

IDENTIFICACIÓN DE *PHYTOPHTHORA PSEUDOSYRINGAE* EN PLANTAS DE CASTAÑO

¹ Pintos, C., ¹ Aguín, O., ^{1,2} Mansilla, J.P., ¹ Montenegro, D., ¹ Rial, C.

¹ Estación Fitopatológica do Areeiro, Subida a la robleda s/n, 36153 Pontevedra, España

² Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo, España

RESUMEN

En el presente trabajo se identifica morfológica, fisiológica y molecularmente, por primera vez sobre castaño, *Phytophthora pseudosyringae* T. Jung & Delatour.

PALABRAS-CLAVE

Phytophthora nemorosa, *P. kernoviae*, ITS-RFLP, ADN mitocondrial

1. INTRODUCCIÓN

En noviembre de 2006 se reciben en el laboratorio de la Estación Fitopatológica do Areeiro muestras de plántulas de castaño, a raíz desnuda, procedentes de un vivero. Las plantas presentaban, a lo largo del tallo, zonas necróticas de color negro violáceo, ligeramente deprimidas que, en algunos casos, confluían dando lugar a una necrosis más extensa. Levantando la corteza en estas zonas se apreciaba el tejido afectado. Algunas yemas estaban secas. Las raíces presentaban buen aspecto aunque se observaban pequeñas necrosis en alguna de ellas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento y caracterización morfológica

Fragmentos de las zonas necrosadas observadas en la base del tallo y porciones de raíces fueron sembrados en medio CMA y V8 agar suplementado con: pimaricina 5 mg/l, rifampicina 25 mg/l, hymexazol 5mg/l y benomilo 10 mg/l. Las placas se incubaron en estufa en oscuridad a 22 °C durante cinco días, transcurridos los cuales se observaba un crecimiento micelial típico de *Phytophthora* sp. El micelio era nuevamente repicado a medio PDA y V8 agar (16 g de agar, 3 g CaCO₃, 200 ml de zumo de vegetales y 800 ml de agua destilada) para estudiar las características culturales del mismo.

Las temperaturas cardinales mínimas, óptimas y máximas de crecimiento, así como, el crecimiento radial diario al óptimo de temperatura fueron establecidos incubando los aislados durante 24 horas a 24 °C y transfiriéndolos, transcurrido ese tiempo, a 2, 5, 10, 15, 18, 20, 22, 25, y 28 °C determinándose el crecimiento radial en 24 horas a cada una de las temperaturas.

La caracterización morfológica del aislado se basó en tres premisas: tipo de micelio, forma, tamaño y desarrollo de los esporangios y producción y tipo de órganos sexuales.

Las características miceliales y la presencia y tipo de *hiphal swelling* eran estudiadas en CMA, V8 y PDA crecido durante siete días en oscuridad a 20 °C.

El tamaño de los esporangios y su ratio fue estudiado sumergiendo discos cortados de micelio, procedentes del borde de la colonia, en extractos filtrados de suelo no estéril e incubándolos a 18 °C bajo luz día. Transcurridas 48 horas se realizan las medidas de 50 esporangios maduros y se estudian sus características.

Cincuenta oogonios, anteridios y oosporas se observaban y medían partiendo de cultivos en V8 crecidos a 20 °C en oscuridad durante 21 días.

Caracterización molecular

Los análisis moleculares se realizaron a partir de micelio aislado en el medio de cultivo V8 sobre celofán. Para la extracción del ADN genómico se utilizó el EZNA Fungal DNA Miniprep kit

(Omega Biotek), siguiendo las instrucciones del fabricante sin añadir RNasa ni mercaptoetanol. En un tubo Eppendorf estéril, se pesaron entre 10-40 mg de la muestra fúngica correspondiente y se centrifugaron sucesivamente con los diferentes tampones del kit. El ADN se diluyó en 100 μ L de agua ultrapura estéril. El ADN fúngico se conservó a -20°C hasta su uso. La amplificación del ADN extraído se llevó a cabo mediante dos procedimientos:

- Amplificación de la región ITS del ADN ribosomal según el protocolo descrito por Cooke *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Con el ADN extraído se hizo una Nested-PCR; una PCR con la pareja de primers ITS4/DC6 y otra con los primers universales ITS4/ITS6. Los primers DC6 e ITS4, amplifican las regiones ITS1, ITS2 y el gen 5,8S y son específicos para los órdenes *Peronosporales* y *Pythiales*, al que pertenece el género *Phytophthora* (Bonants *et al.*, 1997). Para la reacción de amplificación se utilizaron las PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads. La reacción con los primers DC6/ITS4 se realizó con 1 μ L de DNA, 0,3 μ L de primer ITS4 (10 μ M), y 0,3 μ L de primer DC6 (10 μ M) en un volumen de 25 μ L. En el caso de la PCR con los primers ITS4/ITS6 a cada tubo se añadió 1 μ L de DNA, 0,3 μ L de primer ITS4 (10 μ M), 0,3 μ L de primer ITS6 (10 μ M) y agua hasta completar un volumen de 25 μ L. La reacción de amplificación se llevó a cabo siguiendo un programa de 94°C 3 minutos, 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto, seguidos de una extensión final a 72°C durante 10 minutos. En cada experimento de amplificación se incluyó un control negativo (ausencia de ADN) y un control positivo que consistió en un aislado de *Phytophthora* sp.

