracció d'ADN .

FIGURA 5 MOSTREIG DEL DURAMEN DELS ARBRES



Variables topogràfiques, climàtiques i silvícoles

Es van obtenir les variables topogràfiques (pendent, elevació i aspecte) des del Centre Nacional d'Informació Geogràfica d'Espanya (<http://centrodedescargas.cnig.es/>).

Esticitat i nordicitat són dues variables que sorgeixen de la variable inicial “orientació”. Sorgeixen d'aplicar les funcions trigonomètriques $\sin(\text{orientació})$ i $\cos(\text{orientació})$ a la variable convertida en radians. La transformació sinusoidal ens dona la esticitat, amb valors de 1 (Est) a -1 (Oest) i la cosinusoidal fa el mateix amb la nordicitat, amb valors de 1 (Nord) a -1 (Sud).

S'estudia també l'efecte combinat de la nordicitat/esticitat amb la pendent, dissenyant dues noves variables: nordicitat x pendent i esticitat x pendent.

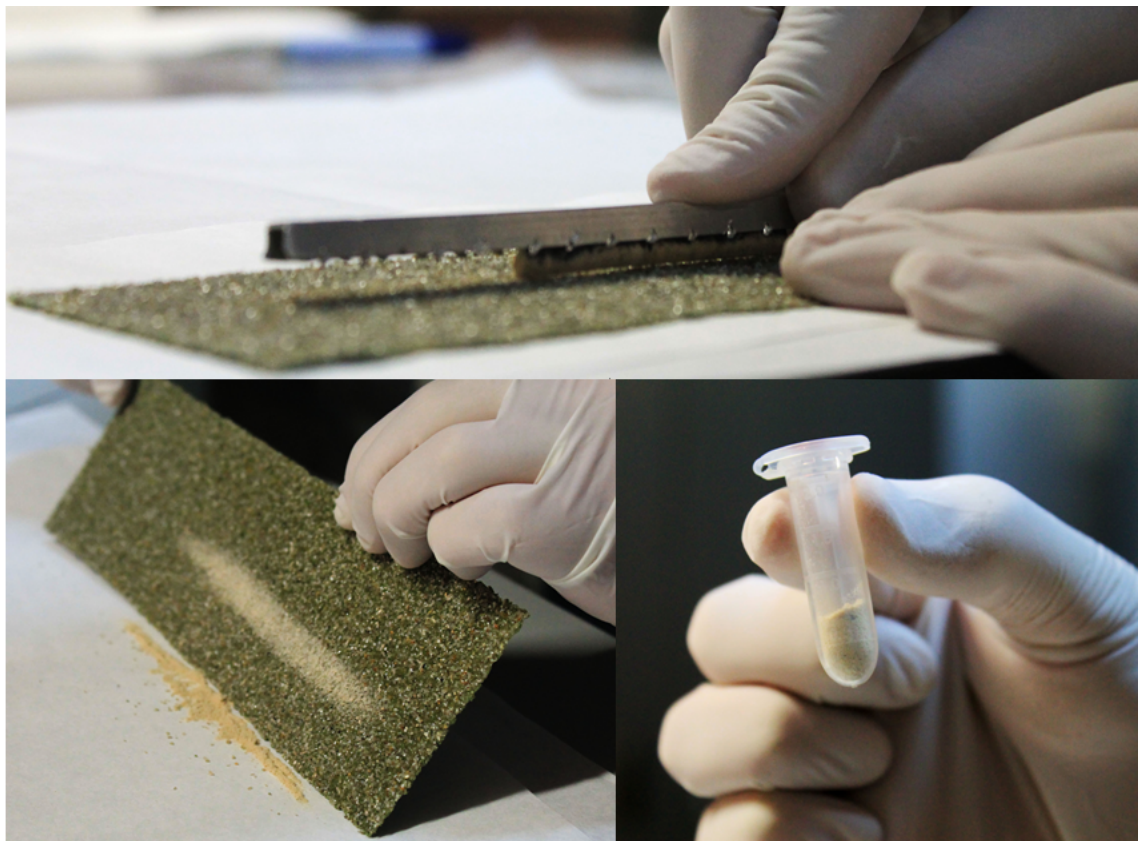
Les dades climàtiques (temperatura anual, precipitació mitjana anual, mitjana anual de dèficit hídric) van ser proporcionats per la Generalitat de Catalunya (<http://territori.gencat.cat/>).

