



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



Selección de árboles plus resistentes a *Phytophthora alni*

ÁVILA, A.¹, MOYANO, C.², PORTILLO, I.², ÁLVAREZ, B.³, ESPINOSA, M.⁴ LÓPEZ-CARRASCO, C.⁵ y PINTADO, J.R.⁴

¹Montarsa medioambiente SL.

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. INIA.

³Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario. IMIDRA.

⁴Dirección General del Medio Natural y Biodiversidad. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

⁵Delegación Provincial de la Consejería de Desarrollo Sostenible en Toledo. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

Resumen

En 2016 se identificó a *Phytophthora alni* como el principal agente causal del decaimiento de alisos en el espacio Natura 2000 "Sotos del río Alberche" (Toledo). Debido a la importancia del aliso (*Alnus glutinosa*) para la estabilidad de los ecosistemas riparios, y el peligro que representa la extensión de la enfermedad, se inició un programa para la conservación de estas poblaciones.

La presencia de alisos asintomáticos en zonas altamente afectadas podría sugerir que presentan cierto grado de tolerancia/resistencia a la enfermedad. De esta forma, a lo largo del río Alberche se preseleccionaron 22 árboles candidatos. Se ensayaron diferentes métodos de inoculación *in vitro*, buscando uno que fuera rápido, repetitivo y que reprodujese las condiciones de infección que se dan en condiciones naturales para realizar una primera selección de genotipos resistentes a la enfermedad. Entre éstos, la inoculación de ramillas terminales de aliso con una suspensión de zoosporas resultó ser válido para evaluar los distintos genotipos candidatos. Así, se han seleccionado 3 árboles plus o selectos con resistencia/tolerancia a *P. alni*. El siguiente paso del programa de conservación y mejora será evaluarlos mediante un test que reproduzca las condiciones de infección que se dan en condiciones naturales y con otras especies de *Phytophthora* identificadas también en la podredumbre radical del aliso.

Palabras clave

Alnus glutinosa, fitóftora, sanidad forestal, podredumbre radical, mejora.

1. Introducción

Los alisos (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) son un componente muy importante en la vegetación ribereña en muchos de los ríos de las zonas templadas y boreales del hemisferio norte, debido fundamentalmente a que son capaces de soportar condiciones de humedad elevada. Estos árboles, además, son intolerantes a la sombra, lo que les hace ser una especie pionera, y por tanto elegida para ser utilizada en la recolonización de hábitats ribereños degradados. Una vez establecidos proporcionan sombra y temperaturas más frías, lo cual permite que otras especies vegetales puedan asentarse. Por otro lado, contribuyen a la fijación y aporte de nitrógeno, afectando significativamente en la dinámica de este elemento a escala local y paisajística, ya que el nitrógeno producido puede ser exportado por toda la cuenca (COMPTON et al., 2003). La estructura de raíz tan extensa que presentan les hace ser buenos estabilizadores de la ribera y sus raíces "adventicias" crean importantes hábitats para invertebrados y peces. En definitiva, estos árboles juegan un papel fundamental en la ecología de los ecosistemas de agua dulce. Esta combinación de atributos, junto con los valores recreativos y estéticos que se derivan de arroyos y ríos, hace que su reemplazo por otras especies sea muy limitado (MALANSON, 1993; CLAESSENS, 2003).

Recientemente, se ha detectado una fuerte reducción de las masas de alisos a lo largo de toda Europa y en algunas partes de América del Norte. El principal agente causal es *Phytophthora alni*. Actualmente, este patógeno ha sido renombrado como un complejo híbrido de origen no claro

compuesto por tres especies *P. alni*, *P. multiformis* y *P. uniformis* con una variada patogenicidad (BRASIER, 2003; HUSSON et al., 2015; IOOS et al., 2006). La mayoría de autores indican que la especie más agresiva debido a la elevada mortalidad que provoca es *P. alni*, la cual se ve favorecida por inviernos cálidos, pero no excesivamente calurosos y altas temperaturas en verano (REDONDO et al., 2015; ŠTEPÁNKOVÁ et al., 2013).

