



2025 | **16-20**
GIJÓN | **JUNIO**

9º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

9CFE-1417

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

Organiza





Propagación de genotipos seleccionados de aliso tolerantes a *Phytophthora* spp.

CORDEIRO, D. (1)*, PIZARRO A. (1)*, ESPINOSA, M. (2), CERVERA, M. T. (3), DÍAZ-SALA, C. (1)

(1) Departamento de Ciencias de la Vida, Facultad de Ciencias, Universidad de Alcalá, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, España.

(2) Servicio Forestal, DG Medio Natural y Biodiversidad, Consejería de Desarrollo Sostenible, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Toledo, España.

(3) Departamento de Ecología y Genética Forestal, Instituto de Ciencias Forestales (ICIFOR-INIA, CSIC), 28040 Madrid, España.

*Ambos autores contribuyeron por igual a este trabajo.

Resumen

Ampliamente distribuidos en Europa, África, Asia y América, los alisos son componentes fundamentales para la conservación de los ecosistemas forestales ribereños. En las últimas décadas, Europa ha sido testigo de una fuerte reducción de las masas de alisos debido, principalmente, al ataque por *Phytophthora* spp., estando ya confirmado en varias cuencas hidrográficas de la Península Ibérica. En España, se han puesto en marcha proyectos de colaboración entre grupos de investigación y organismos públicos para dar respuesta a la urgente demanda de definir métodos para la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos de los alisos. Siete genotipos asintomáticos de la ribera del río Alberche (Castilla-La Mancha), seleccionados como posibles resistentes o tolerantes al ataque por *Phytophthora* spp., fueron utilizados como planta madre para iniciar un programa de propagación vegetativa a gran escala mediante cultivo *in vitro* y estaquillado. A pesar de que factores como la edad del árbol y el genotipo condicionaron la iniciación y la tasa de multiplicación de los cultivos, todos los genotipos fueron establecidos con éxito *in vitro*. La conservación de germoplasma resistente servirá de apoyo al seguimiento y gestión de una de las enfermedades más agresivas de los ecosistemas ribereños.

Palabras clave

Conservación, cultivo *in vitro*, ecosistemas de bosques ribereños, enfermedades forestales, recursos naturales.

1. Introducción

Los alisos son árboles caducifolios de crecimiento rápido, que habitan en zonas húmedas ribereñas y preferentemente no sombreadas. Pertenecen al género *Alnus*, Familia Betulaceae. Están ampliamente distribuidos en Europa y con presencia en norte de África, Asia occidental y América. Tradicionalmente, se consideraba que el aliso de la Península Ibérica, conocido como aliso común, pertenecía a la especie *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Sin embargo, recientemente, un estudio de los alisos europeos demostró la existencia de dos especies en la Península Ibérica (VÍT et al., 2017). Además de la especie diploide *A. glutinosa* ($2n = 2x = 28$), se describió una nueva especie tetraploide, *Alnus lusitanica* Vít, Douda & Mandák ($2n = 4x = 56$). *A. lusitanica*, de nombre común aliso ibérico, tiene una amplia distribución en la región noroeste, centro y sur de la Península Ibérica, mientras que la presencia de



A. glutinosa se limita a la región noreste de España (CORDEIRO et al., 2024). Estas dos especies de alisos presentan diferencias morfológicas, citológicas, bioquímicas y genéticas (VÍT et al., 2017; GOMES MARQUES et al., 2024).

Los alisos son componentes fundamentales en los ecosistemas forestales ribereños. Estos árboles proporcionan sombra y reducen la temperatura, permitiendo que otras especies vegetales puedan asentarse, favorecen la estabilización de riberas a través de su sistema radicular, reduciendo el riesgo de inundaciones, contribuyen significativamente a la dinámica del nitrógeno a escala local y de toda la cuenca, debido a su asociación simbiótica con la bacteria fijadora de nitrógeno *Frankia alni* (Voronin) Von Tubeuf, mejorando, así, la calidad del suelo, y proporcionan refugio y alimento a organismos terrestres y acuáticos (COMPTON et al., 2003; WIPFLI & MUSSLEWHITE, 2004; TEKLEHAIMANOT & MMOLOTSI, 2007; CLAESSENS et al., 2010; HANDA et al., 2014). Además del enorme valor ecológico, los alisos tienen importancia económica, asociada a su madera, de textura fina y duradera, utilizada en la fabricación de muebles (SALCA, 2019). También desempeñan una función social, ya que proporcionan áreas recreativas y de ocio, usos tradicionales y de valor paisajístico forestal.

