

III Reunión del Grupo de Trabajo de Sanidad Forestal

## Influencia de escenarios cambiantes de estrés hídrico y encharcamiento en la susceptibilidad de *Castanea sativa* a *Phytophthora cinnamomi*

Martín M.A.<sup>1</sup>, Vázquez A.<sup>1</sup>, Martín L.M.<sup>2</sup>, Solla A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ingeniería Forestal y del Medio Natural. Universidad de Extremadura.  
Avenida Virgen del Puerto, 2, 10600 Plasencia, España

<sup>2</sup>Departamento de Genética, ETSIAM, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071, Córdoba, España.

\*Autor para correspondencia: [asolla@unex.es](mailto:asolla@unex.es)

### Resumen

El castaño (*Castanea sativa* Mill.) es una especie multipropósito de gran importancia económica y cultural en Europa. Por la versatilidad que presenta su aprovechamiento se considera un buen ejemplo de integración entre la distribución de la biodiversidad natural y la generada por el hombre, y un buen modelo para el desarrollo de estrategias encaminadas a combinar conservación y utilización sostenible. Desde hace tiempo, sin embargo, los castañares experimentan una creciente mortalidad debido a la presencia de *Phytophthora*, probablemente agravada por determinadas circunstancias actuales del cambio climático. El objetivo del trabajo fue cuantificar la influencia de escenarios cambiantes de estrés hídrico vs encharcamiento en la susceptibilidad de *C. sativa* a *P. cinnamomi*. Se utilizaron brinzales de una savia germinados a partir de castaña procedente de Hervás (Cáceres). Durante el período vegetativo, la planta fue dividida en tres grupos y sometida a los tratamientos estrés hídrico, condiciones elevadas de hidromorfía, y riego moderado (control). A las seis semanas de tratamientos las plantas fueron inoculadas artificialmente con *P. cinnamomi*, y a las ocho semanas, sometidas a condiciones cruzadas de estrés hídrico, encharcamiento y riego moderado, de modo que se generaron nueve tratamientos (escenarios cambiantes) y tres controles (escenarios estables). Para constatar la efectividad de los tratamientos se realizaron mediciones periódicas de la humedad del suelo y del estado fisiológico de las plantas. Se presentan resultados de mortalidad y fisiología de las plantas analizadas, y se discuten cuáles son los escenarios más favorables y desfavorables para el castaño, previos y posteriores a la infección por *P. cinnamomi*.

**Palabras clave:** cambio climático, oomiceto, organismo invasor, tinta del castaño.

## 1. Introducción

En los sistemas forestales, el cambio global implica severas alteraciones y amenazas generadas principalmente por el cambio climático y el comercio global. En relación al cambio climático, se prevé un aumento de la temperatura global media (Stocker *et al.*, 2013) lo que favorecerá la incidencia de importantes enfermedades en el ámbito forestal (Sturrock *et al.*, 2011; Pautasso *et al.*, 2012; Helfer, 2013; Martín-García *et al.*, 2014). También se espera una mayor irregularidad de las precipitaciones, con episodios acusados de estrés hídrico y condiciones prolongadas de encharcamiento (Bailey-Serres y Colmer, 2014), lo que generará nuevas interacciones patógeno-huésped mediadas por dichas situaciones cambiantes (Yáñez-López *et al.*, 2012; Corcobado *et al.*, 2014). Por su parte, el comercio global ha supuesto la aparición de múltiples enfermedades causadas por organismos exóticos, dentro de los cuales destaca el género *Phytophthora* por su elevado impacto en casi todas las masas forestales (Santini *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2016).

Todo esto hace que, en la actualidad, poder predecir los efectos del cambio global sobre comunidades forestales diezmadas por patógenos invasores sea todo un reto para la comunidad científica (Alberto *et al.*, 2013; Pautasso *et al.*, 2015).

El castaño (*Castanea sativa* Mill.) es una de las especies multipropósito de mayor importancia económica y cultural en Europa. En España es una especie naturalizada que se utiliza para producción de fruto y madera en comarcas con un gran interés medioambiental, y cuya gestión se hace por métodos tradicionales. Sin embargo, durante las últimas décadas, la gestión del castaño en España y la decadencia de su cultivo han estado asociados estrechamente a un empeoramiento general de su estado sanitario debido a dos enfermedades de origen exótico, la ‘tinta’ y el ‘chancro’. Estas patologías están generadas por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands y el ascomiceto *Cryphonectria parasitica* (Murril) ME Barr (= *Endothia parasitica*), y su introducción en España data de los años 1726 y 1940, respectivamente (Vieitez *et al.*, 1996; Mansilla *et al.*, 2000).

