



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-492

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

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

SELECCIÓN DE GENOTIPOS DE *Alnus glutinos* POTENCIALMENTE RESISTENTES A *Phytophthora xalni*: MICROPROPAGACIÓN Y EVALUACIÓN DE RESISTENCIA

CUENCA VALERA, B.¹, RODRIGUEZ NUÑEZ, L.¹, DE ANTA MONTERO, A.², DE CASTRO ARRIBA, M.E.², CORREDOIRA CASTRO, E.³, SAN JOSÉ CAPILLA, M.C.³

¹TRAGSA. Vivero de Maceda.

²Confederación Hidrográfica del Miño-Sil.

³Dpto. Fisiología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. IIAG (CSIC).

Resumen

El declive de los alisos en Europa se debe, entre otros, a un complejo de especies de *Phytophthora alni*, siendo *P. xalni* la más agresiva. La muerte de los alisos a lo largo de los ríos, pone en peligro la estabilidad de las riberas y modifica sus condiciones ecológicas. La búsqueda de resistencia en poblaciones naturales puede ser útil para conservar genotipos resistentes y usarlos en programas de mejora genética. Se seleccionaron 30 genotipos aparentemente resistentes en 6 rodales de cursos de ríos gallegos infestados por *P. xalni*. Estos genotipos se sometieron a un *screening* rápido para tratar de identificar los 2 genotipos con mayor capacidad de resistencia de entre los 5 muestreados en cada rodal, mediante inoculación de ramillos escindidos con una suspensión de zoosporas. Se ha abordado la clonación de estos 12 genotipos seleccionados, mediante cultivo *in vitro* de yemas axilares en medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) adicionado con citoquinina y auxina. Las vitroplantas aclimatadas y recriadas, están siendo sometidas a evaluación de resistencia mediante inoculación con discos de micelio de agar de *P. xalni*. Los materiales que superen el ensayo serán propuestos al Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) para su uso en restauración de riberas.

Palabras clave

Aliso, cultivo *in vitro*, *screening*, resistencia

1. Introducción

Los alisos tienen un considerable valor paisajístico además de jugar un papel vital en los ecosistemas riparios y de actuar como estabilizadores de las riberas gracias a su sistema radical. Sin embargo, desde mediados de los 2000, se está produciendo una alta mortalidad en el aliso común (*Alnus glutinosa*) a lo largo de muchos ríos europeos. Los primeros signos de mortalidad en las alisedas del norte de la Península se observaron en 2006 (TUSET *et al.* 2006), y la presencia del patógeno se ha confirmado más recientemente (SOLLA *et al.* 2010). Este patógeno, descrito por BRASIER *et al.* (2004), ya ha provocado la muerte de alisos en los bosques de ribera en prácticamente toda Europa (GIBBS *et al.*, 2003; JUNG & BLASCHKE, 2004). *Phytophthora alni* presenta tres variantes con diferente virulencia: *P. alni* ssp. *alni* (PAA); *P. alni* ssp. *uniformis* (PAU); and *P. alni* ssp. *multiformis* (PAM). Ahora sabemos que PAU y PAM son parentales de PAA (IOOS *et al.*, 2006; AGUAYO *et al.*, 2013), pudiendo haberse hibridado en viveros europeos (JUNG & BLASCHKE, 2004). Recientemente, HUSSON *et al.* (2015) propusieron elevarlos a especie y renombrarlas *Phytophthora xalni*, *Phytophthora uniformis* and *Phytophthora xmultiformis*, respectivamente. *P. xalni* es la más agresiva (BRASIER & KIRK, 2001), y la más frecuentemente responsable de la muerte de las alisedas (JUNG & BLASCHKE, 2001).

Ante este escenario de avance de la enfermedad, es de suma importancia conservar genotipos de valor, y seleccionar materiales resistentes que puedan ser empleados en las restauraciones hidrológicas. Para garantizar el mantenimiento y propagación de estos genotipos

seleccionados por resistencia, es necesario recurrir a la propagación vegetativa. La micropropagación es la técnica más ventajosa, por su capacidad de escalado e independencia de la época del año. La proliferación de brotes axilares es el sistema de micropropagación más frecuente en *Alnus* y ya está siendo empleado con éxito para la clonación de genotipos adultos de *Alnus glutinosa* (CORREDOIRA *et al.*, 2011).

