



CONSERVATION AND RESTORATION
OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS PRIORITY HABITAT
IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN
LIFE20 NAT/ES/000021



Mapa de estado y de riesgo de la *Phytophthora alni*



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



Mapa de estado y de riesgo de la *Phytophthora alni*

Acción C5.- Protección frente a agentes fitopatológicos



La Fundación Cesefor
está comprometida
en la lucha contra el
cambio climático



Plan de Igualdad Fundación Cesefor:
Comprometida con la igualdad
efectiva de oportunidades entre
mujeres y hombres

**Fundación Centro de Servicios y promoción Forestal y de su Industria de
Castilla y León (Fundación Cesefor)**

31/05/2024

Proyecto LIFE20 NAT/ES/000021

CONSERVATION AND RESTORATION OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS
PRIORITY HABITAT IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN

Proyecto LIFE Nature and Biodiversity

Inicio del proyecto: 01/09/2021 Fin del Proyecto: 31/08/2025



CONSERVATION AND RESTORATION
OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS PRIORITY HABITAT
IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN
LIFE20 NAT/ES/000021



www.lifealnustaejo.eu

SUMMARY

Due to the problem of *Phytophthora alni* in the Iberian Peninsula, we want to know the current status of this disease in the study areas of the Life Alnus Taejo project. For this purpose, we want to make some maps of the current and future status and some risk maps of *Phytophthora*.

This document is not finalised, but two annexes are presented detailing the methodology we used to collect the alder samples and their laboratory study.

Annex I describes the laboratory methodology used to try to identify *Phytophthora alni* in water samples from the river Alagón. In Annex II, the protocol for collecting samples is presented in more detail for different study areas, specifically the fungus is being studied in water, soil, root and leaf samples. Once we have all the laboratory results, we will obtain very valuable information to know the current state of the riverbanks in the study areas of our project, and therefore the state of risk.



LIFE
ALNUS
TAEJO

CONSERVATION AND RESTORATION
OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS PRIORITY HABITAT
IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN
LIFE20 NAT/ES/000021



NATURA 2000

Informe de detección de *Phytophthora alni* en el río Alagón



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



Informe de detección de *Phytophthora alni* en el río Alagón

Acción C5.- Protección frente a agentes fitopatológicos



La Fundación Cesefor
está comprometida
en la lucha contra el
cambio climático



Plan de Igualdad Fundación Cesefor:
Comprometida con la igualdad
efectiva de oportunidades entre
mujeres y hombres

Fundación Cesefor

03/05/2024

Proyecto LIFE20 NAT/ES/000021

CONSERVATION AND RESTORATION OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS
PRIORITY HABITAT IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN

Proyecto LIFE Nature and Biodiversity

Inicio del proyecto: 01/09/2021 Fin del Proyecto: 31/08/2025



CONSERVATION AND RESTORATION
OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS PRIORITY HABITAT
IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN
LIFE20 NAT/ES/000021



www.lifealnustaejo.eu

INDICE

1.1.	Puesta a punto de la PCR para la detección de <i>P. alni</i> a partir de ADN genómico de <i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>uniformis</i> CECT 20785	2
1.2.	Diseño de un ADN sintético como control de PCR	4
1.3.	Correlación entre masa de ADN detectada por PCR y carga microbiana	7
1.4.	Puesta a punto de la PCR a partir de micelio de <i>P. alni</i> subsp. <i>uniformis</i> CECT 207857	
1.5.	Procesamiento de agua del río Alagón presuntamente contaminada con <i>P. alni</i>	9
1.6.	Puesta a punto de la detección de <i>P. alni</i> en agua artificialmente contaminada con <i>P. alni</i> subsp. <i>uniformis</i> CECT 20785	11
1.6.1.	Selección de cebo y condiciones de cebado	11
1.6.2.	Límite de detección en PCR: dilución de ADN molde	15
1.6.3.	Límite de detección en PCR: reducción de la carga microbiológica	16
1.7.	Diagnóstico rápido de <i>P. alni</i> mediante prueba inmunológica	18
2.	Conclusiones	19
3.	Bibliografía	21

Fundamento y objetivo

Phytophthora es un género de patógenos vegetales del grupo de los oomicetos. Los oomicetos comparten con los hongos ciertos aspectos de su ciclo vital, como son el estadio filamentoso y la reproducción por esporas. Como diferencias, los oomicetos carecen de septos, por lo que las hifas son plurinucleadas, y la pared celular tiene beta glucanos, y no quitina. Muchas especies de *Phytophthora* tienen zoosporas acuáticas carentes de pared celular con dos flagelos. Las zoosporas se encuentran inmersas en películas de agua en la superficie de las hojas, en el suelo, en medios hidropónicos y en masas naturales de agua. La dispersión a través de un curso de agua es el modo de colonizar nuevas zonas. Así, el patógeno puede adherirse a la superficie vegetal retrayendo los flagelos y secretando un mucílago de sujeción. A continuación, ocurre la germinación y los tubos penetran la epidermis de la especie vegetal iniciando el proceso infectivo (Fry y Grünwald, 2010). El género *Phytophthora* también forma oosporas que pueden sobrevivir durante años en el suelo en ausencia de un hospedador vegetal (Nave y col., 2021).

Por lo general, los análisis de presencia o ausencia de *Phytophthora alni* en aliso (*Alnus glutinosa*) se realizan desde una muestra del árbol que comprende corteza y madera y que se toma con un hacha. De esta forma el árbol resulta comprometido, ya que esta lesión produce una debilidad que pueden aprovechar distintos patógenos.

Con el fin de evitar la lesión debida al corte en un muestreo tradicional esta investigación pretende determinar si es posible la detección del oomiceto *P. alni* en agua de río.

1.1. Puesta a punto de la PCR para la detección de *P. alni* a partir de ADN genómico de *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* CECT 20785

Los métodos clásicos para diagnóstico de ciertas patologías pasan por el establecimiento de cultivos, microscopía, tinción química, pruebas bioquímicas o

inmunológicas. Son métodos que requieren un conocimiento específico de la biología del patógeno en estudio e implican tiempo en la diagnosis de la enfermedad. Los métodos de diagnóstico molecular basados en el ADN implican la detección de marcadores específicos del patógeno. En este caso, se requiere de la disponibilidad de al menos una parte del genoma del microorganismo que se pretende detectar, pero el desarrollo del procedimiento de diagnosis, esto es, la técnica molecular aplicada, es genérico y rutinario una vez que se ha adaptado a las condiciones del ensayo específico.

Para el desarrollo de un sistema de diagnóstico a través de ADN que permitiese la identificación de *P. alni* se requirió de un ADN molde, o diana, perteneciente al microorganismo *P. alni* y de parejas de cebadores específicas que amplifiquen este ADN. Como referencia prácticamente universal en la detección de *P. alni*, distintos servicios e investigadores utilizan la información publicada por Iloos y col. (2005), aunque existen posibilidades de otros biomarcadores (Iloos y col., 2006, Sims y col., 2017, Aguayo y col., 2014). Iloos y col. (2005) describen secuencias nucleotídicas específicas de *P. alni* y discriminativas de las subespecies *alni*, *multiformis* y *uniformis*. La pareja de oligonucleótidos PA-F/PA-R es suficiente para identificar las 3 subespecies de *P. alni*, mientras que la pareja PAM-F/PAM-R identifica *P. alni* subsp. *alni* y *P. alni* subsp. *multiformis* y la pareja PAU-F/PAU-R identifica *P. alni* subsp. *alni* y *P. alni* subsp. *uniformis* (Iloos y col., 2005). Este conjunto de 6 oligonucleótidos fue adquirido a ThermoFisher Scientific.