El intercambio de material vegetal y suelo por parte del hombre (Jung *et al.*, 2016) ha originado que *P. cinnamomi* esté presente en un elevado número de castaños de la Península Ibérica. Otra forma de dispersión de *P. cinnamomi* es a través de zoosporas, que se mueven por sí mismas a cortas distancias en el agua capilar del suelo, o pasivamente arrastradas por el agua gravitacional. Su impacto tanto en pérdidas de individuos como de producción, supone una drástica reducción económica del aprovechamiento que desmotiva al propietario hasta el punto de que éste abandona la gestión o reemplaza la especie.

En el norte de la Península, el impacto de *P. cinnamomi* se ha visto amortiguado por la utilización de genotipos resistentes obtenidos de cruzar *C. sativa* con *Castanea crenata* y *Castanea mollissima* (Fernández-López, 2011). Sin embargo, en el interior y sur peninsular, la utilización de estos híbridos no es exitosa ni logra reemplazar las masas de castaño anteriormente afectadas por tinta. Se barajan dos hipótesis sobre las dificultades de arraigo del citado material ‘resistente’ en latitudes sur: (i) no toleran el estrés hídrico estival, o (ii) no resisten las cepas de *P. cinnamo-*

mi locales.

Existe un elevado número de trabajos que predicen y modelizan el impacto del cambio climático sobre las enfermedades forestales (Thompson *et al.*, 2014; Woods *et al.*, 2016), pero son necesarios más datos experimentales reales. Por otra parte, también existen estudios sobre el comportamiento del castaño tras la infección con *P. cinnamomi* en distintos ambientes (Gómez-Laranjo *et al.*, 2004; Vanini *et al.*, 2010; Dinis *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta el momento no hay información sobre cómo pueden influir condiciones desfavorables previas, que determinan el fenotipo y vigor de la planta, en la susceptibilidad de *C. sativa* a *P. cinnamomi*. Se plantean las hipótesis:

1. Condiciones puntuales de estrés previas a la infección influyen en la mortalidad de *C. sativa* ante *P. cinnamomi*.
2. Escenarios cambiantes generan en la planta mayor susceptibilidad a *P. cinnamomi* que escenarios estables.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la influencia de escenarios cambiantes de estrés hídrico y encharcamiento en la susceptibilidad de *C. sativa* a *P. cinnamomi*.

