

O AMENEIRO: PROBLEMÁTICA E POSIBLES SOLUCIÓNS ACHEGADAS POLA BIOTECNOLOXÍA

M. Carmen San José, Laura V. Janeiro, Elena Corredoira*

Os bosques de ribeira encóntranse gravemente ameazados pola enfermidade da podremia da raíz e do colar dos ameneiros causada polo fungo *Phytophthoraalni*. A enfermidade, para a que de momento non se coñece solución, detectouse nas catro provincias galegas e tévese que no prazo de 10-20 anos os amieirais dos nosos ríos poidan desaparecer. Mediante a técnica de micropropagación polo cultivo de xemas axilares e a embrioxénese somática, os autores propoñen solucións biotecnolóxicas a este grave problema.

O AMENEIRO

O ameneiro (*Alnusglutinosa* (L.) Gaertn.), é unha árbore da familia das Betulaceae con presenza natural en Galicia nos bosques de ribeira, onde se lle coñece como ameneiro ou amieiro. É unha árbore de tamaño medio cunha altura entre 17-22 m. De crecemento rápido, pode vivir un máximo duns 100 anos, aínda que se coñecen exemplares que superan os 150, como o ameneiro da Ferverza, situado nun bosque singular xunto ao río Miño, e o ameneiro do Pazo de Maside, cunha idade estimada entre os 100-200 anos, que forma parte do bosque de ribeira do río Ferreira e destaca pola fermosura do seu porte, así como pola súa dendometría non frecuente en exemplares desta especie, encontrándose recollido no Catálogo de Árbores Senlleiras da Xunta de Galicia.

A especie encóntrase de forma natural en Europa, Norte e Nordés de Asia, penetrando en Asia Menor e no Cáucaso até Irán, e noroeste de África. Atópase en toda a Península Ibérica salvo nas provincias máis continentais e secas, existindo amieirais en Galicia, Asturias, Serra Morena, Serra Aracena e en Cataluña.

Aparecen en beiras de ríos e ribeiras humedecidas, fondos de val, lugares inundados e abas húmidas. Aínda que forma moitas veces aliñacións case puras nas ribeiras dos ríos, tamén aparece frecuentemente en comunidades con outras especies.

É unha especie bastante plástica, en canto a condicións climáticas, desenvolvéndose ben en climas de tipo temperado-cálido ou temperado-frío, tolera tamén fríos invernales de certa intensidade, chegando a soportar temperaturas mínimas de ata -40°C, fóra do período vexetativo, xa que non resiste xeadas tardías primaverais.

Respecto á humidade, é unha especie que require dispoñibilidade permanente de auga no chan, pero non de augas estancadas, senón de augas frecuentemente renovadas. Prefire atmosfera húmida, aínda que tamén tolera clima semiseco.

Esténdese dende o nivel do mar até os 1700m de altitude. Mentres que en Galicia, aparece até os 1200m de altitude. Vive tanto en chans calcarios como silíceos, pero prefire estes últimos e os ricos en limos ou fértiles. Pode vivir en terreos máis pobres, grazas aos nódulos radicais que forma en asociación co fungo *Actinomycesalni*, que facilita á planta a dispoñibilidade de fixar nitróxeno atmosférico. En todo caso os chans han de ser soltos e frescos; son exemplos as brañas e ribeiras. Non soporta os chans moi fertilizados.

É unha especie interesante, produtiva e protectora das ribeiras dos ríos, polo que sempre interesará favorecela mediante plantacións ou tratamentos nas ripisilvas nas que aparece. Vexeta perfectamente nos chans moi húmidos e ácidos, que pola contra non conveñen en absoluto a chopos e outras especies sensibles á asfixia radicular por falta de aireación do chan, e nos que a única alternativa de plantación é o bidueiro.



Figura 1. Árbores adultas de ameneiro que foron a orixe dos extrantos utilizados para micropropagación.

ASPECTOS DE INTERESE DO AMENEIRO

Neste xénero (*Alnus* Mill.), o nome (*Alnus*) era o nome latino clásico de varias especies de ameneiro; deriva da raíz indoxermánica o-, ol-. Reluciente (sobre todo referido ás cores vermellas ou pardas) e recorda que a madeira do ameneiro se torna ao golpeala dunha cor vermella-alaranxada viva, por este motivo en moitos países do norte de Europa pensaban que esta árbore estaba enmeigada.

Chamado Fearn polos celtas, rexía a época entre o 26 de decembro e o 22 de xaneiro, aproximadamente, e correspondía ás letras F e V do antigo alfabeto druídico Ogham. Supoñíanselle virtudes protectoras e coas ramas novas confeccionábanse asubíos para atraer aos espíritos do aire. Denominouse a esta especie *glutinosa*, "pegañento", en alusión a esta peculiaridade que presentan brotes e follas novas.

