

Detección e identificación por técnicas moleculares de especies del género *Armillaria* a partir de muestras de suelo

P. E. ESCOFET CRESPO, O. AGUÍN CASAL, J. P. MANSILLA VÁZQUEZ

En este trabajo se presentan los resultados de identificación de especies de *Armillaria* realizada directamente a partir de muestras de suelo, sin la necesidad de aislar y cultivar previamente el micelio en placa. El ADN se extrajo a partir de 250 mg de suelo y la región ITS del hongo se amplificó por nested PCR con los cebadores externos ITS1 e ITS4 y los internos AR1 y AR2. Los productos resultantes de la doble amplificación se analizaron por RFLP utilizando para la digestión las enzimas de restricción *Hinf*I y *Mbo* I. Este método permite discriminar entre especies de *Armillaria* mediante diferentes patrones de bandas característicos de cada especie. El 70% de las muestras analizadas se identificaron como *A. mellea*, el 16% como *A. gallica* y el 14% de las muestras no presentaron infección por *Armillaria*.

P. E. ESCOFET CRESPO, O. AGUÍN CASAL, J. P. MANSILLA VÁZQUEZ. Excmo. Diputación Provincial de Pontevedra. Servicio Agrario. Estación Fitopatológica do Arceiro, Subida a la Robleada, s/n: 36153 Pontevedra-España. E-mail: efa@efa-dip.org

Palabras clave: *Armillaria mellea*, *Armillaria gallica*, nested-PCR, RFLP, suelo.

INTRODUCCIÓN

El género *Armillaria* (Fr.:Fr.) Staudé incluye más de 40 especies que se distribuyen extensamente por todo el mundo. En Europa se han identificado: *A. borealis* Marxmüller & Korhonen, *A. cepistipes* Velenovsky, *A. gallica* Marxmüller & Romagnesi (= *A. bulbosa* (Barla) Kile & Watling), *A. mellea* (Vahl: Fries) Kummer, *A. ostoyae* (Romagnesi) Herink (= *Armillaria obscura* (Schaeff.) Herink), *A. tabescens* (Scop.) Emel (MARXMÜLLER, 1982, 1987; ROMAGNESI y MARXMÜLLER, 1983; TERMORSHUIZEN y ARNOLDS, 1987) y una especie de poco interés patológico denominada inicialmente *Agaricus ectypus* y posteriormente *Armillaria ectypa* (Fries) Lamoure (LAMOURE, 1965). *A. mellea* y *A. ostoyae* son altamente patógenas para plantas leñosas, causando una enfermedad conocida como podredum-

bre blanca radicular, que ocasiona grandes pérdidas económicas. *A. mellea* invade las raíces y cuello de numerosas especies silvestres y/o cultivadas, sobre todo vid, árboles frutales y forestales, mientras que *A. ostoyae* causa daños importantes en coníferas (AGUÍN *et al.*, 2004a; AGUÍN *et al.*, 2004b). Las plantas afectadas muestran inicialmente clorosis, decaimiento de la parte aérea y caída de hojas, llegando en los casos más graves a la muerte (GUILLAUMIN, 1986). *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica* y *A. tabescens* son patógenos débiles, pero pueden causar enfermedad en árboles debilitados (SICOLI *et al.*, 2002). La mayoría de las especies de *Armillaria* se propagan por crecimiento vegetativo subterráneo y se extienden por el sistema radicular de árboles susceptibles (KILE *et al.*, 1991).

