

DIFERENCIAS EN HONGOS ENDÓFITOS DE RAMILLOS ENTRE CHOPERAS AUTÓCTONAS (*POPULUS NIGRA*) Y LAS PLANTACIONES DE HÍBRIDOS (*POPULUS X EURAMERICANA*)

Jorge Martín-García^{1,3}, Michael M. Müller² y Julio Javier Díez Casero³

¹Ingeniería Forestal y del Medio Natural. Universidad de Extremadura. Av. Virgen del Puerto 2. 10600-PLASENCIA (Cáceres, España). Correo electrónico: jorgemg@unex.es

²The Finnish Forest Research Institute. P.O. Box 18. 01301-FIN VANTAA (Finland). Correo electrónico: michael.mueller@metla.fi

³Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible. Universidad de Valladolid-INIA. Av. Madrid 44. Edificio E. 34004-PALENCIA (España). Correo electrónico: jdcasero@pvs.uva.es

Resumen

El álamo negro (*Populus nigra*) es considerada una especie clave en los bosques de ribera en Europa y una de las especies autóctonas más amenazadas, debido entre otras causas a su sustitución por plantaciones monoclonales de híbridos más rentables y a la pérdida de variabilidad genética consecuencia de la intensiva introgresión con estas últimas. El objetivo de este estudio fue describir y comparar la comunidad de hongos endófitos en los ramillos de choperas autóctonas (*P. nigra*) y plantaciones monoclonales de híbridos (*P. x euramericana* clone I-214), para explorar los efectos de la pérdida del álamo negro en la diversidad de hongos endófitos en las choperas españolas. Endófitos de ramillos fueron aislados desde tres choperas autóctonas y tres plantaciones monoclonales de híbridos en Palencia, e identificados a partir de la secuencia de la región ITS de su rDNA. Un total de 13 especies fueron aisladas, seis de las cuales fueron encontradas exclusivamente en *P. nigra*, cuatro sólo en *P. x euramericana* y tres fueron aisladas desde ambos. Los resultados muestran que la comunidad de hongos endófitos de ramillos varía entre las choperas autóctonas y las plantaciones monoclonales.

Palabras clave: Clon, rDNA, Introgresión, Variabilidad, Genética

INTRODUCCIÓN

El álamo negro (*Populus nigra* L.) es una especie dioica, heliófila y pionera de bosques de ribera, ecosistema en el cual desempeña un papel clave. Aunque la distribución de *P. nigra* se extiende por gran parte de Europa, se trata de uno de los árboles más amenazados del continente. Los factores que amenazan a dicha especie son

las infraestructuras hidráulicas que condicionan los periodos de inundación, la plantación de choperas monoclonales de híbridos que reemplazan al álamo negro en búsqueda de una mayor rentabilidad y finalmente la introgresión genética desde estas plantaciones monoclonales, ya que un número reducido de clones son utilizados y por lo tanto estos aportan la mayor cantidad de polen (LEFÈVRE et al., 1998; SMULDERS et al., 2008).

La superficie de plantaciones de híbridos de chopo está incrementando en la actualidad por el valor económico que alcanza su madera en la industria del desenrollo. Su rentabilidad fluctúa entre 1.200 y 2.400 €/ha·año en las mejores calidades de estación (DÍAZ Y ROMERO, 2001). Dichas plantaciones son monoclonales y aunque en España se utilizan varios clones, *Populus x euramericana* (Dode) Guinier clone I-214 (*P. deltoides* Marsh. ♀ x *P. nigra* L. ♂) es el más común, alcanzando hasta el 70% de la superficie total de choperas (FERNÁNDEZ Y HERRANZ, 2004).

En la actualidad los organismos públicos pretenden incrementar la superficie de plantaciones de chopo. Concretamente, Castilla y León, que es la Comunidad Autónoma con mayor superficie de choperas con entorno a dos tercios del total nacional, ha elaborado un borrador de la “estrategia de la populicultura en Castilla y León”, cuyo principal objetivo es doblar la superficie de plantaciones de chopo en las próximas dos décadas. Ante lo cual, un equilibrio entre beneficio económico y el mantenimiento de la diversidad biológica en las choperas es necesario.

