

DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA EN AISLADOS DE *DIPLODIA PINEA* (DESM.) (KICKX) PROCEDENTES DE PLANTACIONES DE *PINUS RADIATA* D. DON DEL PAIS VASCO: PATOGENEIDAD, VCGS Y MORFOTIPOS

Gonzalez de Murillo, M.; Muruamendiaraz, A.; Aragonés, A.; Espinel, S.; Iturrutxa, E.
eiturrutxa@neiker.net.

NEIKER. Granja Modelo – Arkaut. Apdo. 46. 01080 Vitoria-Gasteiz

RESUMEN

Se estudian 36 aislados de *Diplodia pinea* (Desm.) (Kickx) con el fin de caracterizarlos desde distintos puntos de vista, para posteriores tareas de control del patógeno en campo. Si bien todos los aislados estudiados resultan patogénicos, no se observan diferencias significativas en la agresividad de cada uno de ellos tras los ensayos de inoculación realizados. En el estudio de VCGs o Grupos de Compatibilidad Vegetativa se obtiene un 2% de aislados compatibles entre sí un 1% de compatibilidad intermedia, siendo los restantes no compatibles vegetativamente. A nivel molecular sólo se puede hablar hasta el momento de cebadores que amplifican con mayor eficiencia que otros los fragmentos SSR del hongo estudiado.

Palabras clave: agresividad, compatibilidad vegetativa, marcadores SSR

INTRODUCCIÓN

Diplodia pinea (Desm.) (Kickx) (DE WET et al., 2003) es uno de los patógenos más comunes en las plantaciones de *Pinus radiata* D. Don en esta comunidad. La enfermedad provocada por este deuteromiceto, endofito y patógeno latente (BURGESS et al., 2001) puede afectar a otras especies del género *Pinus* siendo también susceptibles especialmente *Pinus nigra* y *Pinus sylvestris* (APS Press) así como otros géneros de coníferas: *Abies*, *Araucaria*, *Chamaecyparis*, *Cupressus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Thuja*, *Juniperus* y *Cedrus* (SWART et al. 1987).

En este estudio se profundiza en el conocimiento de la población de *Diplodia pinea*, su diversidad genotípica y fenotípica.

Esta información resulta de especial trascendencia para deducir su posible origen y potencial de infección, lo que facilita la capacidad de predicción de los daños potenciales y el planteamiento de estrategias de control acordes a la sostenibilidad de las plantaciones y bosque nativo circundante.

Se estudian 36 aislados procedentes de focos de infección de la Comunidad Autónoma Vasca, definiéndose la patogeneidad, los grupos vegetativos de compatibilidad y morfotipos asociados mediante métodos moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

A) PATOGENEIDAD

Se llevan a cabo inoculaciones en invernadero ($T=20^{\circ}\text{C}$ y $\text{HR}=60\%$) sobre árboles de 3 años de *Pinus pinea*, especie citada como especialmente sensible al patógeno objeto de estudio (Swart et al. 1987).

Como fuente de inóculo se utiliza una superficie de alrededor de $0,8\text{ cm}^2$ de micelio de una semana de edad de cada uno de los aislados. Se realiza un corte en cada rama del árbol con tijeras de poda y se procede a cubrir el micelio con parafilm (Chou, 1976). Se realizan 4 repeticiones por aislado.

A los 15 días se mide la herida producida por el hongo en cada una de las ramas inoculadas.

B)GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA

Se obtienen cultivos monoespóricos de 36 aislados de *Diplodia pinea* Desm (Kickx)

Se enfrentan los 36 aislados, tomados de tres en tres, a partir de micelio de 7 días, en placas Petri pequeñas, utilizando como medio agar de avena . Se repite el ensayo tres veces. A partir del quinto día posterior a la siembra se observan los resultados obtenidos.

C)MÉTODOS MOLECULARES

Se prueban 11 parejas de cebadores para conocer cuál de ellas es la que amplifica los fragmentos SSR de *Diplodia pinea* con mayor eficiencia. (BURGUESS et al. 2000).

RESULTADOS

A)PATOGENEIDAD

Todos los aislados provocan necrosis de tejidos vasculares y adyacentes en las ramas inoculadas. Si bien se observan heridas de tamaños diversos, no se obtienen diferencias significativas en cuanto al tamaño de la herida dependiendo del aislado analizado.

B)GRUPOS DE COMPATIBILIDAD VEGETATIVA

Se observa compatibilidad vegetativa de cada uno de los aislados consigo mismo, tal y como cabía esperarse, compatibilidad caracterizada por la fusión de los micelios al crecer. De los 36 aislados testados, se observa un 2% de ellos compatibles entre sí y un 1% que presenta una compatibilidad no tan clara como en los casos anteriores y que se categoriza como compatibilidad intermedia. El resto de los aislados resulta ser incompatible, dando lugar a la formación de barreras de micelio negras que se producen como consecuencia de la muerte y degradación celular de los micelios inicialmente fusionados (LESLIE, J.F, 1993).