Debido a su relevancia, los bosques ribereños de alisos fueron considerados hábitats prioritarios para la conservación a escala europea (hábitat 91E0 de la Directiva de Hábitats 92/43/CEE). Asimismo, el aliso está considerado “Especie de Interés Especial” en el Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Castilla-La Mancha (Decreto 33/1998, de 5 de mayo; DOCM de 15 de mayo). Sin embargo, en las últimas décadas, los bosques de alisos han disminuido drásticamente en toda Europa, debido, principalmente, al ataque por oomicetos del género *Phytophthora* spp. (BJELKE et al., 2016). La presencia de varias especies de este género (*P. xalni*, *P. uniformis*, *P. xmultiformis*, *P. plurivora*, *P. multivora* y *P. lacustris*) y de árboles infectados han sido confirmados en cuencas hidrográficas de Portugal y España (CORDEIRO et al., 2024). La infección de alisos por oomicetos causa la enfermedad de la podredumbre radicular, que se caracteriza por un amarilleamiento de las hojas, la muerte regresiva de las ramas y raíces, el aumento de la producción de frutos y la necrosis de la corteza en el cuello y la parte basal del tallo (GIBBS et al., 1999).

Debido al problema descrito anteriormente, la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos de las poblaciones de alisos en Europa es una prioridad para desarrollar o mantener la resistencia natural de los alisos a *Phytophthora* spp. (JUNG & BLASCHKE, 2004). Por este motivo, es importante identificar genotipos asintomáticos, potencialmente tolerantes o resistentes en condiciones naturales, y comprobar su tolerancia en condiciones controladas. Esta selección inicial de genotipos, tolerantes o resistentes a la enfermedad, permitirá crear una reserva de germoplasma que podrá utilizarse posteriormente en la implementación de programas de mejora genética y de propagación clonal de esta especie, con fines de reforestación o restauración (CORDEIRO et al., 2024).

La biotecnología forestal y las técnicas de cultivo *in vitro* permiten la propagación y conservación de genotipos élite, difíciles de propagar y conservar por otros



métodos (DÍAZ-SALA, 2016). Además, por medio de la propagación vegetativa es posible obtener un alto número de plantas que expresan fenotípicamente el carácter de interés, de forma rápida y en cualquier época del año (DÍAZ-SALA, 2016). Particularmente, los alisos pueden ser propagados vegetativamente mediante enraizamiento de estaquillas leñosas o, preferiblemente, semileñosas (NOVOTNÁ & ŠTOCHLOVÁ, 2012) y mediante cultivo *in vitro* (TREMBLAY & LALONDE, 1984; PÉRINET & TREMBLAY, 1987; SAN JOSÉ et al., 2010, 2013; 2015; BAJJI et al., 2013).

2. Objetivos

Con el objetivo final de una gestión integrada del decaimiento del aliso en los ecosistemas forestales ribereños españoles, se han puesto en marcha varios proyectos para definir métodos para la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos de los alisos. Para ello, siete genotipos de la ribera del río Alberche (Castilla-La Mancha, España), preseleccionados como posibles resistentes o tolerantes al ataque por *Phytophthora* ssp., fueron utilizados como plantas madre para iniciar un programa de propagación vegetativa a gran escala, mediante cultivo *in vitro* y estaquillado.

3. Metodología

La recogida de material se realizó en distintas épocas durante los años 2022-2024 (desde septiembre de 2022 a julio de 2024).

La propagación vegetativa de los siete genotipos seleccionados se llevó a cabo mediante los siguientes métodos:

1. Estaquillado
2. Cultivo *in vitro*
 - a. de explantos obtenidos de material de campo
 - b. de explantos obtenidos en invernadero
 - i. de brotación forzada de estaquillas
 - ii. de plantas estaquilladas

Estaquillas semileñosas del crecimiento del año fueron recolectadas de renuevos basales, brotes epicórmicos del tronco y de ramas gruesas de los árboles adultos seleccionados. Después de la eliminación de hojas, las estaquillas de 20-30 cm fueron desinfectadas superficialmente mediante lavado con agua corriente, inmersión en 0.5% fungicida Beltanol (Probelte) durante 3 min, lavado con agua corriente, inmersión en 10% lejía comercial con TWEEN20 durante 3 min y sucesivos lavados con agua destilada.

Estaquillado

Las estaquillas superficialmente desinfectadas fueron tratadas con auxina, mediante la inmersión de la parte basal en una solución de 1 o 2 g/L ácido 3-indol-butírico (IBA, Sigma-Aldrich) durante 2 o 5 min o en un polvo estimulador de raíz (Vithal Garden). También se trataron mediante riego con 14 mL de IBA a una



concentración de 2 g/L, directamente en el alveolo una vez posicionada la estaquilla.