Si bien dicha estrategia prevé que las plantaciones de chopos no sustituirán los actuales bosques de ribera, una posible pérdida de variabilidad genética debido a la introgresión genética de las plantaciones monoclonales causaría probablemente una serie de efectos indirectos sobre aquellos organismos vinculados a *P. nigra*. Sin embargo, mientras que la mayoría de macroorganismos son específicos de un tipo de ecosistema, muchos microorganismos presentan una especificidad total hacia el hospedante, por lo que la desaparición de una especie de árbol podría conllevar la pérdida de sus microorganismos asociados, por ejemplo de aquellos hongos endófitos exclusivos de *P. nigra*. Esta disminución de biodiversidad fúngica conllevaría la pérdida de metabolitos secundarios segregados por los hongos, fuente potencial de nuevos productos farmacéuticos.

El objetivo principal de este estudio fue describir y comparar las comunidades de hongos endófitos de las choperas autóctonas (*P. nigra*) y las plantaciones monoclonales de híbridos de chopo (*P. x euramericana* clone I-214).

MATERIAL Y MÉTODOS

En la cuenca del río Duero, concretamente en la provincia de Palencia, fueron seleccionadas tres plantaciones monoclonales de híbridos de chopo (*P. x euramericana* clone I-214) de 10 años de edad y tres choperas autóctonas (*P. nigra*). Las características altitudinales, edáficas y climáticas de todas las parcelas fueron similares y su localización no distó más de 60 km entre sí. Tres árboles de cada parcela fueron aleatoriamente seleccionados, si bien se procuró que los árboles seleccionados en las choperas autóctonas tuvieran un diámetro similar a los árboles presentes en las plantaciones monoclonales para minimizar en lo posible la influencia de la edad.

Durante el otoño se recogieron 4 ramas sanas de las cuatro orientaciones del tercio superior de la copa de cada árbol. Posteriormente cuatro trozos de ramillos de 1 año de edad fueron cortados de cada rama y esterilizados (agitación en etanol al 70% durante un minuto, agitación en hipoclorito sódico al 4% durante 4 minutos, de nuevo agitación en etanol al 70% durante un minuto y finalmente unos segundos en etanol al 70% sin agitación). Finalmente, los trozos de ramillo fueron sembrados en placas Petri con medio PDA (patata, dextrosa y agar) y, una vez selladas con Parafilm®, fueron conservadas en oscuridad a 22°C durante tres semanas. Aunque varias colonias crecieron en los 4 trozos de ramillos de cada rama, un único aislamiento procedente de cada rama fue seleccionado de forma aleatoria y subcultivado a una nueva placa Petri con medio PDA. De este modo, se obtuvieron cuatro aislamientos por árbol muestreado, lo que hace un total de 36 aislamientos por especie (4 aislamientos/árbol x 3 árboles/parcela x 3 parcelas) con dos especies de chopos (es decir, un total de 72 aislamientos). Ante la imposibilidad de cuantificar la diversidad total de hongos endófitos, este estudio buscó un equilibrio entre el rigor ecológico y la eficiencia económica por lo que se centró en los endófitos dominantes. Así, un tamaño muestral de 36 aislamientos por especie permite detectar (con una probabilidad del 95%) aquellas especies con una frecuencia superior a 0,08 [$p = 1 - (1 - f)^n$, donde f = frecuencia y n = tamaño muestral].

La identificación de los aislamientos se basó en la comparación de sus secuencias con las depo-

sitadas en la base de datos del GenBank (NCBI), requiriendo una coincidencia mínima del 97% de al menos 401 pares de bases. Previamente fue necesaria la obtención del DNA, para lo cual se siguieron los protocolos establecidos por VAINO et al. (1998). Posteriormente la amplificación de la región ITS del rDNA fue llevada a cabo utilizando los cebadores ITS1-F (GARDES & BRUNS, 1993) y ITS4 (WHITE et al., 1990) y siguiendo los protocolos establecidos por WHITE et al. (1990) y VAINIO & HANTULA (2000). Entonces los productos obtenidos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron purificados con el "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche, Mannheim, Germany), siguiendo las instrucciones de los productores. Finalmente, el DNA purificado fue secuenciado en ambas direcciones al mismo tiempo y las secuencias fueron alineadas mediante LI-COR software (ALIGN IR ver. 2.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las longitudes de las secuencias de la región ITS variaron entre 401 y 548 pares de bases. Todas las secuencias, excepto dos, alcanzaron una similitud aceptable (97% de al menos 401 pares de bases) con alguna secuencia depositada

