

DETECCIÓN DE *ARMILLARIA* MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO DE DIFERENTES ESPECIES FORESTALES EN GALICIA

Paula Escofet Crespo¹, Olga Aguiñ Casal¹, María Jesús Sáinz Osés² y José Pedro Mansilla Vázquez^{1,2}

¹ Estación Fitopatológica do Areeiro (Diputación Pontevedra). Subida la Robleda s/n. 36153-PONTEVEDRA (España). Correo electrónico: efa@efa-dip.org

² Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario. 27002-LUGO (España)

Resumen

El género *Armillaria* incluye especies patógenas que causan pudrición del sistema radicular, y posterior muerte de plantas leñosas. En el suelo, estos hongos se propagan por crecimiento vegetativo y se extienden por las raíces. El diagnóstico de *Armillaria* se realiza habitualmente mediante métodos moleculares basados en la amplificación del ADN fúngico a partir de muestras vegetales invadidas por micelio o rizomorfos. En este trabajo, se aplicaron técnicas de análisis molecular para detectar la presencia de *Armillaria* en suelos donde crecían las siguientes especies forestales sintomáticas: *Abies* sp., *Cedrus* spp., *Cupressocyparis leylandii*, *Pinus* sp., *Chamaecyparis* spp., *Thuja* sp., *Tsuga canadensis*, *Acacia* spp., *Robinia* sp., *Betula celtiberica*, *Castanea* sp., *Quercus* spp., *Aesculus hippocastanum*, *Eucalyptus* sp., *Laurus nobilis*, *Liquidambar* sp., *Populus alba* y *Taxus baccata*. Se tomaron muestras de suelo en las proximidades de la raíz de cada planta, llevando a cabo una extracción del ADN fúngico y posterior amplificación de la región ITS mediante nested-PCR. El producto obtenido se analizó mediante RFLP para discriminar entre especies de *Armillaria*. Los resultados, contrastados por secuenciación del ADN y análisis del material vegetal sintomático, mostraron que la especie más frecuente, causante de pudrición blanca radicular, es *A. mellea* (74%), aunque también se han detectado *A. ostoyae* (10%) y *A. gallica* (16%).

Palabras clave: *Armillaria* spp., Pudrición radicular, Forestal, Nested-PCR, RFLP

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies del género *Armillaria* causan una enfermedad conocida como podredumbre blanca radicular ocasionando grandes pérdidas económicas. Las especies *Armillaria mellea* y *A. ostoyae* son altamente patógenas para plantas leñosas (FOX, 2000), mientras que *A. gallica* se considera un patógeno

no débil, pero que puede causar enfermedad en árboles debilitados (SICOLI et al., 2002). Las especies de *Armillaria* se propagan en el suelo por crecimiento vegetativo subterráneo y se extienden por el sistema radicular de árboles susceptibles (KILE et al., 1991).

El análisis de suelos infectados, mediante técnicas moleculares, permite la detección y amplificación del ADN fúngico de *Armillaria* de

forma rápida y fiable, sin la necesidad de obtener aislados del hongo a partir del micelio subcortical de plantas enfermas (LOCHMAN et al., 2004) lo que facilita adoptar las medidas preventivas necesarias para reducir los daños causados por el hongo.

El objetivo de este trabajo es detectar y diferenciar especies de *Armillaria* mediante técnicas moleculares a partir de suelos donde vegetan especies forestales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras

Se recogieron 60 muestras de suelo (aproximadamente 1 kg) en la proximidad de las raíces (entre 10-30 cm de profundidad en el terreno) de 29 especies forestales diferentes localizadas en las provincias de Pontevedra, A Coruña, Lugo y Ourense que mostraban clorosis, decaimiento y caída de hojas, y se consideraba que podrían estar afectadas por podredumbre blanca radicular causada por *Armillaria*. En 8 muestras de tierra que además incluían raíces, se detectó micelio y/o rizomorfos mediante inspección visual en el laboratorio. Posteriormente todas las muestras se almacenaron a 4°C hasta su análisis. En la tabla 1 se presenta el hospedante, procedencia y tipo de muestra.

