



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios  
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-459

---

---

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017  
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## PATOGENICIDAD DEL COMPLEJO DE *Phytophthora alni* Y DE *P. plurivora* EN PLÁNTULAS DE *Alnus glutinosa*

ZAMORA-BALLESTEROS, C.<sup>1</sup>, MARTÍN-GARCÍA, J. <sup>1,2</sup> y DÍEZ, J.J.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. Campus "La Yutera", Avda. Madrid, 44. 34004. Palencia.

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible UVA-INIA. Campus "La Yutera", Avda. Madrid, 44. 34004. Palencia.

### Resumen

*Phytophthora alni* ha sido asociada al decaimiento y mortandad de *Alnus glutinosa* en Europa desde principios de los noventa, pero en España fue identificada a principios de esta década. Del mismo modo, también se ha demostrado muy recientemente la implicación de otra especie, *P. plurivora*, como corresponsable de dicho decaimiento en España. Los síntomas generales de este decaimiento son el amarilleamiento y escasez de las hojas, la muerte progresiva de las ramas y la necrosis de la corteza en el cuello y la parte inferior del tallo. El objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad de aislamientos del complejo de *P. alni* (*P. xalni*, *P. uniformis* y *P. xmultiformis*) y *P. plurivora* en plántulas de una savia de *Alnus glutinosa*. Para ello se utilizó el método de inoculación en tallo con inóculo de micelio agarizado. La necrosis del tallo y los síntomas de marchitamiento fueron visibles desde las primeras semanas del ensayo en todas las plántulas, excepto en las control. La tasa de supervivencia difirió significativamente entre las plantas inoculadas con *P. alni* y *P. plurivora* respecto al control, pero no se encontraron diferencias entre *P. alni* y *P. plurivora*. El mismo patrón fue encontrado en las longitudes de necrosis y el crecimiento de las plántulas. El aislamiento más agresivo resultó ser de la especie *P. xmultiformis*, con mayor número de muertes y mayor extensión de necrosis en el tallo. En cuanto a la biomasa, en la parte aérea se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y las plantas control, sin embargo no hubo ninguna significación a nivel radicular. Los resultados confirman que *P. plurivora*, una de las especies de *Phytophthora* más comunes que se encuentra en los viveros europeos, es altamente patógena para las plántulas de alisos. Se requiere la implementación urgente de medidas para prevenir el riesgo de propagación del patógeno de los viveros a los ecosistemas naturales. Se necesitan más estudios para aclarar el papel que *P. plurivora* está jugando en la disminución del aliso tanto individualmente como en combinación con el complejo de *P. alni*.

### Palabras clave

Aliso común, patógeno invasivo, inoculación, susceptibilidad, lesiones

### 1. Introducción

La importancia del bosque ripario es ampliamente conocida debido a su papel en la conservación, mantenimiento de la biodiversidad y la estabilización de riberas. De hecho, en la Directiva 92/43/EEC del Consejo relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres, los bosques riparios, y particularmente las alisedas, están clasificadas como hábitat prioritario "91E0 bosques aluviales de *Alnus glutinosa* y *Fraxinus excelsior* (Alno-Padion, Alnion incanae, Salicion albae)". Sin embargo, a pesar de todos los beneficios que éstos proporcionan, han sido altamente alterados por las actividades humanas durante el pasado siglo. Los terrenos vírgenes de estos hábitats fueron casi totalmente perdidos cuando los flujos de agua empezaron a ser regulados mediante presas y canalizaciones a mediados del siglo 20 (SCHNITZLER, 1994). Más recientemente, el severo decaimiento de las poblaciones de aliso se ha convertido en un importante problema en Europa (BELBAHRI *et al.*, 2006), caracterizado por síntomas como la escasez, pequeñez y amarilleamiento de las hojas, manchas alquitranadas o exudaciones en la superficie de la corteza y grietas en el cuello de raíz y en la zona baja del tronco (GIBBS *et al.*, 1999).

El decaimiento del aliso fue detectado por primera vez en el sur de Gran Bretaña en 1993 (GIBBS, 1995). Desde entonces han muerto árboles de aliso en el oeste, centro y norte de Europa (GIBBS *et al.*, 2003; JUNG & BLASCHKE, 2004; OSZAKO, 2005; TRZEWIK *et al.*, 2008). BRASIER *et al.* (2004) nombró formalmente a la *Phytophthora* del aliso como *P. alni* y en base a estudios morfológicos, evidencias citológicas y datos genéticos, dividió a *P. alni* en tres subespecies: *P. alni* ssp. *alni* (Brasier & S.A. Kirk), correspondiente al primer tipo 'estándar'; *P. alni* ssp. *uniformis* (Brasier & S.A. Kirk), correspondiente a la variante sueca; and *P. alni* ssp. *multiformis* (Brasier & S.A. Kirk), correspondiente a las variantes holandesa, alemana y británica. Recientemente, fue propuesto un nuevo nombre taxonómico para las tres subespecies (HUSSON *et al.*, 2015), el cual elevó su estatus a especie y se renombraron como *P. xalni* (Brasier & S.A. Kirk) Husson, loos & Marçais, nothosp. nov., *P. uniformis* (Brasier & S.A. Kirk) Husson, loos & Aguayo, comb. nov. y *P. xmultiformis* (Brasier & S.A. Kirk) Husson, loos & P. Frey, nothosp. nov.

*Phytophthora plurivora* sp. nov. fue previamente identificada como *P. citricola* Sawada, hasta que estudios morfológicos y moleculares demostraron que *P. citricola* comprendía un complejo de especies con características morfológicas similares, pero claras diferencias genéticas (BHAT & BROWNE, 2007). La combinación de características morfológicas, fisiológicas y moleculares sirvieron para describir varias especies dentro del complejo de *P. citricola*, incluida *P. plurivora* (JUNG & BURGESS, 2009).

