



2025 | **16-20**
GIJÓN | **JUNIO**

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

9CFE-1369

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

Organiza





Evaluación de la tolerancia al complejo *Phytophthora xalni*: ensayo de progenies de poblaciones españolas de *Alnus lusitanica* y *A. glutinosa*

CUENCA VALERA, B. (1), DÍEZ GALÁN, A. (2), DEL CAMPO CALVO, R. (2), DÍEZ CASERO, J.J. (2), MELENDRE, C. (1), BUENO GÓMEZ, J. C. (3), DE ANTA MONTERO, A. (3), PÉREZ MARTÍN, F. (4)

(1) Empresa de Transformación Agraria, S.A., S.M.E., M.P. (TRAGSA).

(2) Universidad de Valladolid-iuFOR.

(3) Confederación Hidrográfica Miño-Sil (CHMS).

(4) Dirección general de Biodiversidad, Bosques y Desertificación.

Resumen

El decaimiento de las alisedas en los márgenes de los ríos producida por el complejo *Phytophthora xalni*, motivó que la Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, creara en 2020 un grupo de trabajo para abordar el problema. En 2021 se inició un estudio para la caracterización genética de 627 individuos de 22 poblaciones en 10 cuencas hidrográficas, que permitió la asignación de los individuos de las 22 poblaciones a una u otra especie. En la primavera de 2022 se sembró un ensayo de progenies con las semillas de algunas de estas familias, que fue inoculado entre el otoño de 2023 y la primavera de 2024, con cepas virulentas del complejo *P. xalni*, aisladas en poblaciones de la cuenca hidrográfica Miño-Sil. El aislamiento e identificación de estas cepas, así como la determinación del sistema de inoculación más eficiente, es resultado de la colaboración entre la Confederación Hidrográfica Miño-Sil, TRAGSA y la Universidad de Valladolid-iuFOR. Se ha podido comprobar que la inoculación en primavera produce significativamente más síntomas y mortalidad que la inoculación en otoño, si bien cuando se inocula en otoño y transcurre suficiente tiempo, la expresión de los síntomas también permite discriminar entre familias tolerantes y sensibles. Las variables que permiten una mejor selección de los brinzales tolerantes son el porcentaje de plantas con síntomas y el porcentaje de mortalidad. Varias familias de la población de Villabona (*Alnus glutinosa*) están entre las más tolerantes y varias de la población de Las Colinas (*A. lusitanica*) entre las más sensibles.

Palabras clave

Aliso, resiliencia, bosque de ribera, decaimiento

1. Introducción

Los bosques de ribera constituyen enclaves de extraordinaria relevancia desde el punto de vista de la conservación de la biodiversidad y de la estructura del paisaje, llegando en algunos casos a actuar como corredores naturales de especies forestales (FISCHER et al., 2000). *Alnus glutinosa* (L.) es la especie de ribera de mayor distribución geográfica, presente de forma natural en casi toda Europa, Asia y el noroeste de África. Es una betulácea que juega un papel crucial en la salud de los ecosistemas riparios, capaz de colonizar suelos rocosos y carentes de materia orgánica, gracias a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico (CEBALLOS Y RUIZ DE LA TORRE, 1979). La degradación de las alisedas viene motivada, entre



otros factores, por la fragmentación de sus poblaciones, la alteración de los cauces de los ríos, la lluvia ácida y las sequías periódicas. A esto hay que añadir que en la última década se ha producido un decaimiento severo de la especie atribuido al complejo *Phytophthora xalni* (FERREIRA et al., 2022). Los síntomas son el amarilleamiento de las hojas, muerte regresiva de las ramas y necrosis de la corteza en el cuello y parte inferior del tallo (JUNG et al., 2003). Esta enfermedad se ha extendido rápidamente por toda Europa y en España se ha traducido en una excesiva mortalidad de individuos en muchos ríos del norte de la península (GIBBS et al., 2003; PINTOS et al., 2010; SOLLA et al., 2010).

La Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO), consciente de esta amenaza que pone en peligro la estabilidad de los ecosistemas riparios, creó en 2020 un grupo de trabajo en el que están representados, tanto la propia Dirección General como coordinador del mismo a través de la Subdirección General de Política Forestal y Lucha contra la Desertificación, como otras administraciones y organismos de investigación y universidades que llevan estudiando este problema en los últimos años. Además, la Confederación Hidrográfica del Miño-Sil (CHMS) que ya ha registrado el decaimiento en muchos de los cursos de la cuenca y lleva décadas trabajando en la lucha contra la enfermedad, ha desarrollado con el apoyo de la Universidad de Valladolid-iuFOR, una metodología de inoculación que permita la observación temprana de los síntomas en planta y por tanto la selección de individuos tolerantes.

Alnus glutinosa ha sido descrita generalmente como diploide ($2n=2x=28$) (FEDEROV, 1969). Estudios recientes revelaron la existencia de diferentes citotipos dentro del complejo de la especie, en concreto poblaciones tetraploides en Marruecos (LEPAIS et al. 2013), Portugal (MARQUES-GOMES et al., 2022) y en los Balcanes (MANDÁK et al., 2016). Actualmente sabemos, gracias a trabajos previos del grupo de trabajo creado por MITECO, que la mayoría de las poblaciones de la península, corresponden en realidad a la especie tetraploide *A. lusitanica*, quedando la presencia de *A. glutinosa* relegada al noreste peninsular, Cataluña y norte de Aragón hasta Logroño, donde se ha identificado una población mixta (MARTIN et al., 2024).

