CARACTERIZACIÓN DE HONGOS CAUSANTES DE AZULADO EN *Pinus spp*.

M. VILLARREAL[1], M.T. TROYA[2], F. LLINARES[3], V. RUBIO[1], D. MUÑOZ-MINGARRO[3], M.J. POZUELO[3], N. DE ACERO[3], C. RODRIGUEZ-BORRAJO[3], F. RUBIO[3], V. GONZÁLEZ[1], A. NAVARRETE[2]

[1]Centro Nacional de Biotecnología, Campus Cantoblanco, UniversidadAutónoma de Madrid, 28049 Madrid.
[2]CIFOR-INIA, Ctra. de la Coruña km. 7,5, 28040-Madrid.
[3]Dpto. de Biología, Fac. de CC. Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo, Ctra. Boadilla del Monte km. 5,3, 28668-Madrid.

RESUMEN

En el presente estudio se lleva a cabo una caracterización fenotípica de las especies de *Ceratocystis* y *Ophiostoma* responsables del azulado de la madera de pino. Dichos estudios han sido realizados mediante ensayos de caracterización enzimática, asimilación de azúcares y resistencia-sensibilidad frente a antifúngicos. Asimismo, y como complemento a estos estudios, se llevó a cabo una reconstrucción filogenética basada en secuencias ITS con algunas cepas de los mencionados géneros obtenidas en bases de datos (GenBank).

SUMMARY

The present study is focused on a phenotypic characterisation of several *Ceratocystis* and *Ophiostoma* species, that causes blue-stain of pine wood. Such studies had been based on assays for enzymatic characterisation, assimilation of sugars, as well as measurements of activities against commercial products used for the treatment of stained wood. In addition, a phylogenetic reconstruction based on ITS sequences of both genera retrieved from data bases (GenBank) was performed, to complement phenotypic tests.

Palabras clave: azulado, *Pinus spp.*, *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, caracterización fenotípica, secuencias ITS, filogenia molecular.

Keywords: blue-stain, *Pinus spp*., *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, phenotypic characterisation, ITS sequences, molecular phylogeny.

INTRODUCCIÓN

El azulado de la madera de pino esta producido principalmente por especies de los géneros *Ceratocystis* y *Ophiostoma*, además de una serie de hongos mitospóricos. La aparición de estas manchas en la madera no repercute en las propiedades físico-mecánicas de ésta, dado que la coloración se debe a un fenómeno de difracción de la luz por las hifas en las células leñosas, y tan solo se ha podido demostrar una leve pérdida de peso tras el ataque del hongo (SEIFERT, 1993). No obstante, la depreciación de la madera azulada llega alcanzar hasta el 40 % dado que su utilización para fines donde su aspecto estético es necesario, se ve seriamente mermada.

La caracterización y el conocimiento de la fisiología de este grupo de hongos, es dificultosa, debido a la complejidad en sus ciclos de vida, los diversos mecanismos de dispersión, su capacidad de infectar tanto árboles vivos como trozas apiladas, además de su alta adaptabilidad a las condiciones ambientales. Además, los mecanismos de patogenicidad de las distintas especies sobre sus hospedadores todavía no están suficientemente clarificados, y sólo en algunos taxones parecen ser bien conocidos (i.e.: *Ulmus spp.* / *Ophiostoma ulmi*).

Los hongos causantes del azulado de madera mayoritariamente metabolizan sustancias de reserva de las células leñosas, principalmente monosacáridos de la pared celular (TROYA et al., 1990). No obstante, se ha observado que estos hongos son capaces de degradar en menor medida polisacáridos y pectinas. Debido a la poca información existente sobre el desarrollo de este tipo de patología en algunas especies del género *Pinus*, que han sido tradicionalmente explotadas en el sector forestal de nuestro país (i.e. *P. nigra*, *P. sylvestris*, etc.), se hace necesaria la realización de estudios de caracterización (incluyendo perfiles enzimáticos, asimilación de azúcares, sensibilidad a compuestos antifúngicos, etc.) de las diferentes especies y aislados causantes del daño. Adicionalmente, el empleo con fines sistemáticos de métodos de identificación y caracterización molecular, es una práctica cada vez más extendida en hongos superiores. Así, el uso de herramientas moleculares (en especial, las reconstrucciones filogenéticas basadas en la secuenciación de los genes ribosomales), podría ayudar a la identificación de las especies causantes del azulado, así como la clarificación del status taxonómico de este grupo de hongos.