Hasta hace pocos años la identificación de especies de *Armillaria* se llevaba a cabo



Figura 1. Micelio característico del género *Armillaria* en pino.

mediante procedimientos complejos y lentos. En la década de 1990, se desarrollaron métodos moleculares (ANDERSON y STASOVSKI, 1992; HARRINGTON y WINGFIELD, 1995), basados en la amplificación del ADN a partir de diferentes estructuras fúngicas: micelio situado en la planta (Figura 1), basidiocarpos (Figura 2), rizomorfos, o micelio en cultivo, y la obtención de patrones de restricción, que están siendo utilizados de manera rutinaria en los laboratorios de diagnóstico (PÉREZ-SIERRA *et al.*, 1999; MANSILLA *et al.*, 2000; AGUÍN *et al.*, 2004b). La detección de *Armillaria* en campo no se produce hasta que aparecen plantas sintomáticas de podredumbre blanca radicular, pero en ese momento el hongo puede estar ya muy extendido en el suelo, creando múltiples focos de infección. Esto es debido a que el desarrollo y persistencia de *Armillaria* en el suelo se ve favorecido por su carácter saprófito y su capacidad para formar rizomorfos subterráneos, que pueden alcanzar gran profundidad (Fox, 2003). Actualmente no hay ningún método eficaz que controle *Armillaria* cuando aparecen plantas enfermas, aunque estudios recientes *in vitro* y en viñedo y plantaciones de almendro (sobre patrones de melocotonero) han mostrado resultados prometedores de ciertos azoles (ciproconazol y propiconazol) para el control de *A. mellea* (ADASKAVEG *et al.*, 1999; AGUÍN *et al.*, 2006). La prevención y control de la podre-

dumbre causada por *Armillaria* podrían verse facilitados si el hongo pudiese ser detectado en suelo antes de la aparición de plantas enfermas. Recientemente LOCHMAN *et al.* (2004) han descrito dos cebadores específicos, AR1 y AR2, basados en secuencias conservadas de la región ITS del ADN_r, utilizándolos con éxito para la identificación de las especies europeas de *Armillaria* (excepto *A. ectypa*) a partir de muestras de suelo.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método rutinario de diagnóstico para la detección e identificación de especies de *Armillaria* en suelos gallegos, utilizando los cebadores descritos por LOCHMAN *et al.* (2004) para la amplificación del ADN fúngico.

MATERIAL Y MÉTODOS

La detección y amplificación del ADN fúngico de *Armillaria* en suelos infestados se ha basado en el protocolo propuesto por LOCHMAN *et al.* (2004) con modificaciones en las diferentes etapas del proceso que se detallan a continuación: así para la obtención del ADN se ha variado el kit de extracción; en la etapa de amplificación se han utilizado las "PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads" (Amersham-Pharmacia) y para analizar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) se llevaron a cabo electroforesis en gel de agarosa.



Figura 2. Cuerpos de fructificación de *Armillaria mellea* sobre castaño.

Cuadro 1. Código, procedencia y cultivo de todas las muestras de suelo utilizadas.

CODIGO MUESTRA	PROCEDENCIA	CULTIVO
664	Vigo	Castaño
726	Cambados	Magnolio
744	Pontevedra	Magnolio
719	Estrada	Olmo
771	Sotomayor	Boj
772	Sotomayor	Tejo
773	Sotomayor	Cedro
774	Sotomayor	Roble
775	Sotomayor	Pseudotsuga
776	Sotomayor	Camelia
777	Sotomayor	Azalea
825	Sotomayor	Olivo
826	Sotomayor	Olivo
827	Sotomayor	Olivo
828	Sotomayor	Olivo
876	Bayona	Abeto
877	Bayona	Peral
881	Marín	Seto
884	Estrada	Acacia
885	Estrada	Roble
886	Villagarcía	Castaño
895	Vilaboa	Roble
905	Pontevedra	Camelia
906	Pontevedra	Camelia

Recogida de muestras de suelo

Se tomaron muestras de suelo (aproximadamente 1 Kg) en la proximidad de las raíces (entre 10-30 cm de profundidad en el terreno) de 24 especies ornamentales, frutales y forestales que mostraban clorosis, decaimiento y caída de hojas, y se consideraba que podrían estar afectadas por podredumbre blanca radicular causada por *Armillaria*. Todas las muestras se recogieron en localidades de la provincia de Pontevedra. En el Cuadro 1, se indica la localidad y la especie vegetal afectada. En el laboratorio, se procedió a una inspección visual del suelo, que permitió detectar la presencia de micelio y/o rizomorfos en seis muestras. Posteriormente todas las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Extracción de ADN