En 2021, el MITECO realizó un encargo a TRAGSA para la prospección de 22 poblaciones, dentro de las 10 cuencas hidrográficas con mayor presencia de aliso. Tras el estudio de variabilidad genética y poblacional de estas poblaciones, se eligieron las 12 con mayor variabilidad para estudiar la posible presencia de genotipos tolerantes mediante un ensayo de inoculación con *P. xalni*, e iniciar así un posible programa de mejora. En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en este ensayo relativos tanto al comportamiento de las familias como a la validez del método de inoculación.

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son: i) comprobar si los métodos de inoculación más rápidos y fáciles de aplicar de los propuestos por UVA-iuFOR son eficientes para la selección de genotipos tolerantes; ii) establecer el ranking de tolerancia de las



familias de aliso ensayadas; y iii) comparar el comportamiento de las familias de *A. lusitanica* y *A. glutinosa*, en cuanto a germinación y tolerancia frente al patógeno.

3. Metodología

Material vegetal

Se emplearon brinzales germinados a partir de las semillas recogidas de las poblaciones determinadas dentro del encargo del MITECO a TRAGSA. El estudio de variabilidad poblacional realizado con las 22 poblaciones de este encargo, permitió seleccionar las 12 poblaciones (8 cuencas) con mayor variabilidad genética. De 10 árboles de cada una de estas 12 poblaciones se recogieron frutos, y se dejaron secar a temperatura ambiente para extraer la semilla. Las semillas extraídas se conservaron en bolsas de zip en cámara fría a 4°C hasta la siembra en marzo de 2022.

Gracias al estudio de ploidía realizado previamente con estos materiales (Martín et al., 2022), conocemos la filiación como especie de cada uno de los genotipos madre, de modo que todos los árboles corresponden a la especie *A. lusitanica* excepto los árboles de las poblaciones de Puebla del Segur (PB), Villabona (VB) y Amer (AM), que corresponden a la especie *A. glutinosa*.

Siembra y germinación

De cada uno de los árboles se pesaron 6 lotes de 10 semillas, para disponer el peso medio de las semillas por genotipo. Posteriormente, las semillas limpias se dispusieron en placa de Petri sobre papel de filtro humedecido para estimular germinación y comprobar su viabilidad. Las placas se etiquetaron convenientemente con el código de la familia. Diariamente se registró el número de semillas germinadas en cada familia y las semillas germinadas se emplearon en la siembra del ensayo según diseño.

La siembra se realizó en bandejas Plasnor 170/400-32 con un tamaño de alveolo de 400 cc para garantizar el adecuado desarrollo del brinzal durante 2 savias. Estas bandejas se llenaron con un sustrato formado por una mezcla de turba rubia y vermiculita en proporción 9:1 adicionado con abono de liberación lenta 12 meses. Las bandejas se distribuyeron en 8 bloques de 28 bandejas (la bandeja nº 28 sólo tenía ocupados la mitad de los alveolos), y en cada bloque se sembraron 4 réplicas o medios hermanos por familia (una línea de alveolos de una bandeja), de modo que en el total del ensayo hay 32 brinzales de cada familia. El diseño del ensayo fue de bloques completos al azar, de modo que en cada bloque se aleatorizó la disposición de las familias en las bandejas, y cada familia, cada bandeja y cada bloque fueron convenientemente etiquetados.

La siembra se realizó en la primera quincena del mes de marzo, disponiendo 2-3 semillas por alveolo, ya que dado su pequeño tamaño se hace difícil colocar una sola y porque de este modo garantizábamos la presencia de planta en todos los alveolos. Cuando en algún caso germinaron varias semillas en un mismo alveolo, se hizo un “deshermanamiento” eliminando los brinzales extra hasta dejar uno



solo por alveolo. Tras la siembra del ensayo, las semillas sobrantes, se sembraron por bandejas completas (una por familia) correctamente identificadas con el código de la familia, para disponer de material de reserva.

Inoculación del patógeno y fuente del inóculo.

La Universidad de Valladolid-iuFOR en el contexto de los trabajos encargados por la CHMS, realizó en 2023 un estudio para determinar el sistema de inoculación más eficiente de plantas con el complejo *P.xalni* de cara a seleccionar genotipos tolerantes (resultados en proceso de publicación). Dado el volumen de planta de este ensayo (7040), se seleccionaron dos procedimientos, que sin ser los que mostraban los síntomas de la enfermedad más intensos y precoces, sí permitían inocular simultáneamente un gran volumen de planta con resultados satisfactorios. Estos métodos fueron:

- clavar un fragmento de palillo de dientes co-cultivado con micelio del patógeno, en la zona inferior del tallo, a unos 4 cm del cuello de la raíz, lo suficiente profundo como para que el micelio entre en contacto con el cambium.
- mediante riego del cuello de cada planta, donde previamente se practicó una pequeña herida, con 20 ml de suspensión de micelio de *P. xalni* desarrollado en medio líquido PDB y homogeneizado.