previamente en el GenBank. Un total de 13 especies fueron identificadas, seis de ellas fueron aisladas exclusivamente desde *P. nigra*, cuatro únicamente desde *P. x euramericana* y tres fueron encontradas en ambos hospedantes [(*Lewia infectoria* (Fuckel) M.E. Barr & E.G. Simmons (anamorph: *Alternaria infectoria* E.G. Simmons), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. y *Epicoccum nigrum* Link)]. Si bien, aunque *A. alternata* fue encontrada en ambos hospedantes fue más frecuente en *P. nigra* ($p < 0,03$; test de Fisher) (Tabla 1). Las especies aisladas exclusivamente de *P. nigra* fueron *Alternaria* spp., *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Cryptodiaporthe salicella* (Fr.) Petr., *Fimetariella rabenhorstii* (Niesl) N. Lundq., *Plagiostoma fraxini* (Redlin & Stack) Sogonov y *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons. Por otro lado, *Athelia bombacina* Pers., *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze, *Cytospora chrysosperma* (Pers.: Fr.) Fr. (teleomorph: *Valsa sordida* Nitschke) y una especie no identificada sólo fueron aisladas desde *P. x euramericana*. De todos ellos *C. chrysosperma* fue el aislamiento más frecuente encontrándose en siete de los nueve árboles del clon I-214, lo que indica una frecuencia significativamente superior que la total ausencia en *P. nigra* ($p < 0,01$; test de Fisher) (Tabla 1).

Especie	Similaridad (%)	Abundancia relativa (%)							
		<i>Populus nigra</i>				<i>Populus x euramericana</i>			
		Pn1	Pn2	Pn3	Mean	Px1	Px2	Px3	Mean
<i>Alternaria alternata</i>	99 - 100	33,3	25	25	27,8 ± 2,8	0	25	0	8,3 ± 8,3
<i>Alternaria</i> spp.	100	0	8,3	0	2,8 ± 2,8	0	0	0	0
<i>Athelia bombacina</i>	99	0	0	0	0	0	0	8,3	2,8 ± 2,8
<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	16,7	8,3	0	8,3 ± 4,8	0	0	0	0
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	100	0	0	0	0	0	8,3	0	2,8 ± 2,8
<i>Cryptodiaporthe salicella</i>	99	0	0	8,3	2,8 ± 2,8	0	0	0	0
<i>Cytospora chrysosperma</i>	99 - 100	0	0	0	0	66,7	8,3	75	50 ± 21
<i>Epicoccum nigrum</i>	99 - 100	0	0	33,3	11,1 ± 11,1	0	16,7	8,3	8,6 ± 4,8
<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	98-99	0	25	0	8,3 ± 8,3	0	0	0	0
<i>Plagiostoma fraxini</i>	97	0	8,3	8,3	5,6 ± 2,8	0	0	0	0
<i>Lewia infectoria</i>	99 - 100	25	25	25	25 ± 0	33,3	25	8,3	22,2 ± 7,3
<i>Stemphylium vesicarium</i>	99	16,7	0	0	5,6 ± 5,6	0	0	0	0
No identificado		0	0	0	0	0	16,7	0	5,6 ± 5,6

Tabla 1. Distribución y abundancia relativa de las especies fúngicas aisladas en el estudio. El porcentaje de similitud es respecto al taxón más cercano del GenBank. La abundancia relativa (%) corresponde al aislamiento de una especie desde las 12 ramas muestreadas en cada parcela

Los resultados de este estudio muestran que las comunidades de hongos endófitos difieren entre *P. nigra* y el híbrido del clon I-214, ya que sólo tres de las trece especies encontradas fueron comunes a ambos hospedantes. Precisamente las tres especies comunes a ambos hospedantes pueden ser clasificadas como especies generalistas (SCHULZ & BOYLE, 2005). Esta diferenciación de la comunidad fúngica entre ambos hospedantes es aún más reseñable teniendo en cuenta que el clon I-214 comparte un 50% de la carga genética del *P. nigra*.

A. pullulans fue aislado exclusivamente desde *P. nigra*, si bien este ha sido previamente encontrado en *P. x euramericana* (clone I-214) (MARTÍN-GARCÍA et al., 2011), por lo que es probable que hubiera sido aislado en *P. x euramericana* en este estudio si se hubiese incrementado el tamaño muestral. Dos de las especies aisladas en las choperas autóctonas (*F. rabenhorstii* y *S. vesicarium*) no habían sido identificadas previamente en *P. x euramericana* (CALLAN, 1998; GINNS, 1986; MARTÍN-GARCÍA et al., 2011), *Populus tremula* (SANTAMARÍA & DIEZ) o géneros que comparten el mismo hábitat como *Salix* sp. (PETRINI & FISHER, 1990) y *Alnus* sp. (FISHER & PETRINI, 1990). A su vez, *C. salicella* parece ser una especie típica de hábitat riparios, ya que ha sido aislada con anterioridad en *Salix* sp. (GINNS, 1986), *Alnus* sp. (GINNS, 1986), *Populus tremuloides* (CALLAN, 1998; GINNS, 1986), *P. trichocarpa* (CALLAN, 1998; GINNS, 1986) y *P. canadensis* (*P. deltoides* x *nigra* x *eugenei*) (GINNS 1986). Finalmente, *P. fraxini* no parece ser un endófito específico de los géneros *Fraxinus* sp. y *Chionanthus* sp., como había sido sugerido (SOGONOV et al., 2008).

