

TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A LA SANIDAD FORESTAL

Jonàs Oliva Palau

Departament of Forest Mycology and Pathology. Swedish University of Agricultural Sciences. Box 7026. 75007-UPPSALA (Suecia). Correo electrónico: jonas.oliva@slu.se

Resumen

La introducción de nuevos patógenos, enfermedades emergentes y la aparición de nuevas enfermedades a consecuencia de saltos de hospedante afectan a nuestros bosques, y representan nuevos retos de gran complejidad para la patología forestal. Estos fenómenos aparecen en un contexto de cambio climático y cambio de uso del bosque y requieren de una gran rapidez de respuesta. Las técnicas moleculares del análisis del ADN son una herramienta clave para dar respuestas a las demandas de los técnicos y la sociedad en general. Estas técnicas permiten obtener respuestas rápidas y precisas sobre la identidad del patógeno y su origen. Dependiendo del tipo de marcador, se pueden entender procesos a diferentes escalas y niveles: comunidad, especie, población o individuo. Por ejemplo, la estructura genética de la población da información sobre el modo de dispersión y el tipo de reproducción predominante: sexual o asexual. El ADN puede servir para cuantificar y detectar el patógeno directamente en tejidos o sustratos, sin necesidad de observar la enfermedad. El uso de marcadores genéticos puede facilitar la selección de variedades resistentes. Además de estudiar el patógeno como una especie aislada, podemos describir toda la comunidad microbiana con la que va asociado. Al contrario del ADN, el estudio del ARN permite entender qué procesos están activos a nivel celular tanto por parte del patógeno como por parte del hospedante. En el estudio de la comunidad microbiana, el ARN permite distinguir, de entre las especies presentes, aquellas fisiológicamente activas.

Palabras clave: *Especies invasoras, Patógenos introducidos, ADN, PCR, Piro-secuenciación*

INTRODUCCIÓN

La patología forestal se enfrenta hoy en día a problemas de gran complejidad. Patógenos invasores, enfermedades emergentes, nuevas enfermedades fruto de combinaciones nunca vistas de patógenos y hospedantes o incluso nuevos patógenos fruto de las hibridaciones amenazan las masas forestales en todo el mundo. En España, existe un alto número de patologías forestales en expansión, especialmente aquellas causadas por especies invasoras de patógenos forestales como el nemátodo del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*),

Fusarium circinatum, agente causante del chancro resinoso del pino o *Phytophthora alni* en los alisos. No hay que olvidar especies invasoras que ya están establecidas en la península ibérica y que continúan causando daños, como *Cryphonectria parasitica* agente causante del chancro del castaño, *Ophiostoma novo-ulmi* causante de la grafiosis del olmo o *Phytophthora cinnamomi* asociada a la seca de quercíneas; así como aquellas que podrían aparecer en el futuro como *Ceratocystis platani*, en plátanos, o *Chalara fraxinea* en fresnos. Para hacer frente a estas amenazas, los gestores, políticos y la sociedad en general demandan

soluciones basadas en hechos científicos. Los técnicos e investigadores en patología forestal deben ser capaces de mostrar en poco tiempo la identidad del patógeno, su biología, la etiología de la enfermedad que provoca, así como medidas de control. La longevidad y envergadura de las masas forestales hace que los experimentos sean a veces lentos a la hora de dar respuestas. Las técnicas moleculares de análisis del ADN son una herramienta poderosa que permite agilizar cuestiones básicas como: ¿Cuál es el patógeno? ¿De dónde viene? ¿Cómo se reproduce? ¿Dónde está? ¿Cómo ataca al hospedante? ¿Cómo se defiende el hospedante? ¿Dónde y cómo se dispersa? ¿Con qué otros microorganismos interactúa? Todas estas cuestiones son relevantes respecto a cómo vamos a gestionar la enfermedad. En esta revisión se van a dar ejemplos de cómo diferentes herramientas moleculares pueden ayudarnos a resolverlas. El lector familiarizado con el fundamento de las técnicas moleculares puede obviar los primeros puntos: ¿Porqué mirar en el ADN?. “La PCR: el fundamento...” e ir directamente siguiente párrafo: ¿Cuál es el patógeno?

¿PORQUÉ MIRAR EN EL ADN?

La principal ventaja del estudio del ADN es que estamos leyendo directamente las instrucciones para generar aminoácidos que luego van a generar proteínas, tejidos, y en definitiva los organismos mismos. Si dos organismos son distintos, bien a nivel morfológico o a nivel enzimático, diremos que tienen o muestran un fenotipo diferente. Si realmente son organismos diferentes, estas diferencias van a ser el resultado de diferencias en alguna parte de su genoma (genotipo). En cambio, podría tratarse del mismo organismo y mostrar diferencias debido al ambiente en el que se ha realizado la observación. A la hora de diferenciar organismos es más robusto mirar directamente a los genes (genotipo) que al fenotipo, fruto de la interacción del genotipo con el ambiente. Dicho de otra manera, cuando accedemos a una secuencia de ADN estamos mirando directamente a la información que genera esas diferencias, sin los efectos del ambiente. El ADN está en el núcleo y en las mitocondrias de las células. En los aproximadamente 10.000 genes

que contiene el genoma de un hongo (tomando los hongos como ejemplo de patógeno) es fundamental mirar en el sitio adecuado del genoma, para obtener la información correcta. Una vez sepamos dónde, las técnicas moleculares permitirán leer directamente esa parte del genoma. Las técnicas moleculares deben su éxito a que incluyen tres características deseables de toda metodología: son replicables, fácilmente transferibles y conceptualmente simples. El hecho de que sean transferibles facilita mucho la tarea de decidir qué y como estudiar una determinada zona del ADN. Si un segmento de ADN ha servido en una especie para resolver una cuestión, muy probablemente servirá en otra. Para el principiante, el uso de estas técnicas requiere familiarizarse con una notable cantidad de vocabulario y acrónimos. La mayoría de estos términos se refieren a diferentes técnicas, genes o plásmidos.

