



2025 | **16-20**
GIJÓN | JUNIO

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

9CFE-1327

Actas del Noveno Congreso Forestal Español
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025.**
ISBN: **978-84-941695-7-1**

Organiza





Protocolo de actuación frente a *Phytophthora alni* y otros patógenos en las alisedas dentro del marco del proyecto Life Alnus Taejo.

KOSALKOVÁ, K., PALOMO SEPÚLVEDA, M., GALLEGO GARCÍA, R., RUBIO GUTIÉRREZ, R., CAÑIBANO, C. y PÉREZ-REDONDO, R.

Área de Biotecnología y Área de Recursos Naturales y Biodiversidad. Fundación Centro de Servicios y Promoción Forestal y de su Industria de Castilla y León.

Resumen

Desde su aparición en 2007 en la península ibérica, el oomiceto *Phytophthora alni* se ha convertido en una gran amenaza para la población de *Alnus glutinosa*, provocando una sintomatología que acaba en la muerte de los ejemplares y un daño irreparable en el ecosistema. Uno de los objetivos primordiales del proyecto Life Alnus Taejo, que dio comienzo en el 2021, es la protección frente a agentes fitopatógenos. Por ello se pretende prevenir el impacto de *P. alni* y otros agentes que supongan un riesgo inmediato en los hábitats riparios, como las alisedas que conforman el hábitat prioritario 91E0*, elemento clave de dicho proyecto. Actualmente no existen medidas de prevención del proceso infeccioso. Es por esto que, el proyecto Life Alnus Taejo pretende establecer una metodología de recogida y análisis de muestras con la que poder extraer información sobre *Phytophthora* y otros patógenos, y elaborar un protocolo de detección y prevención que sirva de ejemplo en otras zonas.

Palabras clave

Oomiceto, *Alnus glutinosa*, fitopatología, Hábitat 91E0*.

1. Introducción

El proyecto Life Alnus Taejo LIFE20 NAT/ES/000021 (*Conservation and restoration of mediterranean alder forests priority habitat in western international Tajo river basin*) dio comienzo en septiembre del 2021, y tiene como objetivo proteger, conservar, mejorar y restaurar los ríos y riberas dominados por bosques aluviales residuales (tipo de hábitat prioritario 91E0*), que albergan una elevada biodiversidad e influyen en la calidad del agua de los ríos y sus ecosistemas.

Phytophthora es un género de patógenos vegetales del grupo de los oomicetos. Los oomicetos comparten con los hongos ciertos aspectos de su ciclo vital, como son el estadio filamentosos y la reproducción por esporas. Como diferencias, los oomicetos carecen de septos, por lo que las hifas son plurinucleadas, y su pared celular tiene beta-glucanos, y no quitina. Muchas especies del género *Phytophthora* tienen zoosporas acuáticas carentes de pared celular con dos flagelos. Las zoosporas se encuentran inmersas en películas de agua en la superficie de las hojas, en el suelo, en medios hidropónicos y en masas naturales de agua. La dispersión a través de un curso de agua es el modo de colonizar nuevas zonas. Así, el patógeno puede adherirse a la superficie vegetal retrayendo los flagelos y secretando un mucílago de sujeción. A continuación, ocurre la germinación y los tubos penetran la epidermis de la especie vegetal iniciando el proceso infeccioso (FRY & GRÜNWARD, 2010). El género *Phytophthora* también forma oosporas que



pueden sobrevivir durante años en el suelo en ausencia de un hospedador vegetal (NAVE et al, 2021).

Por lo general, los análisis de presencia o ausencia de *Phytophthora alni* en aliso (*Alnus glutinosa*) se realizan desde una muestra del árbol que comprende corteza y madera y que se toma con un hacha. De esta forma el árbol resulta comprometido, ya que la lesión puede convertirse en un acceso para distintos patógenos. Con el fin de evitar la herida, esta investigación pretende determinar si es posible la detección del oomiceto *P. alni* en otras matrices, como agua de río o raíces, al ser éstas el medio de transporte y de entrada del patógeno en la planta. Para este propósito se utilizará la metodología de detección molecular propuesta por IOOS y colaboradores (2005) combinada con *baiting* (uso de tejidos vegetales trampa; MARTIN et al, 2012).

2. Objetivos

Toma de muestras y análisis en laboratorio de muestras con posible patógeno detectados en los muestreos de campo realizados en la acción A1 del proyecto que hace referencia a la caracterización y diagnóstico de los hábitats 91E0*, en esta acción y como acción preparatoria se realizaron los trabajos de campo y base de datos de los tramos fluviales, inventariando y realizando la caracterización ecológica, botánica e hidrológica de los bosques aluviales residuales. Además, se cartografió la zona para realizar la modelización hidrológica de las diferentes llanuras de inundación para distintos periodos de retorno.

Creación de un protocolo de actuación frente a la propagación de *P. alni*, diferenciando entre zonas donde no se ha detectado el patógeno y zonas con presencia del patógeno, que no sólo valdrá para la detección de *P. alni* sino también de otros oomicetos y que podrá ser aplicado en el marco del proyecto y también a nivel peninsular.