El decaimiento del aliso también ha sido constatado en la última década en las cuencas fluviales del norte y centro de España (TUSET *et al.*, 2006). Sin embargo, no fue hasta el año 2010 cuando la mortalidad de alisos en España fue asociada a la presencia del patógeno *P. xalni* (SOLLA *et al.*, 2010; PINTOS-VARELA *et al.*, 2010). Posteriormente, *P. uniformis* fue también aislada de un árbol sintomático de *A. glutinosa* en España (PINTOS-VARELA *et al.*, 2012) y asociada a la mortalidad del aliso en España (HAQUE *et al.*, 2014).

Tanto el complejo de *P. alni* y *P. plurivora* tienen una alta capacidad patogénica (BRASIER *et al.*, 2004; JUNG & BURGESS, 2009) y son patógenos invasivos en España. Mientras que varios estudios han demostrado que el complejo de *P. alni* es relativamente específico de alisos (BRASIER & KIRK, 2001; SANTINI *et al.*, 2003, 2006; HAQUE & DIEZ, 2012), *P. plurivora* ha sido asociada con serios decaimientos de bosques y daños en varios ecosistemas seminaturales a través de Europa (JUNG & BURGESS, 2009) bajo su clasificación original como *P. citricola*. Los árboles de aliso son principalmente infectados a través las lenticelas y las raíces adventicias durante temporadas de inundación, mientras que las raíces son el primer lugar de infección en plántulas de vivero en lugares no inundados (OßWALD *et al.*, 2014). El patógeno puede propagarse por los sistemas fluviales o suelos una vez introducido en las cuencas o mediante la plantación de producto infectado de viveros (JUNG & BLASCHKE, 2004; ORLIKOWSKI *et al.*, 2012).

Aunque el complejo de *P. alni* ha sido tradicionalmente señalado como el principal causante del decaimiento del aliso, la patogenicidad de *P. plurivora* ha sido también demostrada en *A. glutinosa* (JUNG & NECHWATAL, 2008; RYTKÖNEN *et al.*, 2012; HAQUE *et al.*, 2014), lo cual parece indicar que este patógeno puede también tener un papel importante en el decaimiento de aliso.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue investigar y comparar la patogenicidad del complejo de *Phytophthora alni* (*Phytophthora xalni*, *P. uniformis* y *P. xmultiformis*) y *Phytophthora plurivora* en plántulas de *Alnus glutinosa*.

### 3. Metodología

En la tabla 1 se encuentra detallada la información sobre las especies de *Phytophthora* utilizadas en el presente estudio. Para la preparación del inóculo, las colonias de los aislamientos fueron subcultivadas y reservadas durante 1 semana a 20°C en la oscuridad, en placas Petri que contenían medio selectivo V8 esterilizado (V8 agar: 100 ml/L V8, 3 g/L CaCO<sub>3</sub>, 20 g/L agar técnico). Los test de patogenicidad fueron realizados en plántulas de una savia, sanas de *A. glutinosa*, procedentes del Vivero Central de la Junta de Castilla y León, y cuyo material base era una fuente semillera de categoría identificada y origen autóctono. Su región de procedencia corresponde a la Vertiente Meridional Cantábrica-Lomas de Maragatería (RIU 5) y tiene una superficie de 18,8 ha.

Tabla 1. Origen de los aislados de *Phytophthora* utilizados en este estudio

Especies de <i>Phytophthora</i>	Código de identificación	Año de aislamiento	Hospedante	País	Nº Acceso GenBank
<i>Phytophthora xalni</i>	PA4017	2010	<i>Alnus glutinosa</i>	España	KJ659839
<i>P. xalni</i>	PA8055	2011	<i>A. glutinosa</i>	España	KJ659837
<i>P. xalni</i>	PA02	2012	<i>A. glutinosa</i>	España	-
<i>P. xalni</i>	PAA314	2008	<i>A. glutinosa</i>	Francia	-
<i>P. uniformis</i>	PAU300	2008	<i>A. glutinosa</i>	Francia	-
<i>P. xmultiformis</i>	PAM393	2009	<i>A. glutinosa</i>	Francia	-
<i>P. plurivora</i>	LAMASA1	2012	<i>A. glutinosa</i>	España	KF413074
<i>P. plurivora</i>	SORLDD4	2012	<i>A. glutinosa</i>	España	KF413075

Los test de patogenicidad se llevaron a cabo mediante una herida en forma de “U” invertida en el tallo de las plántulas. Secciones agarizadas con micelio fueron extraídos del margen de crecimiento de las colonias de las especies de *Phytophthora* y colocados frente a la herida de cada tallo. Posteriormente, la herida fue tapada y sellada con Parafilm, y las plántulas fueron incubadas en una cámara de temperatura controlada a 22,5°C y fotoperiodo de 14 horas. El riego de las plántulas fue periódico y equitativo.

El desarrollo de los síntomas fue observado y registrado durante las 37 semanas que duró el estudio. De forma semanal se tomaron medidas de la mortalidad de las plántulas, altura, diámetro y necrosis del tallo (vertical y anillado). Una vez terminado el ensayo, para obtener el peso seco tanto radical como aéreo de cada plántula, todas ellas se separaron del sustrato y se secaron en una estufa durante 48h a 65°C, hasta llegar al peso constante. Posteriormente, se realizaron a cada plántula 4 pesos: foliar, tallo, raíz principal y raicillas secundarias y terciarias.

Al término del estudio, las cepas de *Phytophthora* inoculadas fueron reaisladas del tejido necrosado de todas las plántulas mediante la colocación de estos tejidos en medio selectivo. La identificación de los patógenos fue confirmada por la examinación de la morfología y los patrones de crecimiento de las colonias sobre medio de cultivo V8A.