Las estaquillas se situaron, en posición vertical, en bandejas con perlita y turba rubia (60:40) humedecidas, y se mantuvieron en túneles de niebla en un invernadero con un fotoperíodo de 16h luz a 25 °C y 8h oscuridad a 20 °C para su enraizamiento. Los brotes de las estaquillas enraizadas se utilizaron como fuente de explantos para la iniciación del programa de cultivo *in vitro*.

Brotación forzada de estaquillas en invernadero

Las estaquillas superficialmente desinfectadas se dispusieron, en posición vertical, en bandejas que contenían perlita y vermiculita (50:50) humedecidas, y se forzaron a brotar en túneles de niebla en invernadero, con un fotoperíodo de 16h luz a 25 °C y 8h oscuridad a 20 °C, logrado mediante un sistema de iluminación “led”. Los nuevos brotes se utilizaron como fuente de explantos para la iniciación del programa de cultivo *in vitro*.

Cultivo *in vitro* – esterilización, establecimiento y proliferación de explantos

Las estaquillas recolectadas en campo, superficialmente desinfectadas, y los brotes obtenidos en invernadero mediante estaquillado o brotación forzada fueron utilizados como fuente de explantos para la iniciación de los cultivos. Segmentos nodales de 2-4 cm de longitud, que contenían una o dos yemas axilares, fueron desinfectados siguiendo distintos métodos, que incluían tratamientos con 30, 50 y 100% lejía comercial y TWEEN® 20 (Sigma) durante 20 min. Los tratamientos también se combinaron con una inmersión en 70% etanol durante 5 min, previa al tratamiento con lejía. Un quinto método (SAN JOSÉ et al., 2010, 2013) fue también utilizado – lavado con agua durante 5 min, inmersión en 70% alcohol durante 20 s, aclarado con agua destilada estéril, inmersión en 0.6% cloro (pastillas Millipore®) con 2-3 gotas de TWEEN® 20 (Sigma) durante 5-8 min, y 3 aclarados con agua destilada estéril.

Los explantos fueron cultivados en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS; MURASHIGE & SKOOG 1962; Duchefa Biochemie), suplementado con 2 o 5 mg/L 6-bencilaminopurina (BAP, Duchefa Biochemie), de forma aislada o combinado con 0.01 mg/L ácido indol-3-butírico (IBA, Sigma-Aldrich) y/ o 0.1 mg/L ácido giberélico (GA₃, Duchefa Biochemie) y 30 g/L sacarosa (Duchefa Biochemie). Las condiciones descritas por SAN JOSÉ et al. (2013) también fueron utilizadas para el establecimiento, elongación y proliferación de los explantos. De forma resumida, los explantos fueron esterilizados mediante el método que utilizaba pastillas de cloro como agente desinfectante y que fue descrito anteriormente. Posteriormente, los explantos fueron cultivados, en posición vertical, en tubos de cultivo con 15 mL de medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM; LLOYD & MCCOWN, 1980), suplementado con 2 mg/L BAP, 0.5 mg/L de ácido indol acético (IAA, Sigma-Aldrich) y 30 g/L sacarosa. Los cultivos fueron mantenidos en este medio durante 8



semanas, mediante subcultivos seriados cada dos semanas. Una vez establecidos, los explantos fueron transferidos al mismo medio que contenía una concentración reducida de BAP - inicialmente 0.2 mg/L durante 3 semanas, y, posteriormente, 0.1 mg/L durante 3 semanas adicionales. La fase de proliferación se llevó a cabo mediante ciclos de 9 semanas. En cada ciclo, los explantos fueron cultivados en WPM, suplementado con 0.2 mg/L BAP, 0.5 mg/L IAA, 0.5 mg/L zeatina (Duchefa Biochemie) y 20 g/L glucosa (Duchefa Biochemie), durante 3 semanas, y, posteriormente, transferidos al mismo medio que contenía BAP reducido a la mitad (0.1 mg/L), durante 6 semanas, con un subcultivo después de las 3 primeras semanas.

Todos los medios de cultivo fueron solidificados con 8 g/L agar (Duchefa Biochemie) y su pH fue ajustado a 5.7, antes de su esterilización en autoclave a 121 °C durante 20 min. Todos los cultivos fueron mantenidos en una cámara de cultivo con un fotoperiodo 16 h luz a 25 °C y 8h oscuridad a 20 °C, y una densidad de flujo fotónico de 60 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$.

Para facilitar la transferencia entre subcultivos, principalmente en la fase de mantenimiento de stock *in vitro*, se utilizó el sistema de cultivo en doble fase (RODRÍGUEZ et al., 1991). En este caso, en lugar de transferir los explantos a medio fresco, 500 μL del mismo medio líquido fueron añadidos directamente al cultivo.

