

Especies del género *Armillaria* identificadas en plantas leñosas ornamentales en Galicia

O. Aguín¹, P. Escofet¹, M.J. Sainz² y J.P. Mansilla¹

¹Estación Fitopatológica do Areeiro, Deputación de Pontevedra, Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra, España. oaguin@efa-dip.org

²Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España. mjsainz@efa-dip.org

Palabras clave: pudrición radicular, diagnóstico, técnicas moleculares

Resumen

Las especies patógenas del género *Armillaria* causan podredumbre blanca radicular en numerosas plantas leñosas. En este trabajo, se identificaron mediante métodos moleculares las especies de *Armillaria* que afectaban a una amplia variedad de leñosas ornamentales en Galicia (noroeste de España). El diagnóstico del hongo se realizó a partir de muestras de raíz y/o cuello de plantas sintomáticas mediante PCR/RFLP o de suelo situado alrededor de las raíces aplicando nested-PCR/RFLP. Las identificaciones de las especies de *Armillaria* se verificaron mediante secuenciación de fragmentos de ADN fúngico. Los resultados mostraron que la especie más frecuente causante de pudrición blanca radicular en ornamentales de Galicia es *A. mellea*, ya que se detectó en el 74% de las muestras de planta y en el 92% de las de suelo. En menor proporción, la podredumbre fue causada por *A. gallica*, que se identificó en un 23% de muestras de planta y un 6% de suelo. Se encontró también *A. ostoyae*, aunque solo en un 1,3% de las plantas y un 2% de muestras de suelo. Una única muestra de raíz estuvo afectada por *A. cepistipes*. *Armillaria mellea* se detectó en 46 especies ornamentales diferentes cultivadas en Galicia, lo que indica el alto carácter polífago de este patógeno.

INTRODUCCIÓN

En Europa, se han detectado siete especies del género *Armillaria*. *Armillaria mellea* y *A. ostoyae* son consideradas las especies más patógenas y causan la enfermedad conocida como podredumbre blanca radicular en un amplio rango de hospedadores, afectando principalmente a material vegetal leñoso (Guillaumin et al., 1993). Las otras cinco especies (*A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica*, *A. tabescens* y *A. ectypa*) se consideran saprófitos o parásitos de debilidad. Hasta hace pocos años, la identificación de especies *Armillaria* se realizaba mediante caracterización morfológica y análisis de compatibilidad de aislados en cultivo, métodos que duraban entre seis a ocho semanas y que a veces proporcionaban resultados ambiguos. Actualmente las técnicas basadas en el estudio del ADN permiten un diagnóstico rápido y fiable.

El objetivo de este trabajo fue detectar e identificar especies de *Armillaria* en una amplia variedad de especies leñosas de carácter ornamental, procedentes de diferentes zonas de Galicia (noroeste de España), mediante métodos moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material afectado por especies de *Armillaria* consistió en 77 muestras de raíz y/o cuello de plantas sintomáticas y 49 muestras de suelo situado alrededor de las raíces de plantas afectadas recogidas en las cuatro provincias gallegas. Se utilizaron muestras de suelo cuando no se dispuso de muestras de planta. En el caso de las muestras de raíz y/o cuello, 63 presentaron micelio y 14 rizomorfos. Las muestras procedieron de 54 especies de plantas leñosas de uso ornamental que mostraban síntomas de podredumbre blanca radicular causada por *Armillaria*. En la tabla 1 se presenta la especie hospedadora y el tipo de muestra (planta o suelo).

Para el diagnóstico de especies de *Armillaria*, en el caso de muestras vegetales con presencia de micelio y/o rizomorfos, se utilizó la técnica PCR-RFLP propuesta por Mansilla et al. (2000). El ADN ribosomal (ADNr) del hongo se extrajo mediante el kit comercial "EZNA fungal DNA miniprep" (Omega Biotek) y posteriormente se amplificó mediante PCR utilizando los primers LR12R y O-1 y las PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham). Para cada muestra analizada, se incluyó también un control positivo, un control de extracción y un control negativo de PCR. Los productos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El ADN fúngico amplificado a partir del material vegetal se cortó mediante las enzimas *Alu* I, *Nde* I y *Bsm* I. Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

En las muestras de suelo se llevó a cabo una nested-PCR/RFLP (Lochman et al., 2004; Escofet et al., 2006). Tras la extracción del ADN fúngico con el kit PowerSoil™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc.), se realizó una nested-PCR con los primers externos ITS1 e ITS4 y los internos AR1 y AR2. En la amplificación se usaron las PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads. Los productos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El ADN fúngico obtenido se cortó con las enzimas *Mbo* I y *Hinf* I. Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

La identificación de las especies de *Armillaria* se hizo mediante el análisis de los patrones de restricción obtenidos a partir de muestras de planta y suelo, y adicionalmente por secuenciación del ADN fúngico. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software Sequencing Analysis 5.1 y se compararon con las disponibles en el Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante la aplicación BLAST.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies de *Armillaria* más ampliamente distribuidas en Galicia son *A. mellea* y *A. gallica* (Aguín et al., 2004a). En este trabajo, la especie más frecuente causante de pudrición blanca radicular en ornamentales de Galicia fue *A. mellea*, que se identificó en el 74% de las muestras de raíz y/o cuello analizadas y en el 92% de las muestras de suelo (tabla 1). *A. gallica* se encontró en el 23% de muestras en planta y en tres muestras de suelo.

