

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS ESPAÑOLES DE *Gremmeniella abietina*.

SANTAMARÍA, O.; MARTÍN, J.; OLAIZOLA, J.; PAJARES, J. A.; DIEZ-CASERO, J. J.

Área de Producción Vegetal. Departamento de Biología y Producción de los Vegetales. Universidad de Extremadura. Escuela de Ingenierías Agrarias. Ctra. de Cáceres s/n, 06071 BADAJOZ.. E-mail: osantama@unex.es

Resumen

Gremmeniella abietina (Lagerb.) Morelet (anamorfo *Brunchorstia pinea* (Karsten) Höhn) es un hongo ascomicete que causa chancros y puntiseado de brotes sobre un gran número de especies de coníferas. El patógeno ha sido responsable, en décadas recientes, de gravísimos daños en masas del Centro-Norte de Europa, en Norte América y Este de Asia. Desde la reciente detección de la micosis en 1999 en España, en planta para reforestación y sobre arbolado adulto de *Pinus halepensis*, se ha tratado de delimitar su distribución y alcance actual. Por otra parte, se ha intentado determinar la posición taxonómica y la variabilidad genética que esta especie presenta en España y conocer la susceptibilidad que presentan las especies de coníferas más importantes en nuestras masas forestales al ataque de este hongo. Para el primero de los objetivos se han realizado diversas prospecciones sobre las principales masas españolas de *P. halepensis*. La caracterización se ha realizado morfológica, fisiológica y molecularmente y se ha testado la patogenicidad sobre las especies de pino autóctonas de la Península Ibérica: *Pinus halepensis*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. sylvestris* y *P. uncinata*.

Palabras clave: *Brunchorstia pinea*, micosis, *Pinus* spp, puntiseado

INTRODUCCIÓN

Gremmeniella abietina (Lagerb.) Morelet, cuya fase asexual o anamórfica es *Brunchorstia pinea* (Karsten) Höhn, es un hongo ascomicete haploide que causa una de las enfermedades más importantes en coníferas y es el responsable de gravísimos daños en el Centro-Norte de Europa, en Norte América y Este de Asia (DONAUBAUER, 1972; YOKOTA, 1975; DORWORTH, 1979; PHILLIPS & BURDEKIN, 1992).

Este patógeno fue registrado por primera vez en España en 1933 sobre *Pinus pinaster* Ait. (MARTINEZ, 1933), pero no han vuelto a existir referencias de él hasta que en 1999 fue detectado causando daños de puntiseado y muerte de algunos pies en varias masas de *Pinus halepensis* Mill. en las comarcas castellano-leonesas del Cerrato y Tierra de Campos (SANTAMARÍA 2001). La sintomatología observada en España sobre el pino carrasco consistió en un puntiseado que avanzaba por la copa en mayor o menor grado, en un crecimiento distorsionado de las ramillas terminales y áreas de tejido necrótico deprimido. A veces también se observaron zonas agrietadas y pequeños chancros. En los ramillos que aún conservaban algo de vitalidad aparecieron exudaciones de resina en las yemas. En algunos casos también se observó la presencia de árboles muertos portando en sus ramas y ramillos gran cantidad de cuerpos de fructificación asexual del hongo de tipo picnidio. No se constató la presencia de cuerpos de fructificación sexual tipo apotecio (SANTAMARÍA et al., 2001a; 2003b).

Teniendo en cuenta la reciente aparición de *Gremmeniella abietina* en España, se hace necesario tener un mayor conocimiento de este hongo con la finalidad de establecer su grado de expansión actual, su riesgo real y su potencial de daño. Por ello, en el presente trabajo se presenta una revisión de los distintos ensayos realizados en nuestro laboratorio y encaminados a la consecución de los siguientes objetivos: 1) Delimitar la distribución y alcance actual de la micosis; 2) Determinar la posición taxonómica y la variabilidad de los aislados de *Gremmeniella abietina* obtenidos en diversas masas de *Pinus halepensis* de Castilla y León en base a la sintomatología que provoca en la planta, características de crecimiento en diferentes medios de cultivo y a diferentes temperaturas, morfología y septación de los conidios y en base a marcadores moleculares RAPD y 3) Evaluar el grado de patogenicidad de los aislados españoles obtenidos hasta la fecha sobre las principales especies de