O ameneiro ten unha madeira moi homoxénea e de cor esbrancuxada, que se volve avermellada ao pouco de cortala. É de dureza e gran variabilidade, fibra recta e homoxénea. A súa madeira é doada de traballar, secando ben e pronto, con alta capacidade para admitir tinguiduras e demais tratamentos superficiais, o que a fai axeitada para imitar madeiras de máis calidade (ébano, caoba, nogueira ou cerdeira). Emprégase para a obtención de chapa con segunda transformación para mobles, aínda que non abundan as árbores de elevado diámetro, o que provoca importacións de madeira centroeuropea. Actualmente a súa principal aplicación é en contrachapado así como pequenos usos industriais e traballos de artesanía: talla, tornería, xoguets, instrumentos musicais, regras de debuxo, mangos de cepillos, estacas, barrís, zocos, cabezas de vasoiras

ou outras ferramentas, etc. Tamén en preparación de tintas tipográficas, para tinguir coiro, para papel, paneis e fabricar caixas.

Emprégase tamén como material de construción. Somexida en auga, a madeira do ameneiro é moi duradeira, foi empregada para postes e estacas das obras hidráulicas, en pontes e muíños, así como nas conducións de auga e, antigamente, para as casas construídas dentro da auga, como en Venecia.

Esta árbore foi tamén moi utilizada na medicina popular como remedio curativo para as máis diversas afeccións. A codia é moi rica en taninos (ata o 19%) e contén ácidos graxos como o ácido palmítico e o ácido esteárico. Por iso os preparados da codia posúen varios efectos: astrixentes, anti-inflamatorios, en forma de gargarismos para as inflamacións da boca e amígdalas ou para endurecer as enxivas e, polo mesmo motivo, para curtir os coiros; desconxestivos, febrífugos (serviu de sucedáneo á quina) e antidiarreicos. As follas foron utilizadas como analxésico de acción local e para a cura de feridas de difícil peche. Este remedio foi amplamente usado polos camiñantes para sandar os pés doridos.

Antigamente tamén foi utilizada a súa codia con limadura de ferro para a preparación de infusións que servían aos tintureiros, sombreireiros e curtidores para tinguir de negro; con ela substituíronse as galadas para a fabricación de tinta, para o cal se empregaron tamén as "piñas", ricas igualmente en taninos.

A ENFERMIDADE

Nos últimos anos, as poboacións de ameneiros víronse seriamente afectadas por unha enfermidade que recibiu o nome de podremia da raíz e

do colar dos ameneiros. No ano 2001, a NAPPO (*North American Plant Protection Organization*) publicou unha alerta sobre a *Phytophthora* do ameneiro no seu Sistema de Alerta Fitosanitaria, neste momento o fungo aínda non se describira. No ano 2004, Brasier e colaboradores describiron formalmente o axente causal da enfermidade como *Phytophthoraalni* e consideraron que podería ser un híbrido entre outras dúas especies de *Phytophthora*, *cambivora* e *fragariae*. Existen tres variantes; un híbrido estándar designado como *P. alnisubsp.alni*, unha variante sueca chamada *P. alnisubsp. uniformis*, e unha variante holandesa, alemá e do Reino Unido á que denominaron *P. alnisubsp. multiformis*. As árbores enfermas presentan follas máis pequenas do habitual, amarelas e dispersas, que a miúdo caen prematuramente. Prodúcese a morte de ramas e unha intensificación da floración e frutificación. O máis característico nas árbores afectadas é a presenza de necrose na zona interna da codia que produce notables cancro con exsudados a nivel do colo e madeiro.

En Galicia, como noutras partes de España, a existencia de procesos de decaemento dos ameneiros fíxose notable desde hai algúns anos, observándose mortalidades dispersas de arboredo. Cítanse en particular as ribeiras dos ríos Avia e Arenteiro, na provincia de Ourense, e a bacía alta do río Miño e os seus afluentes na provincia de Lugo. En 2009 confirmouse a presenza do fungo en cinco árbores distribuídas ao longo da ribeira do río Miño na provincia de Lugo. Tras unha mostraxe detallada, comprobouse que o patóxeno está amplamente distribuído en Galicia, encontrándose presente nun gran número de amieirais de ribeira das catro provincias galegas. A enfermidade é tan agresiva que algunhas previsións alertan da desaparición do ameneiro en Galicia nun prazo de 10-20 anos.

Dado o importante papel que desempeña esta especie na estabilización



Figura 2. Brotes que deron orixe aos exprantos.