C)MÉTODOS MOLECULARES

De los cebadores utilizados los que resultan ser más eficientes en la amplificación de los fragmentos SSR son las tres parejas que a continuación se indican:TB23-TB24; TB37-TB38 y TB41-TB42.

CONCLUSIONES

-Se comprueba el poder patogénico de todos los aislados de *Diplodia pinea* estudiados sobre *Pinus pinea*. Se considera la necesidad de realizar este mismo ensayo con clones de pino para así eliminar la variabilidad genética del huésped y poder entrever con claridad el efecto que cada uno de los aislados ocasionaría en un mismo huésped.

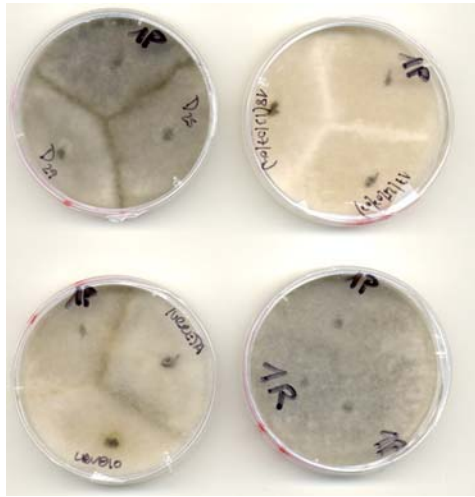
-En el País Vasco existe una gran diversidad de aislados de *Diplodia pinea*, tal y como cabía esperarse teniendo en cuenta el largo periodo que el patógeno lleva en nuestras plantaciones y la diversidad de orígenes de planta a la que se ha venido recurriendo en estos mismos años.



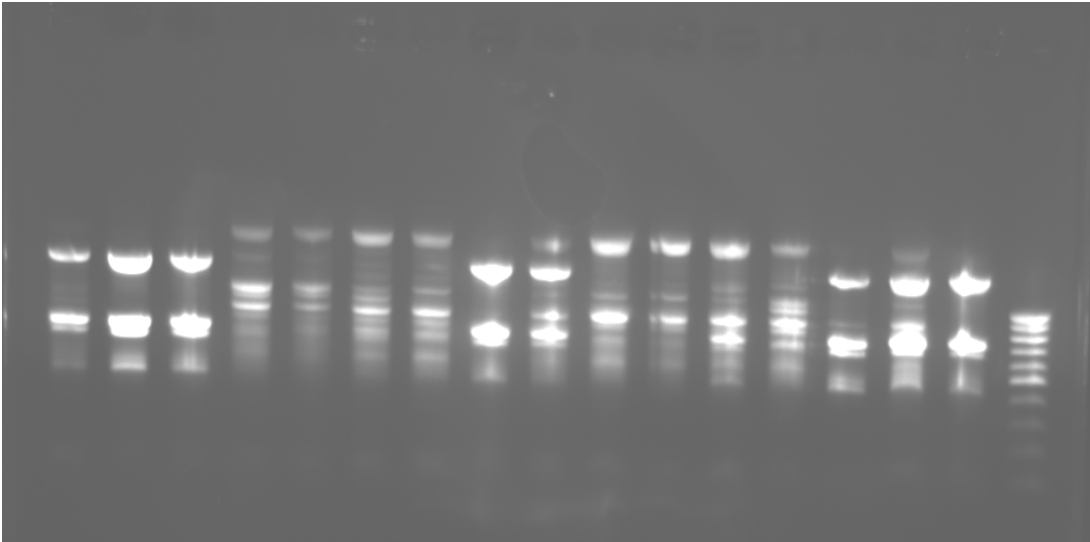
Fotografía 1: aspecto de los árboles inoculados.



Fotografía 2. Lesión ocasionada en ramilla de Pinus pinea tras la inoculación con Diplodia pinea



Fotografía 3: aspecto de los micelios de aislados enfrentados, de derecha a izquierda: fila superior, incompatibilidad en primeros días, posteriores días, fila inferior, compatibilidad total y compatibilidad intermedia para una de las parejas de aislados enfrentados(1P-Laudio)



Fotografía 4: resultados preliminares de los productos de la amplificación de las PCR sobre gel de agarosa al

BIBLIOGRAFÍA

BURGESS T., WINGFIELD B.D. AND WINGFIELD, M.J. 2001. "Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*". *Mycological Research*. 105 (11): 1331-1339 (November 2001)

BURGESS T., WINGFIELD M.J. AND WINGFIELD, B.W. 2000. "Simple Sequence Repeat Markers distinguish among Morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*". *Mycological Research*. 107 (5): 557-566.

CHOU, C.K.S. 1976. "A shoot dieback in *P. Radiata* caused by *Diplodia pinea* II. Inoculation studies". *New Zealand Journal of forestry science* vol 6 (3): 409-420.

DE WET, J.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D. & WINGFIELD, M.J. 2003. "Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*". Forest Research Institute, N.Z Forest Service.

SWART, W.J; WINGFIELD, M.J AND KNOX-DAVIES, P.S. 1987. "Selective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea*". *Applied and Environmental Microbiology*, Jan.2001, p. 354-362.