El ADN molde necesario para poner a punto la(s) PCR se adquirió a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y pertenece al único registro de *P. alni* disponible en esta colección. Está codificado como CECT 20785, *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* y corresponde a un aislado de corteza de *A. glutinosa* en Silleda (Pontevedra) en el año 2011. Según lo descrito por Iloos y col. (2005), los cebadores PA-F/PA-R y PAU-F/PAU-R deben amplificar sobre este molde, pero no así la pareja PAM-F/PAM-R, que discrimina otra subespecie del patógeno.

Una vez que dispusimos de los cebadores y molécula molde de ADN genómico *P. alni* subsp. *uniformis* se pudo comprobar su funcionalidad. En primer lugar, se probaron los cebadores PA-F/R, de uso general para las 3 subespecies de *P. alni*, sobre diluciones de ADN de genómico a diferentes temperaturas. En nuestras condiciones la temperatura óptima de

hibridación para la síntesis del amplicón PA de 447 pb fue de 57,6 °C, inferior a la descrita por Iloos et al. (2005), y se determinó que cantidades de 1,075 ng de ADN genómico aún son detectadas (Figura 1).

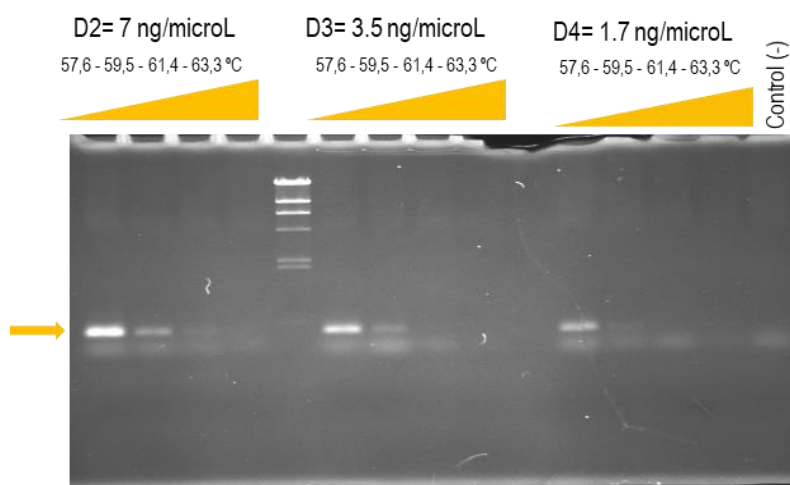


Figura 1. Ajuste de las condiciones de PCR para la pareja de cebadores PA-F/R sobre ADN genómico. Se probaron distintas concentraciones de ADN molde (cada reacción lleva 0.6 microL de la dilución indicada, D2 a D4, en 20 microL finales) y temperatura de hibridación (gradiente de 57,6 a 63,3 °C). La flecha naranja indica la posición del amplicón PA. El control de reacción negativo, sin DNAg, carece de amplificación (Control(-), carril derecho).

La amplificación con la pareja PAU-F/R sobre el ADN genómico de *P. alni* subsp. *uniformis*, no fue posible, quizá en concordancia con que la sensibilidad de estos cebadores es menor que con la de las otras 2 parejas de cebadores y, además, varía entre subespecies (Iloos et al., 2005).

1.2. Diseño de un ADN sintético como control de PCR

Para ayudar a diferenciar los falsos negativos debidos a la posible presencia de sustancias inhibidoras cuando se trabaja con muestras reales, y, además, tener un ADN sobre el que poder optimizar la utilización de los cebadores PAM-F/PAM-R, se construyó una secuencia de ADN sintética de 794 pb con sitios de reconocimiento de los cebadores PAM-F/PAM-R además de los del par PA-F/R (Figura 2).

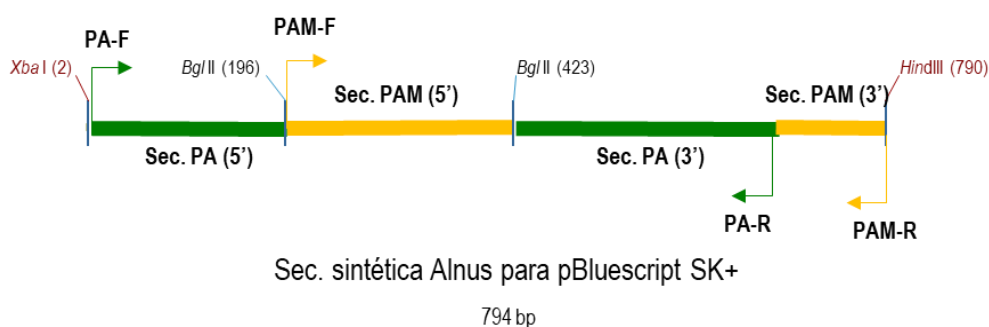


Figura 2. Diseño de una secuencia de ADN artificial para ensayo de PCR con los cebadores PA-F/R y PAM-F/R.

El diseño de la secuencia de ADN sintética utilizó como moldes las secuencias nucleotídicas PA (GenBank: DQ403799.1) y PAM (GenBank: DQ097845.1) de *P. alni*. En primer lugar, en la secuencia PA de 447 pb se modificaron 2 nucleótidos del segmento agattg (posición 196) para obtener un sitio de restricción BglII (agatct). En este sitio BglII se insertaron 221 nt del extremo 5' de la secuencia nucleotídica PAM, donde se contiene la secuencia del cebador PAM-F, seguido de un nuevo sitio de restricción BglII. A continuación del sitio BglII se continuó con la secuencia PA (253 nt, hasta el lugar de hibridación del cebador PA-R) y se añadieron 108 nt del extremo 3' de la secuencia PAM, donde se contiene el cebador PAM-R. Para clonación en pBluescript SK+ la secuencia artificial de 794 nt se flanqueó por los sitios XbaI y HindIII. Como dato adicional, la secuencia sintética puede ser digerida con BglII y religada para reconstituir el fragmento silvestre PA, permaneciendo una cicatriz artificial con la secuencia BglII.

A partir de este diseño del plásmido pAlnus la empresa GeneCust llevó a cabo la síntesis de la molécula.

Una PCR sobre este ADN sintético control, pAlnus, con los cebadores PA-F y PA-R produce un amplicón PA de 674 pb, a diferencia del tamaño producido sobre un ADN silvestre del patógeno, que es de 447 pb (apartado 1). Esto permite diferenciar, a partir de la comparación de los amplicones obtenidos desde muestras reales de *P. alni* cebadas y no

cebadas con este ADN sintético, posibles eventos de inhibición de la reacción de amplificación.

Con los cebadores PAM-F y PAM-R y el molde pAlnus también se amplifica un fragmento de ADN. En este caso el tamaño de amplicón es igual al que originaría el molde de ADN silvestre perteneciente a *P. alni* subsp. *multiformis* (588 pb), pero de secuencia diferente, ya que procede de la fusión de dos segmentos de ADN (PAM y PA). De esta forma, contando con el ADN genómico *P. alni* subsp. *uniformis* y el ADN sintético, se dispuso de los moldes de ADN necesarios para la puesta a punto de las 3 PCR discriminativas de *P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *multiformis* y *P. alni* subsp. *uniformis*.