Las técnicas moleculares empleadas para el análisis de *Armillaria* en suelo se han basado en el protocolo propuesto por LOCHMAN et al. (2004) con modificaciones en las diferentes etapas del proceso (ESCOFET et al., 2006) como la obtención del ADN empleando distinto kit de extracción, la utilización de "PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads" (Amersham-Pharmacia) en la amplificación, y electroforesis en gel de agarosa para analizar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Extracción de ADN a partir de suelo y planta

La extracción de ADN de *Armillaria* de las muestras de tierra se llevó a cabo con el kit comercial "PowerSoil™ DNA Isolation" (MO BIO Laboratories, Inc.). A partir de 1 g de suelo se obtuvo un ADN de gran calidad que se conservó a -20°C hasta su amplificación. Para cada muestra analizada se incluyó también un control

positivo, que consistió en 15 mg de micelio de *Armillaria* sp. y 1 g de tierra esterilizada dos días consecutivos a 121°C durante 30 minutos, y un control de extracción que sólo contenía suelo esterilizado.

Las muestras que incluían diferentes estructuras del hongo - micelio sobre planta y rizomorfos - fueron analizadas según el protocolo de MANSILLA et al. (2000) empleándose para la extracción del ADN ribosomal (ADNr) el kit comercial "EZNA fungal DNA miniprep" (Omega Biotek).

Amplificación mediante nested-PCR/PCR

Para amplificar el ADN extraído de las muestras de tierra se realizó una nested-PCR, empleando "PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads" (Amersham-Pharmacia). Un microlitro de ADN aislado se mezcló con 0,12 µM de los primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) completando con agua pura hasta un volumen final de 25 µl. En la segunda reacción, se utilizaron 2 µl del producto de la primera reacción con 0,5 µM de cada primer específico AR1 y AR2 (LOCHMAN et al., 2004) completando con agua hasta un volumen final de 50 µl. En ambos procedimientos, la amplificación se realizó en un termociclador "PCR Express" (Thermo Hybaid) programado con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 150 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento de los primers a 55°C durante 40 segundos, elongación a 72°C durante 30 segundos, y una elongación final a 72°C durante 5 minutos. Para la segunda amplificación, se utilizaron los mismos parámetros que en la primera PCR, con excepción del anillamiento de primers que se realizó a 60°C y la elongación final a 7 minutos.

El ADN resultante de la extracción a partir del material sintomático se amplificó mediante PCR con los primers LR12R (VELDMAN et al., 1981) y O-1 (DUCHESNE & ANDERSON, 1990).

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. En cada prueba se cargaron 5 µl de cada muestra, del control positivo, negativo y de extracción, y un marcador de 100 pares de bases (pb) hasta 2642 pb (MXIV, Roche Diagnostics). La electroforesis se realizó a 120 voltios durante 50

minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg.ml⁻¹) y se observaron con un transiluminador de luz ultravioleta.

Análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Los productos de ADN de la segunda amplificación de las muestras de tierra fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Hinf*I y *Mbo*I (Fermentas) para el análisis mediante RFLP. Las mezclas de restricción se prepararon con 20 µl de cada amplicón y 4 unidades de la enzima *Mbo*I u 8 unidades de la enzima *Hinf*I, y se incubaron a 37°C durante 1 hora para *Mbo*I y 12 horas con *Hinf*I. El ADNr amplificado a partir del material vegetal sintomático se cortó con las enzimas *Alu*I, *Nde*I y *Bsm*I (Roche Diagnostics) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% a 100 voltios durante 120 minutos. Para la estimación del tamaño de las bandas, se utilizaron el marcador Hyperladder V de 25 pb hasta 500 pb (Bioline) y el Hyperladder II de 50 hasta 2000 pb (Bioline). El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en el transiluminador de luz ultravioleta. La imagen del gel se capturó con un sistema de fotodocumentación y el tamaño de bandas se analizó con el software 1-D Manager (TDI, Madrid).