3. Metodología

3.1 Área de estudio



Figura 1. Mapa con la localización de los puntos de recogida de muestras, en la zona de Salamanca, Cáceres y Portugal.

Para la recogida de las diferentes muestras, se eligieron las zonas siguiendo el área de extensión que abarca el proyecto LIFE Alnus Tajo. De todas las zonas posibles, se excluyeron las que presentaban más problemas de accesibilidad. Las muestras se recogieron entre junio y octubre del 2024, por un lado en la provincia de Salamanca, en las zonas de Las Batuecas-Sierra de Francia, Candelario, Valle del Cuerpo de Hombre y Riberas del Río Alagón y afluentes; en Cáceres en la zona del Río Árrago y Tralgas Río Jerte, Alagón y Esperabán; y por último en Portugal en la zona de Malcata. Todas las zonas forman parte de la cuenca del río Tajo. (Figura 1).

3.2 Protocolo de recogida de muestras

Se recogieron agua y raíces tiernas tratando de que fuesen lo más cercanas entre sí. Idealmente, de un mismo aliso de ribera, se tomaron raíces tiernas de su base y agua en un radio no mayor a 1 metro.

Se tomaron una serie de precauciones para evitar transferir el patógeno entre áreas y/o contaminar las muestras entre sí, comenzando por el uso de botas de goma. Entre los distintos puntos de muestreo se eliminó toda la suciedad (guijarros, hierbas) de suelas y de costados de botas y se descontaminaron a continuación con lejía de uso doméstico (concentración de lejía/hipoclorito sódico entre 47 y 65 gramos de cloro activo por litro) y apta para la desinfección del agua de bebida (otras lejías incluyen higienizantes que pueden ser tóxicos) al menos 2 minutos y se enjuagaron con agua de grifo. Se usaron guantes de un solo uso, evitando que los guantes entrasen en contacto con superficies, materiales o equipos. Estos guantes, papel y todo lo descartable se recogió en una bolsa de basura. El instrumental para cortar las raíces se limpió con papel de cocina, se sumergió en lejía al menos dos minutos y enjuagó con agua de grifo al menos dos veces.



La muestra de agua se recogió en dirección opuesta a la corriente, para reducir la potencial contaminación por botas y evitar que la turbidez pasase a la botella de recogida. La botella se sumergió, evitando hundirla en el fango, se enjuagó tres veces y se recogió 1 l de agua como muestra definitiva. Las raíces jóvenes se cortaron, preferentemente, de distinta disposición (hacia los 4 puntos cardinales) y se introdujeron en una bolsa. Los materiales se transportaron en nevera o caja de poliestireno expandido con hielo o bloques de frío y el envío a laboratorio se realizó inmediatamente, de forma que las muestras se procesaron en menos de 24 horas desde su recogida. Las muestras se enumeraron y codificaron con la inicial -A (agua) o -R (raíz).

3.3 Procesamiento de las muestras de agua.

En campana de flujo laminar se transfirieron 150 ml de la muestra de agua en un matraz, con tapón que permite la aireación pero preserva la esterilidad, y se añadió una hoja de rododendro previamente higienizada. Para ello la hoja se lavó bajo el grifo, se frotó con papel humedecido en etanol 70 %, se sumergió en lejía doméstica al 2% durante 5 min y se enjuagó en agua estéril. El *baiting* se incubó a temperatura ambiente sobre la mesa durante 4 días. Como control negativo se utilizó agua de riego estéril con hoja de rododendro. Como control positivo se añadieron 5 discos (de 6 mm de diámetro) de un cultivo fresco de *P. alni* CECT 20785 al agua de riego estéril con hoja de rododendro.

Una vez transcurridos 4 días de incubación se filtró 40 ml del agua a través de membrana (PES 0.22 micrómetros). La membrana se recuperó y recortó en porciones de 1 x 1,2 cm, que se colocaron hacia abajo sobre placas de V8-PARP (Medio V8: una lata de 330 ml de zumo comercial V8 se mezcló con 1300 ml de agua de grifo. El pH se ajustó a 7,2 +/- 0,2. A cada 100 ml de esta dilución se añadió 0,3 g de CaCO₃ y 1,5 g de agar y se esterilizó en olla durante 15 min. PARP: P, pimáricina, 10 microg/ml; A, ampicilina, 200 microg/ml; R, rifampicina, 10 microg/ml; P, pentacloronitrobenzoceno, 10 microg/ml). Una porción de filtro se destinó a realización de la PCR con cebadores específicos de *P. alni*.

3.4 Procesamiento de las raíces

Las raíces se lavaron bajo el agua de grifo durante 5 minutos, se sumergieron en un vaso con lejía al 2 % durante 4 minutos y se pasaron por agua estéril para eliminar restos del desinfectante. En campana de flujo laminar se recortaron, secaron y varios trozos se depositaron sobre placa de V8-PARP. Las placas se incubaron a 25 °C. Por otro lado, se recogieron fragmentos de raíz que se congelaron para posterior extracción de ADN.