La utilización en PCR de las parejas PA-F/R y PAM-F/R sobre el plásmido que porta el ADN sintético rindió los amplicones de tamaño esperado, PA de 674 pb y PAM de 588 pb. En ambos casos la sensibilidad de la reacción es inferior a 7,9 pg (tamaño de la molécula molde de 3,6 kb) (Figura 3).

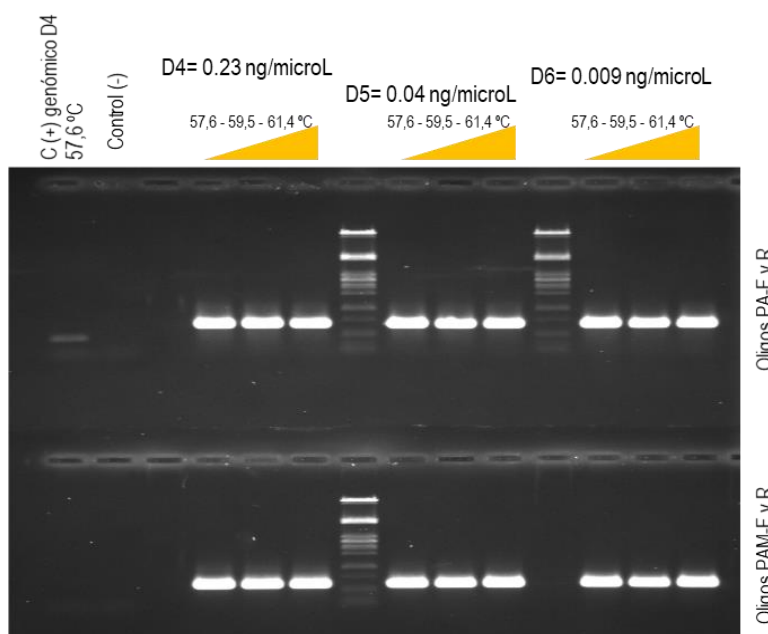


Figura 3. Ajuste de las condiciones de PCR para la pareja de cebadores PA-F/R (arriba) y PAM-F/R (abajo) sobre el molde de ADN sintético. Se probaron distintas concentraciones de ADN molde (cada reacción lleva 0.85 microL de la dilución indicada, D4 a D6) y temperatura de hibridación (gradiente de 57,6 a 61,4 °C). El primer pocillo de ambas líneas, superior e

inferior, C(+), corresponde a las reacciones con PA-F/R o PAM-F/R sobre la dilución D4 del ADN genómico a 57,6 °C, por lo que en la reacción de la línea inferior no hay amplicón porque no existe sitio de hibridación para la pareja de oligos PAM-F/R. Nótese la diferencia de tamaño de amplicón PA en función del molde usado y la diferente concentración de los moldes de ADN usados en la figura 3 (ADN genómico) y en esta figura (ADN sintético de 3,6 kb de tamaño).

1.3. Correlación entre masa de ADN detectada por PCR y carga microbiana

El establecimiento de una correlación entre la masa de ADN detectada mediante PCR y el tamaño del genoma, para así establecer cuántos genomas son detectados con esta técnica, es una cuestión difícil de resolver. Por un lado, los filamentos de la forma micelial de *Phytophthora* son multinucleados, por otro, no existen datos sobre el tamaño de genoma de *P. alni*, y, además, las 3 subespecies de *P. alni* descritas clásicamente tienen distinto nivel de ploidía (Husson y col., 2015). Según estos autores, *P. alni* subsp. *alni* sería una especie alotriploide híbrida, que contiene la mitad del genoma de cada uno de sus progenitores, *P. alni* subsp. *multiformis* y *P. alni* subsp. *uniformis*, que a su vez serían alotetraploide y diploide, respectivamente. En consecuencia, se proponen nuevos nombres taxonómicos formales para ellos: *P. xalni*, *P. xmultiformis* y *P. uniformis* (Husson y col., 2015). Colateralmente, y según el proyecto de secuenciación de 31 distintas especies de *Phytophthora*, entre las que no se encuentra ninguna del complejo *P. alni*, el tamaño de genoma de puede variar entre 37,3 y 107,8 Mb (Kronmiller y col., 2023).

1.4. Puesta a punto de la PCR a partir de micelio de *P. alni* subsp. *uniformis* CECT 20785

Una vez optimizada la PCR desde el ADN molde el paso siguiente es establecer un sistema de rápido de ruptura de la célula o del micelio que además permita realizar la PCR directamente desde este material, sin necesidad de extraer el ADN.

Para determinar cuál puede ser la mínima intervención posible que rompa micelio y deje accesible el ADN, desde un cultivo en medio V8 de *P. alni subsp. uniformis* se tomaron pequeñas porciones de micelio aéreo en microtubos con 150 microL de agua. A estos tubos se aplicó 3 condiciones distintas, combinando tratamientos mecánicos y/o térmicos, reflejados en tabla de la figura 4. El resultado de la PCR mostró que el procedimiento A, 4 ciclos de ruptura mecánica en vórtex con bolas de vidrio (*glass beads*, de 212-300 micras, Sigma) durante 1 minuto seguido de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, libera ADN suficiente para el proceso de amplificación. Las condiciones de 3 ciclos de congelación y calentamiento a 65 °C o una desnaturalización prolongada a 95 °C durante 20 min (condiciones B o C, respectivamente) no rindieron el amplicón (figura 4, panel de la izquierda).

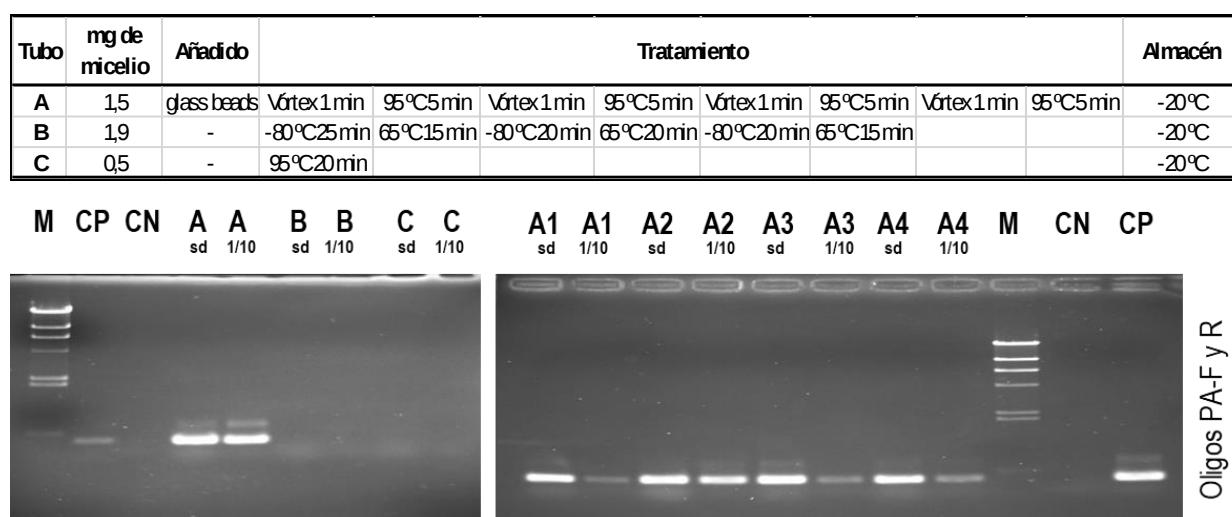


Figura 4. Puesta a punto de la PCR con la pareja PA-F/R a partir de micelio *P. alni subsp. uniformis*. En la parte superior se detallan las 3 condiciones de ruptura ensayadas. En la parte inferior izquierda el resultado de la PCR con la suspensión proveniente de los tratamientos A, B y C. En la parte inferior derecha el resultado de la PCR con el molde proveniente del tratamiento A obtenido tras 1 ciclo, 2, 3 o 4 ciclos de agitación y calentamiento (A1, A2, A3 o A4, respectivamente). En todos los casos se usaron 5 microL de la suspensión sin diluir (sd) o en dilución 1/10 en 20 microL de reacción. M se refiere al marcador de tamaños y CP y CN a los controles positivo y negativo.