El análisis de la supervivencia de las plántulas se llevó a cabo mediante el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier utilizando el paquete estadístico “Survival” (THERNEAU, 2015) implementado sobre el software “R” (R-Development-Core-Team 2013). Las curvas de las funciones de supervivencia fueron calculadas usando la función “survfit” y las diferencias entre curvas fueron calculadas mediante “survdiff”.

El análisis estadístico para estudiar el crecimiento relativo, longitudes de necrosis, anillamiento y peso seco se llevó a cabo mediante análisis de las varianzas (ANOVAs) y se realizaron múltiples comparaciones para analizar los efectos de las inoculaciones del complejo de *P. alni* y *P. plurivora*.

Como consecuencia de que los datos de dichas variables no cumplían dos de las condiciones propias de un ANOVA clásico (normalidad y homogeneidad de las varianzas) se optó por aplicar métodos robustos (GARCÍA-PÉREZ, 2010). Concretamente se llevaron a cabo ANOVAs aplicando la generalización robusta del test de Welch, con una proporción de recorte de las medias muestrales de 0,2. Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico “Wilcox Robust Statistics (WRS)” implementado sobre el software “R”.

#### 4. Resultados

Las plántulas inoculadas empezaron a morir 7 días después de la inoculación. Ninguno de los controles murió. El análisis de supervivencia mostró diferencias significativas entre los distintos aislamientos. En particular, los dos aislamientos testados de *P. plurivora*, SORLDD4 y LAMASA1, mostraron diferencias significativas respecto del control ( $\chi^2 = 6.3$ ,  $P = 0.012$  y  $\chi^2 = 6.1$ ,  $P = 0.014$ , respectivamente). La probabilidad de supervivencia fue similar en ambos aislamientos, con un valor en torno al 50%. De los tres aislamientos españoles de *P. xalni*, solo el aislamiento PA02 generó diferencias significativas con el control ( $\chi^2 = 4.7$ ,  $P = 0.031$ ) y la probabilidad de supervivencia asociada fue por encima del 60%. En cuanto a la comparación entre los aislamientos españoles de *P. xalni* frente a los de *P. plurivora* se constató que no existían diferencias significativas en sus niveles de patogenicidad ( $\chi^2 = 1.2$ ,  $P = 0.266$ ), si bien se observó una menor probabilidad de supervivencia en plántulas inoculadas con *P. plurivora* (Figura 1).

La comparación entre los aislamientos españoles de *P. xalni* y los franceses de *P. xalni*, *P. uniformis* y *P. xmultiformis* no revelaron ninguna diferencia significativa ( $\chi^2 = 4.2$ ,  $P = 0.237$ ). Sin embargo, PAM393 (*P. xmultiformis*) fue el aislamiento asociado a la menor probabilidad de supervivencia (<50%), seguido de *P. uniformis* (Figura 2).

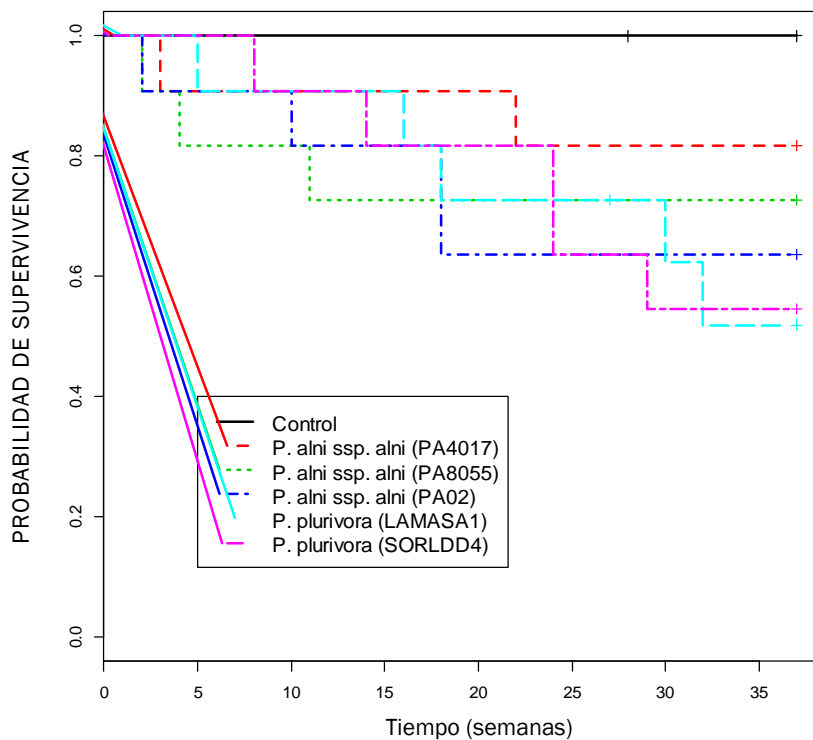


Figura 1. Evolución de la probabilidad de supervivencia durante las 37 semanas de ensayo determinada mediante el uso de la estimación de Kaplan-Meier, en plántulas de *Alnus glutinosa* inoculadas con aislamientos españoles de *P. xalni* y *P. plurivora*,