Figura 3. Brotes utilizados na etapa de multiplicación.

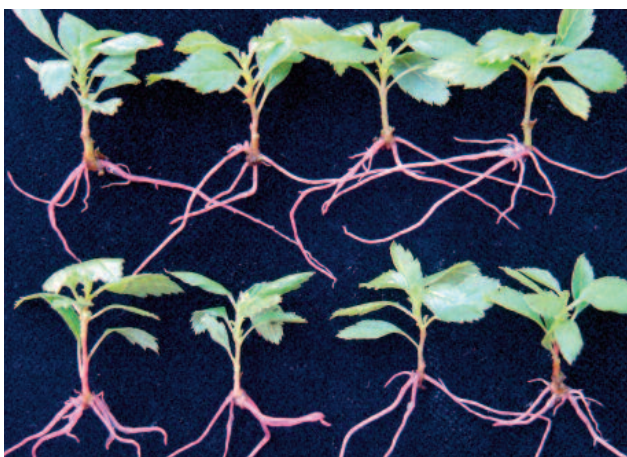


Figura 4. Plantas obtidas in vitro mediante a proliferación de xemas axilares.



Figura 5. As porcentaxes e supervivencia foron superiores ao 90%..

das beiras, na purificación e control da temperatura da auga, e na biodiversidade dos hábitats terrestre e acuático, a súa desaparición afectaría gravemente a estabilidade dos ecosistemas fluviais. O recoñecemento da importancia desta especie e o perigo que representa a extensión da enfermidade, da que non se coñece, polo momento, forma de combatela, fan necesario o desenvolvemento de novas estratexias que permitan a conservación de polo menos os exemplares máis representativos.

SOLUCIÓNS ACHEGADAS POLA BIOTECNOLOXÍA

Desde a década dos noventa, a biotecnoloxía ofrece novas posibilidades para a propagación e conservación das especies, e dentro destas técnicas cabe sinalar o cultivo in vitro de tecidos. A micropropagación baséase na totipotencia, que se pode definir como a capacidade que teñen as células vexetais para rexenerar plantas completas a partir de células ou tecidos das mesmas usadas como explantos. Das tres vías de micropropagación existentes, a proliferación de xemas axilares é a máis utilizada na actualidade, xa que garante a estabilidade xenética e pode aplicarse a unha gran variedade de especies. Mediante esta técnica conseguíuse establecer un sistema de propagación in vitro do ameneiro común a partir de material procedente de árbores adultas seleccionadas.

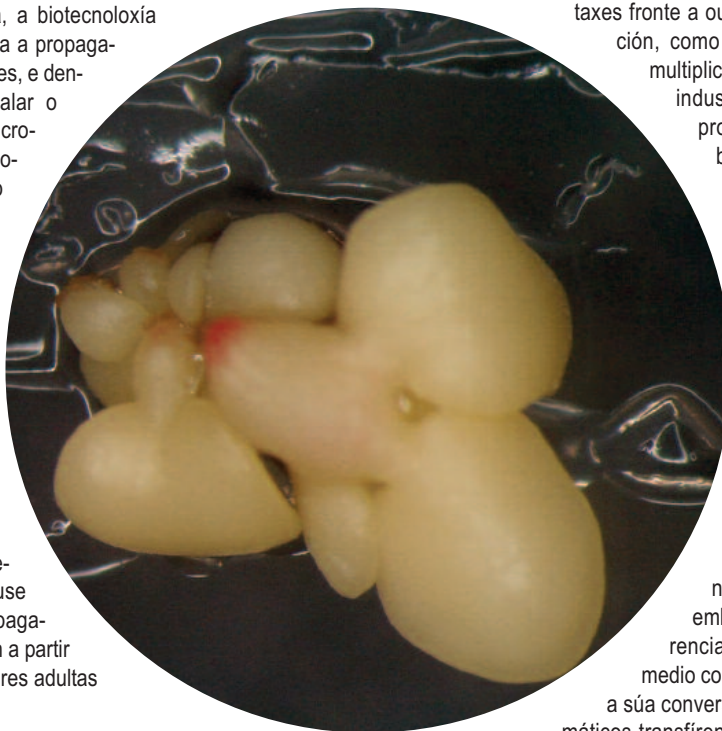


Figura 6. Indución de embrións somáticos.