Se emplearon ambos sistemas simultáneamente para asegurar la aparición de los síntomas. Puesto que cuando se dispuso de los resultados del estudio de la UVA-iuFOR ya era otoño de 2023, se inocularon en ese momento (octubre de 2023) sólo 4 de los 8 bloques del ensayo, y los otros 4 se inocularon en la primavera siguiente (abril de 2024), con la intención de comparar los resultados obtenidos en cada fecha.

Toma de datos y análisis estadístico

En las semanas posteriores a la siembra, se realizó un seguimiento de todas las familias, registrando el número de plantas germinadas, y las muertes que se fueron produciendo. Se dispone por tanto de datos de las variables siguientes: porcentaje de germinación, tiempo a la germinación, altura de la planta previa a la inoculación de otoño y porcentaje de mortalidad de cada una de las familias en el ensayo.

En abril, en el momento de la inoculación de los 4 bloques que quedaban sin inocular, se tomaron datos en los 4 bloques inoculados en otoño (5 meses desde la inoculación) de los siguientes parámetros: nº de plantas muertas, nº de plantas con síntomas (con amarilleamiento de las hojas, marchitamiento, lesiones necróticas a partir del punto de inoculación), y longitud de la lesión necrótica en el tallo ((lesión en el cuello, LC; lesión de palillo, Lp; si ambas lesiones se unían, Lc+Lp) (Figura 1). En septiembre de 2024, una vez concluida la estación de crecimiento, se tomaron datos de las mismas variables para todos los bloques, tanto los inoculados en otoño (11 meses desde la inoculación), como los inoculados en primavera (5 meses desde la inoculación).

Los datos se analizaron empleando el programa IBM SPSS Statistics (versión 25)

mediante análisis de varianza ANOVA I o ANOVA II, según el caso, estimando las diferencias entre medias mediante el test de la Mínima Diferencia Significativa (MDS) (Sokal y Rohlf, 1981) para un nivel de significación del 95%. Para el análisis de los datos correspondientes a porcentajes, se realizó la transformación previa de los datos mediante el $\arcsen\sqrt{X}$, para conseguir la normalización de los valores.



Figura 1. Aliso mostrando lesión necrótica en torno al palillo inoculado con micelio del complejo *P. xalni* (centro) rodeado de brinzales sin síntomas

4. Resultados

Las diferentes poblaciones presentan diferencias significativas para todas las variables cuyos datos se muestran en la Tabla 1 ($p < 0,000$). Las poblaciones de Villabona (VB), Charco del Batán (CB), Las Colinas (LC), Oimbra (OI) y Paderne (PD) tienen las semillas más pesadas, pero sin embargo sólo en las dos primeras poblaciones este mayor peso se traduce en un mayor porcentaje de germinación y un menor tiempo transcurrido hasta que ésta se produce. Las poblaciones de LC y PD, incluso, tiene una germinación significativamente más baja que el resto y tardan significativamente más en germinar que el resto a pesar de su mayor peso. Son también las que exhiben una mayor mortalidad pretratamiento. LC junto con Puebla del Segur (PB), son también, las poblaciones que producen los brinzales más pequeños. Las poblaciones diploides (PB, VB y AM) no se diferencian significativamente de las tetraploides por el comportamiento de sus semillas o sus brinzales.

Tabla 1. Peso de 10 semillas (g), % de germinación, tiempo transcurrido hasta la germinación (d), % de mortalidad previo a los tratamientos y altura de los brinzales al final del periodo vegetativo de 2022 (cm) (las familias de las poblaciones en negrita corresponden e a *A. glutinosa*, y el resto a *A. lusitanica*)

| Población | Peso semillas (g) | % germinación | Tiempo a germinación (d) | % mortalidad pretratamiento | Altura final 2022 (cm) |
|--------------|-------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 01-TF | 9,5±0,6 a | 44,7±4,6 c | 49,7±8,0 bc | 22,8±3,9 a | 28,4±0,7 c |
| 03-CB | 11,4 ±0,6 de | 56,3±6,5 d | 30,1±6,1 a | 24,2±4,3 ab | 25,3±1,7 bc |
| 06-PL | 10,8±0,4 bcd | 63,0±4,0 d | 29,5±3,6 a | 29,8±3,2 ab | 28,2±0,6 c |
| 07-MR | 9,3±0,6 a | 45,2±5,0 c | 35,6±4,1 ab | 27,1±3,4 abc | 23,9±1,1 b |
| 10-PB | 10,4±0,3 bc | 31,0±2,5 b | 77,9±4,4 d | 58,2±5,2 e | 17,4±1,2 a |
| 11-AM | 9,4±0,4 a | 27,8±2,2 b | 73,2±4,2 d | 59,3±5,1 e | 26,0±1,6 bc |



| | | | | | |
|-------|--------------|------------|-------------|--------------|-------------|
| 12-VB | 11,8±0,3 e | 43,8±3,5 c | 48,9±4,7 bc | 31,5±3,8 abc | 26,0±1,0 bc |
| 13-SY | 10,9±0,0 bcd | 26,0±4,3 b | 55,4±6,5 c | 38,5±6,9 cd | 25,2±2,2 bc |
| 14-CP | 10,1±0,1 ab | 31,0±3,2 b | 53,4±6,3 c | 36,9±5,0 bcd | 28,6±1,5 c |
| 17-OI | 11,1±0,0 cde | 28,5±3,5 b | 53,1±7,9 c | 47,9±7,8 de | 26,8±2,4 c |
| 20-PD | 11,1±0,0 cde | 10,6±2,4 a | 72,7±1,9 d | 59,5±1,4 e | 25,9±4,1 b |
| 21-LC | 11,2±0,0 cde | 6,5±1,5 a | 87,2±16,2 d | 73,3±8,7 f | 19,8±3,5 a |
| P | 0,000*** | 0,000*** | 0,000*** | 0,000*** | 0,000*** |
| MDS | 0,8611 | 8,5149 | 14,3618 | 13,0934 | 3,6466 |