A. mellea se detectó en 46 especies ornamentales diferentes, lo que indica el alto carácter polífago de este basidiomiceto y confirma su amplia distribución en Galicia. *Armillaria gallica*, que está considerado como saprófito o patógeno de debilidad (Legrand and Guillaumin, 1993), se encontró en *Abies* sp., *Arbutus* sp., *Camellia* sp., *Cedrus deodara*, *Corylus* sp., *Cyathea cooperii*, *C. medullaris*, *Hydrangea* sp., *Hypericum* sp., *Pseudotsuga* sp. y *Salix babilonica*.

Se identificó también *A. ostoyae*, pero solo en una muestra de micelio obtenido en *Salix babilonica* y en una de suelo en torno a una planta de *Chamaecyparis pisifera*.

A. ostoyae es un patógeno que se detecta habitualmente causando podredumbre blanca radicular en coníferas (Aguín et al., 2004a), sin embargo en las coníferas ornamentales de Galicia la enfermedad estuvo causada mayoritariamente por *A. mellea*.

De las otras cuatro especies de *Armillaria* conocidas en Europa, únicamente se encontró *A. cepistipes* en una muestra de micelio localizado en raíces de *Euonymus* sp. Es la primera vez que se identifica esta especie en una leñosa ornamental en España. Hasta la fecha, *A. cepistipes* solo se había detectado en una sola muestra de vid en Galicia (Aguín et al., 2004b).

Aunque en la mayoría de las leñosas ornamentales se ha encontrado solamente *A. mellea*, hay que destacar que en *Abies* sp., *Camellia* sp., *Cyathea cooperii* e *Hydrangea* sp. se identificaron dos especies de *Armillaria*, *A. mellea* y *A. gallica*, y en *Salix babylonica* hasta tres (*A. mellea*, *A. gallica* y *A. ostoyae*). Tradicionalmente la podredumbre blanca radicular se ha atribuido siempre a *A. mellea* o a *A. ostoyae* (Guillaumin et al., 1993). Sin embargo, los resultados del presente trabajo indican la necesidad de realizar estudios para esclarecer si *A. gallica* es simplemente un saprófito o tiene un carácter patógeno relevante en ornamentales cultivadas en Galicia.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Xunta de Galicia (proyecto PGIDT02RF060301PR).

Referencias

- Aguín, O., Mansilla, J.P. and Sainz, M.J. 2004a. Intraspecific variation in *Armillaria* species from shrubs and trees in northwestern Spain. *Phytopathol. Mediterr.* 43: 299-304.
- Aguín, O., Sainz, M.J. and Mansilla, J.P. 2004b. *Armillaria* species infesting vineyards in northwestern Spain. *Eur. J. Plant Path.* 110: 683-687.
- Escofet, P.E., Aguín, O. y Mansilla, J.P. 2006. Detección e identificación por técnicas moleculares de especies del género *Armillaria* a partir de muestras de suelo. *Bol. San. Veg. Plagas* 32: 231-240.
- Guillaumin, J.J., Mohammed, C., Anselmi, N., Courtecuisse, R., Gregory, S.C., Holdenrieder, O., Intini, M., Lung, B., Maxmüller, H., Morrison, D., Risbeth, J., Termorshuizen, A.J., Tirrón, A. and Van Dam, B. 1993. Geographical distribution and ecology of the *Armillaria* species in western Europe. *Eur. J. For. Path.* 23: 321-341.
- Legrand, P. and Guillaumin, J.J. 1993. *Armillaria* species in the forest ecosystems of the Auvergne (Central France). *Acta Oecol.* 14: 389-403.
- Lochman, J., Sery, O. and Mikes, V. 2004. The rapid identification of european *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 105-110.
- Mansilla, J.P., Aguín, O., Abelleira, A. y Sainz, M.J. 2000. Adaptación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especies de *Armillaria* en Galicia. *Bol. San. Veg. Plagas* 26: 79-88.

Tabla 1. Especies de *Armillaria* identificadas a partir de ADN extraído de micelio o rizomorfos en planta o suelo. Se indica entre paréntesis el número de muestras analizadas.