Para cada muestra de suelo, la extracción de ADN de *Armillaria* se llevó a cabo en dos submuestras de 250 mg siguiendo el protocolo del kit comercial "PowerSoil™ DNA Isolation" (MO BIO Laboratories, Inc.). Cada submuestra se introdujo en un tubo *PowerBead* del kit para romper las células fúngicas. La lisis celular se consigue mediante métodos mecánicos y químicos. Tras sucesivas centrifugaciones con diferentes reactivos del kit, el ADN genómico total se capturó en la membrana del filtro de una columna de centrifugación, posteriormente se lavó y se recuperó con el eluyente, conservándose a -20 °C hasta su amplificación.

La extracción de ADN con el kit "PowerSoil™ DNA Isolation" se llevó a cabo también en muestras de control positivo, que consistieron en 250 mg de suelo esterilizado a los que se añadieron 30-40 mg de micelio de cultivos puros de *A. gallica*, *A. mellea* ó *A. ostoyae*, muestras de control negativo en las que al suelo se añadió micelio de *Rosellinia necatrix* Prill, y muestras de control de extracción que sólo contenían suelo esterilizado. Se eligió *R. necatrix* por la similitud de su micelio y de la podredumbre radicular que causa en numerosas especies leñosas respecto a *Armillaria*. Todos los cultivos fúngicos se mantenían en medio agar-malta en la colección de la Estación Fitopatológica Do Areeiro (EFA). El suelo, para la realización de los controles, procedió de la finca de la EFA y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 30 minutos dos días consecutivos.

Amplificación de la región ITS mediante nested-PCR

Se llevó a cabo la amplificación del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN obtenido a partir de las muestras de suelo mediante nested-PCR. Para la primera PCR, se probaron dos procedimientos diferentes aunque con los mismos cebadores, ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). La secuencia de los cebadores se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS de *Armillaria*

CEBADOR	SECUENCIA (5' → 3')	TAMAÑO (nº de bases)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGC'GG	19
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20
AR1	CTGACCTGTTAAAGGGTATGTGC	23
AR2	AAGCTGAATCCTTCTACAAAGTCAA	25

En el primer procedimiento, se introdujo en un tubo Eppendorf 1 μ l del ADN aislado, 0,3 μ l de cada cebador (10 μ M) y una bolita "PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads" (Amersham-Pharmacia), completando con agua pura hasta un volumen final de 25 μ l.

En el segundo procedimiento, se siguió el protocolo descrito por LOCHMAN *et al.* (2004). La mezcla de PCR consistió en 1 μ l del ADN aislado, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 20 nM de cada cebador, 1,5 U de Taq DNA polymerase (Bioline), y agua pura hasta un volumen final de 25 μ l.

En ambos procedimientos, la amplificación se realizó en un termociclador "PCR Express" (Thermo Hybaid) programado con las condiciones propuestas por LOCHMAN *et al.* (2004): desnaturalización inicial a 94 °C durante 150 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento de los cebadores a 55 °C durante 40 segundos, elongación a 72 °C durante 30 segundos, y una elongación final a 72 °C durante 5 minutos.

En la segunda PCR, se probaron los dos procedimientos utilizados para la primera pero ambos con los cebadores AR1 y AR2 propuestos por LOCHMAN *et al.* (2004). La secuencia de los cebadores se presenta en el Cuadro 2.

Para esta segunda reacción, el primer procedimiento se varió ligeramente: se utilizaron 2 μ l del producto de la primera amplificación, 0,5 μ M de cada cebador y una bolita "PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads" (PCR beads), completando con agua hasta un volumen final de 50 μ l. El segundo procedimiento se llevó a cabo de forma análoga a la primera reacción, solo que utilizando

también 2 μ l del producto de la primera amplificación y cambiando el volumen final a 50 μ l. Para la amplificación, el termociclador se programó con los mismos parámetros que en la primera PCR, con excepción del anillamiento de cebadores que se realizó a 60 °C y la elongación final a 7 minutos.