La edat de les perxada va ser proporcionada pel Centre de la Propietat Forestal.

Preparació de mostres

La secció central corresponent al centre de l'arbre s'escatava amb paper de vidre. Aproximadament 200 mg de serradures es van recollir en una paper de Whatman i després es van transferir a un tub de microcentrifuga Eppendorf de 2.0mL (Figura 6). Es va utilitzar un nou full de paper de vidre net per a cada mostra. S'ha rebutjat les serradures de la perifèria dels nuclis.

FIGURA 6 PREPARACIÓ DE LES MOSTRES



Extracció de DNA

Es va extreure l'ADN de les mostres de serradures utilitzant el kit comercial "QIAamp DNA Stool Mini Kit" (Qiagen NV, Hilden, Alemanya) (Guglielmo *et al.*, 2010) amb les següents modificacions:

Es van realitzar dues incubacions amb 600 µL de tampó ASL en comptes d'un de 1200 µL perquè el volum de la mostra era massa gran. S'ha augmentat el temps d'incubació de 5 a 10 minuts.

Utilitzem aigua calenta (60°C) en comptes del tampó d'extracció del kit (AE) i reduïm el volum de 500 a 200 µl per augmentar la concentració d'ADN.

Disseny d'encebadors

Per determinar si les nostres mostres de fusta tenien *Collophora hispanica* o *Fistulina hepatica* creixent en ells hem dissenyat un parell de primers que amplifiquen específicament cadascuna de les espècies.

Es van dissenyar encebadors específics per *Fistulina hepatica* i *Collophora hispanica*, amb les regions ITS1 i ITS2 menys conservades per garantir l'especificitat. Seqüències de la regió ITS1 i ITS de *F. hepatica* i *C. hispanica* van ser recuperats de la base de dades del Centre Nacional d'Informació sobre Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) així com seqüències d'altres espècies no objectiu que també es van observar en la fusta de castanyer en aquesta zona (Yurkewich, Castaño and Colinas, 2017).

Les seqüències ITS1 i ITS2 van ser alineades per separat per ClustalW utilitzant el programa Mega7.0 (Kumar, Stecher and Tamura, 2016). Es van triar àrees amb baixa homologia per a la ubicació dels primers avançats i inversors. Els primers seleccionats van ser analitzats amb OligoCalc (Kibbe, 2007) per comprovar l'autocomplementarietat, la formació potencial de forquilla, i l'auto-recuit. Finalment, es va realitzar una anàlisi BLAST de nucleòtids per veure si hi havia alineacions significatives amb altres espècies problemàtiques.

La temperatura de recuit dels encebadors es va calcular en funció de la seva seqüència.

Per realitzar la PCR hem utilitzat el "Illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR beads" (GE Healthcare, Little Chalfont, Regne Unit). La quantitat d'ADN necessària per a cada PCR es va determinar provant diferents quantitats d'ADN de 50 a 200 ng. Els millors resultats es van observar a 50 ng d'ADN per a la PCR de fongs generals i 75 ng per a *Collophora hispanica* i *Fistulina hepatica*.

Quantificació de DNA

La quantificació de DNA es va realitzar mitjançant un espectrofotòmetre NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Hem utilitzat l'aigua MiliQ com a blanc i 2 µL de mostra per a la quantificació. NanoDrop ens va donar la concentració d'ADN (ng/µL) i la puresa (proporcions 260/280 i 260/230).