2. Objetivos

El objetivo de este estudio es seleccionar en campo genotipos de *Alnus glutinosa* con potencial resistencia a *Phytophthora xalni*, establecerlos y propagarlos *in vitro*, y confirmar su resistencia mediante su inoculación en laboratorio con el patógeno específico causante de la enfermedad y la observación de los síntomas. El fin último es disponer de Materiales Forestales de Reproducción (MFR) clonales, resistentes a la enfermedad para incluirlos en el CNMB y emplearlos en la recuperación de los sistemas riparios de la cuenca Miño-Sil.

3. Metodología

Se seleccionaron 6 cursos de ríos de la cuenca Miño-Sil que presentaban zonas con daños bióticos en *Alnus glutinosa* producidos por *P. alni*, confirmados mediante analítica de raíces. Estos cursos y zonas fueron: 1. Azúmara-Río Pequeño en Castro de Rei; 2. Avia en Ribadavia; 3. Arnoia en Allariz; 4. Orille en A Bola; 5. Louro en Porriño; y 6. Selmo-Burbia en Sobredo y Villafranca del Bierzo. Las coordenadas de las zonas afectadas en cada curso fueron proporcionadas por la Confederación Hidrográfica Miño-Sil a partir de estudios previos. Estas zonas fueron recorridas por un técnico de TRAGSA, quien seleccionó 5 árboles aparentemente sanos en cada una de ellas. La ausencia de síntomas en los árboles seleccionados fue apoyada mediante análisis de raíz. De cada uno de los árboles seleccionados se tomaron en Noviembre de 2015, dos tipos de materiales: ramillos del año, para realizar un screening previo de resistencia; y renuevos basales, rebrotes de raíz, brotes epicórmicos o ramas bajas, de mayor diámetro, para su establecimiento *in vitro*, salvo en el caso del curso del Louro, donde no pudo realizarse la selección hasta la primavera de 2016.

a. Screening de resistencia

Método 1) Se aplicó el método de inoculación de ramillos terminales con suspensión de zoosporas (CHANDELIER *et al.*, 2015), colocando ramillos de cada árbol en contacto con zoosporas de *P. xalni*, para observar los síntomas de marchitamiento. Para ello 6 ramillos de cada genotipo de unos 15 cm de longitud, de crecimiento del año, fueron incubados individualmente en tubos de ensayo de 50 ml que contenían 4 ml de suspensión de zoosporas, en cámara con fotoperíodo 16/8 y 20°C. Para obtener la suspensión, se incubaron 30 trozos de micelio de *P. xalni* cultivado en V8, en placas de Petri que contenían agua de río estéril durante 2-3 días con cambios diarios del agua. Tan pronto como se observaron zoosporas, los trozos de micelio se colocaron en agua estéril a 4°C para estimular su producción (JUNG *et al.* 1999). En cada tubo se añadieron 4 fragmentos de micelio con zoosporas. La cantidad de ramillos disponibles con condiciones fisiológicas semejantes, limitó a 2 los que pudieron emplearse como control de cada genotipo, a los que aplicó la misma metodología pero sin añadir zoosporas. La cantidad de agua en cada tubo se mantuvo constante mediante la adicción diaria de agua estéril para compensar la transpiración. A los 11 días, se tomó nota de los síntomas observados.

Método 2) Tras el screening del método 1, y dado que en los genotipos de los cursos Azúmara, Avia y Arnoia, la mayoría de los ramillos se defoliaron por deshidratación pero sin marchitamiento, y sin que los tallos se necrosaran, los tallos no deshidratados procedentes del screening anterior, desprovistos de hojas se colocaron en tarros con extracto de suelo que se cocultivó con micelio de *P. xalni* añadiendo 2 discos de 2 cm² de micelio en crecimiento activo y se dispusieron en cámara controlada a 25°C durante 3 días. Los controles se colocan en

extracto de suelo que no estuvo en contacto con micelio. A los 12 días se midió la altura alcanzada por la necrosis en cada tallo.