De los cultivos en V8-PARP, tanto obtenidos de las muestras de agua como de las de raíz, se observó la morfología. Con el fin de obtener cultivos puros se transfirieron tacos de micelio a nuevas placas de V8-PARP. De los aislados se tomaron muestras de micelio destinado a la amplificación por PCR.

3.5 Preparación del molde para PCR desde la membrana de filtración, hifas de micelio o raíces y condiciones de PCR y secuenciación

Las muestras correspondientes a porciones de filtro se hidrataron durante 1-2 horas en microtubo con 150 µl de agua. El micelio de los cultivos se recogió con un palillo a microtubo con el mismo volumen de agua. A continuación, se añadieron esferas de vidrio (*glass beads*, 212-300 micras, Sigma), se mezcló en agitación de vórtice durante 1 min, y se incubó a 96 °C durante 5 min para liberar el ADN.

Alternativamente, desde los filtros se extrajo ADN con los sistemas *DNeasy Plant Pro* y *DNeasy PowerSoil Pro* de Qiagen. Para extraer ADN de las raíces se usó el sistema *DNeasy Plant Pro* de Qiagen.

Las condiciones de PCR y la secuencia de oligonucleótidos PA-F/PA-R para detección de *P. alni* fueron las descritas por IOOS y colaboradores (2005), con inclusión de un ADN sintético control para la detección de posibles eventos de inhibición de la PCR. La identificación taxonómica de los cultivos puros se realizó a través de la secuenciación de un fragmento del ADN ribosomal con los cebadores universales ITS1 e ITS4 (WHITE et al, 1990).

4. Resultados

4. 1. Detección molecular de *P. alni* subsp. *uniformis* CECT 20785 a partir de micelio

En la detección molecular de *P. alni* distintos servicios e investigadores utilizan la información publicada por IOOS y colaboradores (2005) como referencia prácticamente universal, aunque existe la posibilidad de analizar otros biomarcadores (IOOS et al, 2006; SIMS et al, 2017; AGUAYO et al, 2014). La pareja de oligonucleótidos PA-F/PA-R es suficiente para identificar las 3 subespecies de *P. alni*: *P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *uniformis* y *P. alni* subsp. *multiformis*, mientras que la pareja PAM-F/PAM-R identifica *P. alni* subsp. *alni* y *P. alni* subsp. *multiformis* y la pareja PAU-F/PAU-R identifica *P. alni* subsp. *alni* y *P. alni* subsp. *uniformis* (IOOS et al, 2005).

Para el desarrollo de un sistema de diagnóstico a través de ADN que permitiese la identificación de *P. alni* se adquirió en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) un cultivo activo de *P. alni* subsp. *uniformis* CECT 20785, así como su ADN genómico. Este microorganismo corresponde a un aislado de corteza de aliso en



Silleda (Pontevedra) en el año 2011. Además, se diseñó y sintetizó una secuencia de ADN sintética con sitios de reconocimiento para la pareja de cebadores generales PA-F/R. Una PCR sobre este ADN sintético control con los cebadores PA-F y PA-R produce un amplicón PA de 674 pb, a diferencia del tamaño de amplicón generado sobre un ADN silvestre del patógeno, que es de 447 pb. Esto permite diferenciar, a partir de la comparación de los amplicones obtenidos desde muestras reales cebadas y no cebadas con este ADN sintético, posibles eventos de inhibición de la reacción de amplificación cuando se trabaja con muestras reales.

Dentro del proceso de optimización del método, y con el fin de conocer el límite de detección de la técnica, se realizaron reacciones de PCR con diluciones de ADN genómico. La cantidad mínima de ADN genómico de *P. alni* subsp. *uniformis* CECT 20785 que dio lugar al amplicón con la pareja de cebadores PA-F y PA-R fue de 1.0 ng.

Una vez comprobada la funcionalidad de los cebadores y los ADN molde, el de la cepa de colección y el sintético, se puso a punto un sistema de ruptura de las membranas celulares del fitopatógeno que permitiese la liberación del ADN para su posterior amplificación mediante PCR. Para ello, desde un cultivo en medio V8 de *P. alni* subsp. *uniformis* CECT 20785 se tomaron pequeñas porciones de micelio aéreo en microtubos con 150 µl de agua. A estos tubos se aplicó 3 condiciones distintas, combinando tratamientos mecánicos y/o térmicos, reflejados en la Figura 2. El resultado de la PCR mostró que el procedimiento A, 4 ciclos de ruptura mecánica en vórtex con esferas de vidrio durante 1 minuto seguidos de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, libera ADN suficiente para el proceso de amplificación. Las condiciones B o C, respectivamente de 3 ciclos de congelación y calentamiento a 65 °C o una desnaturalización prolongada a 95 °C durante 20 min, no rindieron el amplicón (Figura 2, panel de la izquierda). Tomando como referencia la condición A, se optimizó el proceso de ruptura de las membranas celulares reduciendo el número de ciclos de agitación y calentamiento (Figura 2, panel de la derecha). De esta manera se determinó que un único ciclo de agitación y desnaturalización es suficiente para la liberación de ADN desde micelio y la obtención del amplicón. El procedimiento debe seguir la siguiente secuencia: 1) 1,5-3 mg de micelio tomado de una placa de cultivo en 100-150 µl de agua con bolas de vidrio de 212-300 micras; 2) 1 minuto de agitación en vórtex; 3) 5 minutos de desnaturalización a 95 °C.