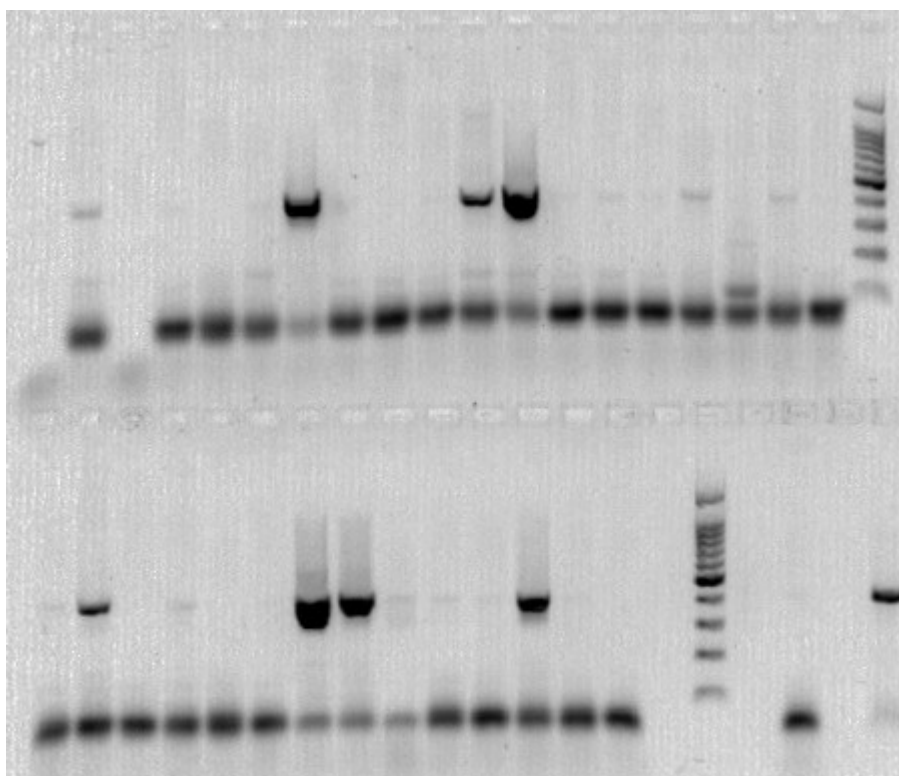
Amplificació de DNA

La PCR es va dur a terme en un termociclador Tgradient de 48 pous de Biometra (Jena, Alemanya). Hem utilitzat els primers ITS1-D i ITS2-B i la temperatura d'anellament de 61°C per l'amplificació de *Collophora hispanica*; ITS1-D, ITS2-D i temperatura d'anellament a 55°C

per *Fistulina hepatica*. També hem utilitzat la temperatura d'anellament de 61°C amb ITS1-F, ITS-4 per a l'amplificació de material fúngic genèric. Els paràmetres del programa són els següents: a) desnaturalització inicial a 95°C durant 5 minuts; b) 35 cicles d'amplificació i c) extensió final a 72°C durant 10 minuts. Cada cicle d'amplificació consisteix en una desnaturalització a 95°C durant 50 segons, anellament a 55 o 61°C durant 1 minut i una extensió a 72°C durant 45 segons. Aquestes condicions del programa es basen en els programes de PCR utilitzats en estudis previs (Guglielmo *et al.*, 2010; Yurkewich, Castaño and Colinas, 2017).

Per determinar si la nostra mostra contenia o no *Collophora* / *Fistulina* utilitzem amb un gel d'agarosa al 2% amb els productes de PCR. El voltatge va variar de 75 a 80V i el temps de funcionament va ser de 50 minuts. El marcador d'ADN utilitzat va ser GelRED (Biotium, Fremont CA, EUA), a una concentració de 2,5 µL GelRED/35 ml d'agarosa 2%. La banda esperada va ser de 344 bp per a *Collophora* i 412 bp per *Fistulina*. Les bandes dels altres fongs difereixen entre espècies (Figura 7).

FIGURA 7 GEL D'AGAROSA QUE MOSTRA LES BANDES DE PRODUCTES D'AMPLIFICACIÓ DE 412 BP EN LES MOSTRES INFECTADES PER *F. HEPATICA*.



Anàlisis de dades

L'anàlisi estadístic es va dur a terme mitjançant R (R Development Core Team 2008), Rcommander shell (Fox 2005) i DataDesk 8.1 (Data Description Inc.), considerant les parcel·les com a unitat d'estudi. La quantitat de malaltia a la parcel·la, que vam definir com



un índex de severitat que consisteix en el numero de mostres amb presència del fong del total de mostres preses a la parcel·la. Es va tractar de manera categòrica i estudiar mitjançant models de regressió logística transformant-lo amb la funció lògit.