Los productos de la primera y segunda PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se cargaron 5 μ l del producto amplificado de cada muestra con 2 μ l de tampón de carga (4 g/ml de sacarosa y 0,25 g/ml de azul de bromofenol) en un gel de agarosa al 2 % (p/v) sumergido en tampón 0,5x TBE (Tris-HCl 0,89 M, ácido bórico 0,89 M y EDTA 0,02 M, pH 8,4). En cada prueba se utilizó un control negativo y un marcador de 100 pares de bases (pb) hasta 2642 pb (MXIV, Roche Diagnostics). La electroforesis se realizó a 120 voltios durante 50 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se observaron con un transiluminador de luz ultravioleta.

RFLP

Siguiendo el método de LOCHMAN *et al.* (2004), los productos no purificados de la segunda amplificación fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Hinf* I y *Mbo* I (Fermentas®) para analizar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. Las mezclas de restricción se prepararon con 20 μ l de cada producto amplificado y 4 unidades de la enzima *Mbo* I u 8 unidades de la enzima *Hinf* I, y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Se llevó a cabo la electroforesis en un gel de agarosa al 3 % a 100 voltios durante 80 minutos. Para la estimación del tamaño de las bandas, se cargó en el gel un marcador

Cuadro 3. Tamaño de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores ITS1/ITS4 y AR1/AR2, en los cuatro controles y en cada una de las muestras de suelo.

CÓDIGO MUESTRA	TAMAÑOS DE AMPLIFICACIÓN (pb)		RESULTADO
	ITS1/ITS4	AR1/AR2	
Control positivo 1	882	724	<i>A. mellea</i>
Control positivo 2	868	711	<i>A. gallica</i>
Control positivo 3	870	713	<i>A. ostoyae</i>
Control negativo 1	-	-	<i>Rosellinia necatrix</i>
664	882	724	<i>A. mellea</i>
726	882	724	<i>A. mellea</i>
744	882	724	<i>A. mellea</i>
719	-	-	negativo
771	882	724	<i>A. mellea</i>
772	882	724	<i>A. mellea</i>
773	882	724	<i>A. mellea</i>
774	882	724	<i>A. mellea</i>
775	882	724	<i>A. mellea</i>
776	-	-	negativo
777	882	724	<i>A. mellea</i>
825	868	711	<i>A. gallica</i>
826	882	724	<i>A. mellea</i>
827	882	724	<i>A. mellea</i>
828	-	-	negativo
876	882	724	<i>A. mellea</i>
877	-	-	negativo
881	882	724	<i>A. mellea</i>
884	882	724	<i>A. mellea</i>
885	882	724	<i>A. mellea</i>
886	-	-	negativo
895	868	711	<i>A. gallica</i>
905	882	724	<i>A. mellea</i>
906	882	724	<i>A. mellea</i>

Cuadro 4. Tamaño de las amplificaciones con los cebadores de ITS y AR y tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hinf* I y *Mbo* I, en el trabajo de Lochman *et al.* (2004).

MUESTRA	TAMAÑO AMPLIFICACIONES	FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (pb)	
	(pb) ITS/AR	<i>Hinf</i> I	<i>Mbo</i> I
<i>A. mellea</i>	882/724	401, 159, 148	235, 215, 149, 125
<i>A. gallica</i>	868/711	294, 227, 69, 63, 43	277, 222, 214
<i>A. ostoyae</i>	870/713	294, 228, 75, 69, 31	351, 222, 137
<i>A. borealis</i>	868/711	293, 172, 75, 68, 56, 31	490, 221
<i>A. cepistipes</i>	868/711	293, 227, 132, 43	277, 222, 214
<i>A. tabescens</i>	847/690	295, 129, 125, 93, 32	223, 216, 126

Cuadro 5. Tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hinf I* y *Mbo I*, en los cuatro controles y en cada una de las muestras de suelo.