En ambos screenings se emplearon los aislados de *P. xalni* UEx22 y UEx23. La limitación en la disponibilidad de ramillos, impidió realizar hacer un análisis estadístico exhaustivo.

b. Establecimiento y producción in vitro

Segmentos de 20-25 cm de los genotipos seleccionados tras el screening, fueron forzados a brotar en condiciones controladas y los nuevos brotes esterilizados según la metodología descrita por SAN JOSÉ *et al.* (2013). Los segmentos apicales y nodales de los brotes fueron utilizados como la fuente de explantos para su cultivo *in vitro*. Estos segmentos fueron situados en posición vertical en tubos de cultivo que contenían el medio mineral WPM de LLOYD Y McCOWN (1980) suplementado con 20 g/l de glucosa, 7 g/l agar Difco y 0,5 mg/l de benciladenina (BA), siendo transferidos a medio fresco de igual composición cada 2 semanas hasta su estabilización. En la fase de multiplicación se utiliza el mismo medio mineral (WPM) suplementado con BA y ácido indol acético en un ciclo de multiplicación de 9 semanas: BA 0.2 mg/l + AIA 0.5 mg/l (3 semanas), BA 0.1 mg/l + AIA 0.5 mg/l (3 semanas) y 0.1 mg/l BA + 0.5 mg/l AIA + 0.5 mg/l de zeatina (3 semanas). Brotes de entre 1,5 y 2 cm procedentes de la etapa de multiplicación, son aislados y transferidos a medio de enraizamiento (WPM con los macronutrientes reducidos a la mitad y 0,1 mg/l de ácido indol-3-butírico (AIB)) durante 7 días, siendo posteriormente transferidos a un medio de igual composición sin AIB para el desarrollo de las raíces. Los brotes enraizados se enviaron al Vivero de TRAGSA para su aclimatación.

c. Aclimatación y recría

Los brotes enraizados de cada uno de los genotipos eran de pequeño tamaño (\approx 2-3 cm), lo que podría reducir el éxito de la aclimatación en una producción industrial. Se evaluó, por tanto, el efecto de un periodo de cultivo en condiciones fotoautotróficas con aporte de CO₂ (2000 ppm) y alta intensidad lumínica (flujo de fotones fotosintéticos, PPF) (\sim 150 μ mol m⁻² s⁻¹), durante 6 semanas, disponiendo los explantos enraizados en envases de 10l que contiene 1200 ml líquido de medio GRESHOFF & DOY (1972), con los macronutrientes reducidos a 1/3, sin reguladores de crecimientos y sin sacarosa. Al cabo de este período las plantas alcanzan un tamaño en torno a los 10 cm y un sistema radical profuso que garantiza la supervivencia en el paso a tierra. Posteriormente se realiza el trasplante a macetas de 1l, con una mezcla de turba rubia y vermiculita en proporción 3:1, y adicionada con abono de liberación lenta Osmocote Exact 8-9 m. Las macetas se disponen en el invernadero para su desarrollo.

d. Evaluación de resistencia de los genotipos micropropagados

Con objeto de poner a punto el método de evaluación de resistencia a emplear con los 12 genotipos seleccionados tras el screening y en fase de micropropagación, se emplearon vitroplantas aclimatadas de 3 genotipos propiedad del IIAG-CSIC (R1, R4 y G1), obtenidos en un proyecto anterior que habían sido aclimatadas y recriadas en macetas de 1l con el mismo sustrato descrito anteriormente. Además se emplearon plantas de semilla como testigos positivos (supuestamente sensibles).

Método 1) Inoculación mediante inundación. Se inocularon en el mes de Junio, 15-18 plantas de cada genotipo y 18 brinzales (testigos positivos), agrupadas en 3 repeticiones de 5-6 plantas, mediante el aporte del micelio de *P. xalni* (aislado UEx23) en crecimiento activo en placa Petri con agar V8 agar, cuando el micelio colonizaba la casi totalidad de la placa, a razón de media placa triturada y disuelta en 200ml de agua estéril por maceta. El aislado fue reactivado previamente (inoculado en tejido vivo y aislado una segunda vez). Otras 5-6 plantas por genotipo y 6 brinzales fueron dejadas como control sin inocular. Todas las plantas, incluidas los controles se mantuvieron 24 h en completa inundación, hasta el cuello de la raíz y posteriormente se colocaron en bandejas donde se mantuvo inundación constante (al menos 5 cm de altura de agua). El ensayo se realizó simultáneamente en invernadero sin control de temperatura, y en



cámara controlada con fotoperíodo 16/8 y temperatura 25/20°C. Todas las semanas se observaron los síntomas.