Es van estudiar també varies regressions lineals, per veure les implicacions de cada variable sobre la incidència de fong.

Les variables independents es van transformar segons les necessitats de l'anàlisi.

Per estudiar la distribució de les mostres amb presència de fong sols a dalt o sols a la soca es va dissenyar un test Chiquadrat. La hipòtesi nul·la del test (probabilitat de presència en soca = probabilitat de presència en tronc) s'ha refutat ($p < 0.05$). Un segon Chisquare s'ha plantejat, per determinar la distribució de les mostres amb presència de fong a dalt. La hipòtesi nul·la espera que la meitat de les mostres amb presència a dalt en tinguin també a baix. Aquesta hipòtesi s'ha descartat ($p = 0.0005$). Per últim s'ha mirat quina és la distribució més extrema que segueix donant un resultat de Chisquare inferior a 0.05. Tal distribució ha estat de 155:100 (dalt i baix respecte sols a dalt), amb una $p = 0.046$.

Resultats i Discussió

Seqüències dels primers

Els encebadors escollits van ser ITS1-DF (5'-TTACACACACACTTGA AAAAACCGTC-3') i ITS2-DF (5'-GGCCCCGGGATGGCAACGACGGCG-3') per *F. hepatica*; ITS1-C (5'-CGCGCCTGTCAGAGGACCC-3') i ITS2-B (5'-CAAGCA CGCACCCGCACCTCCAGA-3') per *C. hispànica*.

També hem utilitzat els encebadors ITS1-F (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAG TAA-3') i ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') , (Gardes and Bruns, 1993) per detectar qualsevol fong que pogués estar creixent en les nostres mostres.

Infecció per *Collophora hispanica*

Els resultats de presència de *Collophora hispanica* no van ser concloents. Vam trobar presència del fong en gairebé totes les mostres, el que ens va portar a concloure que l'inòcul d'aquest patògen és ubic. Es a dir, es seus propàguls estan en l'escorça i l'albeca del arbre y al barrinar per obtenir la mostra contaminen la barrina que després contamina la mostra de fusta del duramen del arbre. De fet, aquest fong va ser detectat per primera vegada al xilema d'ametllers (Gramaje *et al.*, 2012).

Aquesta observació també ens porta a descartar *Collophora hispanica* com a causant del Roig, donat que l'hem trobat a totes les mostres.

Infecció per *Fistulina hepatica*

Ubicació de la infecció a l'arbre

Les mostres amb infecció sols a dalt eren mostres no esperades, així que se'ls ha aplicat el test Chi-quadrat per entendre d'on surten. Gràcies als test, podem afirmar que 1) tenim menys mostres infectades sols a dalt que infectades sols a la base del arbre, i que és un 155% més probable que de tenir sols una infecció, sigui a baix; i 2) que els arbres que mostren infecció a dalt és més probable que també tinguin infecció a baix. Aquesta informació, concordant amb la hipòtesi que tenim de que la infecció puja de la soca al tronc, no és suficient per afirmar que tota la infecció present a dalt del tronc hauria de venir de baix. Per això considerem la infecció superior però no inferior com a una infecció independent en comptes d'una de més avançada.

Efecte del tipus de regeneració

Per cada parcel·la s'ha fet el recompte d'incidència (x d'un màxim de y) per tots els arbres de la parcel·la, sols per rebrots i sols per calcinars. Un cop es tenien els recomptes, s'ha aplicat una prova t de Student per a mostres aparellades per determinar si hi ha diferències entre grups. S'ha determinat que no podem detectar diferències entre grups ($p=0.35$). Per tant, calcinars i rebrots són tractats com una sola població, i tota la modelització es fa sobre la infecció total de les parcel·les sense distinció d'origen dels peus.

Relació de la malaltia amb les característiques de la estació

El resultat de les regressions simples no va ser concloent perquè les significacions individuals van ser molt reduïdes (Taula 2). Però a les regressions múltiples utilitzades per la modelització, algunes variables mostraven significacions altes degut a les interaccions entre elles.

