

Programa de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la “seca”

Felipe Pérez¹
 Beatriz Cuenca²
 F.J. Ruiz-Gómez³
 María Dolores Rey³
 Mar Ruiz- Galea⁴
 Isabel Arrillaga⁵
 Elena Corredoira⁶
 José Antonio Manzanera⁷
 Raúl Tapias⁸
 Alejandro Solla⁹

¹ Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico

² TRAGSA

³ Universidad de Córdoba

⁴ Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA)

⁵ Universidad de Valencia

⁶ Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG CSIC)

⁷ Universidad Politécnica de Madrid

⁸ Universidad de Huelva

⁹ Universidad de Extremadura

Ante la gravedad del decaimiento y mortalidad de la encina y el alcornoque, que amenazan la sostenibilidad de las masas de *Quercus* en la Península Ibérica, en 2017 se constituyó el subgrupo “Mejora genética y fisiológica” que forma parte del grupo de trabajo de “seca de los *Quercus*” coordinado por el MAPA-MITERD. Este subgrupo incluye a científicos y técnicos de varias administraciones, Universidades, centros de investigación y una empresa pública, expertos en mejora genética, fitopatología, ecología, propagación vegetativa, bioquímica y biología molecular. El programa tiene como objetivo la obtención y propagación de plantas de *Quercus ilex* y *Q. suber* tolerantes al estrés hídrico y a la podredumbre radical provocada por *Phytophthora cinnamomi*. A partir del estudio de poblaciones y de árboles “escape” seleccionados en focos de seca, se espera obtener un material apto para restaurar en el futuro zonas con problemas de decaimiento.

ANTECEDENTES

La “seca” de los *Quercus* es actualmente la principal amenaza de las encinas y alcornoques en buena parte de la Península Ibérica, especialmente en el Suroeste, ya que compromete la estabilidad y la persistencia de ecosistemas importantes a nivel ecológico y socioeconómico en el ámbito mediterráneo, como es el caso de la dehesa. Se trata de un síndrome del arbolado que provoca una elevada mortandad y que no puede atribuirse a una única causa. La interacción de factores tales como el cambio climático, los agen-

tes bióticos y la gestión tienen una incidencia conjunta importante (Carrasco-Gotarredona et al., 2009). Sin embargo, dentro de este escenario destacan la presencia de microorganismos virulentos que generan pudrición de raíz, en especial el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* (Corcobado et al., 2013). Se tienen evidencias de que este patógeno invasor actúa sinérgicamente junto a otros factores de estrés, como el déficit hídrico, lo cual justifica que se les dedique esfuerzos de investigación conjuntos.

GRUPO DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Ante la preocupación creciente sobre este problema, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), competente en sanidad vegetal, y el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITERD), competente en materia forestal, crearon en 2017 un grupo de trabajo orientado a concentrar los esfuerzos científico-técnicos de lucha contra la “seca”. Coordinado por ambos Ministerios, el grupo incluye a representantes de las comunidades autónomas más afectadas y a organismos de investigación y universidades que se dedican al estudio de este síndrome. El objetivo del grupo de trabajo es profundizar en el conocimiento y promover actuaciones concretas y prácticas que intenten poner freno a este complejo y grave problema. Está organizado en los siguientes subgrupos: 1) Inventario y seguimiento de focos de Seca, 2) Mejora genética y fisiológica, y 3) Gestión silvopastoral.

El **subgrupo 2**, de “**Mejora genética y fisiológica**”, pone en común diferentes líneas de trabajo sobre la base de los resultados de investigación previos en el ámbito de la selección y propagación de encina y alcornoque tolerantes a la podredumbre radical (Moreira et al. 2018; Martínez et al. 2020). La mejora genética forestal ha demostrado ser una solución óptima para otros problemas fitosanitarios, como por ejemplo para la grafiosis del olmo, la tinta del castaño o la afección del ciprés de Lawson. En agronomía son numerosos los casos exitosos de mejora vegetal, como, por ejemplo, la obtención de patrones de

aguacate resistentes a *Phytophthora cinnamomi*.

Así, tras las reuniones mantenidas de este subgrupo, se detectó la necesidad de iniciar un Programa Nacional a largo plazo para la conservación y mejora de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque. El programa, coordinado y gestionado por el MITERD, pretende seleccionar y propagar planta de encina y alcornoque tolerante a *Phytophthora cinnamomi* y/o estrés hídrico que pueda utilizarse en un futuro próximo para restaurar focos de “seca”.