LA PCR: EL FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES

Haciendo honor a la tendencia de usar acrónimos, la técnica fundamental del análisis del ADN es la llamada PCR, del término inglés “Polymerase Chain Reaction”, denominada en castellano la reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica se basa en amplificar una determinada secuencia del genoma. El proceso consiste en tres etapas: extracción, amplificación y visualización. En la etapa de la extracción se rompen las paredes celulares para liberar el ADN que se encuentra en el núcleo y las mitocondrias. Tras las etapas de centrifugación y lavado se obtendrá una disolución de ADN. Dependiendo de la cantidad inicial de tejido, se va a conseguir más o menos cantidad. El ADN va a estar más o menos mezclado con otras sustancias que pueden inhibir el siguiente paso que es la amplificación. En las células, el ADN está agrupado en cromosomas formando cadenas larguísimas de ADN. Cuando se rompen las paredes celulares lo hacemos mecánicamente, y por tanto también se trocean las cadenas del ADN. Un mayor troceo aumentará la posibilidad de romper también el segmento de ADN que interesa.

El siguiente paso es la amplificación. Amplificar en este caso consiste en aumentar la concentración del segmento de ADN que intere-

sa. Este proceso se hace añadiendo a nuestra muestra de ADN una enzima llamada polimerasa, y para que ésta sepa qué copiar, se añaden una secuencia de comienzo y una de terminación correspondiendo con los flancos de la zona objetivo, llamados cebadores o “primers” en inglés. La enzima copia la cadena de ADN original de nuestra muestra añadiendo nucleótidos los adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), que también se añaden a la solución, para ir formando una copia exacta de ese fragmento. En nuestra muestra va a haber muchas copias originales por donde empezar a copiar, porque habremos extraído ADN de muchas células a la vez. La polimerasa copia de las copias, de manera que la concentración de ADN de la secuencia de interés crece exponencialmente. La amplificación se realiza en 30-40 ciclos cambiando la temperatura para facilitar el copiado o el enganche de los cebadores a las nuevas copias.

El resultado de este enriquecimiento se observa al final del proceso cuando visualizamos el ADN en un gel de electroforesis. Ponemos una pequeña cantidad de nuestra amplificación en un extremo de un gel y luego se genera corriente en ambos lados del gel de manera que el polo positivo atrae el ADN (con carga negativa), a la vez que se le fuerza a pasar por dentro del gel. Una mayor longitud de las cadenas de ADN de nuestro producto provocará una mayor resistencia, de manera que las cadenas se separarán dependiendo de su tamaño. La longitud de las cadenas se mide en pares de bases (bp), las más cortas avanzarán mucho y las más largas apenas se moverán. El gel se mezcla con bromuro de etidio, una sustancia que se adhiere al ADN y hace que éste brille a la luz ultravioleta. Debido a que hemos amplificado una secuencia concreta de una determinada longitud vamos a ver una banda brillante a una cierta distancia. El resto del ADN de la muestra inicial sigue estando ahí y también va a moverse dentro del gel, pero debido a que no ha sido amplificado, no va a ser posible visualizarlo al estar a una concentración mucho menor. Con esta técnica podemos obtener 2 tipos de información respecto a una determinada zona: la longitud entre cebadores, y la presencia/ausencia. Tras realizar la PCR sigue una innumerable lista de técnicas para completar la identificación, como por ejemplo cortar el ADN en determinados pun-

tos que nos interesen con diferentes enzimas, mediante una técnica llamada polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Sin embargo, hoy en día el paso natural después de la PCR es la secuenciación. Con este paso se obtendrá directamente la secuencia de nucleótidos. Las secuencias se comparten en diferentes bases de datos de internet donde se pueden comparar y comprobar a qué especie y a qué zona del genoma corresponden mediante una aplicación llamada BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

¿CUAL ES EL PATÓGENO?

La respuesta a esta pregunta representa un gran avance en el diagnóstico de una enfermedad y, aunque obvia en muchos casos, no siempre resulta fácil. Responder a esta pregunta normalmente pasa por nombrar la especie, y por eso es importante revisar la diferencia entre cómo definimos una especie y qué hacemos para reconocer una especie en realidad. WILEY (1978) definió una especie como un linaje simple de poblaciones ancestrales-descendientes que mantienen su identidad de otros linajes y que tienen sus propias tendencias evolutivas y destino histórico. El problema con esta definición es que no establece un criterio claro a seguir a la hora de diferenciar una especie de otra. Por eso, tradicionalmente se han usado criterios morfológicos, basados en diferencias de forma, o biológicos, basados en la capacidad que tienen los individuos de diferentes especies de cruzarse y generar descendencia fértil. El uso de estos dos criterios en el caso de hongos es complejo y a veces engañoso. Diferenciar patógenos mediante criterios morfológicos requiere de mucha experiencia a la hora de entender claves sistemáticas por la ausencia en muchos casos de órganos distintivos como esporas o estructuras reproductivas, que son además muy específicos de cada división. El elevado número de especies (estimaciones recientes hablan de 5,1 millones de especies de hongos (BLACKWELL, 2011)), y la falta de descripciones para muchas de ellas, complica aun más este tipo de identificación. Los criterios biológicos también son problemáticos. Detectan un rasgo, la incapacidad de aparearse o inter-esterilidad, que ocurre (si es que ocurre) dependiendo de cómo se hayan generado las especies. Dos especies se pueden

generar mediante un proceso alopátrico o simpátrico. Cuando las especies se forman debido a un proceso alopátrico lo hacen típicamente debido al aislamiento geográfico de dos poblaciones. El aislamiento impide el intercambio genético y hace que por ejemplo dos poblaciones A y B evolucionen de manera diferente adaptándose a sus respectivos ambientes *a* y *b*. Las poblaciones A y B, con el tiempo, devienen especies, y aunque estas acaben siendo muy diferentes a nivel morfológico, no existe ninguna razón evolutiva para eliminar la capacidad para aparearse que tenían al principio. Si en cambio la barrera geográfica desaparece, las dos especies van a encontrarse y la evolución va a determinar si van a fundirse otra vez o si existe algún incentivo para conservar su identidad. Si existe tal incentivo, la incapacidad de aparearse va a ser un rasgo ventajoso y por tanto va a tender a aumentar. Un ejemplo de incentivo podría ser que los individuos híbridos (AB) no se adaptasen bien a ninguno de los ambientes *a* y *b*. Esto causaría una selección negativa hacia aquellos individuos que pudieran aparearse y por tanto existiría una selección hacia una mayor inter-esterilidad (GARBELOTTO et al., 1998; OLIVA et al., 2011). En conclusión, al contrario de lo que ocurre en un ambiente simpátrico, en especiación alopátrica el aislamiento geográfico actúa como barrera reproductiva y por lo tanto no hace falta generarla.

