

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE *MITOVIRUS* EN EL CRECIMIENTO MICELIAL DE AISLADOS DE *GREMMENIELLA ABIETINA* *IN VITRO* EN DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA, PH Y POTENCIAL OSMÓTICO

Carmen Romeralo Tapia¹, Leticia Botella Sánchez¹, Oscar Santamaría Becerril² y Julio Díez Casero¹

¹Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid-INIA. Avda. Madrid 44, Edificio E. 34004-PALENCIA (España). Correo electrónico: carmen.romeralo@pvs.uva.es

²Dpto. Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura. Avda. Adolfo Suárez s/n. 06007-BADAJOS (España). Correo electrónico: osantama@unex.es

Resumen

Los *mitovirus* son virus exclusivamente fúngicos que han sido aislados de algunos patógenos forestales, como *Gremmeniella abietina*. En algunos casos pueden reducir la virulencia del hongo, por lo que existe un creciente interés por su posible papel como agentes de control biológico. En este trabajo, se ha llevado a cabo un estudio preliminar para evaluar el efecto de la temperatura (5°; 15°; 25° y 35°C), el pH (4; 5; 7 y 9) y el potencial osmótico (-0.6MPa; -1.2MPa; -1.8MPa y -2.4MPa) en el crecimiento micelial de siete aislados de *G. abietina* bajo condiciones controladas de laboratorio. Cuatro de los aislados tenían *mitovirus* y tres de ellos no. Durante el experimento, el crecimiento micelial fue registrado semanalmente hasta completar 8 mediciones. Las mayores colonias fueron observadas en las placas Petri con pH 4 y 5, temperatura de 15°C y el potencial osmótico de -2.4MPa, mientras que las más pequeñas fueron las emplazadas a 35°C. El crecimiento micelial en los aislados con *mitovirus* fue mayor que el de los aislados sin *mitovirus* a 15°C, mientras que sucedió lo contrario en los tratamientos de -0.6MPa y -1.8MPa. El estudio ha proporcionado conocimiento del efecto de la presencia de *mitovirus* en los aislados de *G. abietina*.

Palabras clave: Control biológico, ARNdc, Hipovirulencia, Hipervirulencia, Micovirus

INTRODUCCIÓN

Gremmeniella abietina (Lagerberg) Morelet (anamorfo *Brunchorstia pinea* (P. Karsten) Höhnelt) es un hongo patógeno que ha causado graves pérdidas en plantaciones y en bosques naturales de coníferas en el hemisferio norte (DORWORTH, 1979; KAITERA & JALKANEN, 1992). En España se

encontró por primera vez en 1929 en *Pinus pinaster* (MARTÍNEZ, 1933) y en *Pinus halepensis* en 1999 (SANTAMARÍA et al., 2003) aunque sólo se ha aislado de árboles sintomáticos de *P. halepensis*.

Los micovirus están presentes en la mayoría de los grupos de los hongos que producen enfermedades a las plantas (GHABRIAL & SUZUKI, 2009; PEARSON et al., 2009). Los síntomas derivados de

la presencia de los micovirus varían y pueden ir desde la no aparición de síntomas, como ocurre en la mayoría de los casos, a la atenuación (hipovirulencia) e incluso al aumento de su virulencia (hipervirulencia) (GHABRIAL & SUZUKI, 2009). Uno de los géneros descritos actualmente de los micovirus es el género *Mitovirus*, el cual, se ha encontrado en algunos hongos fitopatógenos como *Cryphonectria parasitica* (POLASHOCK & HILLMAN, 1994) o *Ophiostoma novo-ulmi* (ROGERS et al., 2009). Recientemente, se han detectado posibles cepas del género *Mitovirus* en los aislados españoles de *G. abietina* (BOTELLA et al., 2011).