CÓDIGO MUESTRA	FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (pb)		RESULTADO
	<i>Hinf I</i>	<i>Mbo I</i>	
Control positivo 1	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
Control positivo 2	294, 227, 69, 63, 43	277, 222, 214	<i>A. gallica</i>
Control positivo 3	294, 228, 75, 69, 31	351, 222, 137	<i>A. ostoyae</i>
Control negativo 1	-	-	<i>Rosellinia necatrix</i>
664	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
726	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
744	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
771	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
772	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
773	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
774	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
775	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
777	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
825	294, 227, 69, 63, 43	277, 222, 214	<i>A. gallica</i>
826	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
827	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
876	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
881	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
884	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
885	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
895	294, 227, 69, 63, 43	277, 222, 214	<i>A. gallica</i>
905	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>
906	401, 159, 148	235, 215, 149, 125	<i>A. mellea</i>

de 50 pb hasta 2000 pb (Hyperladder II, Bioline). El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en el transiluminador de luz ultravioleta. La imagen del gel se capturó con un sistema de fotodocumentación y el tamaño de bandas se analizó con el software 1-D Manager (TDI, Madrid). La identificación de las especies de *Armillaria* se basó en la comparación del tamaño de los fragmentos digeridos con los publicados por LOCHMAN *et al.* (2004).

Secuenciación

Para validar los resultados de identificación de especies de *Armillaria* mediante nested-PCR y RFLP, se secuenció el ADN de cinco muestras de suelo estudiadas (elegidas al azar) y de las tres muestras de con-

trol positivo (suelo esterilizado + *A. mellea*, *A. gallica* ó *A. ostoyae*). El producto de amplificación se purificó con el kit "High Pure PCR Product Purification" (Roche Diagnostic). La reacción de secuenciación consistió en 15 µl del amplicón purificado, 2 µl de terminador marcado (Big Dye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems), 3 µl de tampón de secuenciación 5x (400 mM Tris-HCl pH 9.0 y 10 mM MgCl) y 0,32 µl de cada cebador (20 µM) AR1 ó AR2 (un solo cebador por cada reacción). Los ciclos de temperaturas en el termociclador fueron: un minuto a 96 °C y 25 ciclos de 96 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 segundos, y finalmente 60 °C durante 4 minutos. Para eliminar contaminantes, la reacción de secuenciación se

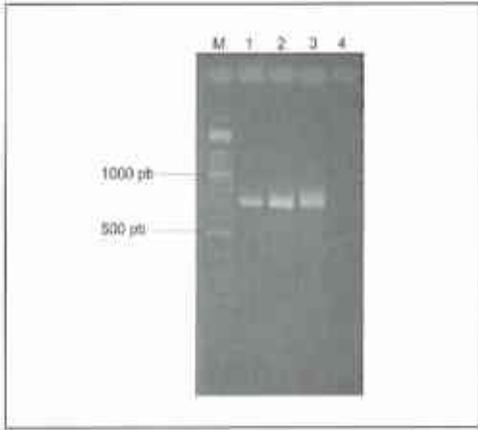


Figura 3. Gel de agarosa al 2% mostrando el fragmento de ADN amplificado con los cebadores AR1 y AR2 de los controles positivos: *A. ostoyae* (1), *A. gallica* (2) y *A. mellea* (3), y del control negativo: *Rosellinia necatrix* (4). M: marcador XIV de 100 hasta 2642 pb.

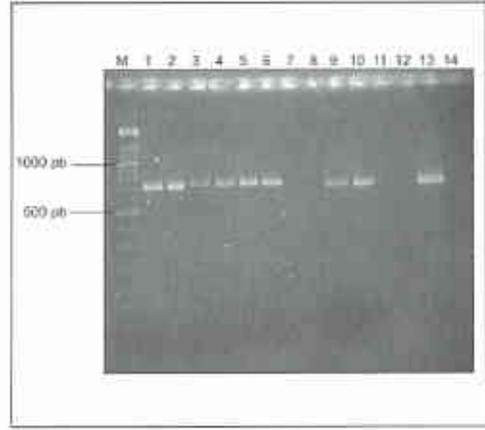


Figura 4. Gel de agarosa al 2% mostrando el fragmento de ADN amplificado con los cebadores AR1 y AR2 en las muestras; 825 (1 y 2), 826 (3 y 4), 827 (5 y 6), 828 (7 y 8), 876 (9 y 10), control de extracción (11), control negativo de amplificación (12), control positivo *A. ostoyae* (13) y control negativo *Rosellinia necatrix* (14). M: marcador XIV de 100 hasta 2642 pb.