Ambos géneros han sido incluidos durante mucho tiempo en la familia *Ophiostomataceae*, e incluso largamente considerados por algunos autores como sinónimos (UPADHYAY, 1981). Sin embargo en la actualidad, ambos géneros constituyen entidades taxonómicas independientes y algunos autores (HAWKSWORTH et al., 1995), excluyen *Ceratocystis* del orden *Ophiostomatales*, que acomodaría exclusivamente táxones pertenecientes al género *Ophiostoma s. l.* (incluyendo a *Ceratocystiopsis*). De este modo, las especies de *Ceratocystis s. str*. aparecen incluidas en el orden *Microascales*. Debido a sus afinidades taxonómicas, patogénicas y ecológicas, ambos géneros suelen ser objeto de estudios paralelos por distintos especialistas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las especies de colección ensayadas en las pruebas fenotípicas han sido: *O. huntii* MUCL 9533, *O. ips* 212114 CABI, *O. piliferum* 18371 MUCL, *O. stenoceras* 18357 MUCL, *O. clavatum* 18760 MUCL, *O. multiannulatum* 19062 MUCL, *O. minuta-bicolor* 18363 MUCL, *C. coerulescens* 18763 MUCL, *C. piceae* 38659 MUCL, *C. olivacea-pini* 18368 MUCL, *O. canum* 18759 MUCL, *O. minus* 18768 MUCL, *O. olivaceum* 18367 MUCL, *O. serpens* 4267 MUCL. Las cepas de *P. pullulans* 2703 CECT y de *S. pityophila* 269217 CABI de hongos de transmisión eólica se ha usado como referencia.

Las secuencias obtenidas de GenBank para la realización del análisis filogenético han sido: *C. resinifera* U75616-17-18, *C. rufipenni* U75620-21, *C. laricicola* U75622, *C. polonica* U75623, *C. pinicola* U75614, *C. douglasii* U75626, *C. coerulescens* U75615, *C. eucalyptii* U75627, *C. australis* U75629, *C. neocaledoniae* U75628, *C. virescens* U75624-25, *C. adiposa* AF 275545, *C. fimbriata* AF 264907-08-09, *C. albofundus* AF275545, *C. paradoxa* U75630, *O. piceae* AF 198226, *O. canum* AF198228-29, AF 128929, *O. floccosum* AF 198231, *O. setosum* AF 198230, *O. himal-ulmi* AF 198234, *O. catonianum* AF 198243, *O. querci* AF 198237-38-39, *O. novo-ulmi* AF 198236, *O. ips* AF 198244, *O. piliferum* AF 221071, *O. cucullarum* AF 198246, *G. erubescens* AF 198247, *O. laricis* AF 224331-31, *O. grandicarpum* AJ 293884, *P. fragrans* AF198248.

Caracterización fenotípica. Dicha caracterización se ha llevado a cabo mediante los ensayos:

1) A partir de cultivos desarrollados en medio base salino de Eggins y Puhg, con 1 % de serrín de *Pinus nigra* o de *P. sylvestris*, se valoró la actividad enzimática extracelular en el sobrenadante, por el método API ZYM (MONGET, 1978), tras 20 días de incubación a 22ºC y 70 % de humedad relativa.

En estos mismos extractos se determinaron las concentraciones totales de proteínas extracelulares, por el método de BRADFORD (1976); y de azúcares reductores, siguiendo el método de Miller (MILLER et al., 1960).