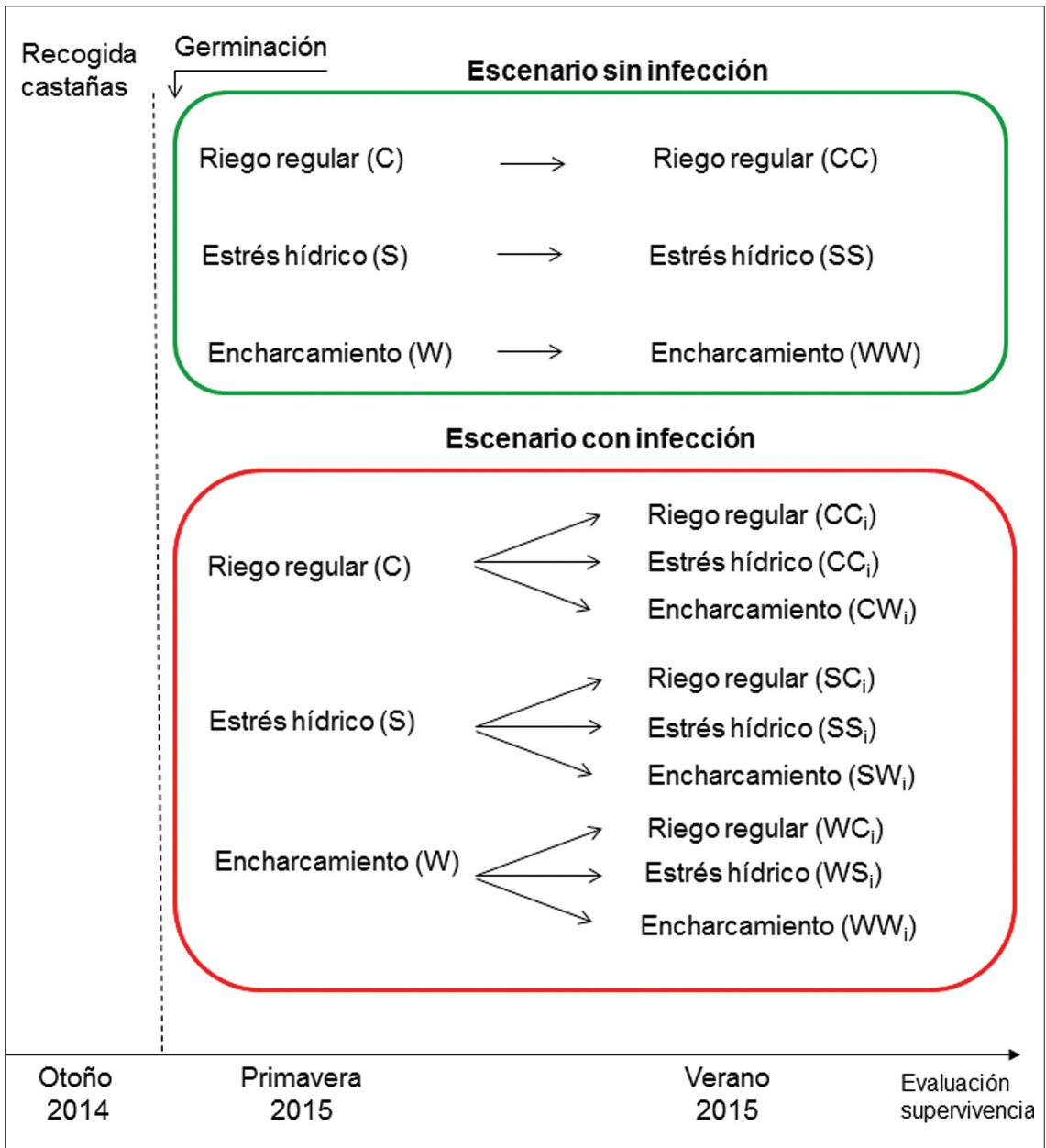
## 2. Material y métodos

Durante el otoño de 2014 se recogieron castañas de Hervás (Cáceres), y en primavera de 2015 se sembraron y germinaron. Durante el período vegetativo de 2015 se utilizaron 576 brinzales, de los cuales aproximadamente un tercio fueron sometidos a condiciones de estrés hídrico (S), un tercio a condiciones de encharcamiento (W) y otro tercio a riego moderado (C) que sirvió como control (*Fig. 1*).

En la sexta semana del experimento, una parte de los brinzales correspondientes a cada uno de los tratamientos fue inoculada de manera artificial con *P. cinnamomi*. La inoculación se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Jung *et al.* (1996). Dos semanas después de las inoculaciones, las plantas de cada grupo se subdividieron y sometieron a condiciones cruzadas de estrés hídrico (S), encharcamiento (W) y riego moderado (C), de modo que se generaron nueve tratamientos (escenarios cambiantes) y tres controles (escenarios estables) ( $n=35$ ) (*Fig. 1*). El experimento fue realizado en los invernaderos del Centro Universitario de Plasencia, bajo una malla de sombreado del 50% de ocultación.

Para constatar la efectividad de los tratamientos se realizaron mediciones periódicas de la humedad del suelo mediante sondas TDR y del estado fisiológico de las plantas (tasa fotosintética (A) y conductancia estomática ( $g_s$ )) mediante IRGA (LCi, ADC Bio Scientific Ltd., UK), bajo la malla de sombreado. En estas mediciones se utilizaron 20 plantas por tratamiento.

Se registraron las mortalidades semanalmente (los miércoles) hasta la semana 13 de las inoculaciones. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis ANOVA con el programa STATISTICA V.10. El análisis de supervivencia se realizó a partir del estadístico de Kaplan-Meier, que permite modelizar probabilidades de super-



**Figura 1.** Tratamientos realizados en las plántulas de *Castanea sativa* bajo los escenarios de infección o no infección con *Phytophthora cinnamomi* (n=35).

vivencia (Solla *et al.*, 2009). Para comparar diferencias entre los distintos tratamientos se analizaron las supervivencias mediante el test de Wilcoxon-Gehan y las esperanzas de vida de las plantas mediante ANOVAs con el programa STATISTICA V.10.