Por otro lado, las especies encontradas en las plantaciones monoclonales, excepto *A. bombacina*, han sido previamente aisladas desde otras especies de árboles. Así, *C. chrysosperma* fue aislada desde *Populus tremuloides* (CALLAN, 1998), *P. tremula* (SANTAMARÍA & DIEZ, 2005), *P. balsamifera* (CALLAN, 1998), *P. trichocarpa* (CALLAN, 1998), *Populus hybrid* (CALLAN, 1998) y *Eucalyptus grandis* (BETTUCCI & ALONSO, 1997). De igual modo, PETRINI & FISHER (1990) encontraron *Cytospora* sp. colonizando *Salix fragilis*. *B. mediterranea* es considerada una especie generalista ya que ha sido aislada desde otros muchos géneros (NUGENT et al., 2005).

Aunque la mayoría de los hongos aislados en este estudio pueden ser clasificados como “verdaderos endófitos”, tres especies (*S. vesicarium*, *B. mediterranea* y *C. chrysosperma*) pueden ser considerados como patógenos de debilidad detectados en su fase de latencia, ya que fueron aislados desde tejidos sin síntomas de enfermedad. *S. vesicarium* es un patógeno capaz de causar graves daños en peral (ROSSI & PATTORI, 2009) y en cultivos de cebolla (AVELING & SNYMAN, 1993), sin embargo hasta la fecha no había sido identificada sobre chopos. *B. mediterranea* aunque generalmente se presenta como un hongo endófito en árboles sanos, ocasionalmente se convierte en un agente patógeno bajo condiciones de estrés hídrico (NUGENT et al., 2005). *C. chrysosperma* es conocido por ser el típico patógeno de debilidad de chopos, aunque bajo ciertas condiciones es capaz de generar graves daños (WORRALL et al., 2008).

La presencia de *C. chrysosperma* únicamente en las plantaciones monoclonales podría ser debido al origen de los plantones del híbrido o a diferencias en la susceptibilidad de las distintas especies de chopo hacia este patógeno de debilidad. Todos los árboles de cada una de las plantaciones monoclonales es muy probable que procediesen de un mismo ortet, por lo que si la cepa madre hubiese estado infectada por *Cytospora*, todos los plantones utilizados en la plantación probablemente fuesen ya portadores de este hongo en su fase latente. Por otro lado, es bien conocido que las distintas especies de chopos, incluso sus clones, presentan diferentes grados de susceptibilidad. Por ejemplo, *P. trichocarpa* es más susceptible a *C. chrysosperma* que *P. x canadensis* (syn. *P. x euramericana*) (BLOOMBERG, 1962a,b), mientras que ALONSO et al. (2000) demostraron que la susceptibilidad de *P. x euramericana* a *C. chrysosperma* variaba según el clon.

CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que las comunidades fúngicas de endófitos varían entre las choperas autóctonas (*P. nigra*) y las plantaciones monoclonales de híbridos (*P. x euramericana* clone I-214). Estos resultados deben ser considerados como preliminares y nuevos estudios

sobre los hongos endófitos de hojas, madera y raíces deben ser llevados a cabo para evaluar el riesgo que supone la disminución de las choperas autóctonas y la posible pérdida de variabilidad genética debida a la introgresión ocasionada por las plantaciones monoclonales.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a Marja-Leena Santanen y Antonio Sanz por su asistencia técnica durante la identificación molecular, y a Juan Andrés Oria de Rueda por su ayuda en la localización de las parcelas de estudio. Este trabajo ha sido financiado por la Unión Europea y la Junta de Castilla y León, a través del programa INTERREG IIIB (proyecto FORSEE).