2) A partir de cultivos desarrollados sobre agar-malta, se realizaron estudios de asimilación de fuentes de carbono mediante siembras en galerías ID 32C, y de resistencia-sensibilidad a antifúngicos mediante galería ATB-Fungus. Para ello, se resuspendieron las esporas, en los medios correspondientes de inoculación de cada sistema de galerías.

Caracterización molecular. Hasta el momento, una serie de cepas de colección, así como una serie de aislados provenientes de diversos muestreos en masas forestales de *P. nigra* y *P. sylvestris*, y las utilizadas en las pruebas fenotípicas anteriormente descritas, se encuentran en fase de procesamiento (extracción de DNA, amplificación mediante PCR y secuenciación automática de su región ITS), según el procedimiento descrito en BOYSEN et al. (1996), para su posterior análisis molecular. No obstante, se ha realizado una búsqueda exhaustiva en GenBank de secuencias de rDNA de diversas especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystis*, así como de algunas fases anamórficas de taxones de los mencionados géneros, de cara a confeccionar una filogenia tentativa de todo el grupo. De este modo, las secuencias de la región ITS completa (ITS 1 y 2 y el gen ribosomal 5.8S) fueron editadas manualmente y alineadas con la aplicación CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994) (Intelli-Genetics, Inc., Mountain View, California). A partir de los alineamientos múltiples, se realizaron reconstrucciones filogenéticas mediante Parsimonia, empleando el programa PAUP 3.1.1 (SWOFFORD, 1993). Como cepa externa o de referencia para ambos tipos de análisis, se empleó la secuencia ITS completa del hongo ascomiceto *Mirioscleroti*nia *scirpicola* (Orden Leotiales, Ascomycetes).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas del API ZYM mostraron que de las 19 enzimas que pueden ser detectadas, se obtuvieron resultados positivos en la mayoría de las cepas para: fosfatasa ácida, esterasa, esterasa lipasa, α-galactosidasa, β-galactosidasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa y n-acetil β-glucosaminidasa, e independientemente del serrín utilizado en las incubaciones, tampoco aparecieron diferencias cuantitativas (datos no mostrados). En la figura 1 se muestra la agrupación de las cepas en función de la detección o no-detección de las diferentes actividades enzimáticas de los sobrenadantes de cultivos sobre serrín de pino silvestre o pino negro. El dendrograma obtenido muestra que en la mayoría de las cepas las actividades enzimáticas detectadas son las mismas, independientemente del sustrato sobre el que crece el hongo. Estos resultados contrastan con los encontrados por TROYA et al (1999) quienes encuentran actividades enzimáticas celulolíticas más elevadas en aislados de Ceratocystis sp. cuando se hacen crecer sobre serrín de Pinus nigra que cuando lo hacen sobre serrín de Pinus sylvestris. Este hecho sugiere que en la naturaleza pueden existir cepas de hongos del azulado con una capacidad mayor que los hongos de colección estudiados, en degradar selectivamente madera de Pinus nigra, las cuales serían las responsables del intenso azulado que se desarrolla sobre la madera fresca en algunos lugares de España (TROYA et al., 2000).

Los análisis de los sobrenadante no muestran cantidades apreciables de proteínas ni de azúcares reductores. No obstante, el crecimiento del micelio observado en los cultivos y la detección de actividades β-galactosidasay β-glucosidasa sugiere una utilización eficaz del material lignocelulósico del serrín. En contraste con éstos resultados, estas actividades lignocelulolíticas no se detectan cuando los hongos se hacen crecer sobre monosacáridos (TROYA et al., 1999) pues la síntesis de celulasas y hemicelulasas se reprime cuando las fuentes de carbono utilizadas son azúcares sencillos, al igual que ocurre en basidiomicetos degradadores de madera (SHEWALE & SADANA, 1978).