La identificación de las especies de *Armillaria* en suelo se basó en la comparación del tamaño de los fragmentos digeridos con los publicados por LOCHMAN *et al.* (2004). Los fragmentos de restricción producidos por las tres enzimas sobre el fragmento LR12R-01 de distintas especies de *Armillaria* en material vegetal se compararon con los publicados por HARRINGTON & WINGFIELD (1995) y PÉREZ *et al.* (1999).

Secuenciación

Para validar los resultados de identificación de especies de *Armillaria*, se secuenció el ADN de tres muestras de suelo. El producto de amplificación se purificó con el kit "High Pure PCR Product Purification" (Roche Diagnostic). En la reacción de secuenciación se empleó el terminador "Big Dye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems). Para

eliminar contaminantes, la reacción de secuenciación se precipitó con etanol y el precipitado se resuspendió en formamida "Hi-Di™" (Applied Biosystems). Tras ser sometido a una desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, el ADN amplificado se separó en un secuenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se analizaron con el Sequencing Analysis 5.1 y mediante el programa de alineamiento BLAST, se compararon las secuencias de las muestras con las que existen en el Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 46 de las 60 muestras de tierra analizadas se observaron bandas de amplificación de 882 pb en la primera reacción y 724 pb en la segunda, y los tamaños de los fragmentos de restricción, obtenidos con la enzima *Hinf*I fueron de 401, 159, 148 pb, y con *Mbo*I de 235, 215, 149, 125 pb, lo que se corresponde con los resultados obtenidos por LOCHMAN *et al.* (2004) para *A. mellea*. Diez análisis de tierra mostraron amplificaciones de 868 y 711 pb en la primera y segunda PCR respectivamente, y las bandas de digestión fueron de 294, 227, 69, 63, 43 pb con *Hinf*I y de 277, 222, 214 pb con *Mbo*I, lo que coincide con lo publicado por LOCHMAN *et al.* (2004) para *A. gallica*. En 6 muestras de tierra los tamaños de amplificación (870 y 713 pb), y los patrones de restricción (*Hinf*I: 294, 228, 75, 69, 31 pb y de 351, 222, 137 pb con *Mbo*I) indican la presencia de *A. ostoyae*. En las figuras 1 y 2 se muestran los tamaños de los fragmentos de restricción de las 3 especies encontradas.

En las 8 muestras, que además de tierra, también incluían material vegetal sintomático en el que se detectaron estructuras fúngicas, se obtuvo el mismo resultado que el conseguido con el análisis de tierra.

Tres de las muestras de suelo fueron secuenciadas con los primers AR1 y AR2, y las secuencias resultantes se compararon con las depositadas en el Gen-Bank dando valores de similitud entre un 97-99%.

Los resultados, contrastados por secuenciación del ADN y análisis del material vegetal sin-

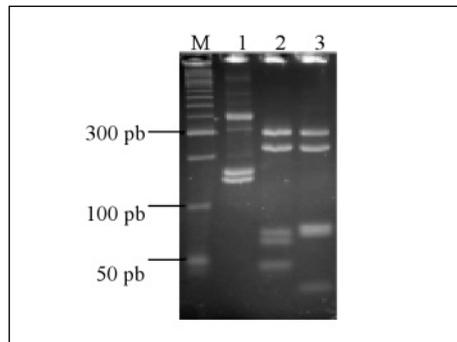


Figura 1. Gel de agarosa al 3% mostrando los fragmentos de digestión del ADN amplificado, con la enzima *HinfI*: *A. mellea* (1), *A. gallica* (2), *A. ostoyae* (3). M: marcador *Hyperladder II* de 50 hasta 2000 pb

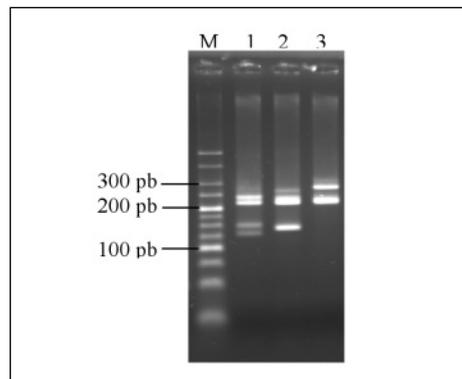


Figura 2. Gel de agarosa al 3% mostrando los fragmentos de digestión del ADN amplificado, con la enzima *MboI*: *A. mellea* (1), *A. ostoyae* (2), *A. gallica* (3). M: marcador *Hyperladder V* de 25 hasta 500 pb