### 3. Resultados y discusión

En mediciones realizadas a las tres semanas del inicio de los tratamientos, el con-

tenido de humedad del suelo fue significativamente diferente para los tres grupos de plantas (C, S y W) (Tab. 1). Ello generó menores valores de tasa fotosintética (A) y conductancia estomática ( $g_s$ ) en las plantas estresadas (SS y WW) frente a las sometidas a riego regular (CC) (Tab. 1), lo que permite constatar que los tratamientos produjeron los efectos esperados en las plantas.

**Tabla 1.** Valores medios ( $\pm$  error standard; n=20) de humedad del suelo y parámetros relacionados con la actividad fisiológica de las plántulas evaluadas, obtenidos durante los distintos tratamientos.

	CC	SS	WW	P
Humedad (% vol)	10.6 $\pm$ 1.1 b	3.9 $\pm$ 1.3 c	21.1 $\pm$ 1.0 a	<0.01
A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	4.47 $\pm$ 0.41 a	2.70 $\pm$ 0.32 b	2.86 $\pm$ 0.35 b	<0.01
$g_s$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	75.0 $\pm$ 6.0 a	31.2 $\pm$ 4.0 b	33.3 $\pm$ 4.0 b	<0.01

C, riego regular; S, estrés hídrico; W, encharcamiento; A, tasa fotosintética;  $g_s$ , conductancia estomática

En la Tab. 2 se muestran los valores de mortalidad para los dieciséis tratamientos evaluados. Empezando por los escenarios sin infección con *P. cinnamomi*, los resultados correspondientes a los tres tratamientos no alternantes (CC, SS, WW) mostraron diferencias significativas de mortalidad de planta, observándose una mayor tasa de mortalidad en castaños sometidos a encharcamiento permanente (WW) ( $P=0.020$ ). Estos resultados contrastan con los obtenidos en un experimento similar realizado con *Quercus ilex*, en el que las plántulas de encina fueron más sensibles a un estrés hídrico prolongado que a un encharcamiento prolongado (Corcobado et al., 2014), lo que indica la poca tolerancia del castaño a la hidromorfía.

**Tabla 2.** Porcentajes de mortalidad final de plantas de *Castanea sativa* (n>35) en función de tres tratamientos (C, S y W) sin y con inoculación de *Phytophthora cinnamomi*. Valores obtenidos 13 semanas tras las inoculaciones.

Escenario	Tratamiento	CC	SS	WW	P
sin infección	Mortalidad (%)	6.4 a A	15.2 a A	35.3 b A	0.020
con infección	Tratamiento	CC <sub>i</sub>	CS <sub>i</sub>	CW <sub>i</sub>	P
	Mortalidad (%)	62.4 a B	73.6 a B	100 b B	0.014
	Tratamiento	SC <sub>i</sub>	SS <sub>i</sub>	SW <sub>i</sub>	P
	Mortalidad (%)	58.3 a B	80.6 b B	82.8 b B	0.004
	Tratamiento	WC <sub>i</sub>	WS <sub>i</sub>	WW <sub>i</sub>	P
	Mortalidad (%)	63.1 a B	63.4 a B	70.5 a B	0.341

C, riego abundante; S, estrés hídrico; W, encharcamiento; C<sub>i</sub>, riego abundante tras la infección con *P. cinnamomi*; S<sub>i</sub>, estrés hídrico tras la infección con *P. cinnamomi*; W<sub>i</sub>, encharcamiento tras la infección con *P. cinnamomi*. En la misma fila, letras minúsculas distintas indican diferencias significativas al 95%. En la misma columna, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas al 95%.

Ante escenarios infectivos la mortalidad de plantas para los mismos tres tratamientos no alternantes fue indiferente al tratamiento ( $P=0.279$ ), si bien fue más acelerada en WWi que en CCI y SSI (esperanzas de vida de 9.5, 12.6 y 12.0 días, respectivamente). Analizando las esperanzas de vida entre plantas infectadas y no infectadas (factor 1) y entre tratamientos (factor 2), la interacción *infección x tratamiento* (factor 1 x factor 2) no fue significativa ( $P=0.790$ ).

Se analizan ahora los resultados teniendo en cuenta variaciones post-inoculación tras un escenario previo común. La mortalidad observada ante un riego favorable (C) previo a la infección con *P. cinnamomi* fue inferior en CCI y CSI que en CWi ( $P=0.014$ ) (Tab. 2), lo que indica un efecto perjudicial exclusivamente del encharcamiento. La mortalidad observada ante un riego escaso (S) previo a la infección con *P. cinnamomi* fue inferior en SSI que en SSI y SWi ( $P=0.004$ ) (Tab. 2), lo que indica esta vez un efecto perjudicial del estrés hídrico y el encharcamiento, y un efecto beneficioso de las condiciones favorables de riego. Finalmente, la mortalidad observada ante encharcamiento (W) previo a la infección con *P. cinnamomi* fue indiferente a los escenarios posteriores ( $P=0.341$ ) (Tab. 2).