El uso del concepto filogenético de especies resuelve los problemas del método morfológico, ya que observa las diferencias directamente en los genes (genotipo), sin la influencia del ambiente. Además no se necesita un medio de cultivo para hacer fructificar al patógeno y podemos estar seguros de que los rasgos que estamos observando, como la coloración o el tamaño de las esporas, no son el resultado del ambiente. El aislamiento reproductivo debido a condiciones simpátricas o alopátricas produce una diferenciación genética. La detección de una especie se basa en el estudio de cómo han evolucionado diferentes genes. La evolución de los genes se estudia mediante árboles filogenéticos. Los árboles muestran semejanzas entre las secuencias, cada secuencia correspondiente a un individuo diferente. Los límites de la especie vienen definidos por la superposición de diferentes árboles filogenéticos de diferentes genes. Si vemos que el mismo patrón de árbol se repite

entre diferentes genes, probablemente indique que no existe intercambio genético entre esos grupos de secuencia. Eso muestra que esas partes de la secuencias están fijadas en la especie. A partir de ese punto, existirán incongruencias, ya que dentro de las especies existirá cierta variación genética de alelos. No todos los genes evolucionan igual, ni todas las partes de los genes evolucionan igual, por lo tanto, un determinado gen puede mostrar variación entre ciertos grupos, pero puede que otro esté fijado (sea el mismo) entre los mismos grupos. Habrá partes de los genes que evolucionen más rápidamente, ya que son necesarios para adaptarse (selección positiva), y otros que por no ser tan importantes vayan a sufrir procesos de selección negativa, donde sólo aquellas combinaciones dañinas se eliminen de la población. Es importante usar más de un gen para poder detectar efectivamente si existe intercambio genético o no, y poder asignar diferentes secuencias a la misma especie. DETTMAN et al. (2003) mostraron la superioridad del reconocimiento filogenético en el caso del ascomiceto *Neurospora*. Demostraron que dos especies morfológicas de *Neurospora* - *Neurospora crassa* y *Neurospora intermedia* - inicialmente subdivididas en 5 especies biológicas, correspondían en realidad a 8 especies filogenéticas. Las 3 especies no mostradas por el método de reconocimiento biológico no habían desarrollado inter-esterilidad. Para ello utilizaron el árbol filogenético de 4 *loci* diferentes, entendiendo *locus* como una parte de un gen.

Mediante PCR buscamos amplificar zonas de aprox. 1.000 bp, distancia que normalmente abarca sólo una parte del gen, ya que los genes suelen ser más largos. Los genes tienen 2 tipos de secuencias que se van alternando, los intrones y los exones. Los exones son las secuencias que codifican proteínas, mientras que los intrones se eliminan al madurar el ARN y no codifican. Las mutaciones en los exones pueden ser dañinas para la célula por eso la evolución las ha ido eliminando, en cambio las mutaciones en los intrones no tienen ningún efecto y al estar dentro del mismo gen que los exones se transmiten a la prole. Una de las estrategias es copiar el intrón (variable) utilizando los exones (fijos) como anclaje de nuestra PCR. Un proceso similar a éste es el que se usa cuando amplificamos la

región de ADN correspondiente al espaciador transcrito interno (ITS), comúnmente usada para identificar hongos. Las regiones ITS se encuentran dentro del gen que se utiliza para hacer los ribosomas. Este gen es singular ya que el ARN no se traduce en proteínas, ya que los ribosomas están hechos de ARN. Los ribosomas son estructuras de las células que traducen el ARN mensajero en proteínas. Están en todos los organismos, tanto eucarióticos (hongos, nematodos, stramenopiles) como procarióticos (bacterias, arquea). En este caso, aunque no se trate de un gen común, se sigue la misma lógica: los cebadores se ponen en las regiones más conservadas (no variables entre especies), tales como las regiones 18S y 28S que hacen de flancos a las regiones variables, ITS 1 y ITS 2, y a una pequeña zona que sí codifica llamada 5.8 S (GARDES & BRUNS 1993). La presencia de un determinado alelo (variación en la secuencia de un gen) en por ejemplo la región ITS1 puede ser diagnóstico en caso de que todos los individuos de esa especie lo tengan, y no exista en otras especies cercanas.

No todas las especies tienen por qué presentar variabilidad en la región ITS. Esta región puede ser suficiente para diferenciar entre diferentes grupos de especies dentro de un género. Por ejemplo, en el género *Armillaria*, la región ITS diferencia entre dos grupos de especies, *Armillaria ostoyae* y *A. borealis*, y *Armillaria cepistipes* y *A. gallica*, pero no es suficientemente variable para diferenciar entre los dos pares de especies (SICOLI et al. 2003). Para solucionar este problema, podemos añadir más genes a nuestro análisis. Habitualmente se van a usar genes de mantenimiento (o “house keeping” en inglés), como β -tubulina (asociado al cito-esqueleto de las células), el factor de elongación α o los genes ribosómicos, presentes en todos los organismos. Hoy en día existen iniciativas para estandarizar un método de código de barras para los hongos con el que identificar todas las especies. Sin embargo, existen ciertos grupos en los que probablemente más de 5 genes van a ser necesarios para obtener una correcta resolución a nivel de especies (ROE et al., 2010). La ventaja de los genes ribosómicos frente a otros es también el alto número de copias que existen en el genoma p.ej. 150 copias en *Saccharomyces cerevisiae*, lo que incrementa las posibilidades de obtener copias intactas después del proceso de extracción. La

región ITS presenta además la ventaja de que existe un alto número de secuencias en la red (GenBank, NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), con las que podemos obtener fácilmente la identidad de nuestro patógeno, o al menos una buena estimación del género. Definir las poblaciones locales como una especie diferente, no es un asunto trivial. En Nueva Zelanda, la aplicación de cuarentena para madera con riesgo de traer *Heterobasidion annosum* se basó en el hecho de que la especie de *Heterobasidion* local era diferente (BUCHANAN, 1988) y por tanto importar una especie nueva era un riesgo potencial. Al mismo tiempo en Europa aún se consideraban la tres especies *H. annosum* s.s. *H. parviporum* y *H. abietinum* como una sola especie. Unos años más tarde se demostraba que en Italia, una especie americana de *Heterobasidion* causaba daños en *Pinus pinea* (GARBELOTTO et al., 2009) y se estaba hibridando con las especies nativas (GONTHIER & GARBELOTTO, 2011). La invasión por *Heterobasidion irregulare*, nativo de Norte América, pasó desapercibida hasta que, mediante métodos moleculares se demostró que los individuos detectados eran de otra especie y que habían sido introducidos al construir cuarteles con madera infectada durante la segunda guerra mundial (GONTHIER et al., 2004).