Tomando como referencia la condición A de la figura 4, se optimizó el proceso para ruptura de las membranas celulares variando el número de ciclos de agitación y calentamiento (figura 4, panel de la derecha). De esta manera se determinó que un único ciclo de agitación y desnaturalización es suficiente para la liberación de ADN desde micelio y la obtención del amplicón. El procedimiento debe seguir la siguiente secuencia:

- 1,5-3 mg de micelio tomado de una placa de cultivo en 100-150 microL de agua con bolas de vidrio de 212-300 micras
- 1 minuto de agitación en vórtex
- 5 minutos de desnaturalización a 95 °C

1.5. Procesamiento de agua del río Alagón presuntamente contaminada con *P. alni*

El aislamiento de *Phytophthora* se puede realizar a partir del tejido vegetal infectado colocado sobre una placa de cultivo con un medio selectivo que permitirá el desarrollo del patógeno. Es a partir de este cultivo sobre el que se utilizan las metodologías de microscopía o PCR para confirmar su identidad. El aislamiento también es posible a partir de suelo o sustrato y agua (Martin y col., 2012; Aguayo y col., 2014; Sims y col., 2017). En estos casos, para recuperar el patógeno en un cultivo microbiológico se utilizan como trampa tejidos vegetales. El trampeo o cebado (*baiting*) consiste en la flotación de un cebo vegetal atractivo para las zoosporas que se hallan en suspensión líquida o como oosporas durmientes. Las esporas colonizan estos cebos que luego se colocan sobre un medio de cultivo. Las condiciones de trampeo varían según la especie de *Phytophthora*, ya que existe una preferencia selectiva por el material vegetal que se usa como cebo. Tradicionalmente se venían utilizando frutos como manzana o limón, aunque ahora se opta por hojas de arbustos o árboles de textura coriácea, como camelia, aguacate o roble (Martin y col., 2012). La especie *P. alni* parece tener preferencia por la hoja de rododendro. El tiempo de incubación del trampeo depende en gran medida de la temperatura del agua, aunque por encima de 15°C el proceso de infección puede ser de 3 a 7 días (Martin y col., 2012).

Se recibieron dos muestras de agua del río Alagón presuntamente infectadas con *P. alni* (entornos de San Esteban de la Sierra y Santibáñez de la Sierra, Salamanca). El agua (0,9 L) se pasó por papel de filtro para eliminar partículas a una botella de cristal Pyrex de 1 L. Para confeccionar la trampa sobre una gasa quirúrgica se dispusieron 4-5 cubos (10-7 mm de lado) cortados del interior de una manzana comercial tipo Golden y 5-6 cuentas de cristal (0,5 cm de diámetro) para añadir peso. Los paquetes se cerraron mediante atadura con cuerda y se sumergieron un par de cm bajo el nivel del agua filtrada. Las botellas cerradas se incubaron a unos 25 °C sobre la mesa durante 44 horas con fotoperiodo natural y luz indirecta. Al cabo de este tiempo, 10 mL de agua se filtraron por 0,22 micras (25 mm de diámetro) y el filtro se incubó en microtubo con 0,5 mL de ClNa 0,9 % durante 1 h con agitación suave para liberar los microorganismos retenidos en él. Los pedazos de manzana usados como cebo se recuperaron a un tubo con 5 mL de ClNa 0,9 %, se agitaron e incubaron durante 1 h. De ambos tipos de preparaciones se hicieron diluciones que se sembraron en medio V8-APR y V8-APR-RB (suplementado con Ampicilina, Pimaricina y Rifampicina, y Rosa de bengala, para evitar el crecimiento de bacterias y hongos) y se sometieron a PCR con los cebadores PA-F/R.

Tras incubación a 25 °C ninguna de las colonias resultantes en V8-APR mostró aspecto compatible con las descripciones del género *Phytophthora* (figura 5). Por otro lado, la PCR realizada con las suspensiones obtenidas del cebado o del filtrado no originó ningún amplicón (resultado no mostrado).

De estos resultados negativos se concluyó que, o bien y en contra de lo esperado, las muestras de agua de río carecían del patógeno o las condiciones de cebado no fueron las adecuadas como para promover la implantación del patógeno en el cebo.



Figura 5. Ejemplo de los cultivos obtenidos con la muestra de agua de San Esteban de la Sierra donde se observan morfologías bacteriana o levaduriforme, pero no del género *Phytophthora*.

1.6. Puesta a punto de la detección de *P. alni* en agua artificialmente contaminada con *P. alni* subsp. *uniformis* CECT 20785

1.6.1. Selección de cebo y condiciones de cebado

Después de estos resultados negativos sobre muestras reales se acordó establecer el protocolo de detección del patógeno infectando artificialmente el agua con la cepa adquirida a CECT, *P. alni* subsp. *uniformis*, CECT 20785.

Se realizó el trapeo con tiras cortadas de hojas de rododendro y/o cubos de manzana, libre de pesticidas. Ambos materiales fueron higienizados con etanol y lejía. Para la infección del agua (de río, esterilizada mediante autoclave) se usaron tacos del cultivo de *P. alni* subsp. *uniformis* en medio V8. Se establecieron seis condiciones distintas según el tipo de cebo (manzana u hoja de rododendro) y la carga microbiana añadida (adición de tacos del cultivo microbiológico con/sin impregnación del cebo con el micelio del patógeno, figura 5).

Los atados de cebo tenían 3 tiras de hoja (0,8 * 2 cm) y/o 6 cubos de manzana (0,6 cm de lado) con 10 o 20 tacos (0,6 cm de diámetro) del patógeno en 150 mL de agua contenida en botellas de 0,25 L de capacidad. Las botellas cerradas se incubaron a temperatura ambiente y fotoperiodo natural, pero sin luz directa, durante 3 días.

Tras los 3 días de incubación se procesaron el agua y los cebos. A través de filtro de 0,22 micras (PES) se pasaron 20 mL del agua de cebado y se recuperó el filtro. En los casos de los ensayos de las botellas 4 y 6, aproximadamente 1/2 del filtro se colocó cara abajo sobre placas de cultivo V8-APR. Todos los filtros, completos o la porción restante, se incubaron 1 h en microtubo con 0.5 mL de agua para facilitar el despegado de los microorganismos retenidos. De estas suspensiones se sembró 0,1 mL en V8-APR. Con respecto a los fragmentos de tejido vegetal usados como cebo, se colocaron directamente sobre el medio de cultivo y, además, en los casos de los trozos de manzana o de hoja de las botellas 4 y 6, parte de ellos se incubaron 1 hora en 0,7 mL de agua que posteriormente se extendió (0,1 mL) en las placas de cultivo (figura 6).