Si se analizan los resultados teniendo en cuenta los distintos escenarios previos a la inoculación ante el mismo tratamiento post-inoculación (valores en la misma columna en Tab. 2), en ninguno de los casos se observaron diferencias significativas de mortalidad. En otras palabras, los escenarios previos a la inoculación no influyeron en la mortalidad final de las plantas.

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo constatan la poca tolerancia del castaño a la hidromorfía. Ante escenarios climáticos estables, la mortalidad del castaño por *P. cinnamomi* es indiferente al escenario, pero ocurre antes si el árbol está encharcado. Si las infecciones se producen en escenarios climáticos cambiantes, condiciones favorables al crecimiento del castaño seguidas de encharcamiento generan la máxima mortalidad. Si las infecciones se producen en planta estresada hídricamente, la mortalidad es máxima si las plantas siguen estresadas o si se encharcan, y se reduce si la planta se riega moderadamente. Finalmente, si las infecciones se producen en árboles sometidos a encharcamiento, la mortalidad es independiente al escenario posterior a la inoculación. Eventos desfavorables para la planta previos a infecciones por *P. cinnamomi*, cortos en duración (tales como el estrés hídrico o el encharcamiento) ni merman ni incrementan la mortalidad final de las plantas. Estos resultados han de ser considerados como preliminares, ya que proceden de plántulas de una savia, y no son directamente trasladables a masas adultas.

#### 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente a través de los proyectos de inves-

tigación AGL2013-48017-C2-1-R y AGL2014-53822-C2-1-R, del Ministerio de Economía y Competitividad. M.A. Martín agradece la financiación a la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la Consejería de Economía, Competitividad e Innovación de la Junta de Extremadura (España). Los autores agradecen la colaboración prestada a César Martín (Viveros la Dehesa) por suministrar el material vegetal empleado en el estudio.

## 6. Bibliografía

- Alberto, F.J., Aitken, S.N., Alía R., González-Martínez, S.C., Hanninen, H., Kremmer, A., Lefèvre, F., Lenormand, T., Yeaman, S., Whetten, R., Savolainen O., 2013. Potential for evolutionary responses to climate change—evidence from tree populations. *Global Change Biol* 19, 1645-1661.
- Bailey-Serres, J., Colmer, T.D., 2014. Plant tolerance of flooding stress— recent advances. *Plant Cell Environ* 37, 2211–2215.
- Corcobado, T., Cubera, E., Juárez, E., Moreno, G., Solla, A., 2014. Drought events determine performance of *Quercus ilex* seedlings and increase their susceptibility to *Phytophthora cinnamomi*. *Agric For Meteorol* 192, 1-8.
- Dinis, L., Peixoto, F., Zhang, C., Martins, L., Costa, R., Gomes-Laranjo, J., 2011. Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (*Castanea*) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol Mol Plant Pathol* 75, 146-156.
- Fernández-López, J., 2011. Identification of the genealogy of interspecific hybrids between *Castanea sativa*, *Castanea crenata* and *Castanea mollissima*. *For Syst* 20, 65–80.
- Gomes-Laranjo, J., Araujo-Alves, J., Ferreira-Cardoso, Pimentel-Pereira, J.M., Abreu, C.G., J. Torres-Pereira, J., 2004. Effect of chestnut ink disease on photosynthetic performance. *J Phytopathology* 152, 138-144.
- Helfer, S., 2013. Rust fungi and global change. *New Phytol* 201, 770–780.
- Jung, T., Blaschke, H., Neumann, P., 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *Eur J For Pathol* 26, 253–272.
- Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A.G., Aguin Casal, O., Bakonyi, J., Cacciola, S.O., Cech, T., Chavarriaga, D., Corcobado, T., Cravador, A., Decourcelle, T., Denton, G., Diamandis, S., Dogmus-Lehtijärvi, H.T., Franceschini, A., Ginetti, B., Green, S., Glavendekić, M., Hantula, J., Hartmann, G., Herrero, M., Ivic, D., Horta Jung, M., Lilja, A., Keca, N., Kramarets, V., Lyubenova, A., Machado, H., Magnano di San Lio, G., Mansilla Vázquez, P.J., Marçais, B., Matsiakh, I., Milenkovic, I., Moricca, S., Nagy, Z.Á., Nechwatal, J., Olsson, C., Oszako, T., Pane, A., Paplomatas E.J., Pintos Varela, C., Prospero, S., Rial Martínez, C., Rigling, D., Robin, C., Rytönen, A., Sánchez, M.E., Sanz Ros, A.V., Scanu, B., Schlenzig, A., Schumacher, J., Slavov, S., Solla, A., Sousa, E., Stenlid, J., Talgø, V., Tomic, Z., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A.M., Wenneker, M., Woodward, S., Pérez-Sierra A., 2016. Widespread *Phytophthora* infestations in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *For Pathol* 46, 134-163.
- Mansilla, J.P., Pintos, C., Salinero, M.C., 2000. Plagas y enfermedades del castaño en Galicia. Xunta de Galicia, Consellería de Agricultura, Ganadería e Política Agroalimentaria. 129 pp.