Con respecto a las pruebas de asimilación de azúcares, puede deducirse que las especies de *Ceratocystis* y *Ophiostoma* son capaces de metabolizar todo tipo de monosacáridos, ya sean hexosas o pentosas (glucosa, manosa, galactosa, fructosa, xilosa y arabinosa) presentes con mayor frecuencia en extraible de madera. Del análisis de resultados que se refleja en la figura 2, se deduce que existe, no obstante, una diversidad muy grande, así *P. pulullans*, *C. olivaceum y C. piliferum* son capaces de crecer sobre 24 azúcares diferentes mientras que *C. clavatum* y *C. minuta-bicolor* sólo lo hacen sobre 12 azúcares (datos no mostrados). Respecto a la capacidad de asimilación de distintas fuentes de carbono no se observan diferencias entre las cepas de los géneros *Ceratocystis* y *Ophiostoma*, ni entre éstas y los hongos de transmisión eólica tomados como referencia.

El dendrograma obtenido con los datos de resistencia–sensibilidad (figura 3) muestran distintas tendencias de agrupación, aunque no existe segregación entre los géneros *Ceratocystis* y *Ophiostoma*. Respecto a esta característica fenotípica, existe también una gran diversidad entre las cepas estudiadas, pues mientras *C. clavatum*, *P. pullulans* y *C. olivaceum* se muestran resistentes a la flucitosina, anfotericina B, nistatina, miconazol y econazol, *O. ips*, *C. minus*, *S. phytiophila*, *C. coerulescens* y *C. minuta-bicolor* son sensibles a los mismos (datos no mostrados).Esta diversidad encontrada en cuanto a la sensibilidad de las cepas de colección puede tenerparalelismo con la que posiblemente exista entre las diferentes cepas causantes de azulado en distintas localizaciones de la Península. Este hecho sugiere que podría ser necesario la aplicación de un tratamiento específico en función de la cepa causante de la infección.

De la reconstrucción filogenética realizada (figura 4) puede deducirse que el género *Ceratocystis* constituye un grupo monofilético independiente de *Ophiostoma*. Así, en el cladograma mostrado, todas las especies de *Ceratocystis*, incluyendo algunas secuencias de *Chalara* (anamorfo reconocido para este género) quedan agrupadas en una rama única (soportada por un 99% de bootstrap). La mayoría de especies incluidas en este clado forman parte del denominado complejo *C. coerulescens*, donde el análisis molecular permitió establecer algunas correlaciones según el rango de huésped, para las especies de éste grupo. Los táxones de *Ceratocystis* aislados de madera de coníferas quedaron agrupadas en una rama única (aunque con valores discretos de bootstrap), sugiriendo un origen monofilético para este tipo de aislados. La secuencia ITS del aislado de *C. coerulescens* mostró una disposición basal al resto de táxones de coníferas, aunque estrechamente relacionada con otros dos táxones saprófitos (*C. pinicola* y *C. douglasii*). Esto parece correlacionarse con el hecho de que *C. coerulescens* muestra un amplio rango de huésped, pudiendo vivir tanto sobre angiospermas y gimnospermas, siendo además una especie ampliamente distribuida a nivel mundial. Estos datos sugieren, al igual que han señalado otros autores (WITTHUHN et al., 2000) que las especies parásitas de coníferas representarían una línea evolutiva más reciente y más especializada que las especies saprófitas del clado, pero posiblemente derivada de un ancestro con comportamiento saprófito y mayor amplitud ecofisiológica. El resto de especies de *Ceratocystis* aparecen diferenciadas del grupo de coníferas, habiendo sido aisladas de diferentes especies de angiospermas. Dentro de este grupo de especies se pudo reconocer un clado que agrupó a aquellos táxones de distribución *Australásica (Chalara australis*, *Ceratocystis eucaliptii* y *Chalara neocaledoniae*) con *C. virescens* como especie basal. Cabe destacar el hecho de que las cuatro especies poseen similares características en lo referente al tipo de conidiogénesis en sus anamorfos (HARRINGTON & McNEW, 1998). Parece también significativo el hecho de que la especie con mayor amplitud ecológica y distribución geográfica más extensa (*C. fimbriata*) ocupe la posición más basal del clado de *Ceratocystis* junto con *C. albofundus*. Este último aparece relacionado con los tres aislados de *C. fimbriata* e interesantemente, ambos táxones han sido a menudo aislados de madera de *Eucalyptus spp*.