Enraizamiento de los tallos y aclimatación de las plantas obtenidas

El enraizamiento de los tallos elongados se llevó a cabo mediante cultivo en medio (WPM y 20 g/L glucosa) al que se añadió 0.5 mg/L zeatina.

Los explantos enraizados fueron trasplantados a alveolos forestales, que contenían una mezcla humedecida de turba, perlita y fibra de coco, y mantenidos dentro de recipientes con alta humedad en el invernadero. Después de 4-6 semanas y de la apertura lenta y progresiva de los recipientes, las bandejas de alveolos fueron situadas en túneles de niebla en el invernadero.

4. Resultados

Selección de genotipos

Siete árboles, localizados en los Sotos del río Alberche, zona de especial conservación de la Red Natura 2000 hábitat 91E0 (Castilla-La Mancha), fueron seleccionados como candidatos debido a la ausencia de síntomas de la enfermedad en zonas ampliamente afectadas por *Phytophthora* spp. y por el decaimiento asociado a la podredumbre radicular. Tras el análisis de la tolerancia de estos genotipos asintomáticos en condiciones de laboratorio, seis fueron considerados tolerantes y uno susceptible (PINTADO et al., 2018; ÁVILA et al., 2020) (Fig. 1). Estos árboles fueron utilizados como planta madre para iniciar un programa de propagación vegetativa a gran escala mediante cultivo *in vitro* y estaquillado.



*Figura 1. Alisos adultos asintomáticos localizados en las alisedas afectadas por decaimiento asociado a la infección por *Phytophthora spp.*, en la ribera del río Alberche, Castilla-La Mancha, España.*

Cultivo *in vitro* de material de campo

A partir de las estaquillas recogidas en campo, previamente desinfectadas superficialmente, se introdujeron *in vitro* un número superior a 1400 explantos de los siete genotipos. Estos explantos se esterilizaron utilizando cinco tratamientos distintos, con lejía comercial o pastillas de cloro. Se obtuvo un 100% de contaminación en todos los tratamientos utilizados, no observándose diferencias entre los genotipos. Debido a ello, no fue posible iniciar cultivos con este tipo de material.

Brotación forzada

Con el objetivo de obtener una fuente continua de explantos y una brotación en un ambiente más controlado que el medio natural, estaquillas de los árboles adultos seleccionados se forzaron a brotar bajo condiciones controladas de invernadero. Los mejores resultados de la brotación forzada se obtuvieron en las estaquillas recogidas en febrero de 2023 (40%, comparado con el 10% de las estaquillas recogidas en septiembre y noviembre de 2022). Además, en esa recogida, la longitud y vigor de los brotes fue significativamente superior, obteniéndose brotes de hasta 10 cm, lo que permitió obtener un mayor número de explantos (Fig. 2).



Figura 2. Brotación forzada en invernadero de estaquillas recogidas en febrero de 2023 de los alisos seleccionados.

Establecimiento, proliferación y enraizamiento *in vitro*

Con el objetivo de determinar un método de esterilización adecuado para este tipo de materiales, 380 explantos obtenidos de los tallos de los distintos genotipos forzados a crecer en el invernadero, se esterilizaron con distintas concentraciones de lejía y se cultivaron en un medio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado con las varias combinaciones y concentraciones hormonales de BAP, auxina y giberelina. Solo el 4% de los explantos se establecieron *in vitro* con éxito, debido a problemas de contaminación, oxidación o inhibición del desarrollo. La utilización de pastillas de cloro como método de esterilización resultó en una tasa de éxito del 42%, dependiendo del genotipo y del estado de la estaquilla de la planta madre. Además de haber sido el método más efectivo de esterilización, este método también fue el menos agresivo para los explantos, ya que el número de explantos oxidados descendió significativamente. Así, de los cinco métodos de esterilización de explantos ensayados, el método más adecuado para estos

genotipos de aliso fue el que utiliza pastillas de cloro como agente desinfectante.

Además del medio de cultivo MS suplementado con las distintas combinaciones hormonales, se ensayó el protocolo de propagación de aliso descrito por San José et al. (2013). De esta forma, fue posible el establecimiento y la proliferación de los siete genotipos de aliso. Sin embargo, el efecto del genotipo sobre la capacidad de micropropagación limitó el establecimiento y proliferación de los explantos de los genotipos 489 y 492 que mostraron una recalcitrancia significativa (Tabla 1). Por el contrario, el genotipo 496 mostró una recalcitrancia menor, lo que permitió obtener altas tasas de establecimiento y proliferación de los explantos en periodos más cortos de tiempo (Fig. 3A). En cualquier caso, todos los genotipos han sido establecidos *in vitro*, aunque las tasas de multiplicación en el mismo periodo de cultivo dependieron del genotipo.