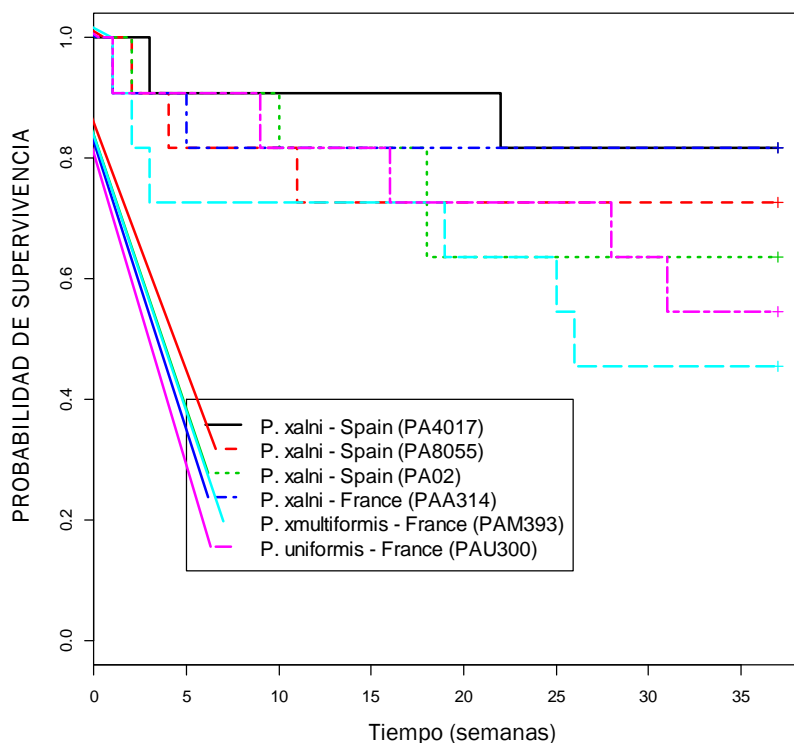


Figura 2. Evolución de la probabilidad de supervivencia durante las 37 semanas de ensayo determinada mediante el uso de la estimación de Kaplan-Meier, en plántulas de *Alnus glutinosa* inoculadas con aislamientos españoles de *P. xalni* y aislamientos franceses del complejo de *P. alni* (PAA: *P. xalni*; PAU: *P. uniformis* y PAM: *P. xmultiformis*).

Ya en la primera semana en la que se realizó la inoculación, el tallo comenzó a presentar síntomas de necrosamiento alrededor de la zona inoculada. Las necrosis aparecieron como

depresiones oscuras que se iban hundiendo con el paso del tiempo. Todas las plántulas inoculadas mostraron síntomas de necrosis en el tallo, mientras que ninguna de las plántulas control lo hizo.

Las lesiones se extendieron rápidamente durante las dos primeras semanas del experimento y en algunas ocasiones llegando a su máxima extensión en ese corto período de tiempo. Hasta la semana 14 aproximadamente, se pudo observar un ligero aumento de la necrosis y fue entonces cuando la tasa de crecimiento pasó a ser prácticamente nula. Los aislamientos PA4017 (*P. xalni*), PA02 (*P. xalni*), SORLDD4 (*P. plurivora*) y PAU300 (*P. uniformis*) presentaron un crecimiento similar a lo largo de todo el ensayo, con una necrosis vertical media entre 35-40 mm. Por otro lado, el aislamiento de *P. xmultiformis* (PAM393) destacó por su elevada lesión en tallo con una longitud media de 76 mm.

El análisis de varianza (ANOVA) confirmó la existencia de altas diferencias significativas en la longitud de las lesiones entre el control y las plántulas inoculadas con los aislamientos españoles de *P. xalni* y *P. plurivora* ( $F_{We} = 50.49$ ,  $P < 0.001$  y  $F_{We} = 45.90$ ,  $P < 0.001$ , respectivamente; Figura 3a). Sin embargo, tales diferencias no se encontraron entre los aislamientos españoles de *P. xalni* y *P. plurivora* ( $F_{We} = 2.12$ ,  $P < 0.155$ ). Algunas diferencias se observaron en la longitud de necrosis causada por los aislamientos españoles y franceses del complejo de *P. xalni* ( $F_{We} = 8.06$ ,  $P = 0.002$ ). En concreto, el aislamiento PAM393 causó lesiones significativamente más largas que el resto de aislamientos, excepto PA8055 (Figura 3b).