En lo concerniente a las especies de *Ophiostoma*, su agrupación en el árbol filogenético sugiere una heterogeneidad a nivel de secuencia más alta que para *Ceratocystis*. Así, y pese a presentar unos porcentajes de bootstrap altos, las distancias genéticas entre nodos parecen sugerir altos niveles de polimorfismo a nivel de ITS. No obstante, en el árbol también puede observarse una agrupación de las especies de *Ophiostoma* pertenecientes al grupo de *O. Piceae*, el cual sí forma un grupo monofilético (con valores de 100% de bootstrap). En este grupo, se observa un claro agrupamiento de las especies de coníferas (*O. piceae*, *O. canum*, *O. floccosum* y *O. setosum*) frente a especies aisladas de caducifolios, al igual que reseñaron HARRINGTON et al. (2001) en su estudio filogenético del complejo *O. piceae*. En lo referente al tipo de anamorfo, las especies analizadas muestran fases conidiogénicas tipo *Sporothrix* y *Graphium*, distribuidas aleatoriamente a lo largo del árbol. Esta ausencia de correlación entre el tipo de anamorfo y el rango ecológico, sugiere el posible origen polifilético del *Ophiostoma s. str*. De hecho, algunos autores (PERRY, 1991) han debatido largamente la conveniencia de aceptar dentro del concepto de *Ophiostoma* géneros periféricos como *Ceratocystiopsis*.

El conjunto de resultados indica que existe una gran diversidad tanto fenotípica como genotípica entre los hongos de colección estudiados, que podría tener igual reflejo en los aislados causantes del azulado a pie de monte que afectan a la industria maderera española. Esta diversidad podría constatarse con el descubrimiento de nuevas cepas y/o especies que podrían ser específicas de madera de *Pinus nigra* o *Pinus sylvestris*. Por ello, se hace necesario la continuidad de estos estudios a fin de determinar el origen u orígenes de la infección y diagnosticar el tratamiento o tratamientos más adecuados.

REFERENCIAS

BRADFORD, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
BOYSEN, M., BORJA, M., DEL MORAL, C., SALAZAR, O. & RUBIO, V., (1996). Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. Curr. Genet. 29: 174-181.
MONGET, D., (1978). Mise au point d'une microméthode de détection et de mesure d'activités enzymatiques (API ZYM). Résultats obtenus dans différents domaines d'application. Thèse de Docteur-Inénieur. Lyon.
HARRINGTON, T.C.& McNEW, D.L., (1998). Partial interfertility among the *Ceratocystis* species on conifers. Fungal Gen. Biol. 25: 44-53.
HARRINGTON, T.C., McNEW, D.L., STEIMEL, J., HOFSTRA, D. & FARRELL, R., (2001). Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma picea* complex and the Dutch elm disease fungi. Mycologia 93: 111-136.
HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C. & PEGLER, D.N., (1995). Ainsworth and Bisby´s dictionary of the fungal. International Mycological Institute, CAB International, Wallingford, UK.
MILLER, G.L., BLUM, R., GLENNON, W.E., BURTON, A.L., (1960). Measurement of carboxymethyl cellulose activity. Analytical Biochemistry 2: 127-132.
PERRY, T.J., (1991). A synopsis of the taxonomic revisions in the genus *Ceratocystis* including a review of blue-staining species associated with *Dendroctonus* bark beetles. Gen. Tech. Rep. SO-86. New Orleans, LA: US.