tomático, mostraron que la especie más frecuente causante de pudrición blanca radicular es *A. mellea*, ya que se detectó en el 74% de las muestras analizadas. En menor porcentaje también se han identificado *A. gallica*, en un 16%, y *A. ostoyae*, en un 10%. Los datos obtenidos según el tipo de análisis realizado para cada muestra se detallan en la tabla 1.

Resultados similares encuentran AGUÍN et al. (2004b) en muestras analizadas en el noroeste de España indicando que la especie más frecuente es *A. mellea* (71%) y que causa sintomatología en arbustos ornamentales, kiwi, viña, árboles frutales y árboles de hoja ancha. Los mismos autores también detectan *A. gallica*, aunque con baja incidencia, en ornamentales, coníferas, árboles frutales, árboles de hoja ancha

y viña; y *A. ostoyae*, afectando principalmente a *Pinus* spp.

Actualmente no hay ningún método eficaz que controle *Armillaria* cuando aparecen plantas enfermas, aunque estudios recientes *in vitro* y en viñedo y plantaciones de almendro (sobre patrones de melocotonero) han mostrado resultados prometedores de ciertos azoles (ciproconazol y propiconazol) para el control de *A. mellea* (ADASKAVEG et al., 1999; AGUÍN et al., 2006). La prevención de la podredumbre causada por *Armillaria* se ve favorecida con la aplicación de esta metodología que facilita un diagnóstico temprano y óptimo, previo a la aparición de plantas sintomáticas, y permite la detección e identificación de varias especies en una misma muestra de tierra.

HOSPEDANTE	PROCEDENCIA	TIPO DE MUESTRA	Nested-PCR/RFLP	PCR/RFLP SECUENCIACIÓN
<i>Abies</i> sp.	Vigo (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Acacia decurrens</i>	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Acacia</i> sp.	A Estrada (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Santiago (CO)	Tierra y corteza	<i>A. mellea</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. gallica</i>	-
<i>Betula celtiberica</i>	Vigo (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Callitris</i> sp.	A Caeira (PO)	Tierra y raíz	<i>A. mellea</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Castanea sativa</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Castanea sativa</i>	Cangas (PO)	Tierra	<i>A. mellea, A. gallica</i>	-
<i>Castanea sativa</i>	Meira-Moaña (PO)	Tierra	<i>A. gallica</i>	-
<i>Castanea sativa</i>	Orense	Tierra	<i>A. gallica</i>	-
<i>Castanea sativa</i>	Monteporreiro (PO)	Tierra y raíz	<i>A. mellea</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Castanea sativa</i>	Ribadumia (PO)	Tierra y corteza	<i>A. gallica</i>	<i>A. gallica</i>
<i>Castanea sativa</i>	Vigo (PO)	Tierra	<i>A. gallica</i>	-
<i>Cedrus deodara</i>	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Cedrus deodara</i>	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. gallica</i>	-
<i>Cedrus libani</i>	Vigo (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Cedrus</i> sp.	Marín (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Cedrus</i> sp.	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Cedrus</i> sp.	Sotomayor (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Chamaecyparis plumosa</i>	Vigo (PO)	Tierra	<i>A. ostoyae</i>	-
<i>Chamaecyparis squarrosa</i>	Vigo (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Cupressocyparis leylandii</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Cupressocyparis leylandii</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Eucalyptus</i> sp.	Poio (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Ilex aquifolium</i>	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Laurus nobilis</i>	Vigo (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Liquidambar</i> sp.	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Pinus radiata</i>	Lugo	Tierra y raíz	<i>A. ostoyae</i>	<i>A. ostoyae</i>
<i>Pinus</i> sp.	Coruña	Tierra y raíz	<i>A. ostoyae</i>	<i>A. ostoyae</i>
<i>Pinus</i> sp.	Coruña	Tierra y raíz	<i>A. ostoyae</i>	<i>A. ostoyae</i>
<i>Pinus</i> sp.	Lugo	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Pinus</i> sp.	Lugo	Tierra	<i>A. ostoyae</i>	-
<i>Pinus</i> sp.	Lugo	Tierra y raíz	<i>A. mellea, A. ostoyae</i>	<i>A. ostoyae</i>
<i>Pinus</i> sp.	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Populus alba</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Populus alba</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. gallica</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. gallica</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Redondela (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Monterroso (LU)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Mos (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus robur</i>	Agolada (PO)	Tierra	<i>A. gallica</i>	-
<i>Quercus robur</i>	A Estrada (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus rubra</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus rubra</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus rubra</i>	Sotomayor (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus</i> sp.	Lugo	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Quercus suber</i>	O Rosal (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Robinia</i> sp.	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Robinia</i> sp.	Santiago (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Salix babylonica</i>	Pontevedra	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Taxus baccata</i>	Sotomayor (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Thuja</i> sp.	Sotomayor (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Thuja</i> sp.	Ribadeo (LU)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Thuja</i> sp.	Padrón (CO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	-
<i>Tsuga canadensis</i>	Sotomayor (PO)	Tierra	<i>A. mellea</i>	<i>A. mellea</i>