Los efectos del cambio climático son ya evidentes y, según los futuros escenarios climáticos, se intensificarán progresivamente a medida que avance el tiempo. Las condiciones de crecimiento del patógeno nos indican que ante estos cambios habrá un aumento en su distribución e incidencia. Como consecuencia, se dará una mayor mortandad de masas de alisos, aumentando de esta forma el riesgo de incendios forestales por la acumulación de biomasa. Por otro lado, dada su función de estabilizador de cuencas, la desaparición de éstas agravaría la reducción de la disponibilidad hídrica y de los problemas debidos a la torrencialidad en los cauces hidrográficos.

Los métodos de control aplicados hasta el momento no han resultado ser eficaces, por lo que un factor clave para la viabilidad a largo plazo de la población de alisos es el desarrollo de resistencia o tolerancia a la enfermedad. La presencia de alisos asintomáticos en zonas altamente afectadas podría sugerir que presentan dicha tolerancia o resistencia a la enfermedad. Por este motivo, es importante buscar genotipos resistentes en condiciones naturales, comprobar su resistencia en condiciones controladas desarrollando un método de evaluación rápido y repetitivo y utilizar posteriormente las selecciones menos susceptibles como material base de reproducción para su uso en la recuperación de los sistemas riparios.

2. Objetivos

Los objetivos fueron los siguientes:

- 2.1. Rastrear y marcar ejemplares asintomáticos de aliso en el espacio protegido Natura 2000 “Sotos del río Alberche”
- 2.2. Seleccionar individuos resistentes/tolerantes a *P. alni*
- 2.3. Analizar su resistencia/tolerancia en condiciones de laboratorio

3. Metodología

3.1. Muestreo

Para la selección de individuos resistentes/tolerantes a *P. alni* se recorrió toda la longitud del tramo del río Alberche desde Calalberche hasta Cerro Alberche, en los términos municipales de El Casar de Escalona, Hormigos, Escalona y Santa Cruz del Retamar, excepto en algún trecho en el que no se pudo acceder debido a la inaccesibilidad al mismo. En base a una escala visual se seleccionaron individuos con índice de severidad entre 0 y 1, en zonas con presencia de la enfermedad (Figura 1). Estos fueron marcados con una ficha identificativa *in situ* en la base del tronco y se tomó su localización GPS. De éstos, se recogieron muestras de tierra, raíces, brotes y tallos. Se cortaron 4 ramas procedentes de los 4 puntos cardinales en el árbol candidato. Posteriormente se colocaron en un recipiente con agua para mantener la humedad y la hidratación de las hojas. Las muestras de raíz y tierra fueron conservadas en frío hasta su análisis en laboratorio.



Figura 1. Selección de individuos candidatos. Con flecha roja se señalan árboles sintomáticos y con flecha verde asintomáticos en focos de podredumbre.

3.2. Comprobación de árboles asintomáticos

De forma preliminar, para reducir el número de árboles candidatos y hasta que se pueda comprobar su resistencia/tolerancia en condiciones controladas mediante inoculaciones, se ha comprobado si los árboles asintomáticos estaban infectados mediante el análisis de muestras de raíz y de tierra, tomadas de la rizosfera a 0,5-1 m del tronco a una profundidad de 10 cm para la identificación de *P. alni*. Las raíces necróticas y no necróticas de aproximadamente 5-6 cm de largo se cortaron en fragmentos de 1 cm, se lavaron con agua esterilizada, se secaron sobre un papel de filtro y se sembraron en PARPNH [agar de jugo V8 con 10 µg mL⁻¹ de pimaricina, 200 µg mL⁻¹ de ampicilina, 10 µg mL⁻¹ de rifampicina, 25 µg mL⁻¹ de pentacloronitrobenceno (PCNB), 50 µg mL⁻¹ de nistatina y 50 µg mL⁻¹ de himexazol]. Las placas se incubaron en oscuridad a 20 °C durante 5 d.