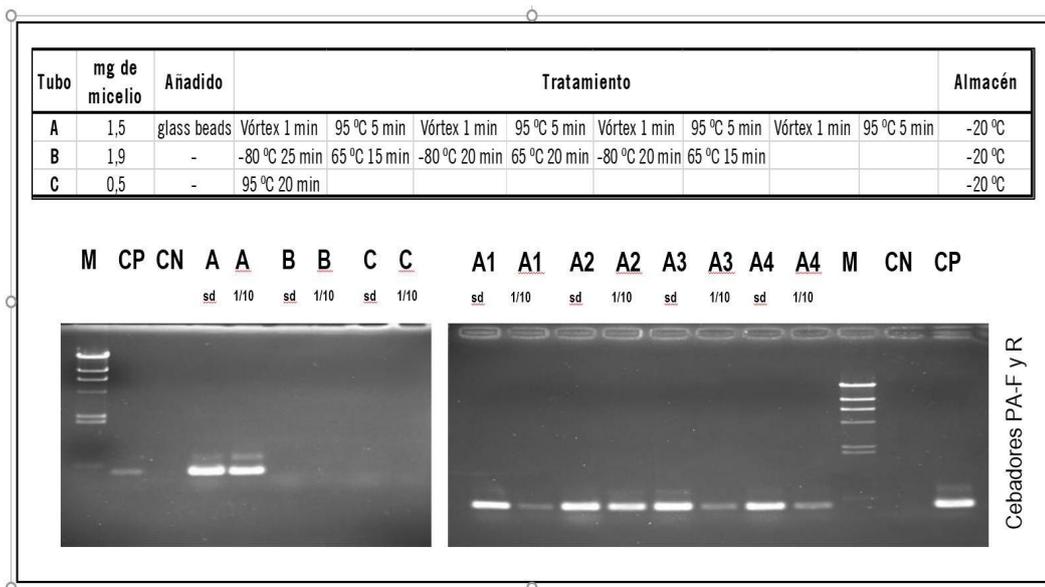


Figura 2. Puesta a punto de la PCR con la pareja PA-F/R a partir de micelio *P. alni subsp. uniformis*. En la parte superior se detallan las 3 condiciones de ruptura ensayadas. En la parte inferior izquierda el resultado de la PCR con la suspensión proveniente de los tratamientos A, B y C. En la parte inferior derecha el resultado de la PCR con el molde proveniente del tratamiento A obtenido tras 1, 2, 3 o 4 ciclos de agitación y calentamiento (A1, A2, A3 o A4, respectivamente). En 20 µl de reacción se usaron 5 µl de la suspensión sin diluir (sd) o en dilución 1/10. M se refiere al marcador de tamaños, CP y CN a los controles positivo con ADN genómico y negativo. El amplicón se produce en el tratamiento A cualquiera que sea el número de ciclos aplicado al micelio.

4. 2. Puesta a punto de un método para la detección en agua de *P. alni subsp. uniformis* CECT 20785

El aislamiento de *Phytophthora* se puede realizar a partir del tejido vegetal infectado colocado sobre una placa de cultivo con un medio selectivo que permitirá el desarrollo del patógeno. Es a partir de este cultivo sobre el que se utilizan las metodologías de microscopía o PCR para confirmar su identidad. El aislamiento también es posible a partir de tierra y agua (MARTIN et al, 2012; AGUAYO et al, 2014; SIMS et al, 2017). En estos casos, para recuperar el patógeno en un cultivo microbiológico se utilizan como trampa tejidos vegetales. El trapeo o cebado (*baiting*) consiste en la flotación de un cebo vegetal atractivo para las zoosporas que se hallan en suspensión líquida o como oosporas durmientes.

Para establecer la metodología de detección del fitopatógeno en agua, se preparó una serie de ensayos de infección artificial. Para ello, en condiciones controladas, se inoculó agua con distinta carga microbiana obtenida a partir de un cultivo activo *P. alni subsp. uniformis* CECT 20785 y se añadieron manzana, hoja de rododendro u hoja de lauroceraso como trampa vegetal. Al cabo de 4 días de incubación se filtraron distintos volúmenes del agua recuperando la membrana de filtración donde queda retenido el microorganismo. Fragmentos del cebo vegetal y de la membrana de filtración se colocaron sobre medio de cultivo V8-APR. Al remanente de esta membrana se añadió agua y guardó a -20 °C. Transcurridos 10

días de incubación de las placas se observó la morfología propia del oomiceto en las que contenían las porciones de membrana, mientras que en las placas con porciones de cebo vegetal había poblaciones mixtas de *P. alni* con otros microorganismos procedentes de la propia microbiota de los cebos utilizados. Micelio aéreo de estas placas de cultivo y muestras guardadas del líquido tras el lavado de los filtros se usaron como material de partida para la liberación de ADN molde y análisis por PCR.