Tabla 1. Tasa de multiplicación de los genotipos de aliso seleccionados.

Genotipo	Explantos introducidos	Explantos <i>in vitro</i>	Multiplicación (%)
484	111	40	36
489	83	6	7.2
492	157	2	1.3
492-2	88	94	106.8
493	46	34	73.9
496	145	1026	707.6
498	244	69	28.3

Otro factor determinante en el establecimiento de los cultivos fue la densidad de flujo fotónico. La aplicación de 60 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}$ favoreció la elongación de los brotes. Por el contrario, una densidad más elevada resultó en miniaturización de hojas y tallos en los macizos de proliferación, sin que fuese posible la obtención de tallos individuales y elongados para su multiplicación (Fig. 3B).

El enraizamiento de los tallos individuales elongados se logró mediante la incubación en medio de cultivo con zeatina (Fig. 3C). De esta forma, pudo simplificarse el proceso además de economizar recursos, resultando el método más eficiente de entre los testados. El sistema de cultivo en *dobles fases*, en el que medio de cultivo líquido es añadido al cultivo, también facilitó el proceso y disminuyó el tiempo de transferencia, no afectando al proceso de propagación.

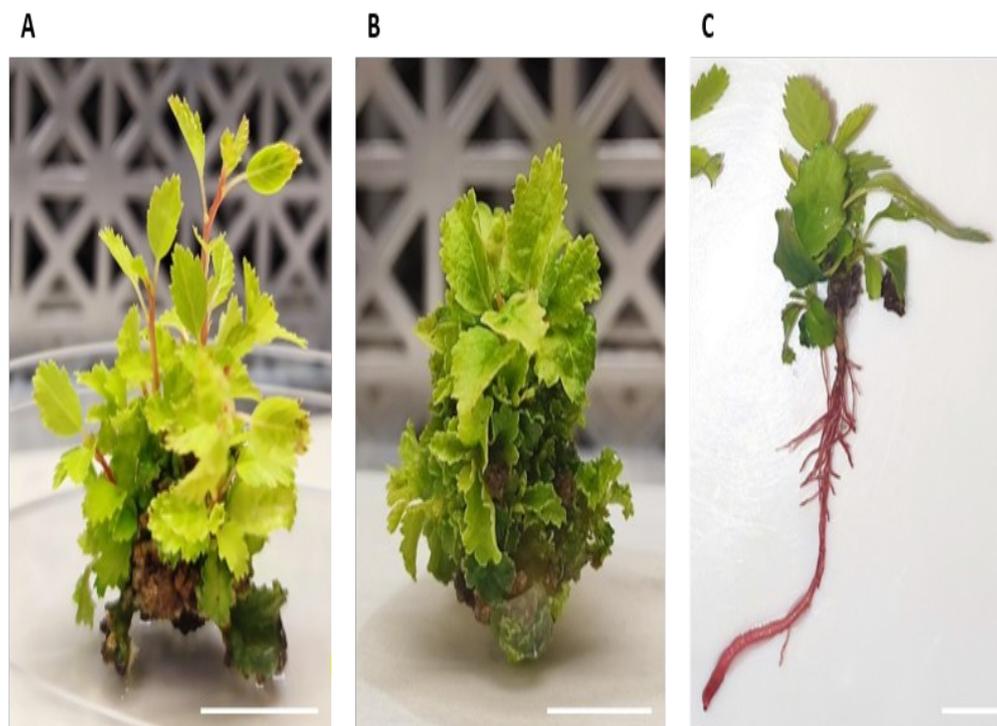


Figura 3. Micropropagación de alisos. A – Proliferación y elongación de brotes. B – Macizo de proliferación en condiciones de alta densidad de flujo fotónico. C- Enraizamiento. Barras de escala: 1 cm.

Aclimatación

Se utilizó un número superior a 1000 tallos elongados y enraizados de los varios genotipos para su aclimatación, en alveolos forestales mantenidos en el interior de recipientes con elevada humedad. Se ha corroborado que el efecto de la humedad es determinante en esta especie, y la disminución de ésta debe ser más progresiva y lenta que la requerida en otras especies, ya que cambios o disminuciones bruscos causan una mortalidad muy elevada de plántulas. La tasa de éxito de la aclimatación fue variable en función del genotipo, siendo superior al 80% de plantas aclimatadas en la mayoría de los genotipos (Tabla 2; Fig. 4).

Tabla 2. Tasa de plantas aclimatadas de los genotipos de aliso seleccionados.

Genotipo	Aclimatación (%)
484	36
492-2	90.3
493	82.1
496	80.7
498	63.0



Figura 4. Aclimatación de alisos propagados in vitro.