	V8-APR con:	Morfología de <i>P. alni</i>	Resultado de PCR para <i>P. alni</i>
Manzana impregnada (Botella 1)	Manzana	? Varios	-
	-	-	-
	-	-	-
	Lavado del filtro	Sin crecimiento	-
Manzana + 10 tacos (Botella 2)	Manzana	? Varios	-
	-	-	-
	-	-	-
	Lavado del filtro	No	-
Manzana + 20 tacos (Botella 3)	Manzana	? Varios	-
	-	-	-
	-	-	-
	Lavado del filtro	Sin crecimiento	-
Manzana impregnada + 20 tacos (Botella 4)	Manzana	Sí	-
	Lavado de manzana	Sin crecimiento	-
	1/2 Filtro (20 mL)	Sin crecimiento	-
	Lavado del filtro	Sin crecimiento	-
Rododendro + 20 tacos (Botella 5)	Hoja	? Varios	-
	-	-	-
	-	-	-
	Lavado del filtro	No	-
Rododendro impregnado + 20 tacos (Botella 6)	Hoja	Sí	PCR+ (6H)
	Lavado de hoja	Sin crecimiento	PCR- (6E)
	1/2 Filtro (20 mL)	Sí	PCR+ (6D)
	Lavado del filtro	Sin crecimiento	PCR- (6F)

Muestras de ensayo, botella 6:

CP control positivo

CN control negativo

M marcador de tamaños

6D micelio crecido desde el Disco (= filtro)

6E líquido de lavado de hoja, Extracto

6F líquido de lavado de Filtro

6H micelio crecido desde la Hoja

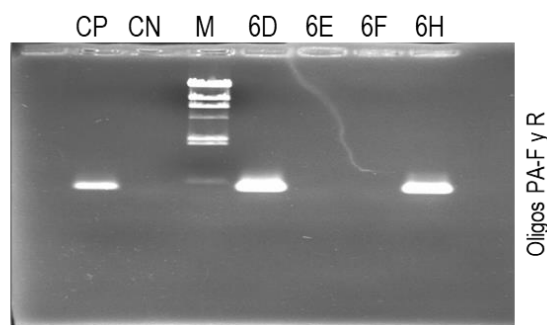


Figura 6. Resumen de los resultados microbiológicos y de PCR obtenidos tras la infección de agua con *P. alni* y cebo de manzana o de hoja de rododendro. De las 6 condiciones solo 2 de ellas (botellas 4 y 6) fueron estudiadas más exhaustivamente (aplicación de los filtros en V8-APR) y solo submuestras de la botella 6 se usaron en PCR (abajo). El símbolo ¿? en la tabla indica distintas morfologías microbianas en los cultivos en los que no siempre está clara la presencia de *P. alni*.

Con un siguiente trampeo se comprobaron los resultados de la recuperación de *Phytophthora* a partir del agua infectada de forma artificial. En esta ocasión se utilizó material de dos arbustos de hoja coriácea, rododendro y lauroceraso (*Prunus laurocerasus*), aunque, una vez higienizadas, los 2 tipos de hoja se cortaron y utilizaron mezclados para preparar el atado en una gasa con las bolas de vidrio. Para favorecer la oxigenación del cebado durante la incubación se usaron matraces de tapa metálica (lo que permite un pequeño intercambio de aire) de 250 mL capacidad con 150 mL agua de grifo esterilizada. A cada envase se le añadió 20 tacos de un cultivo fresco de *P. alni*. Se consideraron 2 condiciones con 2 réplicas técnicas: R, impregnando los pedazos de hoja en un cultivo fresco de *P. alni*, y S, sin impregnar (por tanto, RA y RB y SA y SB).

El cebado se mantuvo a temperatura ambiente sobre la mesa durante 3 días, al cabo de los cuales los pedazos de hoja usados como cebo y por separado, según la especie vegetal, se posaron sobre V8+APR. Se pasó 20 y 40 mL del agua por filtro de 0,22 micras (PES) y una porción (¼) de los filtros se incubó en microtubo con 150 microL de agua para comprobación por PCR. Los 3/4 de filtro restantes se colocaron cara abajo en V8+APR.

Como en el caso anterior, y a pesar de la higienización del material de cebo y del uso de antifúngicos y antibacterianos en el medio de cultivo, alrededor de las hojas crecieron otros microorganismos diferentes a *Phytophthora* (indicado con los signos de interrogación ¿? en las tablas de las figuras 6, 7 y 9). Con respecto a las dos condiciones probadas, hojas de ambos tipos de arbustos impregnadas o no con un cultivo de fitóftora como inóculo adicional, indicó tuvo más éxito el experimento con las hojas sin impregnar (condición SA y SB), por lo que se concluyó que es suficiente con añadir los discos del patógeno en el agua como inóculo. Otra conclusión obtenida es que el cebo de hoja de ambos arbustos es susceptible de ser infestado por *Phytophthora* (figura 7).

Mezcla de hojas de 2 arbustos	V8-APR con:	Morfología de <i>P.alni</i>	Resultado de PCR para <i>P.alni</i>
RA, impregnado de las hojas	Rododendro	¿?	-
	Lauroceraso	Sin crecimiento	-
	3/4 de filtro (20 mL pasados)	Sin crecimiento	-
	3/4 de filtro (40 mL pasados)	Sin crecimiento	-
RB, impregnado de las hojas	Rododendro	¿?	-
	Lauroceraso	Sin crecimiento	-
	3/4 de filtro (20 mL pasados)	Sin crecimiento	-
	3/4 de filtro (40 mL pasados)	Sin crecimiento	-
SA, sin impregnar	Rododendro	¿?	-
	Lauroceraso	¿?	-
	3/4 de filtro (20 mL pasados)	¿?	MyF, PCR+
	3/4 de filtro (40 mL pasados)	¿?	MyF, PCR+
SB, sin impregnar	Rododendro	¿?	-
	Lauroceraso	¿?	-
	3/4 de filtro (20 mL pasados)	¿?	MyF, PCR+
	3/4 de filtro (40 mL pasados)	¿?	MyF, PCR+