Método 2) Inoculación por herida en el tallo. Posteriormente, en el mes de agosto, estas mismas plantas fueron inoculadas mediante la realización de una herida en el tallo a 5 cm del cuello de la raíz que alcance el cambium. Sobre la herida se colocó un disco de agar V8 con micelio en crecimiento activo de *P. xalni* (aislado UEx23), y sobre el disco se colocó una banda de Parafilm ® para mantener el disco en su sitio y evitar su deshidratación. En las heridas de las plantas control se colocó un disco de agar V8 sin micelio. El ensayo se realizó también simultáneamente en invernadero y en cámara controlada, sobre las mismas plantas que se inocularon con el método 1). Los síntomas se observaron semanalmente. La falta de síntomas, planteó la posibilidad de que estuviéramos usando un aislado con poca virulencia, por lo que a mediados de Diciembre de 2016, reinoculamos únicamente las plantas en cámara controlada, puesto que las plantas del invernadero estaban ya en reposo vegetativo, con el aislado PA4017 (HAQUE *et al.*, 2015, ZAMORA-BALLESTEROS *et al.*, 2016), de virulencia constatada para descartar esa posibilidad y cedido por el Dr. Julio Díez de la Universidad de Valladolid.

4. Resultados

a) Screening de resistencia: en Noviembre de 2015, los ramillos de los árboles seleccionados en los cursos Selmo-Burbia, Orille y Azúmara, presentaron diferencias entre genotipos en cuanto a marchitamiento al cabo de los 11 días tras la inoculación, oscilando entre el 16,7% y el 100% de los ramillos con síntomas de marchitamiento, mientras que los controles oscilaron entre 0 y 50%. Los árboles de Azúmara fueron los menos afectados con una media del 60% frente al 86,7% del Selmo-Burbia y el 90% del Orille. Los ramillos de Burbia-1 (BU1), Selmo-5 (SE5), Orille-3 (OR3), Orille-5 (OR5), Azúmara-1 (A1) y Azúmara-2 (A2) fueron los genotipos de cada curso con menor porcentaje de marchitamiento. Sin embargo, los ramillos de Avia y Arnoia, no presentaron síntomas de marchitamiento y simplemente las hojas se deshidrataron y cayeron. A estos ramillos se les aplicó el método 2 de screening, obteniendo unas longitudes de lesión de necrosis que oscilaron entre 12,7 y 39,5 mm para los genotipos del Avia y entre 2,6 y 40,7 para los genotipos del Arnoia, frente a una lesión media en los controles no inoculados de 6,7 mm y 7,1 para Avia y Arnoia respectivamente. Las lesiones de menor longitud correspondieron a los genotipos Avia-2 (AV2) y Avia -3 (AV3), y Arnoia-1 (AR1) y Arnoia-5 (AR5) respectivamente. La imposibilidad de saber si existen diferencias significativas sólo con un análisis estadístico descriptivo, dificultó la selección de los genotipos a micropropagar, optando finalmente por seleccionar los dos árboles de cada curso con menor porcentaje de marchitamiento (método 1) o menor longitud de lesión (método 2). En cuanto a los genotipos de Louro, evaluados en primavera, todos ellos se deshidrataron por completo, tanto las hojas como los tallos, en menos de 3 días, por lo que no pudimos obtener conclusiones al respecto, decidiendo por tanto, proceder a la clonación de los materiales de los dos genotipos que presentaran un mayor vigor en el proceso de forzado a brotación, que resultaron ser los genotipos Louro-2 (LO2) y Louro-4 (LO4).