En la Figura 3 se muestra el resultado de uno de los ensayos realizados para la puesta a punto del método de detección de *P. alni* de colección a partir de muestras de agua.

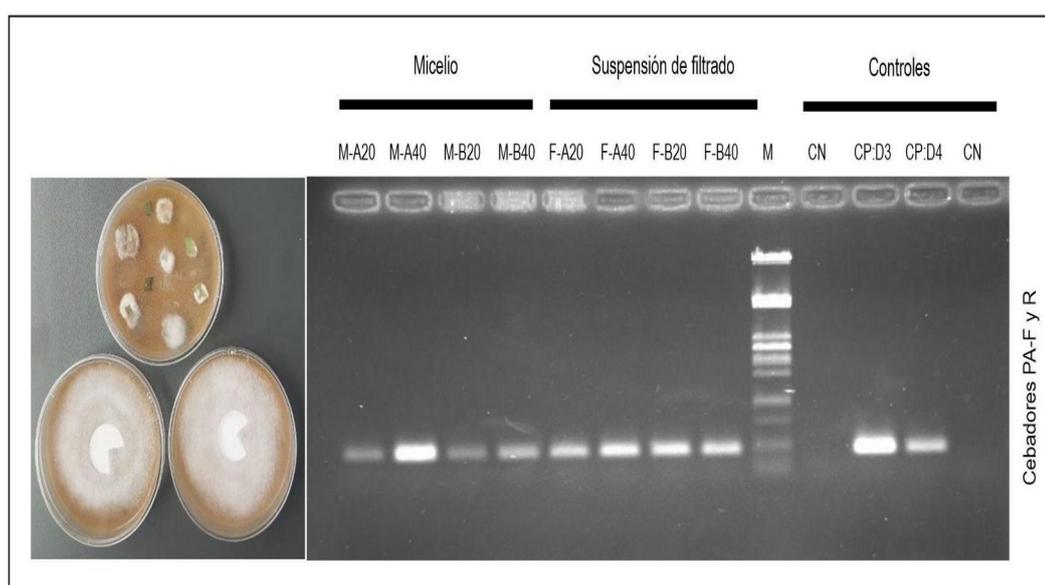


Figura 3. Fase de puesta a punto de la detección de *P. alni* subsp. *uniformis* CECT 20785 en agua tras baiting. A la izquierda cultivos de 10 días en V8-APR (solo se muestra la réplica A del experimento), con fragmentos de hoja de rododendro, arriba, y de membranas de filtración tras filtrar 20 o 40 ml de agua, abajo. A la derecha resultado de PCR de muestras de micelio tomadas de las placas de las membranas de filtración y de las suspensiones de agua tras el lavado de dichas membranas (réplicas A y B). M se refiere al marcador de tamaño molecular. CN es el control negativo y CP:D3 y CP:D4 son controles positivos realizados con dos cantidades distintas de molde de ADN genómico. En todos los casos se obtuvo el amplicón PA, tanto en las submuestras que proceden del micelio del cultivo como en las de las suspensiones del lavado de filtro.

En la serie de ensayos realizados para poner a punto la detección del patógeno desde agua se determinó que tanto el cebo de hoja de rododendro como de lauroceraso eran adecuados para la implantación del fitopatógeno, descartando el uso de manzana. En cuanto al límite de detección de la PCR se concluyó que el inóculo mínimo para obtener el amplicón fue de 7 discos de cultivo de *P. alni* subsp. *uniformis* CECT 20785 con un ratio de volumen de agua filtrada de 1/30 del volumen inicial del baiting.

4.3. Detección de *P. alni* en muestras de agua y raíz

Las muestras de aguas y raíces de 24 puntos de muestreo fueron analizadas. Para las aguas se empleó el método de *baiting* combinado con filtración a través de membrana y siembra en medio selectivo V8-PARP. Para las raíces se empleó el método de siembra directa en medio selectivo. Con ambas matrices se emplearon también los métodos de biología molecular para la detección por PCR de un fragmento específico del genoma de *P. alni* y para la identificación taxonómica de los microorganismos obtenidos mediante secuenciación de la región ITS. Un ejemplo de análisis de PCR se presenta en la Figura 4.