¿DE DÓNDE VIENE EL PATÓGENO?

Los patólogos forestales habitualmente están familiarizados con los patógenos típicos de su región. Sin embargo, es cada vez más común la aparición de organismos invasores introducidos de otras regiones del planeta, a su vez desconocidos por los técnicos locales. Al encontrar un nuevo patógeno, existen dos posibilidades: ya estaba y no había causado daños, o acaba de llegar. Para tratar estas cuestiones debemos entender lo que ocurre a nivel de población dentro de la especie. Los patógenos invasores tienen normalmente una estructura de población diferente a la de un patógeno nativo. Son menos variables, y puede que sólo se reproduzcan asexualmente debido a la falta de otros individuos compatibles con los que cruzarse y generar descendencia.

Al colonizar un nuevo sitio la población sufre un proceso de deriva genética llamado efecto fundador. Los alelos de los genes de los

patógenos invasores se amplifican p.ej. si cogemos 20 individuos de la población original y 1/10 tiene una mutación en un gen, en la población invasora originada de un solo individuo, o ninguno va a tener la mutación o todos la van a tener. Si la tienen, se dice entonces que el alelo se ha fijado. Un proceso similar ocurre cuando la población experimenta un cuello de botella. Una manera de detectar patógenos introducidos es por una alta frecuencia de alelos infrecuentes en la población (GARZA & WILLIAMSON, 2001) ya que el proceso de deriva genética probablemente habrá causado una diferenciación entre la población original y la invasora. Es posible usar marcadores moleculares que permitan diferenciar poblaciones, y ver a qué población pertenece nuestro patógeno desconocido. En este caso vamos a tener que usar marcadores aun más variables que los empleados para diferenciar entre especies, ya que se buscarán diferencias dentro de la especie. Como se ha dicho anteriormente, a veces se necesita más de un gen para observar variabilidad dentro de una especie. En consecuencia, el número de genes para observar variabilidad dentro la especie va a ser aún mayor. En esos casos se suele buscar variabilidad en todo el genoma mediante distintas técnicas tales como mini-satélites, la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) o polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Todas estas técnicas, de una manera u otra, buscan la presencia o ausencia de marcadores en diferentes sitios del genoma. Haciendo un símil con humanos, estaríamos buscando, al azar, genes que dieran información del color de los ojos, el pelo o la piel. Con estos genes vamos a agrupar los organismos en distintas poblaciones conocidas, y vamos a ver a qué grupo se asignan las secuencias de nuestro patógeno invasor. Existen numerosos ejemplos en la literatura de la información que este tipo de estudios puede generar. Por ejemplo, el caso de *Armillaria mellea* en Sudáfrica que según técnicas moleculares (i) se clasificó en el mismo grupo que todos los demás aislamientos de Europa, indicando su probable origen por parte de los colonizadores holandeses y (ii) no presentaba ningún tipo de variabilidad en los marcadores usados, indicando un tipo de reproducción asexual (COETZEE et al.,

2001). Todos los aislamientos encontrados se correspondían en realidad con un clon que se había expandido mediante rizomorfos. De este tipo de datos se puede estimar que la capacidad de este invasor de evolucionar y adaptarse al nuevo ambiente va a ser baja debido a la incapacidad de recombinarse y generar variabilidad. Existen buenos ejemplos del efecto fundador en patógenos introducidos como el caso de *Ceratocystis platani* en Grecia e Italia procedente del este de los Estados Unidos (OCASIO-MORALES et al., 2007), o la aparición de *Teratosphaeria nubilosa* en plantaciones de eucalipto en Uruguay, probablemente procedente de la Península ibérica (PÉREZ et al., 2009).

¿CUÁNTO PATÓGENO HAY?

En los casos en los que sabemos el origen y la identidad de nuestro patógeno, puede interesar cuánto y dónde se encuentra. En muchos casos la observación directa no va a ser posible debido a que no vamos a observar síntomas o signos claros del mismo. Este tipo de cuestiones aparecen cuando queremos saber si un determinado patógeno sobrevive el invierno en el suelo o puede dispersarse por estar latente dentro de las semillas. En estos casos el uso de la PCR convencional puede presentar ciertas limitaciones, dando lugar a falsos negativos. En los casos en los que no amplifiquemos un producto (no veremos una banda en el gel) no sabremos si realmente no había patógeno o sencillamente había muy poco. Para resolver este problema, podemos usar una técnica basada en la PCR llamada PCR cuantitativa mucho más sensible que la primera. La PCR cuantitativa sigue el mismo proceso que una PCR convencional, en la que se hace un seguimiento en tiempo real de cómo se va amplificando el producto. El seguimiento se hace generalmente por dos métodos, Taqman® y SYBR Green, que mandan una señal cada vez que se realiza una copia de nuestra región de interés. Como se ha comentado antes, en cada ciclo la PCR copia de las copias del anterior ciclo, de manera que genera un crecimiento de tipo exponencial, con un exponente de 2. Con este exponente, la curva empieza a crecer en un determinado momento de manera explosiva. En la PCR cuantitativa medimos el

tiempo necesario para detectar ese crecimiento. El tiempo, en este caso se mide en ciclos.

El método Taqman, a diferencia del método de SYBR Green, está basado en dos cebadores (como la PCR) y en una sonda, que se adhiere en alguna parte de la secuencia entre ambos cebadores. Como se ha comentado antes, es habitual poner los cebadores en zonas conservadas a ambos lados de la zona variable que contiene la información. Con el método Taqman se puede, por ejemplo, detectar o cuantificar diferentes especies de *Phytophthora* en el suelo, en una sola reacción añadiendo solamente diferentes sondas específicas (SCHENA et al., 2006). Los sensores de PCR cuantitativa son mucho más precisos que la observación directa en un gel, por lo tanto, esta técnica se utiliza no sólo para cuantificar sino también para detectar cantidades muy pequeñas.

¿DÓNDE SE DISPERSA EL PATÓGENO?