Una alícuota del producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, 0,5 X TBE, 120 V durante aproximadamente 1 hora. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. El tamaño del producto de PCR obtenido se estimó comparándolo con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb).

Para el análisis RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción), 7 μ L del producto de PCR se digirieron con 0,7 μ L (10 U/ μ L) de las endonucleasas de restricción *AluI*, *MspI* y *TaqI* durante al menos una hora a la temperatura indicada por el fabricante. El producto de la digestión se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, 0,5 X TBE, 100 V. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó comparándolos con un marcador de peso molecular de 100 pb y se analizaron empleando el programa 1D-manager (TDI, Madrid).

Los patrones de restricción obtenidos se compararon con los propuestos por Cooke y Smith (2000) mediante aplicación telemática (www.phytid.org-CAB Bioscience).

La región ITS de *Phytophthora* se secuenció utilizando los primers ITS4 e ITS6. El producto de PCR de 900 pb obtenido con estos primers, según se describió en el apartado anterior, se purificó utilizando las columnas High Pure PCR Product Purification. Una alícuota del producto de PCR purificado se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, 0,5 X TBE, 120 V durante aproximadamente 1 hora. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. La concentración de la muestra se estimó visualmente comparándola con un marcador de peso molecular de 100 pb.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el Big Dye terminator V3.1 Cycle sequencing (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez finalizada la reacción las muestras se precipitaron y se desnaturalizaron según las instrucciones del Kit y se corrieron en un secuenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Sequencing Analysis 5.1 (AP Biotech) y se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la aplicación Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997).

- Amplificación de regiones mitocondriales derivadas del gen *coxII* y *coxI* mediante Nested-PCR utilizando las parejas de primers FMPPh-8b/FMPPh-10b y FMPps-1/FMPps-2 según el protocolo descrito por Martin *et al.* (2004).

Pruebas de patogenicidad

Para la inoculación se utilizan hojas jóvenes de castaño. Las hojas, unas con la punta cortada y otras enteras, eran sumergidas en una suspensión de zoosporas durante diez segundos e incubadas, durante cinco días, en cámara húmeda a 18°C , transcurrido ese

periodo se determinaba la presencia y extensión de las manchas obtenidas y se procedía al reaislamiento del patógeno en los medios adecuados.

En el momento actual se están realizando inoculaciones de brotes y del sistema radicular.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y caracterización morfológica de los aislados

De los fragmentos sembrados, procedentes del tallo, se obtiene una colonia cuyo crecimiento es de tipo estelado en V8 agar, algodonoso sin modelo definido de crecimiento en PDA y sumergido estelado-rosáceo en CMA. Las hifas primarias sin ramificar, en V8 agar, presentan, a los diez días, un diámetro de entre 4 y 8.5 μm . También se aprecian hifas irregulares y coraloides. No se observan clamidosporas.

Las *hyphal swellings* son muy características, desarrollándose esféricas en cadena y con abundantes hifas irradiantes digitiformes, siendo mucho más abundantes en agua o en medio CMA.

El óptimo de crecimiento se produce a 20 °C con un crecimiento radial diario medio, en V8 agar, de 4.4 mm/día y muy lento en PDA. La temperatura mínima de crecimiento se encuentra en torno a 4 °C y la máxima a 25 °C no apreciándose crecimiento a 28 °C.

Esporangios: Los esporangios son semipapilados, algunos bipapilados, limoniformes, elipsoides u ovoides, algunos con formas distorsionadas, nacen terminales en esporangioforos sin ramificar o más comúnmente en simpodios más o menos laxos. Se aprecian fundamentalmente en agua aunque se observaron algunos en medio sólido. Su tamaño oscila entre 37-63 X 25-38 μm con una ratio media longitud/ anchura de 1,55 μm . Las zoosporas se descargan a través de un poro cuyo ancho medio es de 7,5 μm . Algunos esporangios germinan directamente, sobre todo en cultivos viejos. Aparecen esporangios caducos en una pequeña proporción con pedicelos de longitud variable.

Oogonios: Se observan rápidamente en cultivo son esféricos terminales con un diámetro medio de 29,5 μm . Las oosporas son pleróticas y se vuelven de color amarillento con el paso del tiempo. Se aprecian oosporas abortadas.

Anteridios: los anteridios son paraginos aunque se observa alguno anfigino.