Al comparar los síntomas producidos por la enfermedad al cabo de los 5 meses desde la inoculación en los brinzales en ensayo (Tabla 2), tanto para los inoculados en otoño como los inoculados en primavera, encontramos una interacción significativa entre la población y el momento de la inoculación ($p_{pobxfech_ino} < 0,000$). Se dan así mismo diferencias significativas de comportamiento entre poblaciones para todas las variables consideradas con la población de PD mostrando más síntomas y la mortalidad más elevada en primavera, y las poblaciones diploides total o parcialmente (PB, VB y AM) mostrando los síntomas más leves y el menor porcentaje de mortalidad. En todos los casos la inoculación de primavera genera significativamente más mortalidad, y en general más síntomas de todo tipo que la de otoño. Sin embargo, en primavera las lesiones medidas son más pequeñas, lo que puede deberse a que, al morir más planta la inoculación de primavera al cabo de los 5 meses, las lesiones de esos brinzales totalmente necrosados no entran en el cómputo de longitud de lesión, y sólo se computan las de las plantas que continúan vivas y que presentan lesiones más reducidas.

Tabla 2. Porcentaje de plantas con síntomas, muertas y longitud de las lesiones en plantas inoculadas en otoño y en primavera a los 5 meses de su inoculación

| Población | Presencia de síntomas (%) | | Longitud media de lesión (cm) | | Mortalidad (%) | |
|-----------|---------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|----------------|-----------|
| | Otoño | Primavera | Otoño | Primavera | Otoño | Primavera |
| 01-TF | 39,4±0,0 | 61,8±0,0 | 5,6±0,3 | 2,5±0,0 | 2,3±0,0 | 55,8±0,0 |
| 03-CB | 45,9±0,0 | 52,2±0,0 | 5,5±0,3 | 2,5±0,1 | 4,8±0,0 | 42,5±0,0 |
| 06-PL | 32,7±0,0 | 64,6±0,0 | 6,1±0,1 | 1,5±0,1 | 2,8±0,0 | 58,3±0,0 |
| 07-MR | 40,8±0,0 | 51,5±0,0 | 6,6±0,3 | 2,3±0,1 | 3,7±0,0 | 44,4±0,0 |
| 10-PB | 31,8±0,0 | 48,4±0,0 | 5,8±0,2 | 2,8±0,1 | 2,4±0,0 | 41,1±0,0 |
| 11-AM | 39,0±0,0 | 47,2±0,0 | 6,6±0,4 | 2,7±0,1 | 1,6±0,0 | 40,2±0,0 |
| 12-VB | 33,9±0,0 | 43,4±0,0 | 5,8±0,2 | 2,9±0,4 | 1,1±0,0 | 33,6±0,0 |
| 13-SY | 21,9±0,0 | 52,6±0,0 | 6,8±0,5 | 1,7±0,1 | 0,0±0,0 | 49,4±0,0 |
| 14-CP | 45,5±0,0 | 66,7±0,0 | 6,4±0,3 | 2,4±0,1 | 0,9±0,0 | 58,6±0,0 |
| 17-OI | 30,7±0,0 | 60,6±0,0 | 5,9±0,4 | 2,4±0,1 | 13,6±0,0 | 55,8±0,0 |
| 20-PD | 27,4±0,0 | 74,4±0,0 | 6,6±0,6 | 2,8±0,2 | 5,3±0,0 | 71,8±0,1 |
| 21-LC | 25,7±0,1 | 54,6±0,2 | 7,6±1,2 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 54,6±0,1 |
| Media | 34,6±2,2 | 56,7±5,4 | 6,3±0,2 | 2,2±0,2 | 3,2±1,1 | 51,1±5,2 |



| | | | |
|----------------|------------|----------|----------|
| p pobxfech_ino | 0,000*** | 0,000*** | 0,000*** |
| p familia | 0,000*** | 0,000*** | 0,000*** |
| p fech_ino | 0,084 n.s. | 0,000** | 0,000** |

Los datos obtenidos muestran que el tiempo transcurrido desde la inoculación a la toma de los datos tiene gran relevancia, con porcentajes de planta sintomática y muerta significativamente más elevados cuando los datos se tomaron a los 11 meses, respecto a la toma de datos realizada a los 5 meses (Tabla 3). Las longitudes medias de las lesiones, sin embargo, son significativamente más reducidas a los 11 meses que a los 5, debido a que cuanto más tiempo transcurre desde la inoculación, más avanzan las lesiones que finalmente ocupan toda la longitud del tallo. En este caso, la planta engrosa el porcentaje de planta muerta, y la lesión ya no computa. El efecto de la población también es muy significativo, con la población de Las Colinas (LC) mostrando un mayor porcentaje de síntomas y de planta muerta, y la población de Santa María de Crayón, con los síntomas y porcentajes de mortalidad más leves.