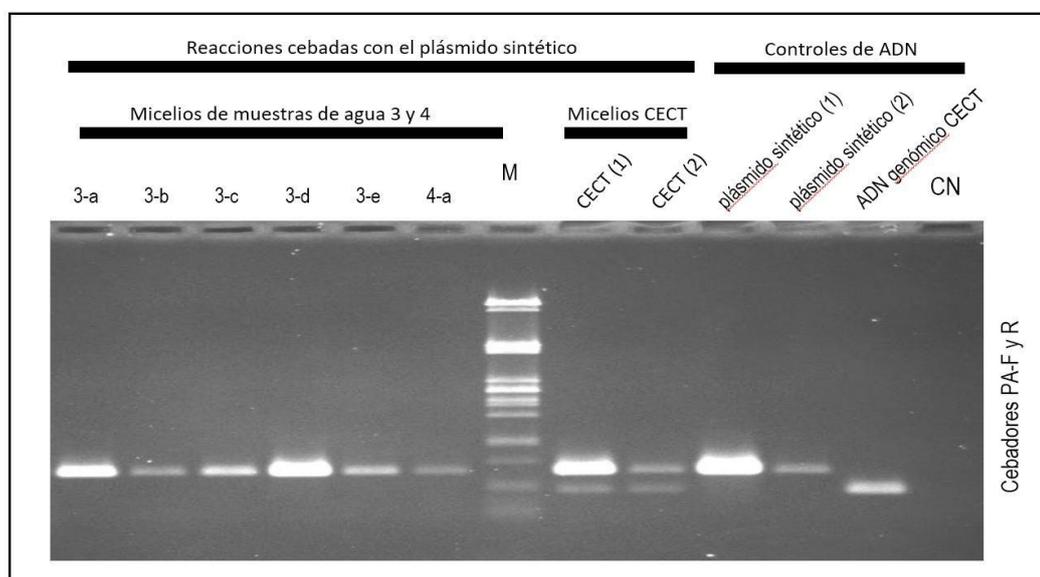


Figura 4. Resultados de PCR de los cultivos originados a partir de las muestras de agua 3 y 4. Las reacciones correspondientes a los micelios obtenidos de los cultivos tras el *baiting* de las muestras de agua 3 y 4 (desde la izquierda, carriles 3-a a 4-a) y de los *baiting* control con *P. alni* subsp. uniformis CECT 20785 (carriles CECT (1) y (2)) se cebaron con el plásmido sintético. M se refiere al marcador de tamaño molecular. Los controles positivos se realizaron con dos cantidades distintas de plásmido sintético (1) y (2) y con ADN genómico de *P. alni* subsp. uniformis CECT 20785. CN es el control negativo. El tamaño de amplicón esperado desde el plásmido sintético es de 0,67 kb y desde ADN genómico de *P. alni* es de 0,45 kb. Las reacciones con micelio de las muestras 3 y 4 poseen el amplicón de 0,67 kb pero no el de 0,45 kb. Esto significa que la reacción de PCR no está inhibida en las muestras problema y que ninguna de ellas es positiva para *P. alni*.

El resumen de los resultados de las 24 muestras analizadas se recoge en la Tabla 1. En ningún caso se produjo la detección de *P. alni* a través de PCR. *Phytophthora alni* tampoco se encontró en la identificación taxonómica de los cultivos puros de los microorganismos aislados. Ambos resultados concuerdan entre sí. La

secuenciación permitió la identificación de otros oomicetos de los géneros *Phytophthora*, *Pythium*, *Phytopyhtium* y *Saprolegnia*. Por otro lado, en las raíces se detectaron ascomicetos que no son objeto del estudio.

Tabla 1. Resumen de resultados. Se indica el lugar de recogida de la muestra y si esta era de agua o raíz, su código (ID), el resultado del análisis de PCR con la pareja de cebadores PA-F/R y la identificación taxonómica del microorganismo/s aislado/s. (*) indica 99 % de identidad de la secuencia obtenida del aislado con dos o más especies depositadas en la base de datos (separadas por /).

Procedencia	Tipo	ID	PCR para <i>P. alni</i>	Identificación por secuenciación ITS de uno o más aislados
San Esteban de la Sierra	agua	1A	negativo	<i>Pythium coloratum</i> / <i>P. dissotocum</i> (*)
San Esteban de la Sierra	agua	2A	negativo	<i>Phytophthora</i> sp. / <i>P. amnicola</i> / <i>P. oleae</i> (*) y <i>Phytopyhtium litorale</i>
San Esteban de la Sierra	raíz	1R	negativo	no analizado
San Esteban de la Sierra	raíz	2R	negativo	<i>Pythium coloratum</i> / <i>P. dissotocum</i> (*)
El Tornadizo	agua	3A	negativo	<i>Saprolegnia ferax</i> y <i>Phytophthora lacustris</i>
El Tornadizo	agua	4A	negativo	no secuenciado, probable <i>Saprolegnia ferax</i>
El Tornadizo	raíz	3R	negativo	<i>Phytopyhtium litorale</i>
El Tornadizo	raíz	4R	negativo	<i>Phytopyhtium litorale</i>
Miranda del Castañar	agua	5A	negativo	<i>Pythium torulosum</i>
Miranda del Castañar	agua	6A	negativo	<i>Pythium torulosum</i>
Casas del Conde	agua	7A	negativo	sin candidato para secuenciación
Casas del Conde	agua	8A	negativo	sin candidato para secuenciación
Miranda del Castañar	raíz	5R	no analizado	sin candidato para secuenciación
Miranda del Castañar	raíz	6R	no analizado	sin candidato para secuenciación
Casas del Conde	raíz	7R	negativo	<i>Pythium dissotocum</i>
Casas del Conde	raíz	8R	negativo	<i>Pythium dissotocum</i>
Montemayor del Río	agua	9A	negativo	<i>Pythium</i> sp. y <i>Saprolegnia ferax</i>
Montemayor del Río	agua	10A	negativo	<i>Saprolegnia australis</i>
Candelario	agua	11A	negativo	<i>Pythium</i> sp.
Candelario	agua	12A	inconcluyente	<i>Pythium dissotocum</i>
Casas del Castañar	agua	13A	negativo	<i>Pythium torulosum</i>
Casas del Castañar	agua	14A	negativo	<i>Phytophthora</i> sp.
Montehermoso	agua	15A	negativo	sin candidato para secuenciación
Montehermoso	agua	16A	negativo	sin candidato para secuenciación
Casas del Castañar	raíz	13R	negativo	<i>Phytopyhtium helicoides</i>