La reducción de la virulencia puede estar relacionada, entre otras razones, a un crecimiento micelial anómalo causado por la presencia de *mitovirus* (GHABRIAL & SUZUKI, 2009; PEARSON et al., 2009). Sin embargo, el crecimiento micelial puede estar también influido por otros factores como la temperatura, el pH o el potencial osmótico. El principal objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la presencia de *mitovirus* en aislados de *G. abietina*, sobre su crecimiento micelial, bajo diferentes condiciones de temperatura, pH y potencial osmótico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron siete aislados españoles de *G. abietina*, cuatro de los aislados contaron con *mitovirus* (P3-12, 00P-07, Hon 3-3 y P1-12) y tres sin ellos (Hon 9-2; P1-8 y VAI-13) (BOTELLA et al., 2011). Cuatro semanas antes del experimento, los hongos fueron subcultivados en medio MOS-agar (extracto de naranja, serum y agar, MÜLLER et al., 1994) y guardados a 15°C en oscuridad para obtener suficiente micelio. Para llevar el control del crecimiento, en la base de cada placa Petri se dibujaron dos líneas perpendiculares y en el punto de intersección se colocó un cuadrado de 0,25 cm² de micelio de cada uno de los aislados. El crecimiento micelial se midió una vez a la semana durante 8 semanas consecutivas. La variable respuesta fue el área de crecimiento y se calculó mediante la siguiente fórmula: Área = $\pi/4$ ($d_1 \times d_2$) donde d_1 y d_2 representaban los dos diámetros de la colonia medidos a lo largo de las líneas.

Se llevaron a cabo tres experimentos en los que se analizaron el efecto (i) de la temperatura (rango de temperaturas analizadas: 5°; 15°; 25° y 35°C), (ii) del valor de pH (con valores de pH de 4; 5; 7 y 9) y (iii) del potencial osmótico (ψ_{π} de 0,6; -1,2; -1,8 y -2,4 MPa) sobre el crecimiento micelial de *G. abietina*. Los dos últimos experimentos se realizaron a 15° C, al ser ésta la temperatura óptima de crecimiento (SANTAMARÍA et al., 2004), y todos en oscuridad. Los diferentes pH se consiguieron añadiendo HCL o KOH al medio MOS hasta alcanzar el pH requerido. Los diferentes potenciales osmóticos fueron conseguidos añadiendo diferentes concentraciones de KCL (250; 500; 750 y 1.000 mM) al medio MOS (LIRA-MÉNDEZ Y MAYEK-PÉREZ, 2006). Se realizaron cuatro repeticiones de cada combinación “aislado x tratamiento”.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS (SAS INSTITUTE INC., 2004). La variable respuesta en todos los modelos fue el área de crecimiento (mm²). Para cada experimento (temperatura, pH y potencial osmótico) se calculó un modelo para evaluar el efecto de la presencia de *mitovirus* (sí/no), los tratamientos (4) y sus interacciones mediante un análisis de variancia de dos entradas. Se tomó un nivel de significación del 95% en todos los análisis. Cuando se encontraron diferencias significativas en el modelo ANOVA, se aplicó un test de separación de medias Tukey-HSD. La normalidad, linealidad y homocedasticidad de los residuos fueron comprobadas mediante el test Shapiro-Wilk y mediante procedimientos gráficos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el experimento de las temperaturas, el área media de crecimiento fue significativamente diferente entre aislados con *mitovirus* y aislados sin *mitovirus* y entre temperaturas. Según el test de Tukey, el mayor crecimiento micelial se encontró a 15°C, lo cual concuerda con SANTAMARÍA et al. (2004) quien demostró previamente que los aislados españoles tenían su óptimo de crecimiento a esa temperatura. Al considerar las temperaturas por separado, sólo se encontraron diferencias significativas entre los aislados con y sin *mitovirus* en el experimento realizado a 15°C. La presencia de *mitovirus* parece tener un efecto en el crecimiento

micelial de *G. abietina* en su temperatura óptima de crecimiento, ya que los aislados con presencia de *mitovirus* presentaron mayor crecimiento micelial que los que no tenían *mitovirus* (Figura 1). Este aumento del crecimiento micelial en nuestros aislados podría estar relacionado con una mayor virulencia del patógeno, ya que de forma general la reducción de la virulencia se asocia a una disminución del crecimiento micelial, aunque es cierto que también puede estar asociada a otras características (GHABRIAL et al., 2009; PEARSON et al., 2008).