En función del marcador empleado, el estudio del ADN permitirá profundizar a diferentes niveles dentro de la misma especie, o incluso entre especies. Si tenemos marcadores muy variables como por ejemplo microsatélites o SNPs, podremos seguir la evolución no de una especie, sino de un determinado individuo de la especie. Este aspecto abre una nueva dimensión en los postulados de Koch en los que no sólo puede ser útil aislar al patógeno una vez ha causado la enfermedad sino comprobar que se trata del mismo individuo. Este aspecto es especialmente importante en estudios de inoculación en campo donde el patógeno de interés también ocurre de manera natural. El estudio de cómo se distribuyen en el bosque diferentes individuos de un patógeno dará, como en el caso de *Armillaria* en Sudáfrica, información de cómo se reproduce, pero también puede proporcionar información relevante de la epidemiología. ¿Cómo se distribuyen los diferentes genotipos (individuos) entre y dentro de los árboles de la masa? STENLID (1985; 1987) demostró que el mismo individuo de *Heterobasidion annosum* que existía en los tocones de la generación anterior, había infectado la nueva generación de árboles, demostrando la necesidad de destocar o proteger los tocones contra la infección por esporas incluso en la corta

final. El seguimiento del mismo individuo permite hacer estudios mediante inoculación artificial y estar seguros de que la enfermedad que observamos está realmente causada por el tratamiento y que no ha habido contaminación de inóculo del exterior o anterior (OLIVA et al., 2011).

Cuando exista riesgo de contagio, puede interesar hacer un seguimiento del patógeno más allá del hospedante. Las esporas de un hongo, por su alto poder de dispersión, pueden ayudar a detectar la presencia de un foco. Este aspecto es especialmente relevante en el caso de los patógenos invasores. En el ámbito forestal, una vez el patógeno invasor se ha establecido, su erradicación es sólo posible en estadios tempranos de la epidemia. En estos casos, una rápida respuesta requiere métodos de detección temprana, como por ejemplo los basados en capturas de esporas. Tradicionalmente, las esporas se han clasificado mediante criterios morfológicos en el microscopio. Las técnicas moleculares permiten complementar este tipo de seguimiento debido a su mayor precisión y a que permiten procesar simultáneamente un alto número de muestras al mismo tiempo (WEST et al., 2008). Es posible extraer el ADN de las cintas de captura de esporas y usar cebadores específicos de especies de cuarentena para detectar su presencia. Por otro lado puede interesar conocer qué insectos vectores son portadores de determinados patógenos. Las técnicas moleculares proporcionan una resolución mucho mayor que el aislamiento mediante el cultivo directo de los insectos. Por ejemplo, para tener una resolución de 25 especies de hongos en *Ips typographus* son necesarias 10 muestras mediante T-RFLP, mientras que en el caso de querer detectar el mismo número de especies mediante aislamientos necesitaremos del orden de 200 muestras (PERSSON et al., 2009).

¿CON QUÉ OTROS ORGANISMOS/INDIVIDUOS CO-EXISTE EL PATÓGENO?

La comunidad microbiana con la que interactúa el patógeno puede facilitar o ralentizar el desarrollo de la enfermedad y dar lugar por ejemplo a suelos supresivos. Por el contrario, la ausencia de competidores puede dar vía libre a

nuestro patógeno para atacar; por tanto podemos usar alguno de los competidores como agentes de control biológico p. ej. *Phlebiopsis gigantea* (OLIVA et al., 2010). Si nuestro interés es describir toda la comunidad microbiana de un tejido podemos utilizar un marcador universal que amplifique alguna zona en común a todos los individuos, y que se sea lo suficientemente variable como para poder diferenciarlos. Este procedimiento puede ser útil cuando, por ejemplo, no se sabe qué patógeno es el que está causando la enfermedad. Podemos extraer el ADN de una muestra y amplificar con un marcador general como la región ITS que incluya a todos los organismos. El producto de nuestra amplificación va a ser una mezcla de secuencias ITS correspondientes a todas las especies presentes en la muestra. Antes de secuenciar es preciso separarlas y para ello se utiliza un método llamado clonación. Este método permite hacer copias exactas de una sola copia de ITS de la mezcla. Si observamos que el 60% de las copias (clones) de nuestra mezcla corresponden a una determinada especie podremos concluir que esa especie es más abundante.

El hecho de detectar ADN no implica que el patógeno sea viable o esté activo. La actividad del patógeno está estrechamente ligada a una mayor necesidad de sintetizar proteínas y por lo tanto a una mayor necesidad de ribosomas. Podemos saber qué especie de hongo está más activa dentro de una comunidad en base al número de ribosomas que produce. Si queremos saber cuántos ribosomas se producen, debemos cuantificar el ARN en vez del ADN. El ARN, al contrario que el ADN, es una molécula efímera. El ARN se genera, como una copia del ADN cuando la célula requiere hacer alguna función. El ARN se traduce en una proteína. Como la célula tiene necesidades cambiantes, el ARN posee la capacidad de degradarse rápidamente. El ARN se puede transformar fácilmente en ADN, mediante la reacción de la transcriptasa inversa (RT-PCR) para que sea más fácil trabajar con él. Como se ha comentado antes, las regiones ITS de los genes ribosómicos se usan para detectar especies. La región ITS se pierde al madurar el ARN, con lo cual cuando analicemos el ARN sólo obtendremos las secuencias de los exones, por eso en la mayoría de estudios de

comunidades microbianas se utilizan partes de las regiones 18S (hongos) y 16S (bacterias). A pesar de que estas regiones son menos variables y sólo permiten una resolución a nivel de género, permiten comparar, mediante métodos como la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), qué organismos están presentes y qué organismos se vuelven más activos bajo determinadas condiciones (MAHMOOD & PROSSER, 2006).

¿CÓMO ATACA EL PATÓGENO Y CÓMO SE DEFIENDE EL HOSPEDANTE?

Entender la interacción entre el patógeno y el hospedante es fundamental para ejercer un control efectivo sobre la enfermedad mediante mejora genética. En esta interacción puede intervenir un solo gen (interacción de tipo gen por gen), o pueden existir numerosos genes implicados en el proceso. Lo que ocurre en la interacción se estudia habitualmente mediante experimentos de inoculación. El patógeno y el hospedante interaccionan y tras un periodo de tiempo determinado p.ej. 1; 2; 5 y días, después de la infección se estudia qué sucede. De la misma manera que amplificando todo el ADN podíamos tener una imagen de cuál es la comunidad microbiana presente en un sitio, podemos, con el estudio del ARN, conocer en un determinado momento todos los genes que se están expresando. Uno de los métodos usados es la llamada librería de substracción. El ARN de nuestro control se hibrida (subtrae) con el ARN de la infección, de manera que sólo aquel que es específico de la infección se mantiene. Este método se ha utilizado por ejemplo para comparar qué genes se expresan en *Pinus pinea* y en *Pinus pinaster* cuando interaccionan con *Bursaphelenchus xylophilus* y entender porqué *P. pinea* es más resistente (SANTOS & VASCONCELOS, 2011).