HOSPEDADOR	PLANTA		SUELO
	MICELIO	RIZOMORFOS	
<i>Abies</i> sp.	<i>A. gallica</i> (1) ¹	<i>A. gallica</i> (1)	<i>A. mellea</i> (1)
<i>Acacia</i> sp.			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Acer</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)		
<i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>A. mellea</i> (3)		<i>A. mellea</i> (2)
<i>Alnus</i> sp.		<i>A. mellea</i> (2)	
<i>Aralia</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)		
<i>Arbutus</i> sp.	<i>A. gallica</i> (1)		
<i>Aucuba</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)		
<i>Betula celtiberica</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Buxus</i> sp.			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Callistemon</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)		
<i>Callitris</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)		
<i>Camellia</i> sp.	<i>A. mellea</i> (10), <i>A. gallica</i> (3)	<i>A. mellea</i> (1), <i>A. gallica</i> (1)	<i>A. mellea</i> (5)
<i>Cedrus deodara</i>			<i>A. mellea</i> (1), <i>A. gallica</i> (1)
<i>Cedrus libani</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Cedrus</i> sp.	<i>A. mellea</i> (2)		<i>A. mellea</i> (3)
<i>Chamaecyparis pisifera</i>			<i>A. ostoyae</i> (1)
<i>Chamaecyparis squarrosa</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Corylus</i> sp.	<i>A. gallica</i> (1)	<i>A. gallica</i> (1)	
<i>Cupressocyparis leylandii</i>			<i>A. mellea</i> (3)
<i>Cupressus sempervirens</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Cupressus</i> sp.	<i>A. mellea</i> (2)		
<i>Cyathea cooperii</i>	<i>A. mellea</i> (1)	<i>A. gallica</i> (3)	<i>A. gallica</i> (1)
<i>Cyathea medullaris</i>			<i>A. gallica</i> (1)
<i>Cyathea</i> sp.			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Cyathea tomentosisima</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Escallonia</i> sp.	<i>A. mellea</i> (2)		
<i>Euonymus</i> sp.	<i>A. cepistipes</i> (1)		
<i>Ginkgo biloba</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Hydrangea</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1), <i>A. gallica</i> (1)	<i>A. gallica</i> (1)	
<i>Hypericum</i> sp.	<i>A. gallica</i> (1)		
<i>Ilex aquifolium</i>	<i>A. mellea</i> (1)		<i>A. mellea</i> (1)
<i>Juglans</i> sp.	<i>A. mellea</i> (2)		
<i>Laurus nobilis</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Liquidambar</i> sp.			<i>A. mellea</i> (1)

Tabla 1: continuación

<i>Liriodendron</i> sp.	<i>A. mellea</i> (2)		
<i>Magnolia</i> sp.	<i>A. mellea</i> (5)		<i>A. mellea</i> (2)
<i>Melaleuca</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)		
<i>Platanus hispanica</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Populus alba</i>			<i>A. mellea</i> (2)
<i>Prunus</i> sp.			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Pseudotsuga</i> sp.	<i>A. gallica</i> (1)	<i>A. gallica</i> (1)	
<i>Quercus suber</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Rhododendron</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)	<i>A. mellea</i> (1)	<i>A. mellea</i> (1)
<i>Robinia</i> sp.			<i>A. mellea</i> (5)
<i>Rosa</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)		
<i>Salix babylonica</i>	<i>A. mellea</i> (2), <i>A. gallica</i> (1), <i>A. ostoyae</i> (1)		<i>A. mellea</i> (1)
<i>Spiraea</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)	<i>A. mellea</i> (1)	
<i>Taxus baccata</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Telopea</i> sp.	<i>A. mellea</i> (1)		
<i>Thuja</i> sp.	<i>A. mellea</i> (5)		<i>A. mellea</i> (2)
<i>Tibouchina urvilleana</i>	<i>A. mellea</i> (2)	<i>A. mellea</i> (1)	
<i>Tsuga canadensis</i>			<i>A. mellea</i> (1)
<i>Wisteria sinensis</i>	<i>A. mellea</i> (1)		



O. Aguiñ, P. Escofet, M.J. Sainz y J.P. Mansilla

Micelio de *Armillaria mellea* en *Camellia*



O. Aguiñ, P. Escofet, M.J. Sainz y J.P. Mansilla

Rizomorfos y micelio en cultivo de *A. ostoyae*



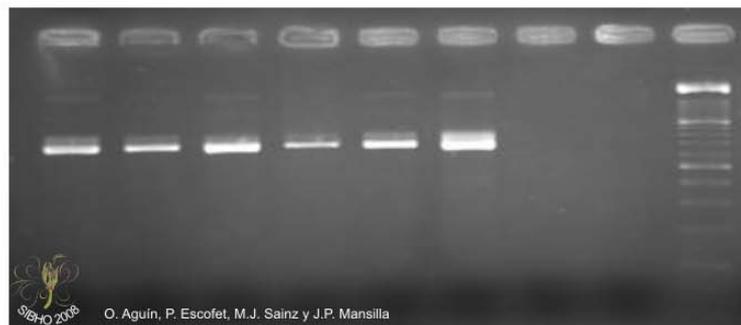
O. Aguiñ, P. Escofet, M.J. Sainz y J.P. Mansilla

.Extracción de ADN a partir de una muestra de suelo



O. Aguiñ, P. Escofet, M.J. Sainz y J.P. Mansilla

Amplificación del ADN en el termociclador



O. Aguiñ, P. Escofet, M.J. Sainz y J.P. Mansilla

Gel de agarosa mostrando el ADN amplificado de A nested-PCR

Especies del género Armillaria identificadas en plantas leñosas ornamentales en Galicia
O. Aguiñ, P. Escofet, M.J. Sainz y J.P. Mansilla