De las raíces sembradas no se obtuvo este crecimiento

Caracterización molecular

- Amplificación de la región ITS del ADN ribosomal

Los primers ITS4 y DC6 amplificaron una única banda de 1300 pb que concuerda con el tamaño esperado para *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000). Con los primers universales ITS4 e ITS6 se obtuvo un fragmento con un tamaño aproximado de 900 pb que está dentro del rango de tamaño esperado para la región ITS del género *Phytophthora* (Cooke *et al.*, 2000). En ningún caso se observó amplificación en el control negativo.

La digestión del fragmento de ADN de 900 pb, resultante de la amplificación de la región ITS con las endonucleasas *AluI*, *MspI* y *TaqI* presentó tres patrones de restricción diferentes. Al comparar el tamaño de los fragmentos con la aplicación telemática ("species identification"-www.phytid.org-CAB Bioscience) no se obtuvo homología significativa con ninguna de las especies descritas en la aplicación (hay que indicar que los RFLPs de *P. pseudosyringae* no se encuentran en dicha página). La secuencia obtenida se analizó utilizando la aplicación BLAST del NCBI mostrando una homología del 99-100% con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI para *Phytophthora pseudosyringae*

- Amplificación de regiones mitocondriales derivadas del gen *coxII* y *coxI*

Los primers FMPH-8b y FMPH-10b amplificaron un fragmento de aproximadamente 457 pb y en la segunda reacción de PCR con la pareja FMPps-1 y FMPps-2 se obtuvo una banda de ADN de 160 pb, tamaño esperado para *P. pseudosyringae* (Martin *et al.*, 2004).

Pruebas de patogenicidad

A los tres días de la inoculación se observan manchas difusas que miden desde 2-3 mm hasta 1 cm y que terminan por confluir. Se aprecia una necrosis del peciolo de la hoja que a los cinco días alcanza una longitud entre 1 y 2 cm y que en algunos casos se transmite por el nervio central hasta la parte superior de la hoja. En otras solo se observan manchas difusas. No se aprecian diferencias en los daños entre las hojas cortadas y las que no lo están solo que en las hojas cortadas se aprecia una entrada por toda la zona de corte. Se siembran en medio V8, a los cinco días de la inoculación, reaislándose el patógeno en todas ellas.

Todavía no existen datos de las inoculaciones de brotes y de raíz.

La combinación de las características morfológicas, fisiológicas y moleculares, expuestas anteriormente, nos permite concluir que el aislado procedente de las necrosis presentes a lo largo del tallo del castaño se corresponde con *Phytophthora pseudosyringae* (Jung *et al.*, 2003). *P. pseudosyringae* ha sido recientemente aislada en especies forestales junto con *P. ramorum* (Werres *et al.*, 2001), *P. kernoviae* (Brasier *et al.*, 2005) y *P. nemorosa* (Hansen *et al.*, 2003). En Europa, *P. pseudosyringae*, fue primeramente descrita en suelos forestales donde crecían diferentes especies de *Quercus*, así mismo, también se aisló en las raíces necróticas y en la base del tallo de *Fagus sylvatica* y *Alnus glutinosa* identificándose, hasta la fecha, en Italia, Francia y Alemania. En USA se aisló en *Umbellularia californica* y *Quercus agrifolia* (EPPO Report 2005/162).

Desde nuestro conocimiento se trataría de la primera identificación de esta especie de *Phytophthora* causando los síntomas descritos en castaño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Bonants, P.J.M., Hagenaar-de Weerd, M., Gent-Pelzer, M.P.E., Lacourt, I., Cooke, D.E.L., Duncan, J.M., 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant pathology* 103: 345-355.
- Brasier, C.M., Beales, P.A., Kirk, S.A., Denman, S., Rose, J., 2005. *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in Britain. *Mycological Research* 109(8): 853-859.
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M., 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17-32.
- Cooke, D.E.L., Smith, J.J., 2000. An online resource for the molecular identification of *Phytophthora* species. Disponible en <http://www.phytid.org> (último acceso el 27 Febrero 2007).
- EPPO report, 2005/162 No 10. <http://archives.eppo.org/EPPORreporting/ReportingArchives.htm>.
- Hansen, E.M., Reeser, P., Davidson, J.N., Garbelotto, M., Ivors, K., Douhan, L., Rizzo, D.M., 2003. *Phytophthora nemorosa*, a new species causing cankers and leaf blight of forest trees in California and Oregon, USA. *Mycotaxon* 88: 129-138.
- Jung, T., Nechwatal, J., Cooke, D.E.L., Hartmann, G., Blaschke, M., Osswald, W.F., Duncan, J.M., Delatour, C., 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research* 107(7): 772-789.
- Martin, F.N., Tooley, P., Blomquist, C., 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of Sudden Oak Death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94: 621-631
- Werres, S., Marwitz, R., Man In't Veld, W.A., De Cock, A.W.A.M., Bonants, P.J.M., De Weerd, M., Themann, K., Ilieva, E., Baayen, R.P., 2001. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research* 105(10): 1155-1165.