En caso de conocer cuáles son los genes de nuestro organismo (por ejemplo, por disponer del genoma) podremos construir chips de ADN, o “micro-arrays” en inglés, cada uno con una sonda asociada a un gen. Entonces se podrá comparar dónde existe una mayor o una menor hibridación y por tanto conocer si hay genes que se están expresando más que otros. Normalmente se corrobora la mayor o menor expresión de los

genes interesantes mediante PCR cuantitativa por ser un método más preciso. Este tipo de estudios suele ir combinado con microscopía para relacionar lo que ocurre a nivel celular con lo que observamos. De esta manera podemos detectar desfases en las respuestas. ADOMAS *et al.* (2008) detectaron que la respuesta del hospedante hacia patógeno *Heterobasidion annosum* ocurría con cierto desfase respecto a la penetración de las hifas. La respuesta tardía probablemente daba tiempo al patógeno a causar la muerte de las células y a avanzar en el tejido. La mayoría de genes se encuentran asociados a rutas metabólicas que han sido estudiadas en organismos modelo de manera que podemos asociar una respuesta a la producción de determinadas sustancias de defensa como estilbenos u otros polifenoles.

Para confirmar que un determinado gen es responsable de un rasgo, se puede generar un individuo mutante del patógeno sin el gen mediante transformación genética y examinar si sigue mostrando el mismo fenotipo p. ej. el rasgo de la patogenicidad (WELD *et al.*, 2006). La transformación se realiza básicamente mediante la bacteria *Agrobacterium* o bien mediante cultivos de protoplastos. Ambas técnicas consiguen remplazar una parte esencial del gen que queremos mutar con otro gen, normalmente asociado a la resistencia a un fungicida. La resistencia al fungicida se usa luego para seleccionar aquellos sub-cultivos que han sido efectivamente transformados. Una vez se tienen los mutantes, se compara su fenotipo con el fenotipo del individuo original para confirmar de esa manera la función del gen. Para demostrar que la pérdida de la función no es debida al proceso de mutación se repone el gen original a los individuos mutantes, que deben expresar entonces el mismo fenotipo que el aislamiento original. La transformación es también una técnica útil para facilitar la visualización del patógeno. Las hifas son normalmente hialinas y difíciles de diferenciar entre organismos en el microscopio. En vez de modificar un gen específico del genoma, podemos sencillamente añadir un gen de fluorescencia, como la proteína verde fluorescente, o “Green fluorescent protein” (*gfp*) en inglés. Si añadimos el gen de la fluorescencia conjuntamente con un promotor asociado a alguna función básicas de la célula,

cada vez que el patógeno realice la función va a producir *gfp* y se va a observar bajo fluorescencia en el microscopio (SAMILS *et al.*, 2006).

¿POR QUÉ ALGUNOS INDIVIDUOS DEL PATÓGENO SON AGRESIVOS Y PORQUÉ ALGUNOS HOSPEDANTES SON RESISTENTES?

En patología forestal, tanto la agresividad del patógeno como la resistencia del hospedante suelen estar asociados a un alto número de genes que interactúan entre si. Este tipo de resistencia, llamada resistencia cuantitativa, muestra típicamente una distribución normal en la población. Los individuos forman un continuo de mayor a menor longitud de necrosis después de una inoculación, como por ejemplo en el estudio de SWEDJEMARK *et al.* (1997). Este tipo de resistencia contrasta con una resistencia vertical, en la que unos determinados individuos son totalmente resistentes y otros susceptibles. Este tipo de resistencia indicará probablemente una interacción gen-a-gen, controlada por un gen de resistencia en el hospedante que tiene como objetivo detectar un gen de avirulencia en el patógeno. Aunque la resistencia no esté controlada por un solo gen, es posible que un número reducido de genes explique una parte importante de la resistencia y por tanto sea posible incorporar alelos resistentes a la población. Para estar seguros de que la resistencia se ha heredado es posible usar marcadores genéticos que se encuentren cercanos al alelo de interés. Este tipo de mejora genética se conoce como mejora genética asistida con marcadores moleculares (COLLARD *et al.*, 2005). Este método asume que los *loci* cercanos tienden a recombinarse menos frecuentemente que los *loci* lejanos. Si un individuo de la progenie tiene el marcador deseado, muy probablemente haya también heredado el alelo correcto.

Para realizar una mejora asistida con marcadores es necesario saber que marcadores están asociados a la resistencia. La variabilidad del *loci* va a explicar un porcentaje de la variabilidad del rasgo de interés. Por ejemplo, la variabilidad en un determinado marcador explica el 30% de la variabilidad de la longitud de la lesión. Este marcador sería un ejemplo de un

locus de carácter cuantitativo (QTL). Dado que la resistencia puede estar asociada a diferentes rasgos, estos estudios suelen medir más de un rasgo a la vez p. ej. periodo de latencia, número de cuerpos de fructificación por hoja, producción de esporas, simultáneamente. La cantidad de QTL puede dar información de cuántos genes están implicados en la resistencia. Para determinar los QTL se necesita previamente tener un mapa de los cromosomas con algún marcador para observar en la progenie cómo se segrega el carácter de interés y poder asociarlo a los marcadores p. ej. para un marcador polimórfico *Aa*, individuos de la progenie que presentan el alelo *A* son significativamente más resistentes que los individuos *a*. Si el marcador *Aa* da señal de ser un QTL, es probable que otros marcadores cercanos a *Aa* también den una señal, mostrando de esta manera la zona en la que se encuentra el gen.

