

IDENTIFICACIÓN DE *Dothistroma septospora* MEDIANTE LA TÉCNICA PCR

O. AGUÍN; C. PINTOS; M.SABARIS; A. ABELLEIRA & J.P.MANSILLA

Estación Fitopatológica "Do Areeiro". Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra

RESUMEN

Se aplicó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del agente causante de la enfermedad conocida como "banda roja". El material vegetal infectado consistió en acículas de *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus* sp. y *Pseudotsuga* sp. Los cebadores seleccionados, ITS2 y ITS5, amplificaron la región ITS situada entre los genes 18S y 5,8S del ADN ribosomal (ADNr) del hongo. Los productos de PCR obtenidos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa y, tras su tinción con bromuro de etidio, se visualizaron bajo luz ultravioleta. Las muestras con presencia de *Dothistroma septospora* presentaron una banda de ADNr con un tamaño de aproximadamente 250 pares de bases.

P.C.: Acículas, ADN, amplificación, banda roja, *Pinus* sp., *Pseudotsuga* sp., PCR

SUMMARY

The fungal species causing the disease known as red band needle blight has been identified by the PCR technique. Infected plant material consisted of needles from *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus* sp. and *Pseudotsuga* sp. PCR amplification of the ITS region between the fungal nuclear 18S and 5.8S genes was carried out using primers ITS2 and ITS5. Amplification products were obtained following electrophoresis on agarose and staining with ethidium bromide, being visualized under UV light. Samples with *Dothistroma septosporai* presented a DNA band of an approximate size of 250 base pairs.

K. W.: Needles, DNA, amplification, red band, *Pinus* sp., *Pseudotsuga* sp., PCR

INTRODUCCIÓN

Dothistroma septospora (Dorogin) Morelet, cuyo teleomorfo se conoce como *Schirrhia pini* Funk y Parker, es el agente responsable de la enfermedad conocida como "banda roja". Se trata de una patología ampliamente distribuida por todo el mundo que afecta a las acículas de coníferas. Los principales hospedadores son especies de *Pinus*, sobre todo *Pinus radiata*, aunque también se ha identificado en *Pseudotsuga* y *Larix*.

Los síntomas iniciales de la enfermedad aparecen durante el otoño y el invierno y consisten en manchas cloróticas que posteriormente evolucionan a un color rojizo, alternándose con zonas verdes. Esta división en bandas rojas y verdes ha provocado la denominación de banda roja. En primavera, sobre la banda roja se desarrollan estromas negros con picnidios de la forma asexual *D. septospora* (SMITH *et al*, 1992). El hongo provoca una defoliación parcial de las acículas, preferentemente de la parte inferior e interior de la copa del árbol. (COBOS-SUAREZ & RUIZ-URRESTARAZU, 1990).

Los ataques más intensos se producen en áreas de clima húmedo.

La identificación del hongo en acículas que presentan una sintomatología clara se realiza por observación y mediante preparaciones microscópicas. La dificultad en la determinación se produce cuando en el material vegetal se observan únicamente síntomas iniciales basados en manchas cloróticas, lo que en gran parte de los casos impide su identificación. Se conoce, por estudios realizados por otros autores, la secuencia de nucleótidos de una zona del ADN de *Dothistroma pini*, con lo cual el objetivo de este trabajo fue poner a punto la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de este hongo en acículas con una sintomatología dudosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó como material vegetal acículas de varios ejemplares de *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pseudotsuga* sp. y *Pinus* sp. recibidos en nuestro laboratorio.

Para la extracción del ADN utilizamos distintos tipos de material: a) fragmentos de acículas que presentaban banda roja con estroma y picnidios, b) acículas con banda roja sin estroma ni picnidios, c) micelio aislado en el medio de cultivo denominado DM (2,3% agar- 5% extracto de malta) y obtenido de la siembra de acículas infectadas por *D. pini* previamente desinfectadas con alcohol y lejía, d) micelio aislado en el medio de cultivo DM al sembrar acículas lavadas con agua destilada, e) acículas con bandas amarillas irregulares y pequeñas, f) acículas con manchas necróticas, g) acículas con manchas amarillas grandes y regulares y h) acículas sin síntomas.

Para obtener aislados puros del micelio del hongo en cultivo, las placas se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron en cámara de cultivo en oscuridad a 24°C.

La extracción del ADN se hizo cogiendo 20-30 mg del material fúngico correspondiente, al que se aplicó el protocolo estándar corto del kit “EZNA fungal DNA miniprep” (Omega Biotek).

Se utilizaron los cebadores ITS2: GCT GCG TTC TTC ATG ATG C e ITS5: GGA AAG TAA AAG TCG TAA CAA GG, que amplifican la región ITS situada entre los genes 18S y 5,8 S del ADN ribosomal (ADNr) (WHITE *et al*, 1990).