Department or Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 16p.
SEIFERT, K.A., (1993). Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. Chapter 18. In: (Wingfield, M.J., Seifert, K.A. & Webber, J.F., eds.) *Ceratocystis* and *Ophiostoma*. Taxonomy, ecology and Pathogenicity. APS Press, USA.
SHEWALE, J.G. & SADANA, J.C., (1978). Cellulase and b-glucosidase production by Basidiomycete species. Can J. Microbiol. 24: 1204-1208.
SWOFFORD, D.L., (1993). PAUP: Phylogenetics analysis using parsimony, version 3.1.1. Washington DC: Smithsonian Institution, Laboratory of Molecular Systematics.
THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., (1994). CLUSTALW: improving the sensivity of progressive multiple sequence alignment throughout sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acids Res 22: 4673-4680.
TROYA, M.T., NAVARRETE, A. & RELAÑO, E., (1990). Analysis of the degradation of carbohidrates by blue-stain fungi. Int. Res. Wood Preser. 90-1457.
TROYA, M.T., RUBIO, F., MUÑOZ, D., LLINARES, F., RODRÍGUEZ, C. YUSTE, M., POZUELO, M.J. & FERNÁNDEZ GOLFÍN; J.I.., (1999). Enzymatic study of *Ceratocystis sp*., blue stain fungi on *Pinus nigra*. Int. Res. Wood Preser. 99-1035.
TROYA, M.T., LLINARES, F., MUÑOZ, D., POZUELO, M.J., ACERO, N., RODRÍGUEZ,C.& NAVARRETE, A., (2000). Detection of semi-quantitative and qualitative enzymatic activities of blue-stain fungi. Int. Res. Wood Preser. 00-10347
UPADHYAY, H.P., (1981). A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. Athens, Georgia: The University of Georgia Press. USA.
WITTHUHN, R.C., HARRINGTON, T.C., STEIMEL, J.P., WINGFIELD, B.D. & WINGFIELD, M.J., (2000). Comparison of isozymes, rDNA spacer regions and MAT-2 DNA sequences as phylogenetic characters in the analysis of the *Ceratocystis coerulescens* complex. Mycologia 92: 447-452.

Fig. 1. Agrupaciones obtenidas a partir de la detección de enzimas extracelulares del sobrenadante de cultivos de los hongos crecidos sobre serrín de *Pinus nigra o Pinus silvestris* e inoculados en galerías API-ZYM.