3.3. Evaluación de resistencia/tolerancia

3.3.1. Producción de inóculo

3.3.1.1. Discos de agar

Para la producción de discos de agar, las colonias de aislamientos de *P. alni* se cultivaron en agar V8 [100 mL/L V8 (Campbell Grocery Products); 3 g/L CaCO₃; 20 g/L agar (Technical DIFCO, Detroit, MI, EEUU)] y se incubaron durante 1 semana a temperatura ambiente. Con ayuda de un sacabocados se tomaron discos de 6 mm del borde de crecimiento para realizar las inoculaciones de las ramas.

3.3.1.2. Producción de esporangios y zoosporas

Las colonias de los aislados de *P. alni* se cultivaron en agar V8 y se incubaron a 22 °C en luz diurna continua durante 2 semanas. Para obtener la suspensión de zoosporas, se tomaron discos de agar del borde de la colonia y se pusieron en placas de Petri que contenían agua con filtrado de tierra (100 g de suelo por 1.000 mL agua del grifo) durante 2-3 d con luz continua a 22 °C. Cada 12 h se cambió el filtrado de tierra de las placas. Transcurrido el tiempo de incubación, el líquido se decantó en un vaso de precipitados estéril. Posteriormente la suspensión se mantuvo a 5 °C durante 1 h y seguidamente a temperatura ambiente durante 75 min para promover la liberación de zoosporas. Se realizó el conteo con el hemacitómetro de la concentración de las zoosporas ajustándola a 2 x 10³ zoosporas/mL (DENMAN et al. 2005; JUNG et al. 1999; RIBERO, 1978).

3.3.2. Test de resistencia

3.3.2.1. Inoculación de ramillas con discos de agar

Ramas de diámetro de 1,2-1,5 cm se cortaron a 15 cm de longitud y se realizó una herida de 6 mm de diámetro, eliminando la corteza y llegando hasta el cambium vascular. En ésta, se colocó un disco de 6 mm de diámetro de micelio de *P. alni* creciendo sobre V8. La herida con el disco se cubrió con parafilm. Las ramas de control se inocularon con discos de agar sin micelio. Se realizaron 4 repeticiones por genotipo más el control de cada uno de ellos. Las ramas inoculadas se incubaron en cámara húmeda a 25 °C durante 6 d en oscuridad (BRASIER & KIRK, 2001; WEBBER & HEDGER, 1986). Pasado el tiempo de incubación se midió la longitud de la necrosis.

3.3.2.2. Inoculación de ramillas terminales con suspensión de zoosporas

Se tomaron ramillas con hojas de 16 cm de longitud y 0,5-1 cm de diámetro. Cada una de ellas se colocó en tubos de ensayo con 15 ml de la suspensión de zoosporas y se pusieron en cámara con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 22 °C (CHANDELIER et al., 2016). Por cada uno de los genotipos se dispusieron otras 2 ramillas en agua como control. La cantidad de agua o inóculo en cada tubo se mantuvo constante mediante la adición diaria para compensar la transpiración. Se analizaron 8 ramitas de cada genotipo. Una vez colocadas en los tubos de ensayo se situaron en cajas para mantener una humedad relativa elevada e impedir la desecación de las hojas. A los 13 d, se tomó nota de los síntomas observados y se evaluaron en función de una escala visual de severidad (gravedad del daño observado), que comprendió los siguientes valores: 0, sin síntomas; 1, algunas hojas marchitas; 2, estaquillas defoliadas o todas las hojas marchitas y necrosis en el tallo. A partir de estos valores se calculó el índice de severidad para cada uno de los genotipos ensayados obtenido como el sumatorio del número de estaquillas x nivel de severidad según la escala anterior/ número total de estaquillas evaluadas.

3.3.2.3. Análisis de datos

En primer lugar, se comprobó si los datos seguían una distribución normal y cumplían con la homocedasticidad, para poder hacer un ANOVA. El valor de P (W) fue menor de 0,05, por lo que los datos no seguían una distribución normal. Para intentar ajustarlos se realizaron varias transformaciones de los datos: (length) 0,5, Log(length), arcsen ((length) 0,5/100). Sin embargo, los datos no se ajustaron, por lo que se usó el modelo no paramétrico de Friedman Two-Way, incluyendo como factores los genotipos y las repeticiones. Se realizaron así mismo sendas comparaciones de medias por el método L.S.D. de Fisher para $p<0,05$ de la longitud de herida causada y el índice de severidad en las estaquillas para los distintos genotipos.