Estaquillado

Con el objetivo de obtener plantas enraizadas de forma rápida y una brotación en un ambiente más controlado que el medio natural, se indujeron raíces directamente en estaquillas de los árboles adultos bajo condiciones de invernadero. Sin embargo, la recalcitrancia de las estaquillas para su enraizamiento limitó el éxito del proceso. Se utilizó un número superior a 1500 estaquillas de los siete genotipos para su enraizamiento directo. El tratamiento mediante pulsos de auxina (2 g/L IBA durante 5 min) fue el más efectivo para el enraizamiento directo de las estaquillas de campo. Los resultados muestran una interacción entre el genotipo y la época de recogida en la tasa de enraizamiento (Tabla 3). En general, las estaquillas recogidas en parada vegetativa mostraron una

mayor competencia para el enraizamiento. Sin embargo, el porcentaje total de enraizamiento fue del 6.7%, siendo el genotipo 484 el más fácil de enraizar y el 493 el más recalcitrante al enraizamiento. Aunque fue posible propagar los siete genotipos mediante este método, el efecto del genotipo, de la edad de las estaquillas y de la época de recogida del material sobre la capacidad de estaquillado limitó la propagación a gran escala por este método.

Tabla 3. Porcentaje de enraizamiento de las estaquillas de los alisos seleccionados en las varias épocas de recogida del material.

Genotipo	09.2022	11.2022	02.2023	05.2023	11.2023	07.2024
484	4.2	46.9	9.4	7.8	12.5	1.6
489	4.2	12.5	0.0	15.4	9.4	6.3
492	0.0	17.9	0.0	3.2	3.1	4.7
492-2	0.0	9.4	3.1	2.7	5.6	4.7
493	0.0	0.0	0.0	12.5	1.6	-
496	-	9.4	0.0	4.2	9.4	-
498	2.9	12.5	3.1	3.6	10.9	-

Para aumentar el éxito del enraizamiento, se incorporó un sistema de calefacción basal en los túneles de niebla para emular un sistema de enraizamiento en cama caliente que, según la bibliografía, favorece la inducción de raíces (SHIBUYA et al., 2012). Sin embargo, no se obtuvo un aumento significativo del número de estaquillas enraizadas.

5. Discusión

Con el objetivo de conservar y propagar genotipos de aliso asintomáticos en condiciones de decaimiento por la infección por *Phytophthora* spp., el método más utilizado en la actualidad es la micropropagación axilar, mediante subcultivos secuenciales y posterior aclimatación de las plantas obtenidas (CORREDOIRA et al., 2011; BAJJI et al., 2013; SAN JOSÉ et al., 2010, 2013, 2015, CORDEIRO et al., 2024). Esta propagación *in vitro* permite no sólo preservar la genética responsable del fenotipo de interés, sino también obtener un gran número de plantas, en poco tiempo y a partir de escaso material inicial. Además, la inducción de embriogénesis somática y posterior crioconservación de los embriones somáticos ha sido descrita en esta especie (CORREDOIRA et al., 2013; SAN JOSÉ et al., 2015).

Uno de los mayores obstáculos en la aplicación de técnicas de micropropagación del aliso es la elevada tasa de contaminación del material de campo. Estos árboles viven en bosques de ribera, y, por lo tanto, en ambientes de elevada humedad que favorece el crecimiento de bacterias y hongos. En este trabajo, fue imposible iniciar el cultivo *in vitro* con explantos obtenidos directamente de estaquillas de



campo de los distintos genotipos, ya que los hongos sobrevivieron a los métodos de esterilización y proliferaron en el medio de cultivo. Así, la brotación forzada de las estaquillas recogidas en campo, en un invernadero bajo condiciones controladas, es una alternativa efectiva para obtener explantos con una menor tasa de contaminación, aunque la época de recogida de las estaquillas puede ser un condicionante (CORREDOIRA et al., 2011). Resultados similares fueron obtenidos por CORREDOIRA et al. (2011) utilizando genotipos de otras procedencias. La brotación forzada en invernadero de los siete genotipos localizados en Castilla-La Mancha resultó más efectiva utilizando las estaquillas recogidas en febrero. Sin embargo, la brotación de las estaquillas de los genotipos de procedencias de Galicia, fueron superiores cuando se utilizaron las estaquillas recogidas en noviembre (SAN JOSÉ et al., 2010). La brotación forzada es altamente dependiente del origen de las estaquillas (leñosas o del crecimiento del año, de renuevos basales, de brotes epicórmicos del tronco o de ramas gruesas), del estado de las estaquillas, de la época de recogida (considerando también las condiciones climáticas del año) y de las condiciones de cultivo en las que son mantenidas las estaquillas (SAN JOSÉ et al., 2010; CORREDOIRA et al., 2011).