TAULA 2 SIGNIFICACIONS DE LES REGRESSIONS SIMPLS

Variable	Relació directa (+) ó inversa (-)	Significació (p)
Àrea Basal	+	0.17
Densitat	+	0.08
Diàmetre normal	-	0.14
Alçada	-	0.22
Edat	-	0.49
Esticitat	-	0.53

Nordicitat	+	0.90
Pendent	-	0.39
Elevació	-	0.28
Temperatura	-	0.05
Precipitació	+	0.13
Dèficit hídric	+	0.05

Tot i els baixos nivells de significació, veiem indicis que la malaltia pot estar associada a l'estrès. Les variables més significatives són la densitat, la temperatura i el dèficit hídric. Totes amb una relació directa excepte la temperatura que es inversa. En un següent estudi s'hauria d'estudiar la hipòtesi de si un major estrès hídric a causa, bé de major competència entre peus, o a estacions més càlides i seques, està associada a majors danys pel Roig. Això seria encara més rellevant en un context de canvi climàtic en el qual és d'esperar que disminueixin les precipitacions i augmenti l'evapotranspiració.

Els dos models associen un major atac fúngic en boscos de major espessor on la competència entre arbres es mes forta i els arbres pateixen mes estrès, que suposa una reducció en les seves defenses i una oportunitat millor de creixement pel fong.

Modelització de la malaltia

Un segon objectiu de l'estudi és poder predir les estacions on és més probable que hi hagi danys per Roig. Per a això farem servir una regressió múltiple amb totes les variables rellevants.

Pel procés de selecció de variables rellevants, es va definir un model complert, que contenia totes les variables estudiades, i un model buit que no en contenia cap. Després es va fer una primera aproximació a elegir variables mitjançant un procés per passos, on les variables s'afegeixen una a una a partir del model buit (endavant) o es van eliminant una a una del model complert (enrere). Un cop eliminades dels dos models algunes variables gens representatives, es va ajustar cadascun dels dos manualment fins a arribar a dos models funcionals. Les variables significatives per ells són:

Enrere: àrea basal, $\log(\text{elevació})$, esticitat^{-1} , alçada, nordicitat, orientació², temperatura (Taula 3).

Endavant: temperatura, orientació² (Taula 4).

TAULA 3 MODEL ENRERE. EL MODEL PRESENTA UNA DESVIACIÓ DE 45.031 (28 G.L.) I UN CRITERI DE INFORMACIÓ DE AKAIKE (AIC) DE 143.29.

	Estimatiu	Error Standard	Valor Z	Pr(> z)
Intersecció	-19.299420	8.497059	-2.271	0.02313
Àrea Basal	0.067787	0.023211	2.920	0.00350
Log(Elev)	2.351797	1.047650	2.245	0.02478
Esticitat⁻¹	-0.014043	0.005453	-2.575	0.01001
Alçada	-0.150846	0.088127	-1.712	0.08696
Nordicitat	0.852062	0.296894	2.870	0.00411
Orientació²	-1.570992	1.072538	-1.465	0.14299
Temperatura	0.341788	0.179309	1.906	0.05663

TAULA 4 MODEL ENDAVANT. EL MODEL PRESENTA UNA DESVIACIÓ RESIDUAL DE 59.363 (35 G.L.) I UN AIC DE 152.18.

	Estimatiu	Error Standard	Valor Z	Pr(> z)
Intersecció	-2.39542	0.91020	-2.632	0.00849
Temperatura	0.21923	0.08928	2.456	0.01406
Orientació²	-1.86874	0.92499	-2.020	0.04335

Atenent al valor del AIC podem afirmar que el model Enrere és millor que l'Endavant, tot i sacrificar 7 graus de llibertat.

L'algoritme de selecció de variables pas a pas Enrere ha inclòs una variable amb un nivell de significació de 0.14: el quadrat de la orientació. Si la fem fora veiem que el model resultant no explica la infecció tan bé com ho feia el primer (Taula 5) però al realitzar un estudi ChiQuadrat dels dos models arribem a la conclusió que la diferència entre ells no és estadísticament significativa (ChiQuadrat $p=0.14$): traïem aquesta variable per obtenir un model més simple.