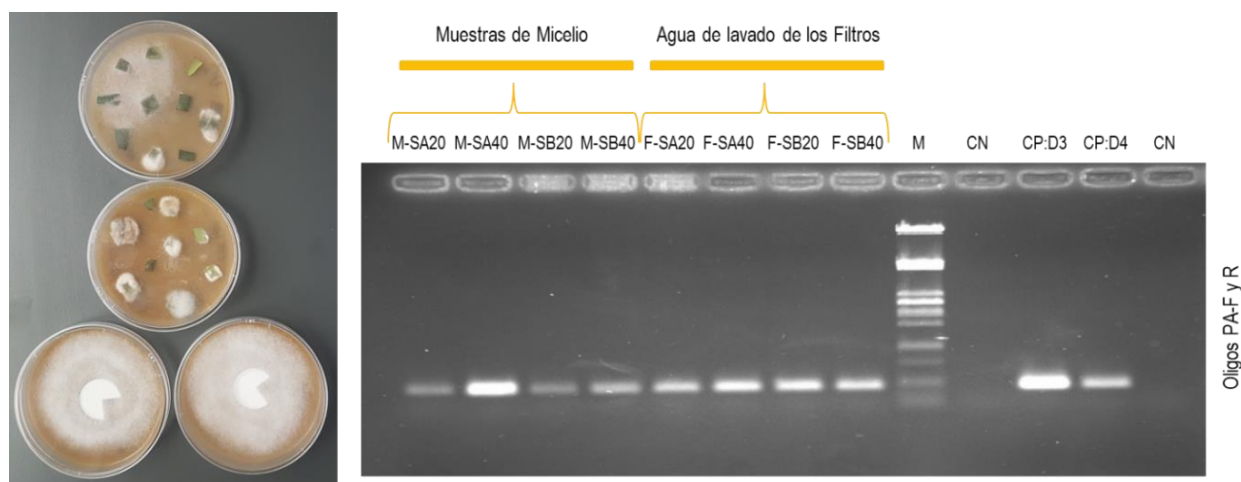


Figura 7. Resumen de los resultados microbiológicos y de PCR obtenidos tras la infección de agua con *P. alni* y cebo de hoja de rododendro y lauroceraso. El símbolo ¿? en la tabla indica distintas morfologías microbianas en los cultivos en los que no siempre está clara la presencia de *P. alni*. Cultivos de 10 días en V8-APR procedentes de las submuestras obtenidas de la condición SA; de arriba abajo con hoja de lauroceraso, hoja de rododendro y filtros (tras filtrar 20 y 40 mL de agua). Resultado de PCR para muestras de micelio tomadas de las placas y de las suspensiones que bañan la porción de filtro de las condiciones SA y SB.

Para comprobación de que la morfología de *Phytophthora* realmente coincide con la especie de *P. alni* se tomó una pequeña porción del micelio aéreo de las placas SA y SB en las que se habían colocado los tacos de filtración y se transfirió a microtubo con 0,1 mL de agua. A estas muestras frescas y a las que contienen el líquido de lavado de los mismos filtros guardado a -20 °C se aplicaron el tratamiento de rotura para ser usadas como molde de PCR (5 microL en 20 microL de reacción). En todos los casos se obtuvo el amplicón PA, tanto en las submuestras que proceden del micelio del cultivo como en las de las suspensiones del lavado de filtro (figura 7).

1.6.2. Límite de detección en PCR: dilución de ADN molde

Para determinar el límite de detección en PCR se seleccionaron dos de estas últimas submuestras, F-SA20 y F-SA40, correspondientes a las suspensiones de lavado de los filtros del agua del mismo ensayo (SA) por los que se filtraron 20 o 40 mL de agua contaminada. Las muestras se diluyeron 1/5 y 1/25 para comprobar límite de detección en PCR. El amplicón disminuyó en intensidad y en la dilución 1/25 fue casi inapreciable para una de ellas (Figura 8).

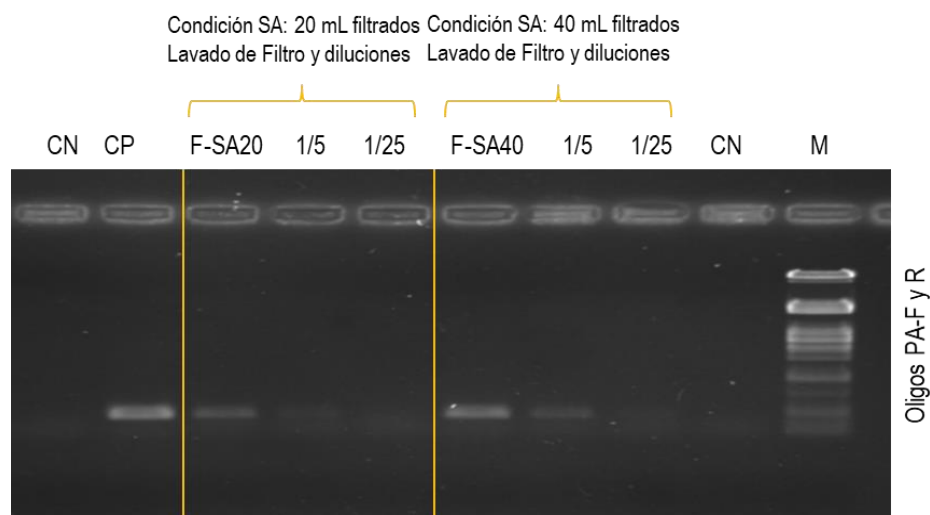


Figura 8. PCR obtenida con las suspensiones que bañan las dos porciones de filtros del mismo ensayo (agua filtrada, 20 y 40 mL) y sus diluciones respectivas.

1.6.3. Límite de detección en PCR: reducción de la carga microbiológica

En la última prueba de infección del agua realizada se redujo la carga microbiológica de *P. alni*, subsp. *uniformis*. En un matraz de 250 mL con 150 mL de agua de grifo estéril se añadieron 20 (condición A1 y A2) o 7 (condición B1 y B2) tacos de un cultivo de *Phytophthora* con fragmentos de hojas de rododendro. El ensayo se realizó por duplicado.

Tras el proceso de incubación del cebado se depositaron los pedazos de hoja (boca arriba y abajo) en su placa respectiva de V8-APR y se filtraron 5, 10, 20 y 40 mL del agua de los 4 matraces excepto del A2, del que solo se filtró 5, 10 y 20 mL. Una porción de $\frac{1}{4}$ del filtro se guardó en microtubo con 150 microL de agua (15 submuestras) y los $\frac{3}{4}$ del filtro restantes se colocaron en V8-APR hacia abajo.

Tras una semana de incubación las placas con los pedazos de tejido vegetal rindieron distintos tipos microbianos. Con respecto a las 15 placas donde se aplicó el pedazo de filtro solo se vio crecimiento en 2 de ellas. Ambas proceden del mismo matraz A1 con la mayor carga de patógeno (20 tacos) y por ellos se ha filtrado el mayor volumen de agua, 20 mL y 40 mL (figura 9).

La PCR se realizó con las 15 submuestras que contienen el agua que bañó la porción de cada uno de los 15 filtros usados, preparadas como se indicó anteriormente para liberar el ADN molde. La concentración de estas suspensiones es de 33 a 266 veces (5 a 40 mL filtrados) con respecto a la del matraz de partida. Para la PCR se usaron 5 microL de muestra en 20 microL totales de reacción (figura 9).

	V8-APR con:	Morfología de <i>P. alni</i>	Resultado de PCR para <i>P. alni</i> (lavado de Filtro)
A1, con 20 discos	Rotolendo	?	-
	3/4 de filtro (5 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
	3/4 de filtro (10 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR-
	3/4 de filtro (20 mL pasados)	S	PCR+
	3/4 de filtro (40 mL pasados)	S	PCR+
A2, con 20 discos	Rotolendo	?	-
	3/4 de filtro (5 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
	3/4 de filtro (10 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
	3/4 de filtro (20 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
B1, con 7 discos	Rotolendo	?	-
	3/4 de filtro (5 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
	3/4 de filtro (10 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
	3/4 de filtro (20 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
	3/4 de filtro (40 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
B2, con 7 discos	Rotolendo	?	-
	3/4 de filtro (5 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR-
	3/4 de filtro (10 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+
	3/4 de filtro (20 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR-
	3/4 de filtro (40 mL pasados)	Sn crecimiento	PCR+