b) Establecimiento y producción in vitro: el desarrollo de nuevos brotes se produjo después de 2-3 semanas en la cámara de crecimiento, variando significativamente los porcentajes de brotación y la longitud de los brotes en función del genotipo y del grosor de las estaquillas. Se consiguió el establecimiento *in vitro* de todos los genotipos, excepto Arnoia-5 y Burbia-1. En este momento se encuentran en fase de multiplicación, excepto los genotipos Orille-3 y Orille-5 que ya se han multiplicado y obtenido brotes para la fase de enraizamiento. El enraizamiento de los genotipos del IAG-CSIC y los brotes de los nuevos genotipos Orille-3 y 5 se efectuó sin problemas en medio de enraizamiento con AIB 0,1 mg/l durante 7 días, oscilando los porcentajes de formación de raíces entre el 60 y el 90% en función del genotipo.

c) Aclimatación y recría: al cabo de las 6 semanas en cultivo fotoautotrófico, las vitroplantas han incrementado considerablemente su tamaño en torno a los 10-15 cm y un sistema radical profuso y desarrollado hojas adaptadas a las condiciones de renovaciones

constantes de aire lo que garantiza la supervivencia en el paso a tierra (Figura 1). Hasta el momento de la redacción de este trabajo, se han aclimatado y recriado únicamente los 3 genotipos cedidos por el IIAG-CSIC, no presentando ninguno de ellos ninguna dificultad, y teniendo un éxito del 100% en la aclimatación. Las primeras plantas de los genotipos OR3 y OR5 ya están también en proceso de aclimatación.



Figura 1. Aspecto de los explantos enraizados al comienzo del período de cultivo fotoautotrófico (izda), y a las 6 semanas, en el momento de pasar a tierra (dcha).

d) Evaluación de resistencia de los genotipos micropropagados: ninguna de las plantas inoculadas con el método 1 presentaron síntomas de marchitamiento, amarilleamiento o lesiones en el tallo en el período comprendido entre Junio y Agosto, ni las que se evaluaron en el invernadero, sometidas a temperaturas elevadas en las horas centrales del día y frescas por la noche, ni las evaluadas en condiciones de temperatura controlada. Tampoco los brinzales empleados como testigos positivos presentaron síntomas de ningún tipo y durante todo el período continuaron su desarrollo vegetativo normalmente (Figura 2a). Esto llevó a pensar en la posibilidad de que este sistema de inoculación empleado con éxito en otras especies con *P. cinnamomi* (ROBIN *et al.*, 2006) podría no ser el más adecuado para garantizar la infección con *P. xalni*, por lo que las mismas plantas fueron reinoculadas en el mes de agosto con el método 2 (Figura 2b).



Figura 2. a. Plantas al cabo de dos meses tras la inoculación por inundación, sin presencia de síntomas. b. Detalle de la inoculación mediante herida en el tallo realizada en Agosto. c. Detalle de la herida cicatrizada y sin lesión a finales de Septiembre. d. Lesión necrótica en testigo sensible tras la inoculación con el aislado PA4017.

Tras la inoculación, en el período comprendido entre Agosto y Noviembre, no se apreciaron tampoco síntomas en ninguna de las plantas inoculadas, ni en las plantas de invernadero ni de la cámara controlada y en Noviembre, las heridas realizadas para inocular estaban en proceso de cicatrización sin presentar necrosis en ningún caso (Figura 2c). Sin embargo, la reinoculación de las plantas de la cámara controlada en Diciembre de 2016 con el aislado PA4017, produjeron al cabo del mes, en el momento de la redacción de este trabajo, claras lesiones necróticas en los testigos positivos (plantas de semilla) (Figura 2d), y en alguna planta de los genotipos en evaluación, si bien no se apreciaba en ese momento, marchitamiento

ni ningún otro síntoma de la enfermedad. La inoculación se repetirá en primavera, tanto en la cámara como en el invernadero con el aislado PA4017 para optimizar las condiciones del ensayo.