En el experimento del pH, el valor de éste afectó significativamente el crecimiento, pero no lo hizo la presencia de *mitovirus* en los aislados. El mayor crecimiento micelial en todas las muestras se observó a pH 4 mientras que el menor crecimiento en las placas con pH 9. En otros hongos, los efectos de los micovirus en general han mostrado sufrir variaciones cuando la composición en nutrientes de los sustratos difieren (VAN DIEPENINGEN et al., 2006), lo que no coincide con nuestros resultados en los que la disponibilidad de los nutrientes estuvo condicionada por los valores de pH, y sin embargo, el efecto de los *mitovirus* no fue evidente.

En el experimento de los potenciales osmóticos, en los valores de -0,6 MPa y -1,8 MPa los aislados con presencia de *mitovirus* presentaron un menor crecimiento micelial que los aislados

sin presencia de *mitovirus*. En nuestro estudio, no hubo una evidencia clara de que un descenso en el potencial osmótico produjera una reducción en el crecimiento micelial como se había observado previamente en otras especies fúngicas (PALMERO et al., 2008; ARMENGOL et al., 2011). Cambios en el comportamiento entre aislados con y sin micovirus se observaron previamente en diferentes potenciales osmóticos para *Monosporascus cannonballus* (ARMENGOL et al., 2011).

Los fitopatólogos se han interesado durante mucho tiempo por el uso potencial de los micovirus en el control biológico (PEARSON et al., 2009). Aunque muchos no producen cambios fenotípicos obvios es razonable asumir que muchas infecciones víricas pueden tener algún efecto en el crecimiento del hongo (McCABE et al., 1999). Los resultados de este experimento sugirieron que la presencia de *mitovirus* afectó al crecimiento micelial bajo diferentes condiciones de cultivo. Si nos basamos en los resultados anteriormente publicados, en las condiciones óptimas de crecimiento a 15°C, los aislados con *mitovirus*, al presentar mayor crecimiento micelial, podrían estar relacionados con una mayor virulencia del patógeno. Lo mismo puede obtenerse de los aislados que crecieron a un potencial osmótico de -2,4 MPa. Por el contrario los aislados que crecieron en medio con potenciales osmótico de -0,6 MPa y -1,8 MPa pre-

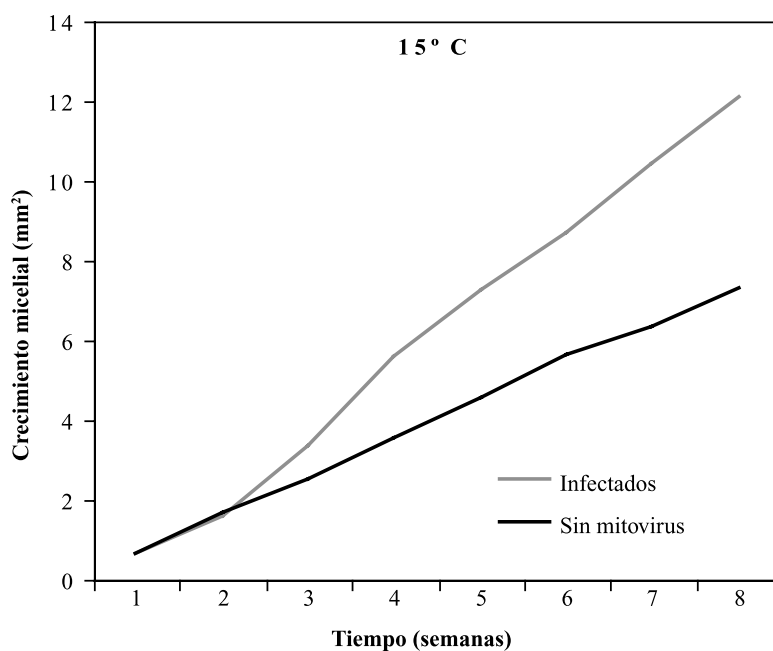


Figura 1. Crecimiento medio de los aislados infectados con *mitovirus* y sin ellos a 15°C durante 8 semanas

sentaron una disminución en el crecimiento micelial en los aislados con presencia de *mitovirus*, lo que podría estar relacionado con una disminución de la virulencia, o hipovirulencia de esos aislados. A pesar de que el crecimiento micelial es el principal factor que se relaciona con la patogenicidad del hongo, se recomienda la realización de otros estudios que incluyan otros parámetros asociados a la virulencia como las tasas de esporulación y la patogenicidad *in vivo*, para establecer una asociación clara entre la presencia de *mitovirus* y la virulencia de los aislados españoles de *G. abietina*.