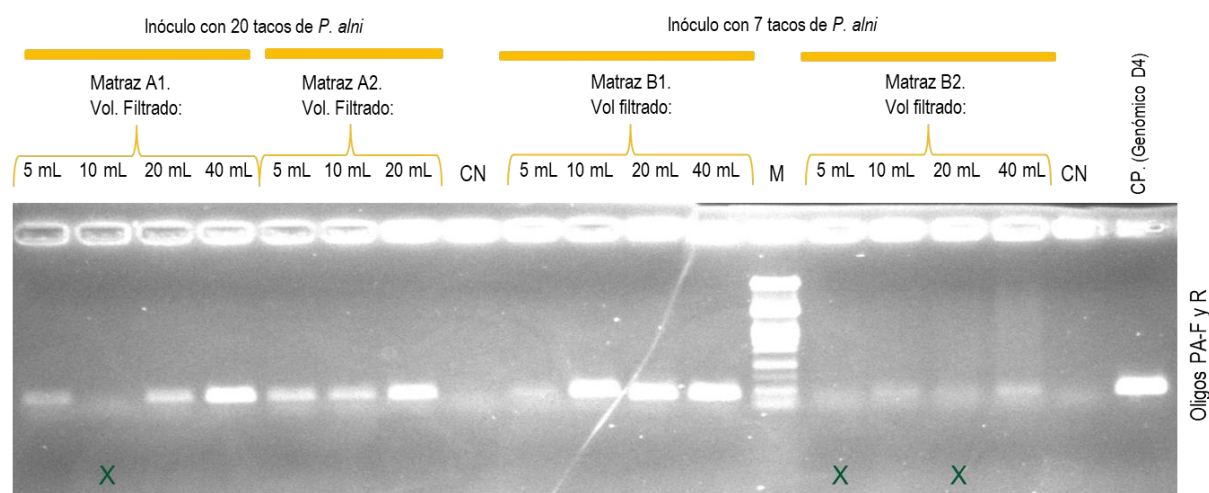


Figura 9. Resumen de los resultados microbiológicos y de PCR obtenidos tras la infección de agua con distinta carga microbiológica de *P. alni* y, posteriormente al cebado, se filtraron distintos volúmenes de agua. El símbolo ¿? en la tabla indica distintas morfologías microbianas en los cultivos en los que no siempre está clara la presencia de *P. alni*. PCR obtenida con las suspensiones que bañan las porciones de filtros de las 15 submuestras. Las cruces de la parte inferior indican las reacciones donde no se obtuvo el amplicón.

Las submuestras en las que se detectó el amplicón PA pertenecen a los 4 matraces analizados, si bien es cierto que, en alguna de las suspensiones, una del matraz A1 y dos del matraz A2, no hubo señal. En concreto las muestras de uno de los matraces que se inoculó con 7 tacos del patógeno la intensidad de amplicón es menor o no se detecta. Hay que recordar que en una PCR la intensidad del amplicón no es proporcional a la abundancia de ADN molde.

En relación con los resultados de los cultivos en placa, donde solo hubo crecimiento alrededor de los filtros procedentes del matraz A1 por los que pasaron 40 y 20 mL de agua, el resultado de la PCR positiva para los cuatro matraces, indica la mayor sensibilidad de la técnica de detección mediante PCR con respecto a la microbiológica.

1.7. Diagnóstico rápido de *P. alni* mediante prueba inmunológica

Existen sistemas de ensayo rápidos (*lateral flow test*) para el diagnóstico de enfermedades causadas por especies de *Phytophthora*, como el desarrollado por Pocket Diagnostic. Se trata de una prueba específica de género que detecta muchas especies de *Phytophthora*, incluidas las siguientes: *P. ramorum*, *P. lateralis*, *P. nicotiana*, *P. Illicis*, *P. infestans*, *P. cinnamomi*, *P. fragariae*, *P. citrocola*, *P. kernoviae*, *P. cactorum*, *P. syringae*, *P. cambivora*. La detección de *P. alni* no está indicada por el fabricante. Este tipo de prueba es inválida para su uso directo sobre agua, sin embargo, y pese a no ser un protocolo validado por el fabricante, sí hay referencias de su uso a través de un sistema de cebo.

En una única ocasión se comprobó el funcionamiento del kit de ensayo con una porción del cultivo en placa de PDA (rectángulo de 0,5* 2 cm) de *P. alni* subesp. *uniformis*, lo

que, a falta de una corroboración, sugiere que el sistema sería útil para la diagnosis de este patógeno en campo a partir de tejido vegetal.



Figura 10. Reacción positiva del sistema Pocket Diagnostic con una porción de agar donde creció *P. alni*. Según el fabricante, la sensibilidad del ensayo es 0,4 % de hoja infectada por cada 0,2 g. <https://www.pocketdiagnostic.com/product/phytophthora-spp-lateral-flow-test/>

2. Conclusiones

- Se han puesto a punto los ensayos de PCR para detección de los fragmentos PA desde ADN genómico de *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* CECT 20785.
- Se han puesto a punto los ensayos de PCR para detección de los fragmentos PA y PAM desde ADN del plásmido sintético pAlnus.
- Partiendo de micelio del patógeno o de una suspensión de células procedentes del lavado del filtro se ha establecido un protocolo de obtención de ADN molde para PCR sin necesidad de usar kits comerciales.
- Dicho protocolo de obtención de ADN molde para PCR es el siguiente:
 - Material biológico de partida:

- Opción 1: 1,5-3 mg de micelio (la punta de palillo) en un microtubo con 100-150 microL de agua
- Opción 2: suspensión en 100 microL de agua de ¼ de filtro por el que se ha filtrado el agua de cebado
 - Adicción de bolitas de vidrio
 - Ruptura mecánica agitando con vórtex 1 minuto.
 - Desnaturalización a 95 °C y 5 minutos.
 - Almacenamiento a -20 °C hasta su uso.
- El límite de detección de ADN genómico en forma pura de *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* CECT 20785 mediante PCR es de 1 ng.
- Para la detección de *P. alni* en cursos naturales de agua es necesario llevar a cabo un cebado con hojas de rododendro o lauroceraso. Tras la incubación con el cebo, el agua se filtra y el material biológico retenido en el filtro se procesa como se ha indicado para su aplicación en PCR.
- El test inmunológico puede utilizarse para detectar *P. alni* en las hojas del cebado.

3. Bibliografía

- Aguayo J, Elegbede F, Husson C, Saintonge FX, Marçais B. Modeling climate impact on an emerging disease, the *Phytophthora alni*-induced alder decline. *Glob Chang Biol*. 2014;20(10):3209-3221. doi:10.1111/gcb.12601
- Fry, W. E. and Grünwald, N. J. 2010. Introducción a los Oomicetes. Trans. Alberto J. Valencia-Botín. 2012. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0220-01
- loos, R., Husson, C., Andrieux, A., Frey, P. (2005). SCAR based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 323– 335.
- loos R, Andrieux A, Marçais B, Frey P. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial ADN analyses. *Fungal Genet Biol*. 2006;43(7):511-529. doi:10.1016/j.fgb.2006.02.006
- Kronmiller BA, Feau N, Shen D, et al. Comparative Genomic Analysis of 31 *Phytophthora* Genomes Reveals Genome Plasticity and Horizontal Gene Transfer. *Mol Plant Microbe Interact*. 2023;36(1):26-46. doi:10.1094/MPMI-06-22-0133-R
- Martin FN, Abad ZG, Balci Y, Ivors K. Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Dis*. 2012;96(8):1080-1103. doi:10.1094/PDIS-12-11-1036-FE
- Nave C, Schwan J, Werres S, Riebesehl J. *Alnus glutinosa* Threatened by Alder *Phytophthora*: A Histological Study of Roots. *Pathogens*. 2021;10(8):977. Published 2021 Aug 3. doi:10.3390/pathogens10080977
- Sims LL, Sutton W, Reeser P, Hansen EM. The *Phytophthora* species assemblage and diversity in riparian alder ecosystems of western Oregon, USA. *Mycologia*. 2015;107(5):889-902. doi:10.3852/14-255