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, D.; PAJARES J., Y DIEZ, J.; 2000. Evaluación del poder patogénico de *Cytospora chrysosperma* en clones de chopo. *Bol. San. Veg., Plagas* 26: 415-423.
- AVELING, T.A.S. & SNYMAN, H.G.; 1993. Infection studies of *Stemphylium vesicarium* on onion leaves. *Mycol. Res.* 97: 984-988.
- BETTUCCI, L. & ALONSO, R.; 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Mycol. Res.* 101: 1060-1064
- BLOOMBERG, W.J.; 1962a. *Cytospora* canker of poplar: factors influencing the development of the disease. *Can. J. Bot.* 40: 1271-1280.
- BLOOMBERG, W.J.; 1962b. *Cytospora* canker of poplar: the moisture relations and anatomy of the host. *Can. J. Bot.* 40: 1281-1292.
- CALLAN, B.E.; 1998. *Diseases of Populus in British Columbia: a diagnostic manual*. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Canadá.
- DÍAZ, L. Y ROMERO, C.; 2001. Caracterización económica de las choperas en Castilla y León: Rentabilidad y turnos óptimos. *En: Actas del I Simposio del Chopo*: 489-500. Zamora.
- FERNÁNDEZ, A. Y HERRANZ, G.; 2004. *El chopo (Populus sp.) Manual de Gestión Forestal Sostenible*. Junta de Castilla y León, Valladolid, 53.
- FISHER, P.J. & PETRINI, O.; 1990. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. *Mycol. Res.* 94: 313-319.
- GARDES, M. & BRUNS, T.D.; 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes — application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- GINNS, J.H.; 1986. *Compendium of plant disease and decay fungi in Canada 1960-1980*. Research Branch of Canada Agriculture Publications, Ottawa.
- LEFÈVRE, F.; LÈGIONNET, A.; DE VRIES, S. & TUROK, J.; 1998. Strategies for the conservation of a pioneer tree species, *Populus nigra* L., in Europe. *Genet. Sel. Evol.* 30: 181-196.
- MARTÍN-GARCÍA, J.; ESPIGA, E.; PANDO, V. & DIEZ, J.; 2011. Factors influencing endophytic communities in poplar plantations. *Silva Fennica* 45: 169-180.
- NUGENT, L.K.; SIHANONTH, P.; THIENHIRUN, S. & WHALLEY, J.S.; 2005. *Biscogniauxia*: a genus of latent invaders. *Mycologist.* 19: 40-44.
- PETRINI, O. & FISHER, P.J.; 1990. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycol. Res.* 94: 1077-1080.
- ROSSI, V. & PATTORI, E.; 2009. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. *Biol. Control* 49: 52-57.
- SANTAMARÍA, O. & DIEZ, J.; 2005. Fungi in leaves, twigs and stem bark of *Populus tremula* from northern Spain. *For. Pathol.* 35: 95-104.
- SCHULZ, B. & BOYLE, C.; 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109: 661-686.
- SMULDERS, M.J.M.; COTTRELL, J.E.; LEFÈVRE, F.; VAN DER SCHOOT, J.; ARENS, P.; VOSMAN, B.; TABBENER, H.E.; GRASSI, F.; FOSSATI, T.; CASTIGLIONE, S.; KRISTUFEK, V.; FLUCH, S.; BURG, K.; VORNAM, B.; POHL, A.; GEBHARDT, K.; ALBA, N.; AGÚNDEZ, D.; MAESTRO, C.; NOTIVOL, E.; VOLOSANCHUK, R.; POSPÍKOVÁ, M.; BORDÁCS, S.; BOVENSCHEN, J.; VAN DAM, B.C.; KOELEWIJN, H.P.; HALFMAERTEN, D.; IVENS, B.; VAN SLYCKEN, J.; VANDEN BROECK, A.; STORME, V. &

- BOERJAN, W.; 2008. Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: Consequences for conservation and restoration. *Forest Ecol. Manage.* 255: 1388-1399.
- SOGONOV, M.V.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y.; MEJÍA, L.C. & WHITE, J.F.; 2008. Leaf-inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. *Stud. Mycol.* 62: 1-79.
- VAINIO, E.J. & HANTULA, J.; 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 104: 927-936.
- VAINIO, E.J.; KORHONEN, K. & HANTULA, J.; 1998. Genetic variation in *Phlebiopsis gigantea* as detected with random amplified microsatellite (RAMS) markers. *Mycol. Res.* 102: 187-192.
- WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J.; 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.), *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*: 315-322. Academic. New York.
- WORRAL, J.J.; EGELAND, L.; EAGER, T.; MASK, R.A.; JOHNSON, E.W.; KEMP, P.A. & SHEPPERD, W.D.; 2008. Rapid mortality of *Populus tremuloides* in southwestern Colorado, USA. *Forest Ecol. Manage.* 255: 686-696.