Tabla 3. Porcentaje de plantas con síntomas, muertas y longitud de las lesiones en plantas inoculadas en otoño a los 5 (abril 2024) y 11 meses (septiembre 2024) de su inoculación

| Población | Presencia de síntomas (%) | | Longitud media de lesión (cm) | | Mortalidad(%) | |
|--------------|---------------------------|------------|-------------------------------|------------|---------------|------------|
| | A los 5 m | A los 11 m | A los 5 m | A los 11 m | A los 5 m | A los 11 m |
| 01-TF | 39,4±0,0 | 76,9±0,0 | 5,6±0,3 | 3,4±0,4 | 2,3±0,0 | 59,7±0,0 |
| 03-CB | 45,9±0,0 | 72,6±0,0 | 5,5±0,3 | 3,8±0,4 | 4,8±0,0 | 49,3±0,0 |
| 06-PL | 32,7±0,0 | 73,0±0,0 | 6,1±0,1 | 3,5±0,3 | 2,8±0,0 | 51,7±0,0 |
| 07-MR | 40,8±0,0 | 75,7±0,0 | 6,6±0,3 | 3,6±0,5 | 3,7±0,0 | 61,9±0,0 |
| 10-PB | 31,8±0,0 | 72,0±0,0 | 5,8±0,2 | 2,8±0,3 | 2,4±0,0 | 60,7±0,0 |
| 11-AM | 39,0±0,0 | 68,7±0,0 | 6,6±0,4 | 4,1±0,6 | 1,6±0,0 | 55,4±0,0 |
| 12-VB | 33,9±0,0 | 60,6±0,0 | 5,8±0,2 | 3,2±0,3 | 1,1±0,0 | 39,1±0,0 |
| 13-SY | 21,9±0,0 | 49,5±0,0 | 6,8±0,5 | 5,2±0,4 | 0,0±0,0 | 28,0±0,0 |
| 14-CP | 45,5±0,0 | 75,2±0,0 | 6,4±0,3 | 3,0±0,4 | 0,9±0,0 | 59,5±0,0 |
| 17-OI | 30,7±0,0 | 71,0±0,0 | 5,9±0,4 | 3,4±0,4 | 13,6±0,0 | 57,5±0,0 |
| 20-PD | 27,4±0,0 | 69,5±0,1 | 6,6±0,6 | 2,9±0,8 | 5,3±0,0 | 54,7±0,1 |
| 21-LC | 25,7±0,1 | 82,9±0,1 | 7,6±1,2 | 1,0±0,0 | 0,0±0,0 | 77,1±0,1 |
| Media | 34,6±2,2 | 70,6±2,5 | 6,3±0,2 | 3,3±0,3 | 3,2±1,1 | 54,6±3,5 |
| p famxtiempo | 0,000*** | | 0,000*** | | 0,000*** | |
| p familia | 0,000*** | | 0,000*** | | 0,009** | |
| p tiempo | 0,000*** | | 0,000*** | | 0,000*** | |

Para determinar qué familias resultaban más tolerantes, se analizaron los síntomas presentados por todas las plantas en septiembre de 2024, independientemente de la fecha de inoculación. La Tabla 4 muestra los resultados por población y la Figura 2, el ranking de todas las familias incluidas en el ensayo



para la variable mortalidad y porcentaje de plantas con síntomas. Estas variables se consideran las más discriminantes al exhibir diferencias más significativas entre familias ($p < 0,000$). Las longitudes medias de las lesiones necróticas producidas en el cuello o en torno al palillo clavado en el tallo no permitieron diferenciar entre familias ($p = 0,984$ y $p = 0,612$ respectivamente). Sin embargo, cuando ambas lesiones llegaban a unirse, provocando una lesión mayor, la longitud de esta sí permitía discriminar familias ($p < 0,05$).

Tabla 4. Porcentaje de plantas con síntomas, muertas y longitud medias de las lesiones en el cuello (Lc), en torno al palillo (Lp), y sin solución de continuidad (Lc+Lp) en septiembre 2024, independientemente de la fecha de inoculación

| Población | Presencia de síntomas (%) | Mortalidad (%) | Longitud Lc (cm) | Longitud Lp (cm) | Longitud Lc+Lp (cm) |
|------------------|---------------------------|----------------|------------------|------------------|---------------------|
| 01-TF | 70,0±0,0 ab | 57,9±0,0 abc | 2,0±0,1 | 3,1±0,7 | 4,6±0,6 |
| 03-CB | 62,9±0,0 ab | 46,1±0,0 ab | 1,6±0,2 | 2,3±0,6 | 4,9±0,4 |
| 06-PL | 68,8±0,0 ab | 54,9±0,0 abc | 2,1±0,3 | 1,6±0,4 | 5,1±0,4 |
| 07-MR | 64,3±0,0 ab | 53,6±0,0 abc | 2,1±0,4 | 1,0±0,2 | 4,9±0,5 |
| 10-PB | 60,0±0,0 ab | 50,1±0,0 abc | 1,4±0,1 | 1,8±0,3 | 4,5±0,5 |
| 11-AM | 58,6±0,0 ab | 48,2±0,0 ab | 2,0±0,2 | 2,6±0,5 | 5,8±0,9 |
| 12-VB | 52,1±0,0 a | 36,4±0,0 a | 1,7±0,1 | 3,1±0,4 | 5,2±0,6 |
| 13-SY | 57,2±0,0 ab | 50,9±0,0 abc | 1,9±0,3 | 3,2±1,0 | 3,5±0,8 |
| 14-CP | 71,2±0,0 ab | 59,1±0,0 abc | 1,6±0,2 | 1,6±0,8 | 4,7±0,3 |
| 17-OI | 66,1±0,0 ab | 56,7±0,0 abc | 1,8±0,4 | 2,1±0,3 | 4,6±0,4 |
| 20-PD | 71,7±0,0 ab | 62,4±0,0 bc | 2,5±1,0 | 2,0±0,5 | 4,7±0,8 |
| 21-LC | 76,1±0,0 b | 71,7±0,0 c | 1,0 | 1,0 | --- |
| | | | | | |
| p familia | 0,000*** | 0,000*** | 0,984 n.s. | 0,612 n.s. | 0,985 n.s. |
| MDS | 22,60 | 23,09 | --- | --- | --- |