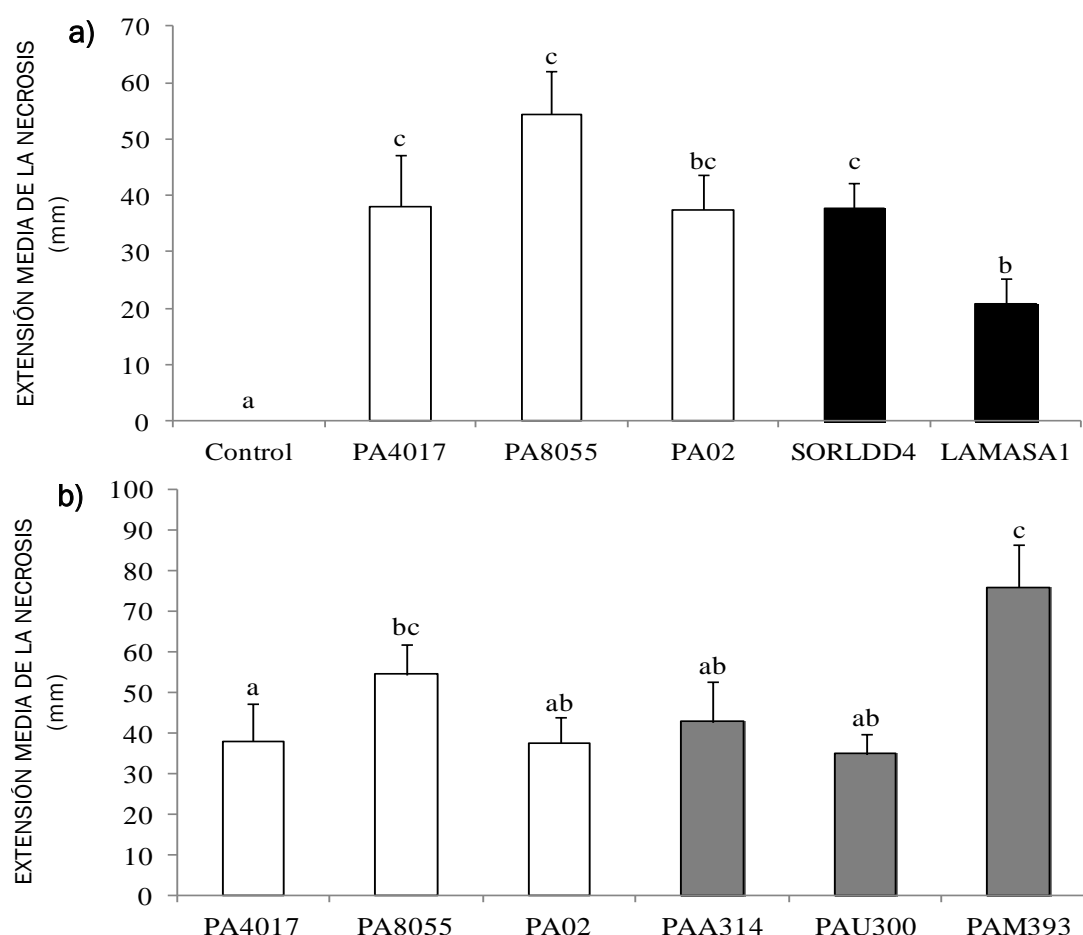


Figura 3. Comparación de la extensión media de la necrosis en el tallo de las plántulas de *A. glutinosa* inoculadas con a) aislamientos españoles de *P. xalni* y *P. plurivora*, y b) aislamientos españoles de *P. xalni* y aislamientos franceses del complejo de *P. alni*. Blanco: aislamientos españoles de *P. xalni*; negro: aislamientos de *P. plurivora*; gris: aislamientos franceses del complejo de *P. alni* (PAA: *P. xalni*; PAU: *P. uniformis* y PAM: *P. xmultiformis*).



Nota: Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Además de la necrosis vertical total, se decidió tomar de manera individual la necrosis que se extendió desde la herida de inoculación hacia la parte superior, y la inferior. Aun así, todos los aislamientos presentaron diferencias significativas con el control en las dos direcciones de crecimiento por separado. El test de Wilcoxon confirmó la existencia de estas diferencias ( $V = 3.568$ ,  $P < 0.001$ ), confirmando que el patógeno tiende más a ascender por el tallo, en lugar de extenderse hacia la parte radical.

El análisis de la varianza indicó la existencia de diferencias significativas en la forma de anillar. Todos los aislamientos españoles tanto de *P. plurivora* como del complejo de *P. alni* mostraron una clara diferencia significativa con el control ( $F_{We} = 384.8$ ,  $P < 0.001$  y  $F_{We} = 207.9$ ,  $P < 0.001$ , respectivamente). Por el contrario, no hubo diferenciación entre las especies *P. plurivora* y *P. xalni* ( $F_{We} = 3.07$ ,  $P = 0.089$ ). Sin embargo las necrosis adquirieron formas ligeramente diferentes: *P. plurivora* causando necrosis más anchas y en forma de diamante, y *P. alni* tendiendo más a las necrosis estrechas y alargadas (Figura 4). Al comparar el anillamiento de las especies de *P. alni* a nivel de procedencia España-Francia, se demostró la no existencia de diferencias significativas ( $F_{We} = 2.56$ ,  $P = 0.099$ ).

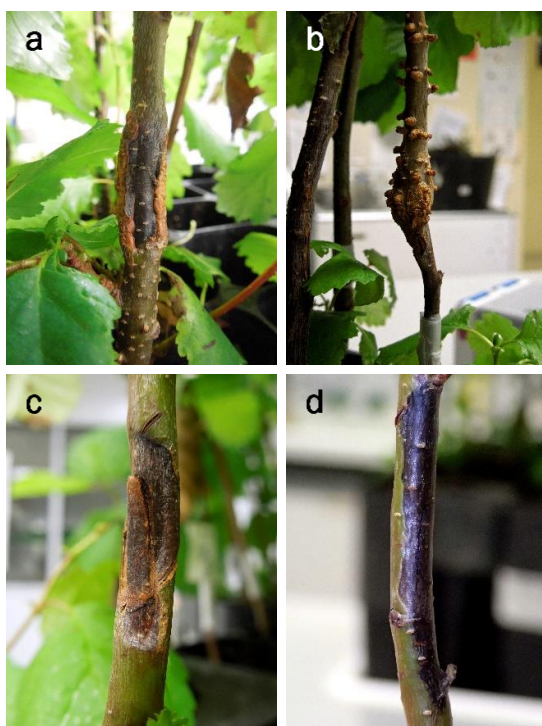


Figura 4. Lesiones causadas en plántulas de aliso por *Phytophthora*: a) plántula con anillado causado por *P. xalni* (PFSPA4017) 6 meses después de la inoculación; b) plántula completamente anillada por *P. xmultiformis* (PAM393) 16 semanas después de la inoculación; c) lesión en forma de diamante causada por *P. plurivora* 11 semanas después de la inoculación; d) lesión estrecha y alargada causada por *P. uniformis* (PAU300) 3 semanas después de la inoculación.

El crecimiento relativo del tallo de las plántulas inoculadas con *Phytophthora* fue la mitad que el de los controles, aunque la diferencia no fue significativa (ANOVA). En el crecimiento del diámetro las diferencias significativas se observaron solo entre los aislamientos españoles de *P. xalni* y el control ( $F_{We} = 4.96$ ,  $P = 0.043$ ), mientras que las diferencias en este parámetro entre *P. plurivora* y el control no fueron significativas ( $F_{We} = 3.89$ ,  $P = 0.064$ ).