coníferas de nuestro país: *Pinus halepensis*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. sylvestris* y *P. uncinata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la recogida de material vegetal sintomático en diversas masas de *Pinus halepensis* de nuestra geografía se contó con la colaboración de la Junta de Castilla y León, la Comunidad de Murcia y la Generalitat Valenciana y de la Dirección General de la Biodiversidad. Este material, junto al recogido en viajes propios, fue llevado a laboratorio para su tratamiento y analizado según las dos metodologías clásicas de aislamiento y caracterización de hongos (cámaras húmedas y placas con medio de cultivo puro). Con estas metodologías se consiguió por un lado la identificación y aislamiento del patógeno en aquellas muestras en las que estuvo presente, y por otro lado, el aislamiento de otros hongos presentes en las muestras y que afectaban en mayor o menor medida al material vegetal analizado. La recogida de muestras fue iniciada en el verano de 2001 y se mantuvo de manera intermitente a lo largo de los años 2002, 2003 y 2004.

Para la consecución del objetivo de caracterización se realizaron tres ensayos: determinación de los ratios de crecimiento *in vitro* en distintos medios de cultivo y a diferentes temperaturas, análisis de la morfología de los conidios (SANTAMARÍA, 2003; SANTAMARÍA et al., 2004b) y análisis molecular de los perfiles RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que generaron los distintos aislados de *Gremmeniella abietina* obtenidos (SANTAMARÍA, 2003; SANTAMARÍA et al., 2003a; 2004a; 2005).

El objetivo de patogenicidad se realizó en *in planta* en invernadero mediante la inoculación del patógeno sobre plantas de una y dos savias de *Pinus pinaster*, *P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. pinea*, *P. halepensis* y *P. uncinata*. Las inoculaciones se realizaron mediante una herida practicada en el tallo a unos 5-10 cm del ápice y posterior puesta en contacto con un trozo de micelio de distintos aislados del patógeno *G. abietina*. Al final del ensayo se procedió a cortar las plantas longitudinalmente por la mitad midiéndose la necrosis interna provocada por el patógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De todas las masas analizadas hasta la fecha únicamente se ha podido constatar la presencia de *Gremmeniella abietina* en seis masas de Palencia (Ampudia, Astudillo1, Astudillo2, Hérmedes de Cerrato, Valle de Cerrato y Villalobón) y en una de Valladolid (Villalba de los Alcores). No obstante, tampoco conviene descartar definitivamente su presencia del resto de masas, ya que en varias de ellas la sintomatología observada fue similar a la aparecida en las zonas donde se detectó el patógeno (SANTAMARÍA, 2001; SANTAMARÍA et al., 2001b). Convendría, por tanto, intensificar los muestreos principalmente en esas zonas con sintomatología análoga. Del resto de especies fúngicas encontradas, la mayoría son especies secundarias o de debilidad, aunque también se constató la presencia en varias masas de hongos con cierta importancia fitopatogénica como pueden ser: *Lophodermium* spp., *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton, *Sirococcus strobilinus* Preuss, *Sclerophoma pithyophila* (Corda) Höhn, *Thyriopsis halepensis* (Ck.) Theiss y Syd. y *Cenangium ferruginosum* Fr. (SANTAMARIA et al., 2002b)

El número de septos en los conidios de los aislados españoles de *G. abietina* osciló entre 0 y 5, aunque el 73,2 % de los conidios presentó tres septos. Las dimensiones de los conidios de los aislados españoles variaron entre 10,7-44,8 x 1,5-4,4. Siendo la variabilidad de los aislados españoles en base a los crecimientos en placa y las dimensiones y septación de los conidios bastante grande incluso dentro del mismo aislado (SANTAMARÍA, 2003; SANTAMARÍA et al., 2004b). Según los marcadores RAPD utilizados, la variabilidad existente entre los aislados españoles fue baja y las distancias genéticas pequeñas entre ellos y mayores con respecto al resto de los grupos analizados. Este hecho evidenció una diferenciación clara de los aislados españoles frente al resto de biotipos analizados a un nivel similar al que se producía entre ellos (SANTAMARÍA, 2003; SANTAMARÍA et al., 2003a; 2004a; 2005). Teniendo en cuenta los síntomas y signos observados en campo, la morfología y septación de los conidios y en base a los marcadores RAPD analizados se puede indicar

que los aislados españoles se encuentran dentro de la variedad *Gremmeniella abietina* var. *abietina*, raza “Europea” y que no pertenecen a los biotipos “Alpino” ni “B (STT)”. Existe una similitud con los aislados pertenecientes al biotipo “A (LTT)” analizados, pero las distancias genéticas evidenciaron una cierta diferenciación con ellos

Los análisis preliminares del ensayo de patogenicidad parecen indicar que todos los aislados de *G. abietina* utilizados resultaron ser patógenos, en mayor o menor medida. También se observó una influencia de la edad de la plántula en el daño causado por el patógeno, aunque éste fue variable con la especie hospedante. *Pinus halepensis* resultó la especie más susceptible a las cepas de *G. abietina* que se probaron y puesto que estas cepas fueron aisladas de pies de pino carrasco, cabría pensar en una cierta especificidad de este patógeno hacia la especie hospedante. No obstante, nuevos ensayos utilizando aislados procedentes de otras especies hospedantes deberían ser realizados para confirmar esta hipótesis.