TAULA 5 MODEL ENRERE MODIFICAT. EL MODEL PRESENTA UNA DESVIACIÓ RESIDUAL DE 47.206 (29 G.L.) I UN AIC DE 143.46.

	Estimatiu	Error Standard	Valor Z	Pr(> z)
Intersecció	-23.614062	8.038899	-2.937	0.00331
Àrea Basal	0.070875	0.023263	3.047	0.00231
Log(Elev)	2.876434	0.989677	2.906	0.00366
Esticitat⁻¹	-0.012142	0.005282	-2.299	0.02151
Alçada	-0.156529	0.087496	-1.789	0.07362
Nordicitat	0.880738	0.297515	2.960	0.00307
Temperatura	0.389302	0.178042	2.187	0.02877

El model matemàtic que queda definit pel model seleccionat és:

$$\begin{aligned}
 \text{ENRERE (modif.): } \logit(\text{infecció}) &= \\
 &= -23.61 + 7.088 \cdot 10^{-2} \cdot \text{BasArea} + 2.876 \cdot \log(\text{Elev.}) - 1.214 \cdot 10^{-2} \\
 &\quad \cdot \text{East}^{-1} - 1.565 \cdot 10^{-1} \cdot \text{Heigh} + 8.807 \cdot 10^{-1} \cdot \text{North} + 3.893 \cdot 10^{-1} \cdot \text{Temperat.}
 \end{aligned}$$



Aquest és un model predictiu que ens permet calcular el risc d'infecció d'una parcel·la, i elaborar un mapa de susceptibilitats, en funció dels paràmetres inclosos en ell: l'àrea basal, l'elevació, la esticitat i nordicitat, l'alçada i la temperatura mitja anual. Al tractar-se d'un model de regressió múltiple no podem interpretar els resultats de les variables individualment, doncs hi ha un importantíssim paper d'interacció entre elles en la bondat de la capacitat predictiva. Per veure l'efecte de cada variable individual en el risc d'infecció ho mirem amb regressió simple.

El conjunt de variables d'aquest model té tres blocs. Una de les variables, temperatura, està fora de tota capacitat de gestió dels propietaris. Tres d'elles, elevació, esticitat i nordicitat, no permeten moltes opcions de gestió però sí que permeten prendre decisions sobre si una perxada ha de ser utilitzada per a castanyer o és millor substituir-la per una altra espècie. Tenim dos variables, àrea basal i alçada, que són perfectament gestionables pel propietari.

La informació desgranada que s'ha d'extreure d'aquest estudi és que per evitar la infecció per *Fistulina hepatica* cal mantenir els boscos amb menys densitat d'arbres i plantar *Castanea sativa* (amb l'objectiu de produir fusta) en parcel·les més fresques i humides. Tot i així, no cal preocupar-se en plantar nous castanyers doncs el fet de que naixin de rebrots no s'ha pogut demostrar que suposi un increment en el risc de contaminació ni aparició de Roig. D'igual manera, l'edat de la perxada o la grandària dels arbres presents tampoc és un factor decisiu en el risc de sofrir *Fistulina hepatica*. El Roig no hauria de ser un impediment per produir fusta de grans diàmetres.

No obstant, al tractar-se d'un estudi observacional, no podem extreure relacions de causa-efecte entre les variables estudiades i els danys per Roig. I així mateix, no podem tenir la certesa que actuacions sobre les variables observades tindrien efecte sobre la quantitat de malaltia. Per poder fer aquest pas s'hauria d'estudiar l'efecte de les variables d'interès sobre la quantitat de malaltia en un estudi experimental.

Conclusions i proposta de actuacions

El fong amb més pes a la malaltia del Roig és *Fistulina hepatica*.

Disposem d'un mètode eficaç per detectar el Roig en perxades abans de tallar.

No totes les infeccions venen de la soca. Una part poc important d'elles es poden produir per ferides a la part mitjana o alta del tronc.

No s'ha pogut detectar una diferència en la susceptibilitat al Roig entre peus provinents de rebrot i calcinals. Degut a la manca de calcinals no podem descartar que aquesta diferència existeixi però amb la mostra disponible no és possible detectar-la. Doncs no sembla necessari afavorir la regeneració de llavor.