Casas del Castañar	raíz	14R	negativo	<i>Pythium torulosum</i>
Montehermoso	raíz	15R	negativo	ascomiceto: <i>Clonostachys rosea</i>
Montehermoso	raíz	16R	negativo	<i>Pythium torulosum</i>
Pinofranqueado	agua	17A	negativo	<i>Phytophthora lacustris</i>
Pinofranqueado	agua	18A	negativo	sin aislado para secuenciación
Cadalso	agua	19A	negativo	<i>Phytophthora sp.</i>
Cadalso	agua	20A	negativo	<i>Pythium deliense</i>
Pinofranqueado	raíz	17R	negativo	ascomiceto: <i>Thelonectria beijingensis</i>
Pinofranqueado	raíz	18R	negativo	<i>Phytophythium helicoides</i>
Cadalso	raíz	19R	negativo	<i>Pythium sp.</i>
Cadalso	raíz	20R	negativo	ascomicetos: <i>Penicillium janthinellum</i> y <i>Dactylonectria pauciseptata</i>
Penamacor, tramo 14_01	agua	21A	negativo	<i>Phytophythium sp.</i> y <i>Phytophthora sp.</i>
Penamacor, tramo 14_01	agua	22A	negativo	<i>Phytophthora sp.</i> y mucoromiceto: <i>Mortierella elongata</i>
Penamacor, tramo O_01	agua	23A	negativo	<i>Pythium sp.</i>
Penamacor, tramo O_01	agua	24A	negativo	<i>Phytophythium sp.</i> y <i>Phytophythium litorale</i>
Penamacor, tramo 14_01	raíz	21R	no analizado	<i>Pythium heterothallicum</i>
Penamacor, tramo 14_01	raíz	22R	no analizado	ascomicetos: <i>[Penicillium] mirabile</i> y <i>Clonostachys rosea</i>
Penamacor, tramo O_01	raíz	23R	no analizado	ascomiceto: <i>Mortierella verticillata</i>
Penamacor, tramo O_01	raíz	24R	no analizado	mucoromiceto: <i>Linnemannia elongata</i> . Ascomicetos: <i>Clonostachys aureofulvella</i> y <i>Fusarium libertatis</i>

5. Discusión

Los oomicetos, particularmente los del género *Phytophthora*, tienen un impacto devastador en los ecosistemas naturales y agrícolas debido a su capacidad para infectar una amplia variedad de plantas. Su alta adaptabilidad, eficiente dispersión y resistencia en condiciones adversas los convierte en peligrosos agentes microbianos, y hace necesario el desarrollo de estrategias de prevención y mitigación. Entre estas estrategias se hallan los programas de monitoreo para detección de infecciones tempranas, las restricciones al movimiento de plantas, suelos o aguas contaminadas o el desarrollo de plantas resistentes para la restauración ecológica de áreas afectadas. La presente publicación pretende contribuir al establecimiento de una metodología de recogida y análisis de muestras con la que poder extraer información sobre *Phytophthora* y otros patógenos para elaborar un protocolo de detección y prevención.

Los métodos para aislar *Phytophthora* incluyen el uso de técnicas de siembra



directa o de *baiting*. La siembra directa es útil para el análisis de raíces y muy efectiva cuando el inóculo del microorganismo es alto. Por otro lado, el *baiting* se ajusta al estudio de aguas o tierras y permite detectar especies con baja densidad poblacional o aquellas que sobreviven como oosporas inactivas. Este método utiliza cebos atractivos que son colonizados por las zoosporas en suspensión y que luego se transfieren a medios selectivos.

Para la atracción de distintas especies de *Phytophthora* se utilizan cebos de hojas de plantas de hoja perenne o incluso frutas sumergidas (MARTIN et al, 2012). Parece existir una preferencia de especie por el cebo utilizado, y, aunque para *P. alni* se usa hoja de rododendro, nuestro estudio indica que también es posible el uso de hoja de lauroceraso. Estas hojas tienen una estructura gruesa y resistente, lo que las hace adecuadas para soportar la inmersión sin descomponerse rápidamente, y facilitan la observación de decoloraciones debidas a las colonizaciones microbianas. El tiempo de incubación del trapeo depende en gran medida de la temperatura del agua, aunque por encima de 15°C el proceso de infección puede ser de 3 a 7 días (MARTIN et al, 2012).