Agradecimientos

Estos trabajos han sido financiados por la Junta de Castilla y León y por el Fondo Social Europeo a través de una beca de Formación de Personal Investigador. También queremos agradecer la colaboración de la Junta de Castilla y León, la Comunidad de Murcia y la Generalitat Valenciana y de la Dirección General de la Biodiversidad en la recogida de material vegetal sintomático de *Pinus halepensis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DONAUBAUER, E. 1972. Distribution and hosts of *Scleroderris lagerbergii* in Europe and North America. Eur. J. For. Path. 2, 6-11.

DORWORTH, C.E. 1979. Stand reduction of red pine by *Gremmeniella abietina*. Can. J. For. Res. 9, 316-322.

MARTÍNEZ, J. 1933. Una grave micosis del pino observada por primera vez en España. Bol. Soc. Españ. Hist. Nat. 33: 25-29.

PHILLIPS, D.H. & BURDEKIN, D.A. 1992. Diseases of Forest and Ornamental Trees. The MacMillan Press LTD. London.

SANTAMARÍA, O. 2001. Detección y distribución de *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet en la provincia de Palencia y micoflora asociada en *Pinus halepensis* Mill. Trabajo Fin de Carrera de I. de Montes. ETSIIAA de Palencia.

SANTAMARÍA, O. 2003. Caracterización morfológica, fisiológica y genética de aislados españoles de *Gremmeniella abietina* y comparación con los procedentes de otros países. Trabajo Tutelado de Investigación. ETSIIAA de Palencia.

SANTAMARÍA, O.; ALVES-SANTOS, F.M. & DIEZ, J.J. 2003a. Molecular characterisation of *Gremmeniella abietina* isolates from Spain. En libro de actas del “Joint Workshop on Molecular Diagnostics Of Plant Pathogens”. Lamezia-Terme (Italia), 2003.

SANTAMARÍA, O.; ALVES-SANTOS, F.M. Y DIEZ, J.J. 2004a. Caracterización molecular de aislados españoles de *Gremmeniella abietina*. En libro de actas del XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Lloret de Mar (Girona), 2004.

SANTAMARÍA, O.; ALVES-SANTOS, F.M. & DIEZ, J.J. 2005. Genetic characterisation of *Gremmeniella abietina* isolates from Spain. Plant Path. 54. *In press*.

SANTAMARÍA, O.; MARTÍN, P.; PAJARES, J.A.; RUIZ, D. Y DIEZ, J.J. 2001a. Presencia de *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet en el sur de Palencia. III Congreso Forestal Español.

Granada, 2001.

SANTAMARÍA, O.; PAJARES, J.A. Y DIEZ, J.J. 2001b. Detección y distribución en la provincia de Palencia de *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet, un nuevo patógeno sobre el pino carrasco. En libro de Actas de la XVIII Reunión Del Grupo De Trabajo Fitosanitario De Forestales, Parques Y Jardines. Zamora, 2001.

SANTAMARÍA, O.; PAJARES, J. A. Y DIEZ, J. J. 2002b. *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet una nueva amenaza sobre el pino carrasco. En Junta de Castilla y León (eds.), La salud de los bosques de castilla y león, Informe 2001: 149-153. Junta de Castilla y León, Burgos.

SANTAMARÍA, O.; PAJARES, J.A. & DIEZ, J.J. 2003b. First report of *Gremmeniella abietina* on *Pinus halepensis* in Spain. Plant Path. 52, 425.

SANTAMARÍA, O.; PAJARES, J.A. & DIEZ, J.J. 2004b. Physiological and morphological variation of *Gremmeniella abietina* from Spain. For. Path. 34, 395-405.

YOKOTA, S. 1975. Scleroderris canker of todo-fir in Hokkaido, Northern Japan. III. Dormant infection of the causal fungus. Eur. J. For. Path. 5, 7-12.