Para realizar el mapa genético y evaluar los QTL se usan marcadores variables y co-dominantes como los microsatélites, que permiten saber en la progenie de qué parental ha heredado un determinado *locus*. Los micro-satélites son zonas del genoma con un motivo repetitivo de secuencia, lo que genera una alta variabilidad de longitudes en un *locus* p.ej., 1; 2; 3 o *n* repeticiones de las bases CT, darán longitudes de 174; 176; 178 y $172+2\cdot n$ pares de bases. En organismos diploides, existen dos copias del genoma. Debido a que los cebadores están en los flancos del micro-satélite, se amplifican 2 copias (iguales o diferentes); una copia heredada de cada progenitor. Este tipo de marcador se usa típicamente para pruebas de paternidad. Para las especies con el genoma disponible es relativamente sencillo encontrar marcadores a lo largo de los cromosomas. En caso de no tener acceso al genoma, podemos generar marcadores por técnicas como el AFLP. Para maximizar la resolución de nuestros QTL se suelen hibridar dos padres con rasgos muy diferenciados, por ejemplo, una especie de árbol susceptible con otra especie resistente. Este tipo de técnicas se han realizado en híbridos de sauces y de chopos para conocer cuántos genes están involucrados en la resistencia y de qué especie proceden (JORGE et al., 2005; RÖNNBERG-WÄSTLJUNG et al., 2008). De la misma manera que podemos saber por qué ciertos individuos del hospedante son más resistentes, podemos tam-

bién saber dónde están los genes que hacen que determinados individuos de la población del patógeno sean más agresivos p.ej. LIND et al. (2007).

TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Las técnicas de secuenciación masiva han revolucionado el mundo de las técnicas moleculares (MACLEAN et al., 2009). Hasta su aparición, se habían usado técnicas basadas en la detección de presencia ausencia de determinados *loci*, por ejemplo para detectar la presencia de un determinado patógeno en un tejido. Si existía alguna secuencia compatible con los cebadores específicos daba lugar a amplificación y por tanto una identificación positiva. Debido al bajo coste de la secuenciación hoy es posible amplificar miles de secuencias de ITS de un determinado tejido y, de manera automática, comprobar su identidad en bases de datos en internet. En estos casos no dependemos de la especificidad de nuestros cebadores. Estas tecnologías han reducido el coste de secuenciación de 100 bp/euro, a 28.000 bp/euro. El bajo coste de secuenciación ha cambiado radicalmente el uso de marcadores. En vez de tratar de descubrir QTLs mediante el uso de micro-satélites y determinar en qué lugar del genoma se encuentra un determinado gen, hoy podemos secuenciar el genoma de diferentes individuos de nuestra población de interés, y comparar directamente genomas enteros y ver exactamente en qué gen y en qué parte del gen difieren (DALMAN, 2010). Este tipo de análisis está facilitado por el hecho de que la mayoría de genomas son de acceso público y están sujetos a un proceso continuo de actualización. Otro tipo de aplicación puede ser el estudio de comunidades microbianas. Por ejemplo es posible observar la evolución de la comunidad de micorrizas con la edad del arbolado (WALLANDER et al., 2010). Estos métodos pueden ser muy útiles en métodos de seguimiento de esporas para por ejemplo detectar especies de patógenos forestales invasores (STENLID et al., 2011).

DE LA TEORÍA A LA PRÁCTICA

El mundo de las técnicas moleculares avanza rápido, básicamente debido al desarrollo de estas

técnicas en otros campos de la biología o la medicina. Ante un abanico tan amplio de técnicas se hace difícil decidir, aunque en muchos casos nuestras decisiones van ser del tipo: ¿escojo una técnica simple o compleja?, ¿desarrollo la metodología en mi laboratorio o intento colaborar con alguien que la domine? La respuesta a estas cuestiones depende de las disponibilidades técnicas, de personal o presupuestaria del laboratorio en cuestión. Sin embargo, en la mayoría de los casos es siempre mejor aprender una técnica nueva aunque sea más compleja y cara, ya que va a repercutir en la obtención de más información y de más calidad. Además, el dominio de una técnica más novedosa incrementa el atractivo del grupo para futuras colaboraciones. Dependiendo del conocimiento previo puede ser muy beneficioso hacer estancias para aprender de primera mano cómo se realiza el análisis y no tener que descubrir uno mismo aspectos triviales de la metodología, que en la mayoría de los casos no se incluyen en los protocolos. El volumen de información que genera este tipo de técnicas requiere de personal especializado para su análisis con conocimientos de bioinformática, biología molecular, genética y fisiología. La colaboración entre grupos con experiencia en estas especialidades aumenta las posibilidades de éxito.

Agradecimientos

Quiero agradecer al grupo de Sanidad Forestal de la SECF y especialmente a Alejandro Solla (Universidad de Extremadura, Ing. Forestal y del Medio Natural) la oportunidad y la financiación para presentar esta revisión en la II Reunión Científica de Sanidad Forestal en Plasencia (Cáceres) en septiembre de 2011. Agradezco también a Carmen Romeralo (Universidad de Valladolid) la revisión del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- ADOMAS, A.; HELLER, G.; OLSON, Å.; OSBORNE, J.; KARLSSON, M.; NAHALKOVA, J.; VAN ZYL, L.; SEDEROFF, R.; STENLID, J.; FINLAY, R. & ASIEGBU, F.O.; 2008. Comparative analysis of transcript abundance in *Pinus sylvestris* after challenge with a saprotrophic, pathogenic or mutualistic fungus. *Tree Physiol.* 28(6): 885-897.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J.; 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- BLACKWELL, M.; 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98(3): 426-438.
- BUCHANAN, P.K.; 1988. A new species of *Heterobasidion* (Polyporaceae) from Australasia. *Mycotaxon* 32: 325-337.
- COETZEE, M.P.A.; WINGFIELD, B.D.; HARRINGTON, T.C.; STEIMEL, J.; COUTINHO, T.A. & WINGFIELD, M.J.; 2001. The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers. *Mol. Ecol.* 10(2): 387-396.
- COLLARD, B.; JAHUFER, M.; BROUWER, J. & PANG, E.; 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142(1): 169-196.
- DALMAN, K.; 2010. *Heterobasidion root rot: Genetic mapping of virulence and evolutionary history*. PhD thesis Dept. Forest Mycology and Pathology. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- DETTMAN, J.R.; JACOBSON, D.J. & TAYLOR, J.W.; 2003. A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57(12): 2703-2720.
- GARBELOTTO, M.; LINZER, R.; NICOLOTTI, G. & GONTHIER, P.; 2009. Comparing the influences of ecological and evolutionary factors on the successful invasion of a fungal forest pathogen. *Biol. Invasions* 12(4): 943-957.
- GARBELOTTO, M.; OTROSINA, W.J.; COBB, F.W. & BRUNS, T.D.; 1998. The European S and F intersterility groups of *Heterobasidion annosum* may represent sympatric protospecies. *Can. J. Bot.* 76: 397-409.
- GARDES, M. & BRUNS, T.D.; 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2(2): 113-118.