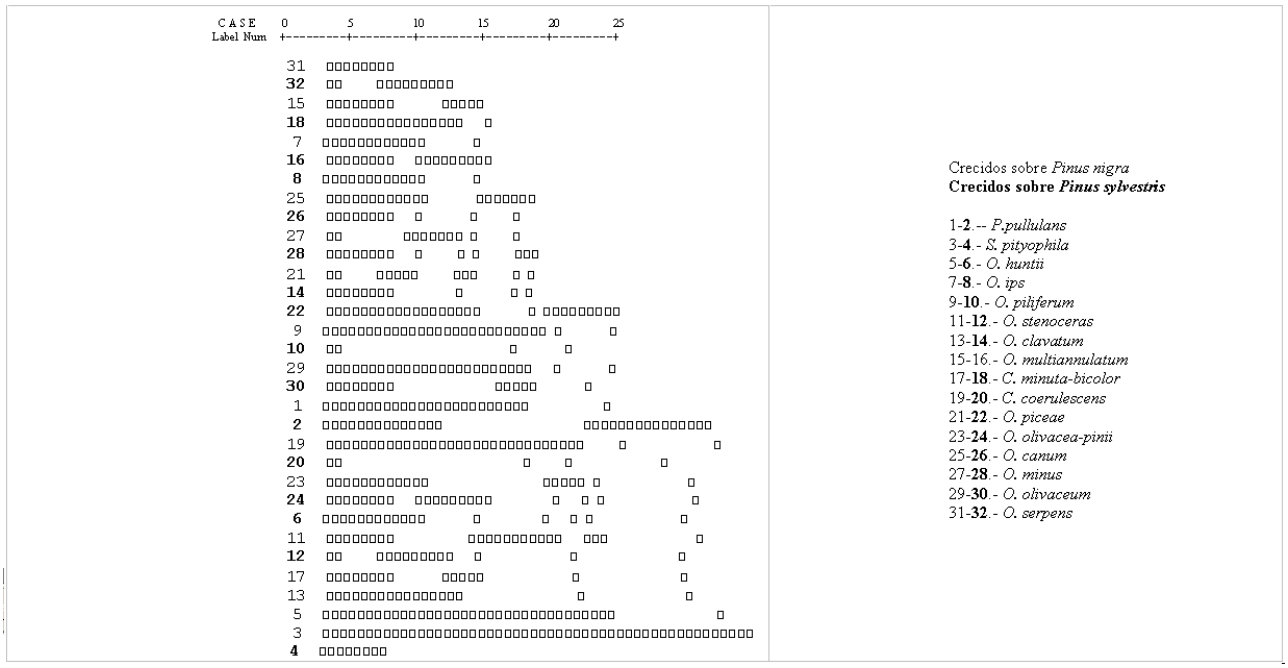


Fig. 2. Agrupaciones obtenidas con los resultados de la incubación de esporas de los hongos crecidos en agar-malta en galerías API-32 C para el estudio de asimilación de fuentes de carbono.

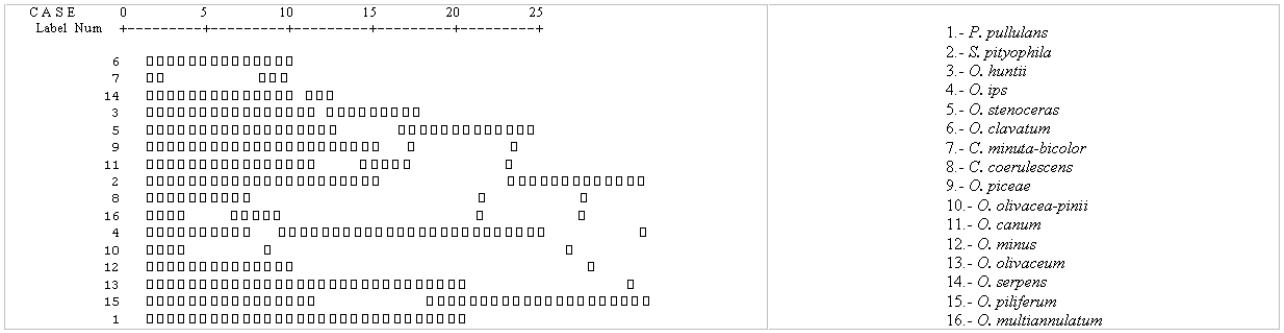


Fig. 3. Agrupaciones obtenidas con los resultados de la incubación de esporas de los hongos crecidos en agar-malta en galerías ATB fungus para el estudio de resistencia a antifúngicos.