En cuanto a la asignación de biomasa de la parte aérea y radicular de las plántulas, sólo se observaron diferencias significativas en el análisis de la parte aérea. El análisis del peso seco aéreo reveló que tanto las especies de *P. alni* como *P. plurivora* tienen diferencias significativas



con control ( $F_{We} = 10.58$ ,  $P = 0.015$  y  $F_{We} = 10.43$ ,  $P = 0.012$ , respectivamente), aunque entre ellas estas diferencias no existen ( $F_{We} = 0.04$ ,  $P = 0.835$ ). Por otro lado, al contrastar los aislamientos españoles con los franceses del complejo de *P. alni* no se observaron diferencias significativas ( $F_{We} = 0.60$ ,  $P = 0.627$ ), tampoco las hubo entre las tres especies de *P. alni*.

Los patógenos inoculados se reaislaron de las plántulas inoculadas, pero no de los controles.

## 5. Discusión

La patogenicidad de *Phytophthora plurivora* y del complejo de *P. alni* (*P. xalni*, *P. uniformis* and *P. xmultiformis*), fue examinada en laboratorio sobre plántulas de aliso común (*Alnus glutinosa*). Este es el primer estudio donde se ha comparado el poder patogénico de aislamientos procedentes de *P. plurivora* y *P. xalni* de España en aliso. *Phytophthora xalni* ha sido tradicionalmente identificado como el principal causante del decaimiento del aliso (BRASIER *et al.*, 1995); sin embargo, nuestros resultados indican que *P. plurivora* causa en plantas de 1 savia tanto daño como *P. xalni*. Los aislamientos españoles de *P. xalni* causaron un ratio de mortalidad de 30%, mientras que *P. plurivora* mató un 50% de las plántulas. Estos resultados difieren de los de HAQUE *et al.* (2014), que obtuvo mayores tasas de mortalidad asociadas con *P. plurivora* - equivalente a 100% en sólo 3 meses en una prueba de inoculación separada con plántulas de 2 años. Esta diferencia puede estar relacionada con el origen genético o con las diferencias en la edad de las plántulas. Sin embargo, esta última es improbable porque se sabe que la ontogenia de las plantas influye en su respuesta frente a *Phytophthora* spp., y la susceptibilidad generalmente disminuye con la edad (OßWALD *et al.*, 2014).

Tanto el complejo de *P. alni* como *P. plurivora* pueden iniciar la infección directamente en el tallo. Sin embargo, en el caso de infecciones que comienzan en las raíces, el complejo de *P. alni* crece hacia arriba hasta el tallo y las raíces distales permanecen sanas, mientras que *P. plurivora* crece exclusivamente en raíces (JUNG & BLASCHKE, 2004; OßWALD *et al.*, 2014). El hecho de que la extensión hacia abajo de la lesión desde el punto de inoculación sea relativamente limitada y no esté conectada con la superficie de la raíz puede explicar la falta de significación en el análisis estadístico de la biomasa radical. La inoculación de los tallos puede no ser representativa de las infecciones naturales que ocurren en los bosques ribereños europeos, ya que el complejo de *P. alni* y *P. plurivora* progresan principalmente hacia el tallo desde las raíces (CHANDELIER *et al.*, 2016).

*Phytophthora xmultiformis* causó la mayor mortalidad de plántulas, seguida por *P. uniformis* y *P. xalni*, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto no es consistente con los resultados de estudios previos que demuestran que *P. xalni* fue la especie más agresiva, seguida por *P. xmultiformis*, y que *P. uniformis* fue sólo débilmente patógena (BRASIER & KIRK, 2001; DE MERLIER, 2005). Sin embargo, SANTINI *et al.* (2003, 2006) y HAQUE *et al.* (2015) demostraron que *P. uniformis* causó un daño agresivo a las plántulas de uno y dos años de edad y ramas separadas, respectivamente. HAQUE *et al.* (2015) señaló que el diámetro del material vegetal puede ser el parámetro más importante para determinar la virulencia de *P. uniformis*. Nuestros resultados son consistentes con esta sugerencia y apoyan la hipótesis de que *P. uniformis* puede convertirse en un patógeno agresivo en brotes jóvenes y plántulas.

El presente estudio ha demostrado que tanto el complejo de *P. alni* como *P. plurivora* son patógenos agresivos de plántulas de alisos comunes. Ensayos de inoculación han demostrado la patogenicidad de *P. plurivora* en varios huéspedes como *Quercus robur*, *Fagus sylvatica*, *Tilia cordata*, *Acer platanoides* y *Syringa vulgaris* (JUNG *et al.*, 2005; JUNG & BURGESS, 2009; WEILAND *et al.*, 2010). Asimismo, su patogenicidad también se ha demostrado en *A. glutinosa* (JUNG & NECHWATAL, 2008, HAQUE *et al.*, 2014). Sin embargo, *P. plurivora* rara vez se ha asociado con el decaimiento del aliso en campo (JUNG *et al.*, 2003; HAQUE *et al.*, 2014).



Otros estudios ya han publicado que *P. plurivora* es probablemente la especie más importante de *Phytophthora* que amenaza los ecosistemas forestales y seminaturales de Europa (JUNG & BURGESS, 2009) y Estados Unidos (SCHOEBEL *et al.*, 2014). *P. plurivora* presenta varios rasgos distintivos: (i) una amplia amplitud ecológica que afecta a árboles forestales y también plantas ornamentales (JUNG & BURGESS, 2009); (ii) un alto grado de patogenicidad probablemente debido a su capacidad para evitar el reconocimiento del huésped y suprimir su respuesta (SCHLINK, 2010); y (iii) una mayor capacidad de sobrevivir en el suelo en condiciones naturales que *P. alni* (JUNG & BLASCHKE, 2004). Estas características han mejorado la propagación del patógeno en todo el mundo a través del comercio de material vegetal enfermo en viveros. En este sentido, se piensa que se ha producido la propagación de *P. plurivora* en los EE.UU. desde Europa. Además, el hecho de que *P. plurivora* sea una de las especies más comunes de *Phytophthora* en viveros europeos (JUNG *et al.*, 2015) incrementa el riesgo de propagación desde los viveros al campo.