LIFE
ALNUS
TAEJO

CONSERVATION AND RESTORATION
OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS PRIORITY HABITAT
IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN
LIFE20 NAT/ES/000021



NATURA 2000

Recogida de muestras de distinto tipo para detección de *Phytophthora alni*



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



Recogida de muestras de distinto tipo para detección de *Phytophthora alni*

Acción C5.- Protección frente a agentes fitopatológicos



La Fundación Cesefor
está comprometida
en la lucha contra el
cambio climático



Plan de Igualdad Fundación Cesefor:
Comprometida con la igualdad
efectiva de oportunidades entre
mujeres y hombres

Fundación Cesefor

03/05/2024

Proyecto LIFE20 NAT/ES/000021

CONSERVATION AND RESTORATION OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS
PRIORITY HABITAT IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN

Proyecto LIFE Nature and Biodiversity

Inicio del proyecto: 01/09/2021 Fin del Proyecto: 31/08/2025



CONSERVATION AND RESTORATION
OF MEDITERRANEAN ALDER FORESTS PRIORITY HABITAT
IN WESTERN INTERNATIONAL TAJO RIVER BASIN
LIFE20 NAT/ES/000021



www.lifealnustaejo.eu

Se pretende ver qué matriz es más adecuada para la detección de *P. alni*. Se considerarán 3 matrices o tipo de muestras: tierra, agua y brotes jóvenes (o incluso raicillas) del árbol.

Para evaluar cuál es el tipo de muestra más conveniente, los tres tipos de muestras se tomarán lo más cercanos posibles entre sí. Por tanto, idealmente, de un mismo árbol enfermo y de su entorno, se tomarán los 3 tipos de muestra:

1. Agua tomada en un radio no mayor a 1 metro al árbol de referencia
2. Brotes tiernos de la base del árbol (¿lo más bajas posibles o cercanas a la raíz? Mejor que no tengan demasiada "madera". También podrían ser raicillas)
3. Tierra tomada en un radio de 0,5 metros de ese mismo árbol

Para dirimir la conveniencia de un tipo de muestra frente a otro para detectar al patógeno se tendrá en cuenta, posteriormente, la facilidad de recogida de muestra y la de manipulación en laboratorio.

Material y precauciones para evitar el transferir el patógeno entre áreas y/o contaminar las muestras entre sí:

1. Mejor usar botas de goma que deben descontaminarse entre sitios. Eliminar toda la suciedad, guijarros, hierbas, de suelas y costados de botas. Descontaminar en lejía*, al menos que estén 2 minutos en contacto, y enjuagar con agua de grifo.
2. Usar guantes de un solo uso, evitar que los guantes entren en contacto con superficies, materiales o equipos. Tirar los guantes, papel y todo lo descartable a una bolsa de basura.
3. Barrenas (taladro o *soil borer*) o pala, cuchillo o similar, etc. Limpiar bien con papel de cocina. Sumergir en lejía al menos un par de minutos y enjuagar con agua de grifo al menos un par de veces. No utilizar material de recogida que no haya sido limpiado e higienizado con lejía.

- **Lejía.** En la etiqueta ha de poner “apta para la desinfección del agua de bebida” (otras lejías incluyen higienizantes que pueden ser tóxicos). Hay distintas concentraciones de lejía/hipoclorito sódico en función de si el producto está indicado para uso doméstico, profesional o industrial. Las lejías de uso doméstico tienen una concentración de lejía/hipoclorito sódico entre 47 y 65 gramos de cloro activo por litro.

- Para usar en campo y no dañar medio ambiente **no tengo criterio definido** sobre la dilución de lejía conveniente: encontré lejía sin diluir (recogida de anfibios), diluciones $\frac{1}{2}$ (equivale a 50 %; Laramie y col 2015), diluciones 2,5 % (25 mL en 1 litro de agua; recomendación del SACYL para limpieza de superficies).

- Las diluciones de lejía son inestables, por lo cual se han de preparar diariamente y, mientras están en campo, mantener tapadas.

4. Para recoger el agua botellas de al menos 1.5 L de capacidad. Valen botellas de agua embotellada de las que no se haya bebido directamente.

- Si no se tienen botellas limpias, previamente, en casa: limpiar las botellas con lejía * (añadir el líquido, tapar, agitar, dejar un par de minutos y descartar) y enjuagar con agua de grifo al menos tres veces (añadir líquido, tapar, agitar y descartar). Dejar secar boca abajo.

- Aquí es importante: 1) el criterio de dilución de lejía es el que se aplica para desinfección agua de bebida y debe venir indicado en la etiqueta de la botella de lejía. Si la etiqueta se refiere a "gotas" usar la regla de que 20 gotas constituyen 1 mL. Puede ser útil tener una jeringuilla de farmacia de al menos 10 mL para medir estos volúmenes. 2) es tan crítica la desinfección de estas botellas como el enjuagado (3 veces) para eliminar los restos de lejía.

5. Bolsas de un solo uso y de cierre zip para recoger tierra y material vegetal (sin usar).

6. Nevera o caja de poliespán con hielo o bloques de frío para guardar las muestras y para hacer el envío.

Procedimiento

1. Seguir las instrucciones de higienización del instrumental, uso de guantes y tratamiento de "basura".
2. Para codificar las muestras, si se recogen los 3 (o 2) tipos entorno a un mismo árbol que lleven una codificación común (por ejemplo, del árbol nº 1: las muestras 1-A, 1-B y 1-T corresponden de agua, brote y tierra).
3. Recogida de agua próxima al árbol afectado (idealmente, a no más de 1 m de distancia)

Si en el punto seleccionado corre el agua, recoger la muestra colocándonos en dirección opuesta al flujo de agua, para reducir la potencial contaminación por botas y para evitar que la turbidez pase a la botella de recogida.

Sumergir la botella y enjuagar nuevamente tres veces (tapar y agitar) para eliminar los posibles restos de lejía antes de recoger la muestra definitiva.

No hundir la botella en el fango (evitar materia orgánica).

4. Recogida de brotes del árbol afectado.

Cortar ramillas tiernas, a poder ser de distinta disposición (hacia los 4 puntos cardinales) e introducir en bolsa (si son del mismo ejemplar de árbol pueden ir en la misma bolsa).

5. Recogida de tierra con barrena próxima al árbol afectado (no más de 1 m de radio, idealmente)

Eliminar cubierta de hojarasca y coger 4 muestras en los 4 puntos cardinales (NSEO) a 15-20 cm de profundidad. Juntar los 4 cilindros (del mismo árbol) en bolsa plástica. Una muestra de 0,3-0,5 kg es suficiente.

6. Mantener refrigeradas las muestras y transportar al laboratorio refrigeradas (caja de poliestirén y bloques térmicos) lo antes posible (envío de un día para el siguiente, para recibirlas antes de las 12 de la mañana y, preferentemente, entre martes y jueves).

Uso de lejía:

Lejía doméstica sin diluir: <https://sosanfibios.org/buenas-practicas/>

Laramie, M.B., Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., and Strickler, K.M., 2015, Environmental DNA sampling protocol—Filtering water to capture DNA from aquatic organisms: U.S. Geological Survey Techniques and Methods, book 2, chap. A13, 15 p., <http://dx.doi.org/10.3133/tm2A13>.