En la Figura 2 se señalan en verde 10 familias con menos del 25% de mortalidad, de las cuales 5 corresponde a la población de VB, 2 a la población de AM, 2 a la de PD y 1 a CB. En la misma figura las 20 familias más sensibles, con mortalidad mayor del 75% aparecen en negro. De las 20, 5 corresponden a la población de LC, y el resto a las poblaciones de CP (3), SY (2), PD (2), OI (2), AM (2), CB (1), TF (1), PL (1) y MR (1).



Figura 2. Ranking de tolerancia de las familias ensayadas en base al porcentaje de mortalidad y porcentaje de plantas con síntomas. Las familias con mortalidades menores de 25% aparecen en verde, y en negro las que presentan mortalidades superiores al 75%. (* Para facilitar la visualización, no parecen en el gráfico muchas de las familias con porcentajes intermedios, entre 40 y 60% de mortalidad, lo que genera el escalón que se aprecia donde se sitúa el asterisco).

5. Discusión

En ensayos anteriores llevados a cabo por TRAGSA (datos no publicados) se identificó una relación positiva entre el peso de la semilla y el porcentaje de germinación, lo que no coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, al menos a nivel de población. Sería necesario un estudio más detallado a nivel de familia, para comprobar si se da o no esta correlación. Un mayor tamaño y peso de la semilla normalmente significa que poseen una mayor cantidad de reservas que pueden utilizar para ayudar en el proceso de germinación y establecimiento de la plántula (LEISHMAN et al. 2009).

Así mismo, MARTÍN et al. (2024) comprueban un elevado nivel de diferenciación genética entre las dos especies según los resultados de su análisis de la variación molecular (AMOVA) y de componentes principales (PCA), de las mismas familias usadas en este trabajo en el que emplearon 10 marcadores microsatélites diferentes. Otros estudios señalan también, la existencia de diferencias morfológicas claras entre las especies atendiendo a variables como el tipo y localización de tricomas en hojas y yemas, grosor y longitud de los amentos o la forma de las lenticelas presentes en los brotes del año (VIT et al., 2017).

Sin embargo, en este estudio, a nivel población no se han apreciado diferencias en cuanto a peso de las semillas, su comportamiento germinativo y crecimiento posterior de los brinzales, entre las poblaciones diploides y tetraploides. MARQUES-GOMES et al. (2022), al comparar el comportamiento de semillas de las dos especies obtiene resultados muy similares a los de este trabajo. Estos autores encuentran diferencias significativas entre *A. glutinosa* y *A. lusitanica* atendiendo a características de las semillas, en concreto al tamaño, midiendo la proyección de la superficie de éstas. No obstante, al igual que en nuestro estudio, no pudieron diferenciar claramente entre especies atendiendo al peso de la semilla. Tampoco encontraron diferencias entre las dos especies a la hora de comparar el éxito germinativo, obteniendo valores muy similares, salvo cuando estudiaron el comportamiento de las semillas en diferentes rangos de temperatura. En este caso, *A. lusitanica* sí que exhibía un mayor éxito de germinación con temperaturas medias más elevadas que su contraparte, lo que es coherente con su distribución



natural, en las zonas más meridionales de Europa, con temperaturas más altas.

CHANDELIER et al. (2016), encuentran mortalidades significativas a los 3 meses de la inoculación mediante inundación, con diferencias significativas entre genotipos. En las inoculaciones mediante heridas en el tallo, ZAMORA-BALLESTEROS et al. (2016) observa los primeros síntomas a la semana de la inoculación y obtienen tasas de mortalidad de hasta el 30% en plántulas inoculadas con *P. xalni*. CLEMENZ et al. (2008) sin embargo, tardan hasta 2 años en obtener el 75% de mortalidad, si bien las plantas presentan lesiones necrosadas ya en los primeros meses tras la inoculación. Esto concuerda con nuestros resultados, donde a los 5 meses tenemos ya expresión suficiente de síntomas, y a los 11 meses, estos son significativamente más evidentes. En experimentos previos, el grupo de la UVA-iuFOR obtuvo síntomas de la enfermedad en un plazo más corto empleando el método de herida en el tallo o el de inundación (datos en proceso de publicación), pero la mayor complejidad de realización de estos métodos, los hacen inviables para testar, como en el caso de este trabajo, miles de plantas simultáneamente.