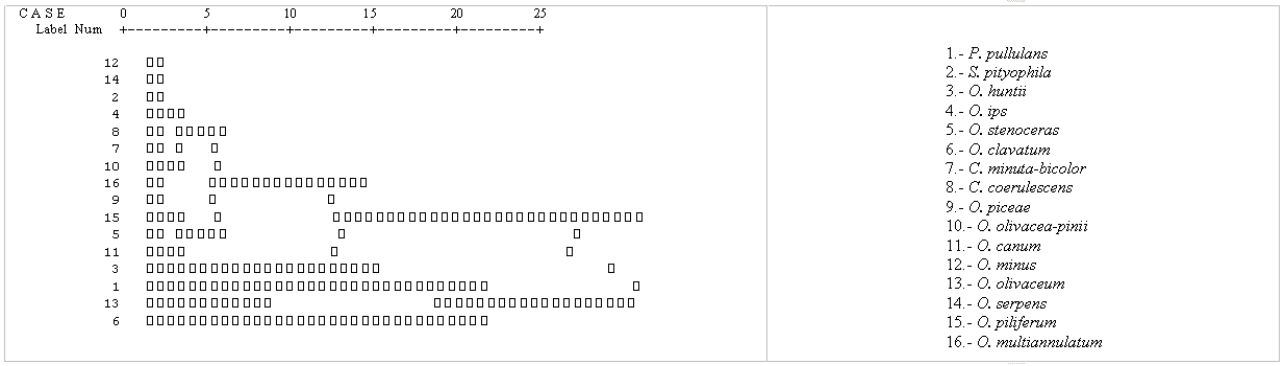
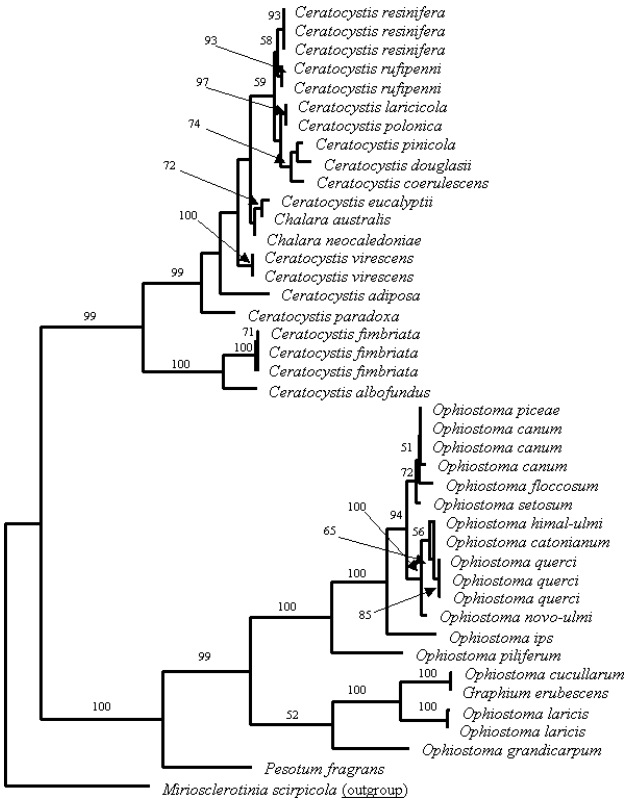


Fig. 4. Reconstrucción filogenética parcial de los géneros *Ophiostoma* y *Ceratocystis.* La figura muestra uno de los árboles más parsimoniosos generados mediante el programa PAUP 3.1.1., usando el programa CLUSTALW para los alineamientos múltiples. Los árboles fueron enraizados utilizando la secuencia ITS de *M. scirpicola* como grupo externo. Los valores sobre cada rama indican el porcentaje de bootstrap (valores mostrados por encima del 50%). Las longitudes horizontales representan distancias genéticas.


Ceratocystis resinifera
Ceratocystis resinifera
Ceratocystis resinifera
Ceratocystis rufipenni
Ceratocystis rufipenni
Ceratocystis laricicola
Ceratocystis polonica
Ceratocystis pinicola
Ceratocystis douglasii
Ceratocystis coerulescens
Ceratocystis eucalyptii
Chalara australis
Chalara neocaledoniae
Ceratocystis virescens
Ceratocystis virescens
Ceratocystis adiposa
Ceratocystis paradoxa
Ceratocystis fimbriata
Ceratocystis fimbriata
Ceratocystis fimbriata
Ceratocystis albofundus
Ophiostoma piceae
Ophiostoma canum
Ophiostoma canum
Ophiostoma canum
Ophiostoma floccosum
Ophiostoma setosum
Ophiostoma himal-ulmi
Ophiostoma catonianum
Ophiostoma querci
Ophiostoma querci
Ophiostoma querci
Ophiostoma novo-ulmi
Ophiostoma ips
Ophiostoma piliferum
Ophiostoma cucullarum
Graphium erubescens
Ophiostoma laricis
Ophiostoma laricis
Ophiostoma grandicarpum
Pesotum fragrans
Mariosclerotinia scirpicola (outgroup)