5. Discusión

Este trabajo pretende emplear un método de screening rápido y de alto rendimiento para centrar los esfuerzos de clonación en aquellos genotipos adultos con mayor probabilidad de presentar resistencia. CHANDELIER *et al.* (2015) compararon varios métodos de inoculación con este mismo objetivo, como la herida-inoculación de tallos escindidos, de tallos *in situ*, y la inoculación de ramillos terminales mediante suspensión de zoosporas, encontrando este último método más repetitivo y robusto que el primero por estar este más sujeto a cambios estacionales. En nuestro caso, el método de los ramillos terminales mostró diferencias entre genotipos cuando el test se condujo a mediados de Noviembre, mientras que más avanzado el otoño, y en primavera, la deshidratación de los ramillos se manifestó de manera demasiado rápida para poder apreciar diferencias. Otros autores también emplean este tipo de test rápidos en materiales adultos. DENMAN *et al.* (2005) emplean hojas escindidas completas, heridas o no, de diferentes especies para evaluar su susceptibilidad a *Phytophthora ramorum*. HAQUE *et al.*, (2015) emplea hojas con o sin herida, ramillos y ramas para evaluar la virulencia de diferentes aislados. En el caso de los ramillos, estos autores no detectan diferencias entre localizaciones del muestreo, sino sólo para la interacción temperatura y aislado.

Los resultados obtenidos muestran la posibilidad de establecer *in vitro* aliso con material procedente de árboles adultos seleccionados por su tolerancia a la enfermedad causada por *P. xalni*. Diversos autores han reportado la utilización de la citoquinina BA para el desarrollo de brotes de material de origen juvenil (GARTON *et al.*, 1981; PÉRINET & LALONDE, 1983; TREMBLAY & LALONDE, 1984), no obstante la utilización de material de origen adulto hace necesario dividir el periodo de multiplicación en tres ciclos de 3 semanas cada uno y la incorporación de AIA y zeatina para mejorar la calidad de los brotes (SAN JOSÉ *et al.* 2013). Si bien los brotes de aliso enraízan bien en el medio sin reguladores, la incorporación de AIB al medio de enraizamiento incrementa los porcentajes y el número de raíces (SAN JOSÉ *et al.* 2012).

Ninguno de los dos métodos de inoculación de plantas completas empleados con los aislados UEx22 y UEx23 produjo síntomas a corto o medio plazo en las plantas evaluadas. Al reinocular en el tallo en Diciembre con el aislado PA4017, aparecen lesiones en las plantas más sensibles al cabo del mes, pero sin síntomas de marchitamiento. Sin embargo, CHANDELIER *et al.* (2015), encuentran mortalidad significativa 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*. Sin embargo, CLEMENZ *et al.* (2008), tardan hasta 2 años en obtener el 75% de mortalidad, pero las plantas presentan lesiones necrosadas ya en los primeros meses tras la inoculación, lo que concuerda con nuestros resultados hasta el momento. Diversos autores reflejan la influencia de la época del año en que se evalúa en la expresión de los síntomas, siendo esta máxima en Agosto (CLEMENZ *et al.*, 2008; ŠTOCHLOVA *et al.* (2012), así como de la virulencia del aislado (CHANDELIER *et al.*, 2015). Según esto, la falta de síntomas de nuestras primeras inoculaciones pudo deberse a una falta de virulencia de los aislados empleados. Las lesiones necrosadas en la reinoculación de invierno corroboran la virulencia del aislado PA4017, si bien la lentitud en la expresión de síntomas puede deberse a la época del año en que se han realizado las inoculaciones.



6. Conclusiones

La clonación de individuos adultos seleccionados de *Alnus glutinosa* es posible y el sistema desarrollado es eficiente para emplearlo a nivel preindustrial. Es necesario profundizar en el sistema de evaluación de la resistencia, para poder disponer de un sistema fiable, repetitivo y que muestre síntomas a corto plazo y que permita evaluar de manera fiable los genotipos clonados.

7. Agradecimientos

Este trabajo está siendo financiado en su totalidad por la Confederación Hidrográfica del Miño-Sil, a través de la Encomienda de Gestión EXPTE: 178/15/CA/EG. Los autores agradecen al Dr. Alejandro Solla de la Universidad de Extremadura y al Dr. Julio Díez, de la Universidad de Valladolid, su apoyo técnico y la cesión de los aislados de *P. xalni*.