4. Resultados

Se recorrieron aproximadamente 40 km del tramo del río Alberche desde Calalberche hasta Cerro Alberche, por los términos municipales de El Casar de Escalona, Hormigos, Escalona y Santa Cruz del Retamar, sin embargo, en algunas zonas no se pudo acceder, por lo que la longitud y el área de selección fueron de aproximadamente 23 km y 92 ha, respectivamente. A lo largo del recorrido se marcaron 22 candidatos por la ausencia de síntomas de la enfermedad en áreas con presencia de la podredumbre radical. De las muestras de tierra y raíz absorbentes recogidas de los árboles candidatos no se obtuvo ninguna colonia de *P. alni*.

Las estaquillas de los árboles candidatos se recogieron entre julio y agosto según el protocolo de NOVATMÁ & STOCHLOVÁ (2012). Según el análisis no paramétrico de la longitud de la lesión, no hubo diferencias estadísticas entre las repeticiones ($p=0,1865$), pero sí entre genotipos ($p=0,0001$). De esta forma, los valores medios de la longitud de herida causada en los distintos genotipos se compararon mediante el test LSD de Fisher para $p<0,05$ (Figura 2 y Figura 3). La comparación de medias mostró que los genotipos 491 y 492.2 fueron los mejores de todos con menor longitud de lesión. Los genotipos 496 y 484 no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los mejores, por lo tanto, podrían considerarse también como tolerantes. Según el análisis para el índice de severidad de las estaquillas inoculadas, hubo diferencias estadísticas entre los distintos genotipos ($p<0,0001$) y entre las repeticiones ($p=0,0318$), por lo que se

compararon los valores medios entre sí mediante el test LSD de Fisher (Figura 4). Al comparar las medias se observó que el genotipo 484 fue significativamente diferente de todos los demás. Después, los mejores genotipos fueron 489 y 492.2 con una severidad muy baja, aunque significativamente mayor que la del 484 (Figura 5).

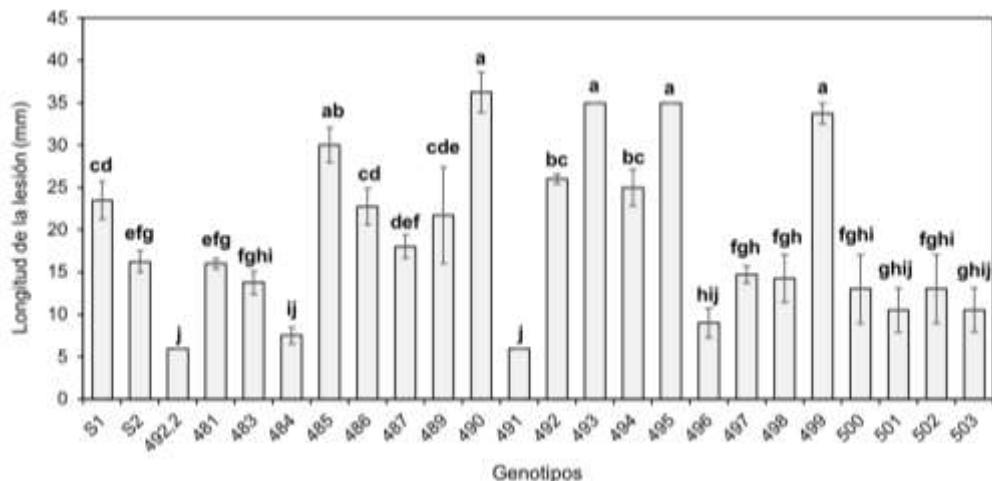


Figura 2. Comparación de genotipos según la longitud de la lesión. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)



Figura 3. Detalle de las lesiones en el test de inoculación en ramillas.