precipitó con etanol. El precipitado se resuspendió en formamida “Hi-Di™”(Applied Biosystems). Tras ser sometido a una desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, el ADN amplificado se cargó en un secuenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se analizaron con el Sequencing Analysis 5.1 y mediante el programa de alineamiento BLAST, de acceso libre en Internet, se compararon las secuencias de las muestras con las que existen en el Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección y amplificación del ADN fúngico de *Armillaria* en suelos infestados se consiguió utilizando el protocolo de amplificación secuencial o nested-PCR. El mayor problema para la caracterización molecular de los hongos patógenos que infestan suelos es disponer de un método de extracción que dé lugar a un ADN de calidad ya que los suelos contienen una elevada cantidad de ácidos húmicos que son inhibidores de la PCR (TSAI y OLSON, 1991). Los resultados obte-

nidos con el kit “PowerSoil™DNA Isolation” (MO BIO Laboratories) indican su conveniencia para la extracción eficaz de ADN de *Armillaria*, a partir de las muestras de suelo; si bien los resultados son óptimos, se analiza solo 0,5 g de suelo por muestra por lo que sería conveniente probar algún kit que permita trabajar con una cantidad de tierra más representativa.

La amplificación tanto con las PCR beads como con la mezcla de reacción dió resultados satisfactorios similares. Sin embargo nuestra experiencia apoya el uso de las PCR beads por su rapidez y comodidad de trabajo.

De las 24 muestras analizadas, 5 de ellas no mostraron banda de amplificación, por lo que se determinaron como negativas para *Armillaria*. Dos presentaban una banda de amplificación de 864 pb en la primera PCR y de 711 pb en la segunda (para cada submuestra) y las 17 restantes presentaron un tamaño de amplificación de 882 pb en la primera PCR y de 724 pb en la segunda para cada una de las submuestras (Cuadro 3). Al comparar los tamaños de bandas obtenidos

en las dos amplificaciones con los publicados por LOCHMAN *et al.* (2004), se comprobó que en el primer caso las muestras se correspondían con *A. gallica* y el segundo con *A. mellea* (Cuadro 4). En ningún experimento se obtuvo amplificación en los controles negativos.

Los fragmentos de ADN obtenidos en la nested-PCR (Figuras 3 y 4) aportaron información para la identificación pero no pudo ser utilizada como método rutinario de diagnóstico porque la similitud del tamaño de las bandas entre las especies no permite su discriminación de forma fiable. Fue necesario hacer digestiones y analizar los fragmentos de restricción para la obtención de diagnósticos concluyentes.

El tamaño de los fragmentos de restricción de los controles positivos y de muestras de suelo, obtenidos por la digestión con las enzimas endonucleasas *Hinf I* y *Mbo I*, se muestran en el Cuadro 5. En total se realizaron 19 digestiones de las muestras y una digestión por cada control positivo utilizado. De las 19, dos de ellas presentaban un patrón de bandas de ADN de 294, 227, 69, 63, 43 pb con *Hinf I* y 277, 222, 214 pb con *Mbo I* correspondiéndose con lo publicado por LOCHMAN *et al.* (2004) para *A. gallica* y las 17 restantes pertenecen a *A. mellea* claramente diferenciadas del resto, por un patrón de bandas característico: 401, 159, 148 pb fragmentos digeridos con *Hinf I* y 235, 215, 149, 125 con *Mbo I*. Paralelamente, en tres de las muestras estudiadas (726, 881 y 884) además del suelo también se analizó material sintomático, con presencia de micelio blanco en el sistema radicular, mediante la técnica PCR-RFLP (MANSILLA *et al.*, 2000); en los tres casos el resultado fue *A. mellea*, lo que confirmó los resultados de suelo. En ninguna de las muestras naturales se encontró *A. ostoyae* pero se obtuvo su patrón de bandas correspondiente en el control positivo con unos fragmentos de 294, 228, 75, 69, 31 pb en la primera digestión con *Hinf I* y 351, 222, 137 para la segunda con *Mbo I*. Los fragmentos de restricción de los controles positivos (*A.*