- GARZA, J.C. & WILLIAMSON, E.G.; 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10: 305-318.
- GONTHIER, P. & GARBELOTTO, M.; 2011. Amplified fragment length polymorphism and sequence analyses reveal massive gene introgression from the European fungal pathogen *Heterobasidion annosum* into its introduced congener *H. irregulare*. *Mol. Ecol.* 20(13): 2756-2770.
- GONTHIER, P.; WARNER, R.; NICOLOTTI, G.; MAZZAGLIA, A. & GARBELOTTO, M.M.; 2004. Pathogen introduction as a collateral effect of military activity. *Mycol. Res.* 108: 468-470.
- JORGE, V.; DOWKIW, A.; FAIVRE-RAMPANT, P. & BASTIEN, C.; 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytol.* 167(1): 113-127.
- LIND, M.; DALMAN, K.; STENLID, J.; KARLSSON, B. & OLSON, Å.; 2007. Identification of quantitative trait loci affecting virulence in the basidiomycete *Heterobasidion annosum* s.l. *Curr. Genet.* 52(1): 35-44.
- MACLEAN, D.; JONES, J.D.G. & STUDHOLME, D.J.; 2009. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat. Rev. Micro.* 7(4): 287-296.
- MAHMOOD, S. & PROSSER, J.I.; 2006. The influence of synthetic sheep urine on ammonia oxidizing bacterial communities in grassland soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56(3): 444-454.
- OCASIO-MORALES, R.G.; TSOPELAS, P. & HARRINGTON, T.C.; 2007. Origin of *Ceratocystis platani* on native *Platanus orientalis* in Greece and its impact on natural forests. *Plant Dis.* 91(7): 901-904.
- OLIVA, J.; BENDZ-HELLGREN, M. & STENLID, J.; 2011. Spread of *Heterobasidion annosum* s.s. and *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies* 15 years after stump inoculation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75: 414-429.
- OLIVA, J.; GONTHIER, P. & STENLID, J.; 2011. Gene flow and inter-sterility between allopatric and sympatric populations of *Heterobasidion abietinum* and *H. parviporum* in Europe. *Forest Pathol.* 41(3): 243-252.
- OLIVA, J.; THOR, M. & STENLID, J.; 2010. Long term effects of mechanized stump treatment against *Heterobasidion annosum* s.l. root rot in *Picea abies*. *Can. J. For. Res.* 40(6): 1020-1033.
- PÉREZ, G.; HUNTER, G.; SLIPPERS, B.; PÉREZ, C.; WINGFIELD, B. & WINGFIELD, M.; 2009. *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa* the causal agent of *Mycosphaerella* leaf disease (MLD), recently introduced into Uruguay. *Eur. J. Plant Pathol.* 125(1): 109-118.
- PERSSON, Y.; VASAITIS, R.; LÄNGSTRÖM, B.; ÖHRN, P.; IHRMARK, K. & STENLID, J.; 2009. Fungi vectored by the bark beetle *Ips typographus* following hibernation under the bark of standing trees and in the forest litter. *Microb. Ecol.* 58(3): 651-659.
- ROE, A.D.; RICE, A.V.; BROMILOW, S.E.; COOKE, J.E.K. & SPERLING, F.A.H.; 2010. Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: insights from blue stain fungal symbionts of the mountain pine beetle. *Mol. Ecol. Resour.* 10(6): 946-959.
- RÖNNBERG-WÄSTLJUNG, A.-C.; SAMILS, B.; TSAROUHAS, V. & GULLBERG, U.; 2008. Resistance to *Melampsora larici-epitea* leaf rust in *Salix*: analyses of quantitative trait loci. *J. Appl. Genet.* 49(4): 321-331.
- SAMILS, N.; ELFSTRAND, M.; LINDNER CZEDERPILTZ, D.L.; FAHLESON, J.; OLSON, Å.; DIXELIUS, C. & STENLID, J.; 2006. Development of a rapid and simple *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the fungal pathogen *Heterobasidion annosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 255(1): 82-88.
- SANTOS, C. & VASCONCELOS, M.; 2011. Identification of genes differentially expressed in *Pinus pinaster* and *Pinus pinea* after infection with the pine wood nematode. *Eur. J. Plant Pathol.* 132(3): 407-418.
- SCHENA, L.; HUGHES, K.J.D. & COOKE, D.E.L.; 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Mol. Plant Pathol.* 7(5): 365-379.
- SICOLI, G.; FATEHI, J. & STENLID, J.; 2003. Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of

- European Armillaria species. *Forest Pathol.* 33(5): 287-297.
- STENLID, J.; 1985. Population structure of *Heterobasidion annosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility, and isoenzyme patterns. *Can. J. Bot.* 63: 2268-2273.
- STENLID, J.; 1987. Controlling and predicting the spread of *Heterobasidion annosum* from infected stumps and trees of *Picea abies*. *Scand. J. For. Res.* 2(1): 187-198.
- STENLID, J.; OLIVA, J.; BOBERG, J.B. & HOPKINS, A.J.M.; 2011. Emerging diseases in European forest ecosystems and responses in society. *Forests* 2(2): 486-504.
- SWEDJEMARK, G.; STENLID, J. & KARLSSON, B.; 1997. Genetic variation among clones of *Picea abies* in resistance to growth of *Heterobasidion annosum*. *Silvae Genetica* 46(6): 369-375.
- WALLANDER, H.; JOHANSSON, U.; STERKENBURG, E.; BRANDSTRÖM DURLING, M. & LINDAHL, B.D.; 2010. Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce forests. *New Phytol.* 187(4): 1124-1134.
- WELD, R.J.; PLUMMER, K.M.; CARPENTER, M.A. & RIDGWAY, H.J.; 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res.* 16(1): 31-44.
- WEST, J.S.; ATKINS, S.D.; EMBERLIN, J. & FITT, B.D.L.; 2008. PCR to predict risk of airborne disease. *Trends Microbiol.* 16(8): 380-387.
- WILEY, E.O.; 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Biol.* 27(1): 17-26.