La amplificación se realizó en los viales “Ready-To-Go-PCR beads” (Amersham Pharmacia), a los que se añadió 0.5 µl de cada cebador (10 pmol/µl), 1 µl del ADN extraído y agua hasta completar un volumen final de reacción de 25 µl. Las condiciones del termociclador fueron las propuestas por BRADSHAW *et al* (2000): desnaturalización inicial de 95°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, finalizando el programa con una extensión de 72°C durante 5 minutos. En todas las pruebas se incorporó un control negativo (acícula sana), uno positivo (acícula infectada por *D. pini* con banda roja, estroma y fructificaciones) y un control sin ADN. Para cada muestra se hicieron dos diluciones de amplificación. Además se siguió la misma metodología utilizando acículas infectadas por *Alternaria alternata*, *Pestalotia stewensonii* y *Naemacyclus minor*.

Los fragmentos amplificados se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 2% sobre tampón 1X TBE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y la visualización se hizo en un transiluminador de luz ultravioleta. El análisis de la longitud de los fragmentos de ADN se hizo con el programa de densimetría TDI-Manager.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras con presencia de *Dothistroma pini*, los cebadores ITS 2 y ITS 5 amplificaron un fragmento de ADN que se situó a 250 pares de bases (Figura 1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por BRADSHAW *et al* (2000) para 28 cepas de *D. pini* procedentes de ocho países (Alemania, Brasil, Canadá, Francia, Guatemala, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Eslovaquia).

En los controles negativos no hubo amplificación. En las acículas con manchas cloróticas irregulares no se detectó la presencia del hongo, pero sí en acículas que tenían manchas similares a las provocadas por la banda roja pero que no presentaban estroma ni fructificaciones ni coloración rojiza (Tabla 1).

La mayor cantidad de ADN extraído se consiguió a partir de muestras que procedían de aislados fúngicos obtenidos en el medio DM cuyas acículas habían sido desinfectadas. No se observó amplificación del ADN a 250 pb para las muestras de acículas infectadas por los hongos *Alternaria alternata*, *Pestalotia stewensonii* y *Naemacyclus minor*.

Tabla 1.- Resultados de la amplificación del fragmento de ADN amplificado con los cebadores ITS 2 y ITS5 en las diferentes muestras

Material fúngico utilizado	Fragmento de ADN amplificado de 250 pb
Acículas sintomáticas con banda roja, estromas y picnidios	Positivo

Acículas sintomáticas con banda roja sin estromas ni picnidios	Positivo
Micelio de <i>Dothistroma pini</i> aislado en el medio de cultivo DM procedente de acículas infectadas previamente desinfectadas con alcohol y lejía	Positivo
Micelio de <i>Dothistroma pini</i> aislado en el medio de cultivo DM procedente de acículas infectadas previamente desinfectadas con alcohol y lejía	Positivo
Acículas con presencia de bandas necróticas	Negativo
Acículas con presencia de bandas cloróticas regulares	Positivo*
Acículas con presencia de bandas cloróticas irregulares y pequeñas	Negativo
Acículas sanas	Negativo
Acículas infectadas por <i>Naemacyclus minor</i>	Negativo
Acículas infectadas por <i>Pestalotia stewensoni</i>	Negativo
Acículas infectadas por <i>Alternaria alternata</i>	Negativo
Control sin ADN	Negativo

* solo apareció la banda de 250 pb en una de las muestras

CONCLUSIONES

La técnica PCR fue eficaz para la identificación de *Dothistroma pini* cuando la extracción del ADN se realizó a partir de acículas sintomáticas y sobre micelio aislado en el medio de cultivo DM, tanto con o sin desinfección previa de las acículas. Esto asegura que, aunque el hospedador (en este caso las acículas) no presenten síntomas claros, la presencia del hongo será detectada en las muestras mediante la técnica PCR. A pesar de los resultados positivos obtenidos en este trabajo, es necesario continuar con los estudios para llegar a conocer la especificidad del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- BRADSHAW, R.; GANLEY, R.; JONES, W., y DYER, P. (2000) *High levels of dothistromin toxin produced by the forest pathogen Dothistroma pini*. Mycol. Res. 104:325-332
- COBOS-SUAREZ, J.M. y RUIZ-URRESTARAZU, M.M. (1990) *Problemas fitosanitarios de la especie Pinus radiata D. Don en España, con especial referencia al País Vasco*. Bol. San. Veg. Plagas, 16:37-53
- SMITH, I.; DUNEZ, J.; LELLIOT, R.; PHILLIPS, D.; ARCHER, S. (1992). *Manual de enfermedades de las plantas*. Ed. Mundi-Prensa. 414.
- WHITE, T, BRUNS, T, LEE, S Y TAYLOR, J.1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. En: PCR Protocols: A guide to methods and applications (ed. M. Innis, D. Gelfand, J Sninsky y T. White) pp 315-322. Academic Press: San Diego. Estados Unidos.