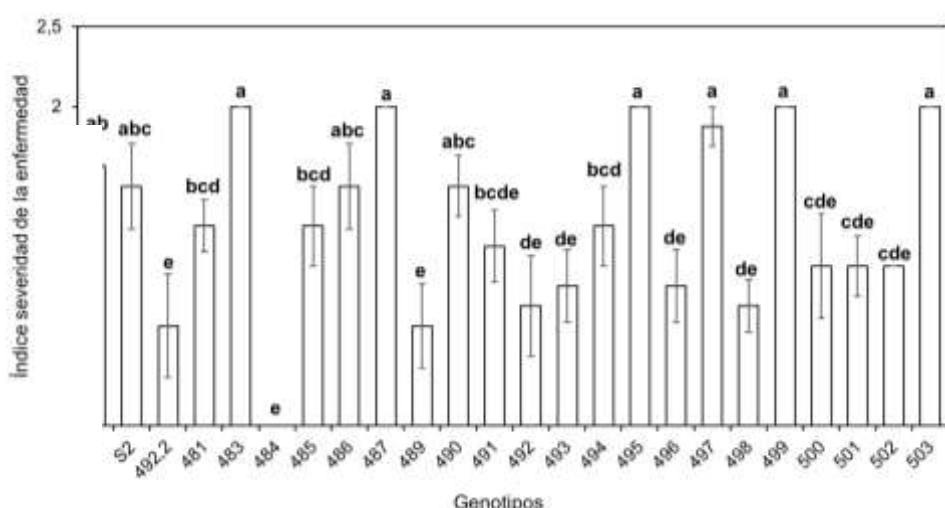


Figura 4. Comparación de genotipos según el índice de severidad. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

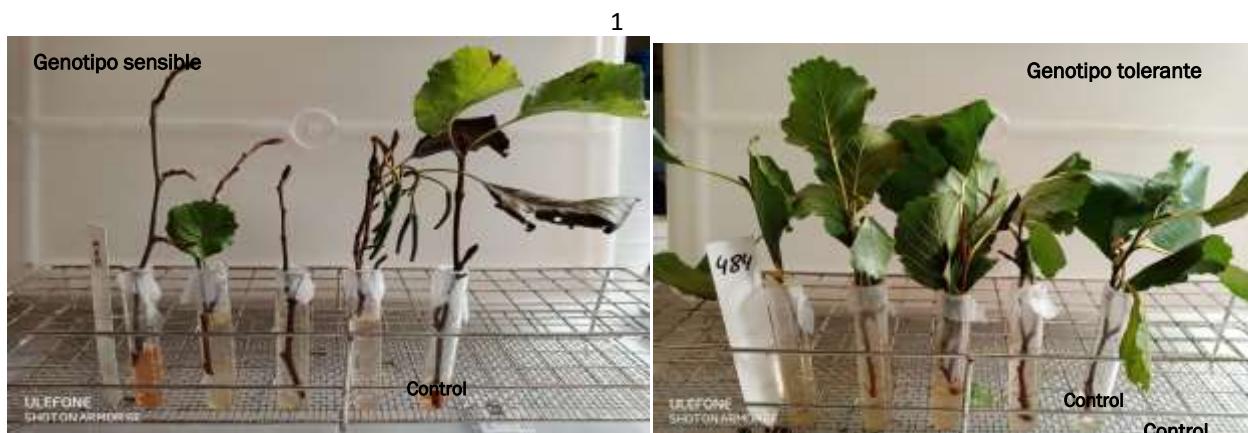


Figura 5. Test de inoculación en ramas terminales.

Si unimos estos resultados a los obtenidos con el experimento anterior, el mejor genotipo de todos los ensayados es el 492.2, que presentó la menor longitud de lesión y el valor de severidad de enfermedad de los más bajos observados, seguido de los genotipos 491, el cual no causó lesión en el primer experimento y no fue significativamente diferente del 492.2 en el segundo experimento, y el 484 que, aunque en el experimento con brotes no se observaron daños, sí produjo lesión en el primer experimento.

5. Discusión

De los 22 genotipos preseleccionados en campo por su ausencia de síntomas, se han seleccionado finalmente 3 por su tolerancia/resistencia a *P. alni*. Los métodos de inoculación y evaluación de resistencia utilizados en este estudio son válidos para realizar una selección preliminar de los mejores individuos candidatos en base a su resistencia o tolerancia al patógeno. Estos métodos de inoculación artificial son rápidos y repetitivos en condiciones de laboratorio. No obstante, es necesario que se reproduzcan las condiciones de infección que se dan en condiciones naturales para comprobar los genotipos resistentes a la enfermedad. El modo común de infección de fitóftoras en un huésped es a través de raíces finas (BRASIER & KIRK, 2001), por lo que se debería evaluar los genotipos mediante la inoculación con raíces.