Agradecimientos

Este estudio está financiado por el proyecto del Ministerio "Control biológico de *Gremmeniella abietina* en España (AGL2008-03622)."

BIBLIOGRAFÍA

- ARMENGOL, J.; ALANIZ, S.; VICENT, A.; BELTRAN, R.; ABAD-CAMPOS, P.; PÉREZ-SIERRA, A.; GARCÍA-JIMENEZ, J.; BEN SALEM, I.; SOULI, M. & BOUGHALLEB, N.; 2011. Effect of dsRNA on growth rate and reproductive potential of *Monosporascus cannonballus*. *Fungal Biol.* 115: 236-244.
- BOTELLA, L.; TUOMIVIRTA, T.T.; HANTULA, J. & DIEZ, J.J.; 2011. Viral dsRNA molecules are present in the Spanish population of *Gremmeniella abietina*. En: J.J. Diez, P. Martínez-Álvarez y C. Romeralo (eds.), *Actas del Congreso IUFRO WP 7.02.02 "Global Change and Forest Diseases: New Threats, New Strategies"*. Montesclaros, Spain.
- DORWORTH, C.E.; 1979. Influence of inoculum concentration on infection of Red Pine seedlings by *Gremmeniella-Abietina*. *Phytopathology* 69: 298-300.
- GHABRIAL, S.A. & SUZUKI, N.; 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Rev. Phytopathol.* 47: 353-384.
- KAITERA, J. & JALKANEN, R.; 1992. Disease history of *Gremmeniella-Abietina* in a *Pinus sylvestris* Stand. *Eur. J. For. Path.* 22: 371-378.
- LIRA-MÉNDEZ, K. Y MAYEK-PÉREZ, N.; 2006. Potencial osmótico variable en el crecimiento in vitro y la patogenicidad en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de *Fusarium* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(2): 88-97.
- MARTÍNEZ, J.; 1933. Una grave micosis del pino observada por primera vez en España. *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.* 33: 25-29.
- MCCABE, P.; PFEIFFER, P. & VAN ALFEN, N.; 1999. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends Microbiol.* 7: 377-381.
- MÜLLER, M.M.; KANTOLA, R. & KITUNEN, V.; 1994. Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycol. Res.* 98: 593-603.
- PALMERO, D.; DE CARA, M.; IGLESIAS, C.; RUIZ, G. & TELLO, J.C.; 2008. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 1405-1409.
- PEARSON, M.N.; BEEVER, R.E.; BOINE, B. & ARTHUR, K.; 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology RID D-3988-2011. *Mol. Plant Pathol.* 10: 115-128.
- POLASHOCK, J.J. & HILLMAN, B.I.; 1994. A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 8680-8684.
- ROGERS, S.L.; ATKINS, S.D. & WEST, J.S.; 2009. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. *Plant Pathol* 58: 324-331.
- SANTAMARÍA, O.; PAJARES, J.A. & DIEZ, J.J.; 2003. First report of *Gremmeniella abietina* on *Pinus halepensis* in Spain. *Plant Pathol.* 52: 425-425.
- SANTAMARÍA, O.; PAJARES, J.A. & DIEZ, J.J.; 2004. Physiological and morphological variation of *Gremmeniella abietina* from Spain. *Forest Pathol.* 34: 395-405.
- SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT®; 2004. *User's Guide*. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA.
- VAN DIEPENINGEN, A.; DEBETS, A. & HOEKSTRA, R.; 2006. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. *Fungal Genet. Biol.* 43: 446-452.