ESTRATEGIAS DEL PROGRAMA

El programa se basa en primer lugar en la **reproducción sexual de material seleccionado**. Dado que la tolerancia a la podredumbre radical provocada por *P. cinnamomi* es hereditaria, se plantea el establecimiento de huertos semilleros, que son plantaciones de árboles seleccionados por sus caracteres hereditarios, desarrollados y tratados para producir y recolectar fácilmente cosechas de semilla abundantes. En este caso, se seleccionarán como componentes de cada huerto, genotipos, por especie y procedencia, que hayan mostrado su tolerancia en ensayos de vivero. La bellota producida en los huertos semilleros se espera que genere planta que haya heredado el carácter de tolerancia de sus progenitores. Esta estrategia tiene la ventaja de que garantiza una elevada variabilidad genética. El material se utilizaría en situaciones de regeneración de las masas naturales de encina y alcornoque afectadas por focos de “seca”.

La segunda estrategia es la **reproducción vegetativa del material**



Muestreo hojas

tolerante. Los genotipos que hayan mostrado mayor tolerancia a la enfermedad se propagarán vegetativamente a través de diferentes técnicas, principalmente de micropropagación, y serán registrados en el futuro como clones. Este material se utilizaría en situaciones más concretas, es decir en plantaciones con un carácter productivo o bien como patrones de injerto, en el que se podría injertar púas seleccionadas, por ejemplo, por su mayor producción de bellota o corcho.

Por último, el programa fomentará el **incremento del conocimiento de la variabilidad en la respuesta a estrés de ambas especies**, mediante la identificación de marcadores genéticos y moleculares de interés para la mejora. Por ello, incluye tareas relativas al estudio de la respuesta fisiológica de las especies frente a estreses bióticos y abióticos, patología, micropropagación, genética y multiómica.

Ensayo de campo en La Haza de la Concepción



TAREAS DEL PROGRAMA

A continuación, se describen brevemente cada una de las tareas de las que consta el Programa.

El **primer grupo de tareas** comprende:

- **Caracterización e identificación de árboles en focos de “seca” y selección de árboles “escape”.**

A través de la información de las CCAA y de los OPIs participantes, y con el apoyo de los resultados del Subgrupo de Trabajo de Inventario y seguimiento de focos de “seca”, se caracterizan y seleccionan, a través de un protocolo común, parcelas de muestreo y árboles “escape”, estos, árboles que dentro de un foco de “seca” donde se ha constatado la presencia de *Phytophthora*, no presentan síntomas externos. De dichos árboles se recolectan bellotas, hojas y muestras de suelo en el entorno próximo, y se caracteriza su comportamiento fisiológico a través de medidas de fotosíntesis y potencial hídrico. También se caracterizan “árboles susceptibles”, y se recogen muestras de su rizosfera para evaluar la composición de la microbiota del suelo. La comparación de la información procedente de los árboles susceptibles con la de los árboles escape permite caracterizar individuos que podrían presentar tolerancia a la podredumbre de raíz.

- **Caracterización e identificación de árboles para estudio de variabilidad poblacional**

Esta tarea pretende seleccionar y recolectar material de árboles fuera de los focos de “seca”, en una representación sistematizada de las poblaciones de encina y alcornoque a nivel nacional, y analizar diferencias entre poblaciones, comparándolas, a su vez, con los resultados del material recolectado en árboles escape. El estudio tiene como objetivos (i) describir el comportamiento de la encina y del alcornoque frente al estrés hídrico, a la afección por *P. cinnamomi*, y a ambos factores de estrés de forma conjunta, (ii) elucidar la importancia relativa de cada uno de los factores de estrés en la respuesta de la plantas, (iii) identificar poblaciones, progenitores y genotipos tolerantes a los factores anteriores, (iv) cuantificar estimas de mejora, y (v) validar marcadores moleculares funcionales EST-SSR para el estudio de variabilidad-respuesta de las especies. Este objetivo incluye nueve poblaciones por especie, que en el caso de la encina se corresponden con nueve regiones de procedencia; y en el alcornoque se corresponden con las 9 regiones de procedencia principales identificadas para la especie.