Tabla 1. Hospedante, procedencia, tipo de muestra y resultados obtenidos según los análisis realizados para cada muestra

BIBLIOGRAFÍA

- ADASKAVEG, J.E.; FÖRSTER, H., WADE, L.; THOMPSON, D.F. & CONNELL, J.H.; 1999. Efficacy of sodium tetrathiocarbonate and propiconazole in managing *Armillaria* root rot of almond on peach rootstock. *Plant Dis.* 83: 240-246.
- AGUÍN, O.; SAINZ, M.J. & MANSILLA, J.P.; 2004a. *Armillaria* species infecting vineyards in northwestern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 683-687.
- AGUÍN, O.; MANSILLA, J.P. & SAINZ, M.J.; 2004b. Intraspecific variation in *Armillaria* species from shrubs and trees in northwestern Spain. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 299-304.
- AGUÍN, O.; MANSILLA, J.P. & SAINZ, M.J.; 2006. In vitro selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root rot of grapevine in the field. *Pest Manag. Sci.* 62: 223-228.
- DUCHESNE, L.C. & ANDERSON, J.B.; 1990. Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria*. *Mycological Research* 94: 266-269
- ESCOFET, P.E.; AGUÍN, O. Y MANSILLA, J.P.; 2006. Detección e identificación por técnicas moleculares de especies del género *Armillaria* a partir de muestras de suelo. *Bol. San. Veg., Plagas* 32: 231-240
- FOX, R.T.V.; 2000. *Armillaria* root rot: *Biology and control of honey fungus*. Ed. Intercept Limited. Andover.
- HARRINGTON, T.C. & WINGFIELD B.D.; 1995. A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* 87(2): 280-288.
- KILE, G.A.; 1991. *Armillaria root disease*. Agriculture Handbook No. 691. Forest Service, United States Department of Agriculture. Washington, D.C.
- LOCHMAN, J.; SERY, O. & MIKES, V.; 2004. The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 105-110.
- MANSILLA, J.P.; AGUÍN, O.; ABELLEIRA, A. Y SAINZ, M.J.; 2000. Adaptación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especies de *Armillaria* en Galicia. *Bol. San. Veg., Plagas* 26: 79-88.
- PÉREZ, A.; WHITEHEAD, D. & WHITEHEAD, M.; 1999. Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species. *Mycological Research* 103: 1631-1636.
- SICOLI, G.; ANNESE, V.; GIOIA, T. & LUISI, N.; 2002. *Armillaria* pathogenicity tests on oaks in southern Italy. *J. Plant Pathol.* 84(2): 107-111.
- VELDMAN, G.M.; KLOOTWIJK, J.; DE REGT, V.C.H.F. & RUDI, R. J.; 1981. The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. *Nucleic Acids Research* 9: 6935-6952.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J.; 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and application*: 315-322. Academic Press. San Diego.