La utilización de medios de cultivo específicos para especies leñosas y la aplicación de un esquema de subcultivos, con una combinación de hormonas (citoquininas y auxinas) y fuente de carbohidratos adecuados, resultó jugar un papel importante en el éxito de la multiplicación de los explantos de árboles de aliso adultos (SAN JOSÉ et al., 2010, 2013). Por ejemplo, en la etapa de proliferación, la sustitución de sacarosa por glucosa favoreció el desarrollo de nuevos brotes (SAN JOSÉ et al., 2013) y la incorporación de zeatina resultó en una mayor elongación (SAN JOSÉ et al., 2010). Siguiendo el protocolo optimizado para genotipos de procedencias de Galicia (SAN JOSÉ et al., 2013), fue posible reproducir los resultados con los siete genotipos seleccionados de Castilla-La Mancha. Sin embargo, el efecto del genotipo generó mayor o menor dificultad en la propagación de los cultivos. Además, la edad de estos árboles, estimada en más de 40 años, confiere una elevada recalcitrancia, que afectó al establecimiento *in vitro* de estos genotipos. El ajuste de la densidad de flujo fotónico fue crucial para la efectiva aplicación del protocolo y propagación de los cultivos.

Como se esperaba, la edad de los árboles seleccionados y su genotipo condicionó la tasa de enraizamiento de las estaquillas. También influyó el estado de desarrollo y tipo de material recolectado, ya que deben ser recogidas estaquillas semileñosas basales, aunque su disponibilidad es variable.

6. Conclusiones

Hay una demanda urgente para la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos de los alisos. El éxito de la micropropagación depende del genotipo, de la edad del árbol y de la disponibilidad de material joven. Sin embargo, se ha aplicado con éxito un protocolo establecido en otro laboratorio y para otros genotipos, en siete genotipos de Castilla-La Mancha. La conservación de germoplasma resistente servirá de apoyo al seguimiento y gestión de una de las enfermedades más agresivas de los ecosistemas ribereños.



7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ Unión Europea «NextGenerationEU»/PRTR (TED2021-130790B-C32 a CD-S y MTC), y por Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha /EU (SBPLY/21/180501/000258 a CD-S). Los autores agradecen a la Dirección General de Medio Natural y Biodiversidad (JCCM) por facilitar el acceso a las masas de alisos y proporcionar el material vegetal. Autorización número ESNC160 concedida por la Dirección General de Biodiversidad, Montes y Desertificación del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico.

8. Bibliografía

ÁVILA, A.; MOYANO, C.; PORTILLO, I.; ÁLVAREZ, B.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ-CARRASCO, C.; PINTADO, J. R.; 2022. Selección de árboles plus resistentes a *Phytophthora alni*. *Actas del 8º congreso Forestal Español. Sociedad Española de Ciencias Forestales* ID Resumen: 1123

BAJJI, M.; THUNISSEN, C.; DRUART, P.; 2013. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* juvenile explants of black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.). *Biotechnol. Agron. Soc Environ.* 17 12–19

BJELKE, U.; BOBERG, J.; OLIVA, J.; TATTERSDILL, K.; MCKIE, B. G.; 2016. Dieback of riparian alder caused by the *Phytophthora alni* complex: projected consequences for stream ecosystems. *Freshw. Biol.* 61 565–579

CLAESSENS, H.; OOSTERBAAN, A.; SAVILL, P.; RONDEUX, J.; 2010. A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *Forestry* 83 163–175

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

CORDEIRO, D.; PIZARRO, A.; VÉLEZ, M. D.; GUEVARA, M. A.; DE MARÍA, N.; RAMOS, P.; COBO-SIMÓN, I.; DIEZ-GALÁN, A.; BENAVENTE, A.; FERREIRA, V.; MARTÍN, M. A.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P. M.; SOLLA, A.; CERVERA, M. T.; DIEZ-CASERO, J. J.; CABEZAS, J. A.; DÍAZ-SALA, C.; 2024. Breeding *Alnus* species for resistance to *Phytophthora* disease in the Iberian Peninsula. *Front. Plant Sci.* 15 1499185

CORREDOIRA, E.; JANEIRO, L. V.; SAN JOSÉ, M. C.; 2011. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación del aliso con vistas a su conservación. *Recursos Rurais* 7 49–57

CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; MARTINEZ, M. T.; VIEITEZ, A. M.; SAN JOSÉ, M. C.; 2013. Somatic embryogenesis in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Trees* 27 1597–1608