Diversos autores reflejan la influencia en la expresión de los síntomas, de la época del año en que se evalúa (CLEMENZ et al., 2008; ŠTOCHLOVA et al., 2012). Esto puede justificar que la expresión de síntomas y la mortalidad obtenida en este trabajo, sea significativamente menor al inocular en otoño respecto a la inoculación en primavera, cuando la actividad fisiológica de la planta y del patógeno es mayor. CHANDELIER et al. (2016) señala también la influencia de la virulencia del aislado. En ensayos previos de TRAGSA (CUENCA et al., 2017) en los que se emplearon diferentes sistemas de inoculación, apenas se registraron síntomas, lo que pudo deberse efectivamente a una falta de virulencia del aislado empleado.

La población de Villabona, perteneciente a la especie *A. glutinosa*, ha resultado tener el mayor número de brinzales y familias tolerantes al final del ensayo. Sin embargo, es necesario un estudio más completo para poder sacar conclusiones sobre el comportamiento de ambas especies frente al patógeno. Hasta donde sabemos, no se han publicado aún estudios comparativos de la tolerancia entre ambas especies, pero parte del grupo de trabajo creado por el MITECO está actualmente profundizando en el estudio de la población mixta de Amer (Logroño), para determinar las diferencias de comportamiento de los individuos de cada especie de esta población, tanto a nivel fenológico como en cuanto a tolerancia.

La doble inoculación planteada en este trabajo ha permitido discriminar aquellos genotipos que se comportan mejor frente a la enfermedad, e identificar las familias con un mayor número de supervivientes, sentando las bases de un futuro programa de mejora. CHANDELIER et al. (2016) calculan la heredabilidad del carácter porcentaje de mortalidad de *A. glutinosa* frente a *P. xalni*, en un valor que oscila entre el 0,6 y el 0,8. Este valor es suficientemente alto para plantearse realizar la mejora a través de la selección de progenitores tolerantes con los que establecer un huerto semillero. La vía clonal, estableciendo mezclas de clones que garanticen la biodiversidad de las plantaciones también es una vía factible, puesto que el protocolo de micropropagación de la especie está desarrollado (CORDEIRO et al., 2024; SAN JOSÉ et al., 2013, 2016). Este futuro programa de mejora requerirá de nuevas selecciones para ambas especies, de acuerdo a las regiones de



procedencia (RP) definidas, teniendo en cuenta, además, que las RPs establecidas actualmente en la legislación española de ámbito forestal, solo consideran la presencia en España de la especie *A. glutinosa*.

6. Conclusiones

El sistema de doble inoculación mediante riego del cuello de la planta con suspensión de micelio, e hincado en el tallo de un palillo co-cultivado con micelio, ha permitido evaluar el comportamiento en cuanto a tolerancia frente al decaimiento producido por el complejo *P. xalni*, de más de 7000 brinzales de las dos especies, *A. lusitanica* y *A. glutinosa*. Los síntomas son más evidentes, permitiendo una mejor selección de los brinzales tolerantes, si se inocula en primavera, o en caso de inocular en otoño, cuando se deja transcurrir suficiente tiempo desde la inoculación. Las variables más discriminantes para realizar la selección de los genotipos, fueron el porcentaje de brinzales con síntomas y el porcentaje de mortalidad.

La población de Villabona (*A. glutinosa*) tiene el mayor número de familias con elevada tolerancia mientras que la población de Las Colinas (*A. lusitanica*) tiene el mayor número de familias entre las más sensibles. Es necesario continuar profundizando en el comportamiento de ambas especies frente al complejo *P. xalni* para poder definir adecuadamente los programas de mejora a plantear en el futuro.

7. Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación del MITECO a través del Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014 – 2020, dentro de la submedida 15.2, de apoyo al fomento y la conservación de los recursos genéticos forestales, que dispone de una cofinanciación de fondos FEADER al 75%, y por el expediente 89/22/CA/EG/SE de la Confederación Hidrográfica de Miño-Sil para *Investigar el decaimiento y sus criterios de manejo adaptado en los bosques de alisedas de la demarcación Miño-Sil*.

8. Bibliografía

CEBALLOS, L.; RUÍZ DE LA TORRE, J.; 1979. Árboles y arbustos de la España Peninsular. IFIE y ETSIM Madrid.

CHANDELIER, A., HUSSON, C., DRUART, P., & MARÇAIS, B. (2016). Assessment of inoculation methods for screening black alder resistance to *Phytophthora xalni*. *Plant Pathology*, 65(3), 441–450. <https://doi.org/10.1111/ppa.12418>

CORDEIRO, D., PIZARRO, A., VÉLEZ, M. D., GUEVARA, M. Á., DE MARÍA, N., RAMOS, P., ... & DÍAZ-SALA, C. (2024). Breeding *Alnus* species for resistance to *Phytophthora* disease in the Iberian Peninsula. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1499185.



CLEMENZ, C., FLEISCHMANN, F., HÄBERLE, K.-H., MATYSSEK, R., & OSSWALD, W. (2008). Photosynthetic and leaf water potential responses of *Alnus glutinosa* saplings to stem-base inoculation with *Phytophthora alni* subsp. *alni*. *Tree Physiology*, 28(11), 1703–1711. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.11.1703>

FEDOROV, A.A.; 1969. Chromosome numbers of flowering plants. *Acad Sci USSR Moscow Repr*, 419-429.