8. Bibliografía

AGUAYO, J.; ADAMS, G. C.; HALKETT, F.; CATAL, M.; HUSSON, C.; NAGY, Z. Á.; HANSEN, E. M.; MARÇAIS, B. & FREY, P. 2013. Strong genetic differentiation between North American and European populations of *Phytophthora alni* subsp. *uniformis*. *Phytopathology*, 103: 190–199

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

BRASIER, C.M.; KIRK, S.A.; DELCAN, J.; COOKE, D.E.L.; 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.C.; 2015. Assessment of inoculation methods for screening black alder resistance to *Phytophthora xalni*. *Plant Pathology*.

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: 1703-1711.

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.

DENMAM, S.; KIRK, S.A.; BASIER, C.M.; WEBBER, J.F.; 2005. In vitro leaf inoculation studies as an indication of tree foliage susceptibility to *Phytophthora ramorum* in the UK. *Plant Pathology*, 54: 512-521.

GARTON, S.; HOSIER, M.A.; READ, P.E.; FARNHAM, R.S.; 1981. *In vitro* propagation of *Alnus glutinosa* Gaertn. *Horticultural Science* 16 (3), 758-759.

GIBBS, J.N.; CECH, T.; JUNG, T.; STREITO, J.C.; 2003. Field studies on dissemination of the alder *Phytophthora* and disease development. In: Gibbs, J.N.; Van Dijk, C.; Webber, J.F. eds. 2003. *Phytophthora* disease of alder in Europe. Edinburg, UK: Forestry Commission Bulletin No. 126: 55-64.

GRESSHOFF, P.M.; DOY, C.H.; 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, 107(2), 161-170.



HAQUE, M. M. U.; 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 Pathology*, 45(6), 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 Genetics and Biology*, 77: 12-21.

IOOS, R.; ANDRIEUX, A.; MARCAIS, B.; FREY, P.; 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungus Genet. Biol.* 43: 511-529.

JUNG, T.; COOKE, D.E.L.; BLASCHKE, H.; DUNCAN, J.M.; OßWALD, W.; 1999. *Phytophthora quercina* sp. Nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research*, 103: 785-798.

JUNG, T.; BLANSCHKE, M.; 2001. Wurzelzerstörende der Erlen (*Phytophthora* Collar Rot of Alders). LWF Merkblatt (LWF Leaflet). No. 6. Freising, Germany: Bavarian State Institute of Forestry (LWF).

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

LLOYD, G.; McCOWN, B.H.; 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagator's Society*, 30: 421-427.

PÉRINET, P.; LALONDE, M.; 1983. *In vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Plant Science Letters* 29(1), 9-17.

ROBIN, C.; MOREL, O.; VETTRAINO, A.M.; PERLEROU, C.; DIAMONIS, S.; VANNINI, A.; 2006. Genetic variation in susceptibility to *Phytophthora cambivora* in European chestnut (*Castanea sativa*). *Forest Ecology and Management*, 226: 199-207.

SAN JOSÉ, M.C.; JANEIRO, L.V.; CORREDOIRA, E.; 2013. Micropropagation of threatened black alder. *Silva Fennica*, 47(1), 1-12.

SAN JOSÉ, M.C.; ROMERO, M.L.; JANEIRO, L.V.; 2012. Effect of indole-3-butyric acid on root formation in *Alnus glutinosa* microcuttings. *Silva Fennica* 46(5), 643-654.

SOLLA, A.; PÉREZ-SIERRA, A.; CORCOBADO, T.; HAQUE, M.M.; DÍEZ, J.J.; JUNG, T.; 2010. *Phytophthora alni* on *Alnus glutinosa* reported for the first time in Spain. *Plant Pathology*, 59: 123-130.

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.

TREMBLAY, F.M.; LALONDE, M.; 1984. Requirements for the *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3(2), 189-199

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. In: Cobos, J.M.; ed. *Proceedings of the XXIII Annual Meeting of the Forest Health Working Group*, Madrid, Spain, 2006. 527-537.

ZAMORA-BALLESTEROS, C.; HAQUE, M. M. U.; DIEZ, J. J.; MARTÍN-GARCÍA, J.; 2016. Pathogenicity of *Phytophthora alni* complex and *P. plurivora* in *Alnus glutinosa* seedlings. *For. Path.* doi:10.1111/efp.12299