Aunque el presente estudio confirma la patogenicidad potencial de *P. plurivora* a las plántulas de alisos y HAQUE *et al.* (2014) demostraron que *P. plurivora* estuvo involucrado en algunos casos de declive de alisos a lo largo de arroyos en España, se necesitan más estudios y ensayos, incluyendo análisis moleculares, para (i) confirmar la patogenicidad de *P. plurivora* a alisos en un amplio rango de condiciones ambientales (ABRAHAM *et al.*, 2013) y (ii) para dilucidar si la disminución de alisos puede haber sido erróneamente atribuida al complejo de *P. alni* en aquellos casos en que el patógeno no fue identificado.

## 6. Conclusiones

Los aislamientos españoles de las especies *P. plurivora* y *P. xalni* fueron patogénicos en plántulas de *A. glutinosa* y mostraron un poder patogénico similar. Esto alienta a un mayor estudio del rol de *P. plurivora* en el decaimiento de las masas de aliso.

## 7. Agradecimientos

Los autores agradecen a Claude Husson por suministrar los aislamientos franceses del complejo *Phytophthora alni*. También agradecen al Vivero Forestal Central de la Junta de Castilla y León por el suministro de las plántulas de alisos.

## 8. Bibliografía

ABRAHAM, A.; PHILIP, S.; JACOB, C.K.; JAYACHANDRAN, K.; 2013. Novel bacterial endophytes from *Hevea brasiliensis* as biocontrol agent against *Phytophthora* leaf fall disease. *BioControl* 58 (5), 675-684.

BELBAHRI, L.; MORALEJO, E.; CALMIN, G.; OSZAKO, T.; GARCÍA, J.A.; DESCALS, E.; LEFORT, F.; 2006. *Phytophthora polonica*, a new species isolated from declining *Alnus glutinosa* stands in Poland. *FEMS Microbiol Lett* 261(2), 165-174.

BHAT, R.G.; BROWNE, G.T.; 2007. Genetic diversity in populations of *Phytophthora citricola* associated with horticultural crops in California. *Plant Dis* 1991, 1556–1563.

BRASIER, C.M.; ROSE, J.; GIBBS, J.N.; 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathol* 44, 999-1007.

BRASIER, C.M.; COOKE, D.E.L.; DUNCAN, J. M.; 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *P Natl Acad Sci* 96, 5878-5883.

BRASIER, C.M.; KIRK, S.A.; 2001. Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder phytophthoras, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathol* 50, 218–229.

BRASIER, C.M.; KIRK, S.A.; DELCAN, J.; COOKE, D.; JUNG, T.; MAN IN'T VELD, W.A.; 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycol Res* 108, 1172-1184.

CHANDELIER, A.; HUSSON, C.; DRUART, P.; MARÇAIS, B.; 2016. Assessment of inoculation methods for screening black alder resistance to *Phytophthora xalni*. *Plant Pathol* 65, 441–450.

DE MERLIER, D.; CHANDELIER, A.; DEBRUXELLES, N.; NOLDUS, M.; LAURENT, F.; DUFAYS, E.; CLASSENS, H.; CAVELIER, M.; 2005. Characterization of alder *Phytophthora* isolates from Wallonia and development of SCAR primers for their specific detection. *Phytopathology* 153, 99-107.

GARCÍA-PÉREZ, A.; 2010. Métodos avanzados de estadística aplicada. Métodos robustos y de remuestreo. UNED Universidad Nacional a Distancia. Madrid, Spain.

GIBBS, J.N.; 1995. *Phytophthora* disease of alder in Britain. *EPPO Bull* 25, 661-664.

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.

GIBBS, J.; VAN DIJK, C.; WEBBER, J.; 2003. *Phytophthora* disease of alder in Europe. *For Comm Bull* 126, 82.

HAQUE, M.M.; DIEZ, J.J.; 2012. Susceptibility of common alder (*Alnus glutinosa*) seeds and seedlings to *Phytophthora alni* and other *Phytophthora* species. *Forest Syst* 21, 313-322.

HAQUE, M.M.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; LOMBA, J.M.; MARTÍN-GARCÍA, J.; DIEZ, J.J.; 2014. First report of *Phytophthora plurivora* causing collar rot on common alder in Spain. *Plant Dis* 98, 425.

HAQUE, M.M.; MARTÍN-GARCÍA, J.; DIEZ, J.J.; 2015. Variation in pathogenicity among the three subspecies of *Phytophthora alni* on detached leaves, twigs and branches of *Alnus glutinosa*. *Forest Pathol* 45, 484–491.

HUSSON, C.; AGUAYO, J.; REVELLIN, C.; FREY, P.; IOOS, R.; MARÇAIS, B.; 2015. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genet Biol* 77, 12-21.

JUNG, T.; NECHWATAL, J.; COOKE, D.E.L.; HARTMANN, G.; BLASCHKE, M.; OßWALD, W.; DUNCAN, J.M.; DELATOUR, C.; 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycol Res* 107, 772-789.



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.

JUNG, T.; HUDLER, G.W.; JENSEN-TRACY, S.L.; GRIFFITHS, H.M.; FLEISCHMANN, F.; OßWALD, W.; 2005. Involvement of *Phytophthora* spp. in the decline of European beech in Europe and the USA. *Mycologist* 19, 159–166.

JUNG, T.; NECHWATAL, J.; 2008. *Phytophthora gallica* sp. nov., a new species from rhizosphere soil of declining oak and reed stands in France and Germany. *Mycol Res* 112, 1195-1205.

JUNG, T.; BURGESS, T.I.; 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia* 22, 95-110.

JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L.; HENRICOT, B.; ABAD-CAMPOS, P.; ADAY, A.G.; AGUÍN, O.; BAKONYI, J.; CACCIOLA, S.O.; CECH, T.; CHAVARRIAGA, D.; CORCOBADO, T.; CRAVADOR, A.; DECOURCELLE, T.; DENTON, G.; DIAMANDIS, S.; DOĞMUŞ-LEHTIJÄRVI, H.T.; FRANCESCHINI, A.; GINETTI, B.; GREEN, S.; GLAVENDEKIĆ, M.; HANTULA, J.; HARTMANN, G.; HERRERO, M.; IVIC, D.; HORTA, M.; LILJA, A.; KECA, N.; KRAMARETS, V.; LYUBENOVA, A.; MACHADO, H.; MAGNANO DI SAN LIO, G.; MANSILLA, P.J.; MARÇAIS, B.; MATSIKHA, I.; MILENKOVIC, I.; MORICCA, S.; NAGY, Z.Á.; NECHWATAL, J.; OLSSON, C.; OSZAKO, T.; PANE, A.; PAPLOMATAS, E.J.; PINTOS-VARELA, C.; PROSPERO, S.; RIAL, C.; RIGLING, D.; ROBIN, C.; RYTKÖNEN, A.; SÁNCHEZ, M.E.; SANZ-ROS, A.V.; SCANU, B.; SCHLENZIG, A.; SCHUMACHER, J.; SLAVOV, S.; SOLLA, A.; SOUSA, E.; STENLID, J.; TALGØ, V.; TOMIC, Z.; TSOPELAS, P.; VANNINI, A.; VETTRAINO, A.M.; WENNEKER, M.; WOODWARD, S.; PERÉZ-SIERRA, A.; 2015. Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathol* 46: 134–163.

ORLIKOWSKI, L.B.; TRZEWIK, A.; PTASZEK, M.; ORLIKOWSKA, T.; 2012. Relationship between source of water, occurrence, and pathogenicity of *Phytophthora plurivora*. *Acta Mycol* 47, 3–9.

OSZAKO, T.; 2005. Alder decline in Poland. *6th Meeting IUFRO Working Party 7.03.04* (Diseases and insects in forest nurseries). 129-137. Uherské Hradiště, Czech Republic.

OßWALD, W.; FLEISCHMANN, F.; RIGLING, D.; DIEZ, J.J.; COELHO, A.C.; CRAVADOR, A.; DALIO, R.J.; HORTA, M.; PFANZ, H.; ROBIN, C.; SIPOS, G.; SOLLA, A.; CECH, T.; CHAMBERY, A.; DIAMANDIS, S.; HANSEN, E.; JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L.B.; PARKE, J.; PROSPERO, S.; WERRES, S.; 2014. Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathol* 44, 169-190.

PINTOS-VARELA, C.; RIAL, C.; MANSILLA, J.P.; AGUÍN, O.; 2010. First report of *Phytophthora* rot on alders caused by *Phytophthora alni* subsp. *alni* in Spain. *Plant Dis* 94, 273-273.

PINTOS-VARELA, C.; RIAL, C.; AGUÍN, O.; MANSILLA, J.P.; ARES, A.; 2012. First report of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* on Black alder in Spain. *Plant Dis* 96, 589.



RYTKÖNEN, A.; LILJA, A.; VERCAUTEREN, A.; SIRKIÄ, S.; PARIKKA, P.; SOUKAINEN, M.; HANTULA, J.; 2012. Identity and potential pathogenicity of *Phytophthora* species found from symptomatic *Rhododendron* plants in a Finnish nursery. *Can J Plant Pathol* 34, 255-267.

SANTINI, A.; BARZANTI, G.P.; CAPRETTI, P.; 2003. Susceptibility of some Mesophilic hardwoods to alder *Phytophthora*. *J Phytopathol* 151, 406-410.

SANTINI, A.; BIANCALANI, F.; BARZANTI, G.P.; CAPRETTI, P.; 2006. Pathogenicity of four *Phytophthora* species on wild cherry and Italian alder seedlings. *J Phytopathol* 154, 163-167.

SCHLINK, K.; 2010. Down-regulation of defense genes and resource allocation into infected roots as factors for compatibility between *Fagus sylvatica* and *Phytophthora citricola*. *Funct Integr Genomics* 10, 253-264.

SCHNITZLER, A.; 1994. Conservation of biodiversity in alluvial hardwood forests of the temperate zone. The example of the Rhine valley. *Forest Ecol Manag* 68, 385-398.

SCHOEBEL, C.N.; STEWART, J.; GRUENWALD, N.J.; RIGLING, D.; PROSPERO, S.; 2014. Population history and pathways of spread of the plant pathogen *Phytophthora plurivora*. *PLoS ONE* 9, e85368.

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.

THERNEAU, T.; 2015. A Package for Survival Analysis in S. R package version 2.38, [<http://CRAN.R-project.org/package=survival>]

TRZEWIK, A.; ORLIKOWSKA, T.; OSZAKO, T.; 2008. The threat by *Phytophthora alni* of alder (*Alnus glutinosa*) in Poland. *ZPPNR* 529, 227-233.

TUSET, J.J.; GONZÁLEZ, V.; HINAREJOS, C.; MIRA, J.L.; SÁNCHEZ, G.; 2006. Prospección para determinar la posible presencia de *Phytophthora* spp. en las alisedas del norte de España. En: Cobos, J.M. (eds.): *XXIII Annual Meeting of the Forest Health Working Group*. 527-537. Madrid, Spain.

WEILAND, J.E.; NELSON, A.H.; HUDLER, G.W.; 2010. Aggressiveness of *Phytophthora cactorum*, *P. citricola* l, and *P. plurivora* from European beech. *Plant Dis* 94, 1009-1014.