mellea, *A. gallica* y *A. ostoyae*) digeridos con *Hinf I* y separados en un gel se muestran en la Figura 5. A la vista de los resultados, la especie más extendida en los suelos analizados fue *A. mellea* en un porcentaje del 70%. Resultados similares encuentran AGUÍN *et al.* (2004b) en muestras analizadas en el noroeste de España indicando que la especie más frecuente es *A. mellea* (71%) y que causa sintomatología en arbustos ornamentales, kiwi, viña, árboles frutales y árboles de hoja ancha. En el 16% de las muestras analizadas se detectó *A. gallica*, cuya presencia fue ya publicada en Galicia, aunque con baja incidencia, en ornamentales, coníferas, árboles frutales, árboles de hoja ancha y viña (AGUÍN *et al.*, 2004b).

La comparación de las secuencias de las muestras estudiadas con las secuencias depositadas en el Gen-Bank dió valores de similitud entre un 92-99%. Así, al contrastar la secuencia obtenida con el fragmento de ADN amplificado de la muestra 876 con las secuencias depositadas en el Gen-Bank, este mostró un 99% de similitud con la región ITS del ADN ribosómico de *Armillaria mellea*, en donde de los 539 nucleótidos analizados, 536 se correspondían con la secuencia del Gen Bank y solo 3 eran diferentes.

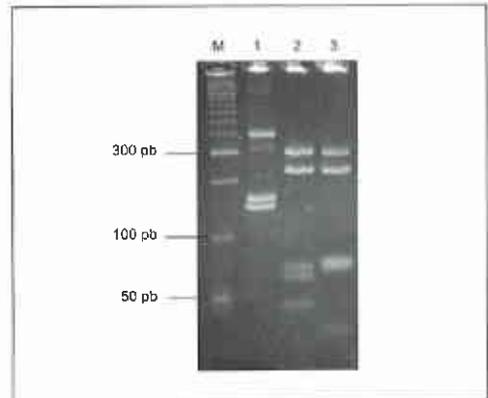


Figura 5. Gel de agarosa al 3% mostrando los fragmentos de digestión del ADN amplificado, con la enzima *Hinf I* en los controles positivos: *A. mellea* (1), *A. gallica* (2) y *A. ostoyae* (3). M: marcador Hyperladder II de 50 hasta 2000 pb.

Las muestras 772, 775, 826 y 885, también elegidas al azar y secuenciadas aportaron resultados similares entre 92-97% de similitud. En los controles positivos, *A. mellea* muestra un 99% de similitud en los 628 nucleótidos analizados mientras que *A. gallica* y *A. ostoyae* presentan un 92%. Estos resultados de secuenciación corroboran las identificaciones conseguidas anteriormente por nested-PCR y RFLP.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman que el procedimiento utilizado puede ser empleado como método eficaz de diagnóstico rutinario de las especies de *Armillaria* a partir de muestras de suelo, sin necesidad de aislar el hongo ni observar presencia de estructuras fúngicas (micelio, rizomorfos, etc.) en las muestras. La rápida extracción de ADN con el kit comercial "Power-

Soil™DNA Isolation", la fácil amplificación usando "PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads" y el análisis de fragmentos de restricción en geles de agarosa, hacen posible una detección e identificación efectiva de especies de *Armillaria*.

Esta metodología permite un diagnóstico temprano y óptimo, previo a la aparición de plantas sintomáticas, para conocer el grado de infestación del terreno por el hongo y poder aplicar las medidas preventivas necesarias para reducir la incidencia de la enfermedad causada por *Armillaria*.