La densitat és el factor silvicultural més important en quant a la incidència de *Fistulina hepatica*, mostrant les parcel·les més denses un índex més elevat d'infecció. Es recomana reduir l'àrea bisimètrica de les perxades.

Factors ambientals com la temperatura mitjana anual o la precipitació semblen ser rellevants. Les parcel·les més fresques i/o amb una major precipitació anual són menys susceptibles al Roig. Es recomana substituir el castanyer per altres espècies més tolerants en les perxades més seques.

El model desenvolupat permet estimar la probabilitat que una perxada pateixi Roig en l'àrea del Montseny y les zones limítrofes que es puguin considerar homòlogues.

Aquestes recomanacions són basades en aquest estudi observacional i haurien de ser validades en un d'experimental.

Agraïments

Volem expressar el nostre agraïment a la Diputació de Barcelona pel finançament parcial d'aquest estudi, al Centre de la Propietat Forestal per la informació sobre les dades silvícoles de les perxades de castanyer del Parc del Montseny, i a Antonio Álvarez, Francesc Bolaño, Maria Corral, Josep Miró, Albert Morera, Eduard Muñoz, Oleguer Plana i Nicholas Sande per la seva col·laboració en les tasques de camp i laboratori.

Referències

Castello, J. D., Leopold, D. J. and Smallidge, P. J. (1995) 'Pathogens, Patterns, and Processes in Forest Ecosystems: Pathogens influence and are influenced by forest development and landscape characteristics', *BioScience*, 45(1), pp. 16–24. doi: 10.2307/1312531.

Fox, J. 2005. "The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. Version 2.4-1." *Journal of Statistical Software* 14(9): 1–42.

Gardes, M. and Bruns, T. D. (1993) 'ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts', *Molecular Ecology*, 2(2), pp. 113–118. doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.

Gramaje, D. *et al.* (2012) 'Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain)', *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 28, pp. 1–13. doi: 10.3767/003158512X626155.

Guglielmo, F. *et al.* (2010) 'Optimization of sampling procedures for DNA-based diagnosis of wood decay fungi in standing trees', *Letters in Applied Microbiology*, 51(1), pp. 90–97. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02860.x.



Kearns, H. S. J. and Jacobi, W. R. (2007) 'The distribution and incidence of white pine blister rust in central and southeastern Wyoming and northern Colorado', *Canadian Journal of Forest Research*, 37(2), pp. 462–472. doi: 10.1139/x06-231.

Kibbe, W. A. (2007) 'OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator', *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), pp. 43–46. doi: 10.1093/nar/gkm234.

Kim, M. S., Klopfenstein, N. B. and McDonald, G. I. (2010) 'Effects of forest management practices and environment on occurrence of *Armillaria* species', *Journal of Korean Forest Society*, 99(2), pp. 251–257. Available at: http://www.fs.fed.us/rm/pubs_other/rmrs_2010_kim_m004.pdf.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Molecular biology and evolution*, 33(7), pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

Mòdol, E. C. (2013) *Propietats químiques, físiques, mecàniques i resistent de la fusta massissa i laminada de castanyer del Sistema Mediterrani Català* Eduard Correal Mòdol.

Nogueira, E. M., Nelson, B. W. and Fearnside, P. M. (2006) 'Volume and biomass of trees in central Amazonia: influence of irregularly shaped and hollow trunks', *Forest Ecology and Management*, 227(2006), pp. 14–16. doi: 10.1016/j.foreco.2006.02.004.

R Development Core Team. 2008. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*: ISBN 3-900051-07-0. <http://www.r-project.org>.

Sturrock, R. N. *et al.* (2011) 'Climate change and forest diseases', *Plant Pathology*, 60(1), pp. 133–149. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02406.x.

Sudin, M. and Harun, A. (1991) 'A survey of heart rot in some plantations of *Acacia mangium* in Sabah', *Journal of Tropical Forest Science*, 6(1), pp. 37–47.

Yurkewich, J. I., Castaño, C. and Colinas, C. (2017) 'Chestnut Red Stain: Identification of the fungi associated with the costly discolouration of *Castanea sativa*', *Forest Pathology*, (December 2016), pp. 1–9. doi: 10.1111/efp.12335.