- Martín-García, J., Solla, A., Corcobado, T., Siasou, E., Woodward, S., 2014. Influence of temperature on germination of *Quercus ilex* in *Phytophthora cinnamomi*, *P. gonapodyides*, *P. quercina* and *P. psychrophila* infested soils. *For Pathol* 45, 215-223.
- Pautasso, M., Döring, T.F., Garbelotto, M., Pellis, L., Leger, M.J., 2012. Impacts of climate change on plant diseases – opinions and trends. *Eur J Plant Pathol* 133, 295–313.
- Pautasso, M., Holderenrieder, O., 2015. Forest health in a changing world. *Microb Ecol* 69, 826-842.
- Santini, A., Ghelardini, L., De Pace, C., Desprez-Loustau, M.L., Capretti, P., Chandelier, A., Cech, T., Chira, D., Diamandis, S., Gaitniekis, T., Hantula, J., Holdenrieder, O., Jankovsky, L., Jung, T., Jurc, D., Kirisits, T., Kunca, A., Lygis, V., Malecka, M., Marcias, B., Schmitz, S., Schumacher, J., Solheim, H., Solla, A., Szabò, I., Tsopelas, P., Vannini, A., Vettraino, A.M., Webber, J., Woodward, S., Stenlid, J., 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytol* 197, 238-250.
- Solla, A., Aguín, O., Cubera, E., Sampedro, L., Mansilla, J.P., Zas R., 2009. Survival time analysis of *Pinus pinaster* inoculated with *Armillaria ostoyae*: genetic variation and relevance of seed and root traits. *Eur J Plant Pathol* 130, 477-488.
- Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor, M.B., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Yu., Bex, V., Midgley, P.M., 2013. Technical Summary. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report on the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Ed. Stocker et al NY, Cambridge University Press.
- Sturrock, R.N., Frankel, S.J., Brown, A.V., Hennon, P.E., Kliejunas, J.T., K. J. Lewis, K.J., Worrall, J.J., Woods, A.J., 2011. Climate change and forest diseases. *Plant Pathol* 60, 133–149.
- Thompson, S. E., Levin, S., Rodriguez-Iturbe, I., 2014. Rainfall and temperatures changes have confounding impacts on *Phytophthora cinnamomi* occurrence risk in the south-western USA under climate change scenarios. *Global Change Biol* 20, 1299–1312.
- Vanini, A., Natili, G., Anselmi, N., Montagni, A., Vettraino, A., 2011. Distribution and gradient analysis of ink disease in chestnut forests. *For Path* 40, 73-86.
- Vieitez, E., Vieitez, M.L., Vieitez, F.J., 1996. *El Castaño*. Ed. Edilesa, León. 341 pp.
- Woods, A.J., Martín-García, J., Bulman, L., Vasconcelos, M.W., Boberg, J., La Porta, N., Peredo, H., Vergara, G., Ahumada, R., Brown, A., Diez, J.J., 2016. *Dothistroma* needle blight, weather and possible climatic triggers for the disease's recent emergence. *Forest Pathol* doi: 10.1111/efp.12248
- Yáñez-López, R., Torres-Pachecho, I., Guevara-González, R.G., Hernández-Zul, M.I., Quijano-Carranza, J.A., Rico-García, E., 2012. The effect of climate change on plant diseases. *Afr J Biotechnol* 11, 2417–2428.