Además, se ha descrito a *P. multiformis* y *P. uniformis* también como causantes de la podredumbre radical en *Alnus glutinosa*. Por tanto, sería necesario inocular estos mismos genotipos con otros aislados de *P. alni* y otras especies de *Phytophthora* descritas para probar su patogenicidad y virulencia sobre los genotipos seleccionados y comprobar que su resistencia es de tipo genético.

6. Conclusiones

Los trabajos realizados en este estudio constituyen el inicio de un programa de mejora genética de resistencia/tolerancia a la podredumbre radical del aliso. La existencia de variación fenotípica en la población estudiada en cuanto a resistencia a la enfermedad nos permite dar los primeros pasos para el desarrollo de una línea de mejora genética del aliso que culmine con la obtención de individuos que posean resistencia a la enfermedad, procurando conservar el máximo de diversidad genética y capacidad de adaptación a un amplio rango de situaciones ambientales, especialmente climáticas.

7. Agradecimientos

Estos trabajos han sido financiados dentro del Programa de Desarrollo Rural de Castilla-La Mancha, periodo 2014-2020 dentro de la Submedida/Operación: 4.4 Inversiones no productivas en el sector forestal.

8. Bibliografía

- BRASIER, C.M.; KIRK, S.A.; 2001. Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder phytophtoras, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species of bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathol.* 50,218-229.
- CHANDELIER, A.; HUSSON, C.; DRUART, P.; MARÇAIS, B.C.; 2016. Assessment of inoculation methods for screening black alder resistance to *Phytophthora alni*. *Plant Pathol.* 65, 441-450.
- Claessens, H.; 2003. The alder populations of Europe. *For. Comm.Bull.* 126,5-14.
- COMPTON, J.E.; CHURCH, M.R.; LARNED, S.T.; HOGSETT, W.E.; 2003. Nitrogen export from forested watersheds in the oregon coast range: the role of N₂-fixing red alder. *Ecosystems* 6,773-785.
- DENMAM, S.; KIRK,S.A.; BASIER, C.M.; WEBBER, J.F.; 2005. *In vitro* leaf inoculation studies as an indication of tree foliage susceptibility to *Phytophthora ramorum* in the UK. *Plant Pathol.* 54,512- 521.
- HUSSON, C.; AGUAYO, J.; REVELLIN, C.; FREY, P.; IOOS, R.; MARÇAIS, B.; 2015. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genet. Biol.* 77, 12-21.
- IOOS, R.; ANDRIEUX, A.; MARCAIS, B.; FREY, P.; 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genet. Biol.* 43,511-529.
- JUNG, T.; COOKE, D.E.L.; BLASCHKE, H.; DUNCAN, J.M.; OßWALD, W.; 1999. *Phytophthora quercina* sp. Nov., causing root rot of European oaks. *Mycol. Res.* 103,785-798.
- MALANSON, G.P.; 1993. Riparian Landscapes. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511565434>.
- REDONDO MA, BOBERG J, OLSSON CHB, OLIVA J. 2015. Winter conditions correlate with *Phytophthora alni* subspecies distribution in Southern Sweden. *Phytopathology* 105:1191-1197. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-15-0020-R>.
- RIBEIRO, O.K.; 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer Pub. 417 pp. Vaduz, Liechtenstein.
- ŠTĚPÁNKOVÁ, P.; ČERNÝ, K.; STRNADOVÁ, V.; HANÁČEK, P.; TOMŠOVSKÝ, M.; 2013. Identification of *Phytophthora alni* subspecies in riparian stands in the Czech Republic. *Plant Prot. Sci.* 49,3-10.

WEBBER, J.; HENDRY, S.; 1986. Comparison of interactions between *Ceratocystis ulmi* and elm bark saprobes *in vitro* and *in vivo*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 86(1),93-101.