FERREIRA, V.; PAZIANOTO, L. H.; SOLLA, A.; 2022. Invasive forest pathogens affect the characteristics, microbial colonisation, and decomposition of leaf litter in streams. *Freshw Biol* 67, 416-429.

FISCHER, R.A.; MARTIN, C.O., FISCHENICH, J.C.; 2000. Riparian ecology and management in multi-land use watersheds. International Conference on American Water Resources Association, 1-7.

GIBBS, J.N.; VAN DIJK, C.; WEBBER, J.F.; 2003. *Phytophthora* disease of Alder in Europe. Forestry Commission Bulletin 126. Edinburgh, UK.

JUNG, T.; BLASCHKE, M.; SCHLENZIG, A.; OSSWALD W.; GULDER H.J.; 2003. *Phytophthora* disease of alders in Bavaria: extent of damage, mode of spread and management strategies. In: MCCOMB, J.A.

LEISHMAN, M. R., WRIGHT, I. J., MOLES, A. T., & WESTOBY, M. (2009). The evolutionary ecology of seed size. 31–57.

LEPAIS, O.; MULLER, S.; SAAD-LIMAM, O.; RHAZI, L.; BELOUAHEM-ABED, D.; DAOUD-BOUATTOUR, A.; MOKHTAR GAMMAR, A.; GHRABI-GAMMAR, Z., BACLES, Z.; 2013. High genetic diversity and distinctiveness of rear-edge climate relicts maintained by ancient tetraploidisation for *Alnus glutinosa*. *Plos One* 8, e75029.

MANDÁK, B.; VÍT, P.; KRAK, K.; TRÁVNÍČEK, P.; HAVRDOVÁ, A.; HANDICOVÁ, V.; ZÁKRAVSKY, P.; JAROLÍMOVÁ, V.; BACLES, C.; DOUDA, J.; 2016. Flow cytometry, microsatellites and niche models reveal the origins and geographical structure of *Alnus glutinosa* populations in Europe. *Ann Bot* 117, 107–120.

MARQUES-GOMES, I.; FARIA, C.; RODRIGUES-CONCEIÇÃO, S.I.; JANSSON, R.; CORCOBADO, T.; MILANOVIĆ, S.; LAUREN, Y.; BERNEZ, I.; DUFOUR, S.; MANDÁK, B.; ENNOUNI, H.; SAHLI, A.; ATER, M.; DORADO, F.J.; CAPERTA, A.D.; DAVID, T.; SOLLA, A.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.M.; 2022. Germination and seed traits in common alder (*Alnus* spp.): the potential contribution of rear-edge populations to ecological restoration success. *Restor Ecol* 30, e13517.



MARTÍN, M. A., MORENO, R., DIE, J. V., CABRERA, A., CASTRO, P., PÉREZ, M. D., PALOMINO, C., CUENCA, B., PÉREZ, F., & SOLLA, A. (2024). Distribution, diversity and genetic structure of alders (*Alnus lusitanica* and *A. glutinosa*) in Spain. *Forest Ecology and Management*, 562(121922), 121922. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.121922>

PINTOS VARELA, C.; RIAL MARTÍNEZ, C.; MANSILLA VÁZQUEZ, J.P.; AGUÍN CASAL, O.; 2010. First Report of *Phytophthora* Rot on Alders Caused by *Phytophthora alni* subsp. *alni* in Spain. *Plant Dis* 94, 273-273.

SAN JOSÉ, M., JANEIRO, L., & CORREDOIRA, E. (2013). Micropropagation of threatened black alder. *Silva Fennica*, 47(1). <https://doi.org/10.14214/sf.892>

SAN JOSÉ, M. C., JANEIRO, L. V., MARTÍNEZ, M. T., VALLADARES, S., CERNADAS, M. J., MONTENEGRO, R., & CORREDOIRA, E. (2016). Biotechnological approaches for the improvement and conservation of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. In M. Anis & N. Ahmad (Eds.), *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement* (pp. 467–486). Springer Science + Business Media.

SOLLA, A.; PÉREZ-SIERRA, A.; CORCOBADO, T.; HAQUE, M.M.; DIEZ, J.J.; JUNG, T.; 2010. *Phytophthora alni* on *Alnus glutinosa* reported for the first time in Spain. *Plant Pathol* 59, 798-798.

ŠTOCHLOVA, P., NOVOTNÁ, K., & ČERNÝ, K. (2012). Factors affecting the development of *Phytophthora alni* ssp. *alni* infections in *Alnus glutinosa* L. *Journal of Forest Science*, 58(3), 123–130.

VÍT, P.; DOUDA, J.; KRAK, K.; HAVRDOVÁ, A.; MANDÁK, B.; 2017. Two new polyploid species closely related to *Alnus glutinosa* in Europe and North

ZAMORA-BALLESTEROS, C., HAQUE, M. M. U., DIEZ, J. J., & MARTÍN-GARCÍA, J. (2017). Pathogenicity of *Phytophthora alni* complex and *P. plurivora* in *Alnus glutinosa* seedlings. *Forest Pathology*, 47(2), e12299. <https://doi.org/10.1111/efp.12299>