- **Propagación de árboles “escape” y de árboles fuera de focos para evaluar en su descendencia la tolerancia al estrés y el sistema radicular**

De las bellotas recolectadas, tanto de árboles escape, como de los del estudio de variabilidad poblacional,

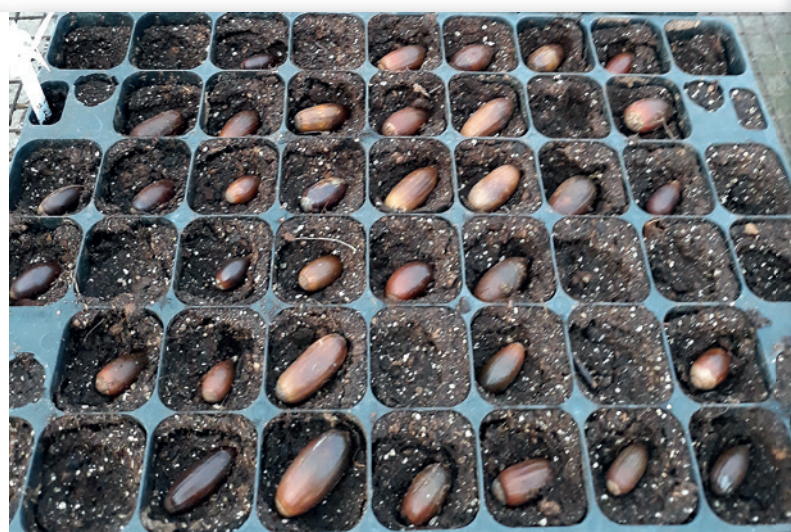
se está produciendo planta destinada a ensayos de tolerancia. Las plantas se producen en tres lugares con condiciones ambientales distintas: norte (vivero de TRAGSA en Maceda, Ourense), centro (Grado de Forestales de la Universidad de Extremadura, Plasencia) y sur (Vivero de la Universidad de Huelva). Los ensayos consistirán en inocular la planta con el patógeno y someter a ésta a períodos de sequía, simulando lo que acontece en el monte. Los ciclos durarán dos períodos vegetativos consecutivos. En Plasencia y en Huelva se evaluará el sistema radicular de aquellas procedencias de respuesta al estrés hídrico más contrastada. Las plantas supervivientes pasarán a integrar la colección de materiales tolerantes, que serán en el futuro testados como clones. Durante este primer año se han ensayado un total de 18.350 plantas.

- **Propagación clonal y micropropagación del material evaluado y criopreservación**

Esta tarea, a desarrollar por los grupos del IMIDRA, IIAG – CSIC, Universidad de Valencia, Universidad de Huelva y TRAGSA, tiene como finalidad principal la obtención de copias clonales de cada genotipo necesarias para realizar los ensayos de campo, los ensayos de confirmación de tolerancia y la instalación de las poblaciones de mejora y las plantaciones de producción de material forestal de reproducción (MFR). Secundaria-



Bellotas de encina secando tras su desinfección



Siembra de un bloque de ensayo según diseño

mente, se pretende poner a punto las técnicas que permitan la incorporación de la multiplicación clonal a los sistemas de producción de MFR de las especies comprendidas en el programa. En este sentido resulta fundamental desarrollar y transferir las *técnicas de multiplicación, bien por embriogénesis somática o por organogénesis*, con el fin de que éstas puedan ser empleadas en la multiplicación masiva de los genotipos de mayor valor por su tolerancia para su uso como portainjertos o como productores directos de bellota o corcho. Los genotipos con mejor respuesta a la multiplicación vegetativa pasarán a componer una *variedad sintética*, que se podrá usar en selvicultura clonal. El resto, se implantará en huertos semilleros o bancos clonales, formando las poblaciones de mejora para la explotación y continuación del programa.

Las técnicas varían en función de la especie y de la edad del material. Existe mayor dificultad en micropropagar encina que alcornoque y árboles adultos que planta juvenil. Cada genotipo dentro de cada especie presenta, sin embargo, una respuesta diferente al ser propagado. Cobra también importancia la conservación a largo plazo de las distintas líneas

embriogénicas inducidas, por lo que se incorporarán técnicas de crioconservación ya desarrolladas y aplicadas con éxito tanto a encina como a alcornoque por el IIAG-CSIC.