Para a iniciación dos cultivos recóllense pólas da copa ou brotes basais de árbores de entre 20 e 30 anos (Figura 1), que se forzaron a xermolar en condicións controladas. Os brotes desenvolvidos (Figura 2) foron a orixe dos explantos (seccións apicais e nodais) para o establecemento dos cultivos utilizando o medio mineral definido por Lloyd e McCown (WPM), suplementado con 2 mg/l de benciladenina e 0.5 mg/l de ácido indol acético para facilitar o desenvolvemento dos brotes. Na etapa de multiplicación utilizouse este mesmo medio mineral con 0.1 mg/l de benciladenina, sendo necesarias 3 transferencias a medio fresco de igual composición para a elongación dos brotes (Figura 3). Cando estes alcanzan unha lonxitude de entre 1,5 e 2cm, poden ser illados e enraizados para a obtención de plantas completas. Na fase de enraizamento utilizouse o medio WPM cos macronutrientes reducidos á metade e 0.1 mg/l de ácido indol butírico. A formación das raíces ten lugar na parte inferior dos brotes e aparecen a partir dos 10-12 días de cultivo (Figura 4). As plantas son posteriormente transferidas a macetas cunha mestura de terra e perlita (3:1), manténdose no invernadoiro por un período de 2-3 meses para a súa aclimatación.

As porcentaxes de supervivencia foron superiores ao 90% (Figura 5) (San José et al., 2013). Desta forma, se o material procede de árbores resistentes á enfermidade, obteríanse miles de copias que son xeneticamente iguais aos seus proxenitores e que poderían ser utilizadas para a repoboación das zonas afectadas pola enfermidade.

Segmentos apicais e nodais dos brotes na fase de multiplicación poden ser almacenados en armarios frigoríficos cunha temperatura de entre 2 a 4°C até 18 meses. Mediante esta técnica de crecemento reducido conséguese espazar considerablemente o período de subcultivo, reducindo

significativamente os custos de propagación e o risco de contaminación, o que permitiría almacenar a baixo custo centos de clons mentres se realizan os traballos de campo.

Outra vía de micropropagación é a denominada embrioxénese somática, a cal se pode considerar como a expresión máxima da totipotencia vexetal. Mediante esta vía pódese obter unha estrutura bipolar, semellante a un embrión cigótico, a partir de células somáticas, sen que se produza a fusión de gametos como acontece na propagación sexual.

A embrioxénese somática presenta unha serie de vantaxes fronte a outros métodos de micropropagación, como a súa enorme capacidade de multiplicación que permitiría a produción industrial, ademais de obter nun só proceso estruturas completas (co brote e a raíz) que poden ser almacenadas doadamente e encapsular para a formación da denominada semente artificial. No caso do ameneiro utilizáronse embrións cigóticos inmaturos que, unha vez illados, se situaron no medio mineral definido por Murashige e Skoog, suplementado con benciladenina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético en pequenas doses (este último é un regulador de crecemento utilizado habitualmente neste campo) para a indución dos embrións (Figura 6). Unha vez diferenciados, multiplícanse no mesmo medio con 0.1 mg/l de benciladenina. Para a súa conversión en plantas, os embrións somáticos transfírense a medio con 3% de maltosa seguido de 6 semanas no medio WPM con 0.1 mg/l de benciladenina e 0.1 mg/l de zeatina (Corredoira et al., 2013). Este protocolo ofrece grandes posibilidades para a propagación en masa e conservación do ameneiro.

Ápices procedentes dos cultivos en multiplicación e embrións somáticos poden ser almacenados en nitróxeno líquido (crioconservación) durante períodos ilimitados de tempo, o cal facilitaría a creación dun banco de xermoplasma da especie cun custo reducido. En ambos os dous casos utilizouse a técnica de vitrificación, mediante a cal os tecidos son deshidratados con solucións altamente concentradas que evitan o risco de formación de cristais de xeo dentro das células, o que facilita a recuperación dos explantos unha vez desconxelados. A partir dos ápices conseguíronse porcentaxes de supervivencia dun 50%, mentres que chegan ao 90% cos embrións somáticos.

En conclusión, mediante a técnica de propagación in vitro é posible conseguir a clonación de exemplares de ameneiro seleccionados que poidan, posteriormente, ser transferidos ao campo para o repoboación dos bosques de ribeira afectados pola enfermidade da podremia dos ameneiros, contribuíndo así á estabilidade dos ecosistemas fluviais.

Bibliografía

- Álvarez et al. 2000. Manual de selvicultura de frondosas caducifolias. USC.
- Brasier et al. 2004. Mycol. Res. 108: 1172
- Corredoira et al. 2013. Trees 27: 1597
- San José et al. 2013. Silva Fennica 47: 1

*M. Carmen San José e Elena Corredoira traballan no Instituto de Investigacións Agrobiolóxicas de Galicia. CSIC; Laura V. Janeiro é membro do INLUDES (Deputación de Lugo).