DIAZ-SALA, C.; 2016. Physiological, cellular, molecular and genomic analysis of the effect of maturation on propagation capacity, in Vegetative Propagation of Forest Trees. Eds. Y. S. Park, J. M. Bonga and H. K. Moon. National Institute of Forest Science. 75–96. Seoul

GIBBS, J. N.; LIPSCOMBE, M. A.; PEACE, A. J.; 1999. The impact of *Phytophthora* disease on riparian populations of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *Eur. J. For. Pathol.* 29 39–50

GOMES MARQUES, I.; VIEITES-BLANCO, C.; BARRENTO, M. J.; SEMEDO, J. N.; RODRIGUES, A. P.; SCOTTI-CAMPOS, P.; MARTÍN, M. A.; SOLLA, A.; DAVID, T. S.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P. M.; 2024. Phenotypic variation and genetic diversity in European *Alnus* species. *Forestry* cpae039

HANDA, I. T.; AERTS, R.; BERENDSE, F.; BERG, M. P.; BRUDER, A.; BUTENSCHOEN, O.; CHAUVET, E.; GESSNER, M. O.; JABIOL, J.; MAKKONEN, M.; MCKIE, B. G.; MALMQVIST, B.; PEETERS, E. T.; SCHEU, S.; SCHMID, B.; VAN RUIJVEN, J.; VOS, V. C.; HÄTTENSCHWILER, S.; 2014. Consequences of biodiversity loss for litter decomposition across biomes. *Nature* 509 218–221

JUNG, T.; BLASCHKE, M.; 2004. Phytophthora root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathol.* 53 197–208

LLOYD, G.; MCCOWN, B. H.; 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30 421-427

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 473–497

NOVOTNÁ, K.; ŠTOCHLOVÁ, P.; 2012. Selection of the best method for vegetative propagation of mature *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. trees resistant to *Phytophthora alni*. *Acta Univ. Agric. silvic. Mendel. Brun.* 60 105–110

PÉRINET, F.; TREMBLAY, F. M.; 1987. Commercial micropropagation of five *Alnus* species. *New For.* 3 225–230

PINTADO, R.; ÁVILA, A.; SANCHO, R.; ÁLVAREZ, B.; PINTOS, C.; RIAL, C.; AGUÍN, O.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ-CARRASCO, C.; 2018. Caracterización del estado fitosanitario de diversos hábitats protegidos (alisedas y castaños) frente a la presencia de especies de *Phytophthora* en diversos espacios de la Red Natura 2000 de la provincia de Toledo. *Libro de Resúmenes XIX Congreso de la Sociedad Española de*



Fitopatología póster 129 página 238

RODRIGUEZ, R.; DÍAZ-SALA, C.; CUOZZO, L.; ANCORA, G.; 1991. Pear *in vitro* propagation using a double-phase culture system. *HortScience* 26 62–64

SALCA, E.A.; 2019. Black alder (*Alnus glutinosa* L.) - a resource for value-added products in furniture industry under European screening. *Curr Forestry Rep* 5 41–54

SAN JOSÉ, M. C.; JANEIRO, L. V.; CORREDOIRA, E.; 2010. Micropropagación del aliso común para la conservación de su germoplasma. *Spanish Journal of Rural Development* 1 31-38

SAN JOSÉ, M. C.; JANEIRO, L. V.; CORREDOIRA, E.; 2013. Micropropagation of threatened black alder. *Silva Fennica* 47 892

SAN JOSÉ, M. C.; JANEIRO, L. V.; CORREDOIRA, E.; 2015. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. germplasm. *Trees-Struct. Funct.* 29 539–549

SHIBUYA, T.; TSUKUDA, S.; TOKUDA, A.; SHIOZAKI, S.; ENDO, R.; KITAYA, Y.; 2012. Effects of warming basal ends of Carolina poplar (*Populus × canadensis* Moench.) softwood cuttings at controlled low-air-temperature on their root growth and leaf damage after planting. *J. Forest Res.* 18 279–284

TEKLEHAIMANOT, Z.; MMOLOTSI, R. M.; 2007. Contribution of red alder to soil nitrogen input in a silvopastoral system. *Biol. Fert. Soils* 43 843–848

TREMBLAY, F. M.; LALONDE, M.; 1984. Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 3 189–199

VÍT, P.; DOUDA, J.; KRAK, K.; HAVRDOVÁ, A.; MANDÁK, B.; 2017. Two new polyploid species closely related to *Alnus glutinosa* in Europe and North Africa – an analysis based on morphometry, karyology, flow cytometry and microsatellites. *Taxon* 66 567– 583

WIPFLI, M. S.; MUSSLEWHITE, J.; 2004. Density of red alder (*Alnus rubra*) in headwaters influences invertebrate and detritus subsidies to downstream fish habitats in Alaska. *Hydrobiologia* 520 153–163