- **Evaluación de la aptitud como portainjertos del material tolerante**

Esta tarea tiene como finalidad evaluar y seleccionar, por su aptitud como portainjerto, aquellos genotipos que de entre los materiales tolerantes presenten una mayor compatibilidad. Se ensayarán los genotipos de alcornoque tengan mayor aptitud a la micropropagación para asegurar un suministro más rápido de vitropplantas aclimatadas. De cada uno de los genotipos se injertarán doce plantas en cada período de injertado, que incluye tres momentos diferentes dentro de la ventana de oportunidad anual. Se emplearán como donantes dos árboles seleccionados por su porcentaje de compatibilidad que mejor resultado hayan dado en los ensayos previos del Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales El Serranillo (Gadalupe), dependiente del MITERD.

- **Ensayos de tolerancia en campo**

Se ha considerado importante

que el material seleccionado como tolerante en vivero sea también testado en campo. Para ello se prevé instalar cuatro parcelas entre las comunidades autónomas de Andalucía, Extremadura y Castilla - La Mancha que se instalarán en zonas afectadas por podredumbre radical, con terreno lo más uniforme posible, y donde se haya comprobado la presencia del oomiceto. Se instalará todo el material tolerante del que haya sido posible obtener copias clonales.

- **Instalación de poblaciones de mejora y de materiales de base**

El cuarto año del programa se pretenden instalar dos huertos semilleros con los materiales seleccionados de encina y alcornoque y bancos clonales en diferentes comunidades autónomas. Se contempla la inclusión del resto de los materiales clonales para en el futuro establecer un huerto semillero por región de procedencia y especie (5 de alcornoque y 1 de encina).

- **Autorización de materiales de base para la producción de material forestal de reproducción**

Los materiales seleccionados durante la ejecución del programa que



injerto de encina sobre alcornoque



Equipo ERSAF caracterizando árboles en un foco de seca



Evaluación de ensayo de tolerancia en vivero de la Universidad de Extremadura



Deshidratación de hojas

hayan demostrado su superioridad como materiales tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* y/o sequía, serán propuestos para ser autorizados como materiales de base a los órganos competentes de las comunidades autónomas donde se hayan realizado los ensayos y posteriormente registrados en el Registro y Catálogo Nacional de Materiales de Base. Esta tarea permitirá la disposición de materiales forestales de reproducción en el mercado para restauraciones de zonas afectadas por podredumbre radical.

Por su parte, el **segundo grupo de tareas** comprende las siguientes actividades:

- **Ensayos de tolerancia *in vitro***
Esta tarea, a realizar por el grupo

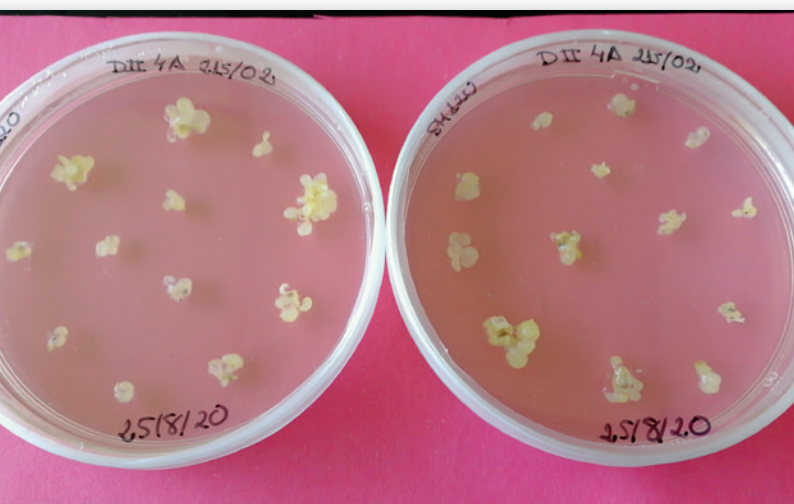
UPM-UCM, tiene como finalidad desarrollar un protocolo que permita evaluar la tolerancia *in vitro* de diferentes genotipos de encina y alcornoque a *P. cinnamomi* y correlacionar los resultados obtenidos con los del test de tolerancia en vivero. Se pretende acortar los períodos de ensayo y acelerar los resultados del programa. Se realizará un análisis de correlación entre los resultados obtenidos en laboratorio y en vivero para determinar la validez del test.