En el protocolo de actuación para el análisis de agua que hemos diseñado se combina el método de *baiting* con la posterior retención de microorganismos en una membrana de filtración (LARAMIE et al, 2015). Estos filtros se incuban en medio selectivo o se pueden usar para obtención de ADN para la detección por PCR, procedimiento que es más rápido y cómodo que la técnica microbiológica.

Nuestro muestreo revela la biodiversidad de *Phytophthora* spp. y otros oomicetos en los ecosistemas de alisedas analizadas (Figura 5). No obstante, existen limitaciones y mejoras en el protocolo de actuación. Por ejemplo, las poblaciones de *Phytophthora* spp. pueden fluctuar estacionalmente (REDONDO et al, 2015), de manera que es recomendable tomar muestras en diferentes épocas del año. Las condiciones experimentales del *baiting*, temperatura y tiempo de incubación, así como la preferencia de cada oomiceto por un tipo u otro de cebo vegetal pueden determinar el éxito del análisis (MARTIN et al, 2012). En este caso particular las muestras analizadas resultaron ser negativas para *P. alni*. Esto puede deberse a la ausencia del patógeno o a una baja carga microbiana, inferior al límite de detección del método aplicado. Para asegurar el correcto desarrollo del procedimiento siempre se incluyó el tratamiento de controles negativos y positivos de *baiting*, que resultaron correctos. Además, gracias al uso de un ADN molde sintético, que se incluyó en las reacciones de PCR, se demostró que no existió inhibición de la ADN polimerasa.



Figura 5. Localización del género *Phytophthora* en las muestras recogidas en Salamanca, Cáceres y Portugal.

6. Conclusiones.

Se ha establecido un protocolo para recogida y análisis de muestras. La combinación de uso de tejidos vegetales trampa y de filtros de retención para aislamiento microbiológico, junto con las metodologías de PCR e identificación taxonómica son enfoques complementarios para la detección de oomicetos en ecosistemas de ribera.

7. Agradecimientos

En primer lugar, a la Universidad de Évora y Ambianta que recogieron las muestras en la zona de Portugal y Cáceres y enviaron para analizar, así como a las técnico de Cesefor que lo hicieron en la zona de Salamanca.

Con la contribución del instrumento financiero LIFE de la Unión Europea; el programa LIFE es el instrumento financiero de la Unión Europea para el Medio Ambiente y la Acción Climática y es uno de los principales contribuyentes al Pacto Verde Europeo.

8. Bibliografía

AGUAYO, J.; ELEGBEDE, F.; HUSSON, C.; SAINTONGE, F.X.; MARÇAIS, B. 2014. Modeling climate impact on an emerging disease, the *Phytophthora alni*-induced alder decline. *Glob Chang Biol.*;20(10):3209-3221. doi:10.1111/gcb.12601

FRY, W. E. & GRÜNWARD, N. J. 2010. Introducción a los Oomicetos. *Trans. Alberto J. Valencia-Botín.* 2012. *The Plant Health Instructor.* DOI:10.1094/PHI-I-2012-0220-01



IOOS, R.; HUSSON, C.; ANDRIEUX, A.; FREY, P. 2005. SCAR based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 323– 335.

IOOS, R.; ANDRIEUX, A.; MARÇAIS, B.; FREY, P. 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial ADN analyses. *Fungal Genet Biol.* 43(7):511-529. doi:10.1016/j.fgb.2006.02.006

LARAMIE, M.B.; PILLIOD, D.S.; GOLDBERG, C.S.; STRICKLER, K.M. 2015. Environmental DNA sampling protocol—Filtering water to capture DNA from aquatic organisms: U.S. Geological Survey Techniques and Methods, book 2, chap. A13. <http://dx.doi.org/10.3133/tm2A13>.

MARTIN, F.N.; ABAD, Z.G.; BALCI, Y.; IVORS, K. 2012. Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Dis.* 96(8):1080-1103. doi:10.1094/PDIS-12-11-1036-FE

NAVE, C.; SCHWAN, J.; WERRES, S.; RIEBESEHL, J. 2021. *Alnus glutinosa* Threatened by Alder *Phytophthora*: A Histological Study of Roots. *Pathogens*.10(8):977. doi:10.3390/pathogens10080977

REDONDO, M.A.; BOBERG, J.; OLSSON, C.H.; OLIVA, J. 2015. Winter Conditions Correlate with *Phytophthora alni* Subspecies Distribution in Southern Sweden. *Phytopathology*. 105(9):1191-1197. doi:10.1094/PHTO-01-15-0020-R

SIMS, L.L.; SUTTON, W.; REESER, P.; HANSEN, E.M. 2015. The *Phytophthora* species assemblage and diversity in riparian alder ecosystems of western Oregon, USA. *Mycologia*. 107(5):889-902. doi:10.3852/14-255

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. 1990. *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*. Publisher: Academic Press. pp.315-322.