- **Búsqueda de marcadores moleculares de respuesta a resistencia/tolerancia**

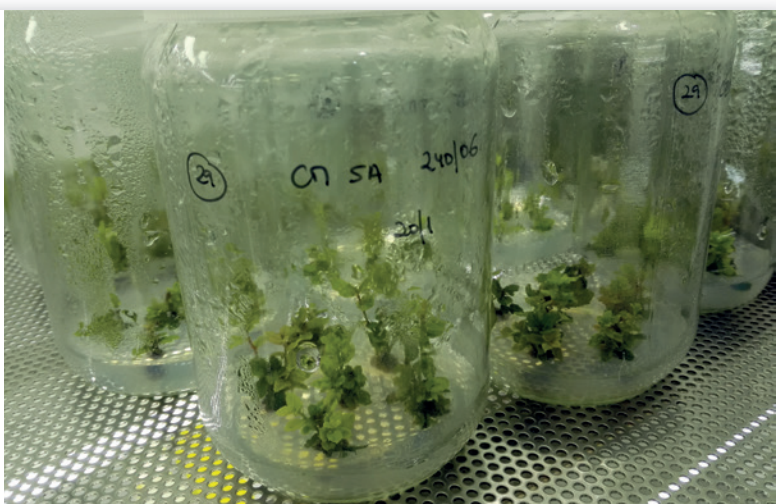
Estas tareas se realizarán utilizando protocolos desarrollados y publicados por la Universidad de Córdoba

para encina y por la Universidad de Extremadura para castaño (Alcaide et al., 2020). Bellotas y hojas se utilizarán para estimar variabilidad (marcadores de DNA-microsatélites) y realizar análisis multiómicos de respuesta al patógeno, así como para la identificación de marcadores asociados a la resistencia al patógeno. Con ello se espera identificar, en el futuro, genotipos de encina y alcornoque tolerantes mediante técnicas analíticas más sencillas, permitiendo acelerar la selección sin necesidad de hacer ensayos de vivero.

- **Recogida y análisis de muestras para estudio del componente biológico del suelo**
Como complemento al conoci-



Embriogénesis somática de alcornoque adulto



Cultivo de yemas axilares de alcornoque

miento del proceso infeccioso de *P. cinnamomi* se está estudiando el microbioma del suelo y la rizosfera de árboles candidatos a tolerantes (por no expresar síntomas) y de árboles infectados. La comunidad microbiana del suelo puede desempeñar un papel fundamental en la relación del árbol y el patógeno. La presencia en la rizosfera de determinados hongos, como las micorrizas, puede enmascarar síntomas como la defoliación en árboles afectados por *Phytophthora* (Corcobado et al., 2014; Ruiz-Gómez et al., 2019). Por ello, se busca diagnosticar la presencia de oomicetos en la rizosfera de árboles escape y no escape y la riqueza y diversidad del microbioma del suelo mediante técnicas de metabarcoding, así como caracterizar el suelo en el que se producen las diferentes respuestas, de acuerdo al protocolo establecido por el grupo ERSF de la Universidad de Córdoba. Este análisis permitirá identificar respuestas de los árboles frente al patógeno, relacionando la ausencia de síntomas con la estrategia de escape o con la tolerancia, y aportar información valiosa sobre la biodiversidad del suelo.

CONCLUSIONES

Aunque el síndrome de la “seca” se lleva estudiando desde hace décadas en nuestro país, hasta el momento no se había promovido la búsqueda coordinada de resultados prácticos a nivel estatal. Así, los resultados esperados de este Programa Nacional pueden contribuir en gran medida a paliar este vacío, al obtener plantas de encina y de alcornoque tolerantes que puedan ser utilizadas en el futuro en zonas afectadas por *P. cinnamomi*. Se avanzará enormemente en el conocimiento de los marcadores moleculares, el componente biológico del suelo y el desarrollo y transferencia de las técnicas de micropropagación, como parte de una estrategia conjunta de lucha contra la enfermedad. Sin embargo, no hay que olvidar que el problema de la “seca” es muy complejo y debe ser abordado desde un punto de vista integral. En cada caso concreto se debe incorporar una gestión silvopastoral particular para combatir la seca, siendo la mejo-

ra genética un complemento más y no la única solución.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todos los miembros del subgrupo de trabajo de mejora genética y fisiológica frente a *La Seca*, en especial a:

- G. Fernández, D. León, C. Ane-gón, L. Prieto, J.L. Peñuelas, J.L. Nicolas, N. Herrero y E. Pérez del MITERD.
- J.M. Jaquotot y J.M. Cobos del MAPA
- J.R. Guzmán y J.M. Ruiz de la Junta de Andalucía.
- J.L. del Pozo, J. González de Miranda y F.J. Nieto de la Junta de Extremadura
- D. García, M. Rodríguez y F.M. Vázquez del CICYTEX.
- M. Espinosa de la Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha.
- L. Ocaña, L. Luquero, L. Rodríguez, F. Roman, C. del Campo y A. Quevedo de TRAGSA.
- R.M. Navarro, J. Jorrín, R. Sánchez-Cuesta, C. de Miguel Rojas, M.A. Castillejo B. San Eufasio y M.A. Martín de la Universidad de Córdoba
- F.J. Dorado, F. Alcaide, R. González, A. Camisón, M. Vivas, R. Bo-

nal, M. Rodríguez y F. Pulido de la Universidad de Extremadura.

- M. Fernández y M.L. Fernández Universidad de Huelva.
- J.R. González Adrados, M. Berrocal y J.A. Domínguez Núñez de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM)
- A. Gómez Garay, B. Pintos y T. Solís de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).
- A. Alborch, M.A. Sánchez y M.A. Pérez-Oliver de la Universidad de Valencia.
- I. Hernández, C. Villarreal del IMI-DRA.
- M.T. Martínez F.J. Vieitez y F. Mos-teiro del Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG - CSIC).
- R. Alia y D. Barba del CIFOR-INIA.

Durante los cuatro primeros años el Programa de mejora y conservación de los recursos genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la “seca” cuenta con una cofinanciación del FEADER al 75%, al estar estas actividades incluidas en el Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014 - 2020, dentro de la submedida 15.2, de apoyo al fomento y la conservación de los recursos genéticos forestales.

REFERENCIAS

- Alcaide, F., Solla, A., Cherubini, M. et al. (2020). Adaptive evolution of chestnut forests to the impact of ink disease in Spain. *J. Syst. Evol.* 58:504-516
- Carrasco-Gotarredona et al. (2009). Procesos de Decaimiento Forestal (la Seca), Situación del Conocimiento. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Corcobado, T., Cubera, E., Moreno, G. et al. (2013). *Quercus ilex* forests are influenced by annual variations in water table, soil water deficit and fine root loss caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Agric. For. Meteorol.* 169: 92-99.
- Corcobado, T., Vivas, M.; Moreno, G.; Solla, A. (2014). Ectomycorrhizal symbiosis in declining and non-declining *Quercus ilex* trees infected with or free of *Phytophthora cinnamomi*. *For. Ecol. Manage.* 324: 72-80
- Martínez, M.T., Vieitez, F.J., Solla, A. et al. 2020. Vegetative propagation of *Phytophthora cinnamomi*-tolerant holm oak genotypes by axillary budding and somatic embryogenesis. *Forests* 11, 841.
- Martín, J. A., Sobrino-Plata, J., Rodríguez-Calcerrada, J., Collada, C., Gil, L. (2019). Breeding and scientific advances in the fight against Dutch elm disease: Will they allow the use of elms in forest restoration? *New Forests*, 50, 183-215.
- Moreira, A. C., Tapias, R., Fernandes, L., et al. (2018). Field susceptibility of cork oak trees with different provenances to *Phytophthora cinnamomi*. *For. Pathol.* 48, e12461.
- Rodríguez, L., Cuenca, B., López, C. A., Lario, F. J., & Ocaña, L. (2005). Selection of *Castanea sativa* Mill. genotypes resistant to ink disease in Galicia (Spain). *Acta Horticult.* 693, 645.
- Ruiz-Gomez, F. J.; Navarro-Cerrillo, R.; Osswald, W. et al. (2019). Assessment of functional and structural changes of soil fungal and oomycete communities in holm oak declined dehesas through metabarcoding análisis. *Sci. Rep.* 9, 5315
- Sniezko, R. A., Hansen, E. M. (2000). Screening and breeding program for genetic resistance to *Phytophthora lateralis* in Port-Orford-cedar (*Chamaecyparis lawsoniana*): early results. *Phytophthora Diseases of Forest Trees*, 91-94.