A pesar de haber encontrado una buena técnica para la extracción de ADN directamente del suelo y haber logrado la amplificación, se valora la necesidad de obtener los mismos resultados partiendo de una mayor cantidad de suelo. El próximo paso en esta línea de investigación es evaluar otras metodologías de extracción que permitan trabajar con una cantidad más representativa de muestra.

ABSTRACT

ESCOFET CRESPO P. E., O. AGUÍN CASAL, J. P. MANSILLA VÁZQUEZ. 2006. Detection and Identification with molecular techniques of species of the genus *Armillaria* from soil samples. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 231-240.

In the present work *Armillaria* species were identified taking soil samples without isolating and cultivating the mycelium on a plate. DNA was extracted from 250 mg of soil and the ITS region of the rDNA was amplified using Nested-PCR with external primers ITS1 and ITS2 and internal primers AR1 and AR2. Products obtained were analysed by RFLP using the restriction enzymes *Hinf* I and *Mbol* I, thus obtaining fragments of different molecular weight. This method allows the discrimination among *Armillaria* species using band patterns specific for each species. The 70% of the analyzed samples corresponds to *A. mellea*; the 16% corresponds to *A. gallica*, and the 14% of the samples does not present *Armillaria* infection.

Key words: *Armillaria mellea*, *Armillaria gallica*, nested-PCR, RFLP, soil.

REFERENCIAS

- ADASKAVEG, J. E., FÖRSTER, H., WADE, L., THOMPSON, D. F., CONNELL, J. H. 1999. Efficacy of sodium tetrathiocarbonate and propiconazole in managing *Armillaria* root rot of almond on peach rootstock. *Plant Dis.*, 83: 240-246.
- AGUÍN, O., SAINZ, M. J., MANSILLA, J. P. 2004a. *Armillaria* species infecting vineyards in northwestern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.*, 110: 683-687.
- AGUÍN, O., MANSILLA, J. P., SAINZ, M. J. 2004b. Intraspecific variation in *Armillaria* species from shrubs and trees in northwestern Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 299-304.
- AGUÍN, O., MANSILLA, J. P., SAINZ, M. J. 2006. In vitro selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root rot of grapevine in the field. *Pest Manag. Sci.*, 62: 223-228.

- ANDERSON, J. B., STASOVSKI, E. 1992. Molecular phylogeny of Northern Hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia*, **84**: 505-516.
- BAHNWEG, G., SCHULZE, S., MÖLLER, E. M., ROSEN-BROCK, H., LANGEBARTIELS, C., SANDERMANN, H. 1998. DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark, and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, **262**: 79-82.
- FOX, R. T. V. 2003. *Armillaria* root rot: biology and control of honey fungus. 23e Salon du Champignon de Montpellier 18-20 October, Institut de Botanique, 163 rue Auguste Broussonet, 34090 Montpellier.
- GULLAUMIN, J. J. 1986. Le pourridié de la vigne. *Phytoma-Défense des cultures*, Novembre: 19-26.
- HARRINGTON, T. C., WINGFIELD, B. D. 1995. A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia*, **87**(2): 280-288.
- KILE, G. A. 1991. *Armillaria root disease*. Agriculture Handbook No. 691. Forest Service, United States Department of Agriculture Washington, D.C., 233 pp.
- LAMOURE, D. 1965. *Armillaria ectypa*. Comptes rendu hebdomadaire. Séanc. Acad. Sci., Paris 260: 4562.
- LOCHMAN, J., SERY, O., 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., 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.
- MANSILLA, J. P., AGUÍN, O., SAINZ, M. J. 2001. A fast method for production of *Armillaria* inoculum. *Mycologia*, **93**: 612-615.
- MARXMÜLLER H. 1982. Etude morphologique des *Armillaria* ss. str. à anneau. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France*, **98**: 87-124.
- MARXMÜLLER H. 1987. Quelques remarques complémentaires sur les *Armillaires* annelées. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France*, **103** (2): 137-156.
- PÉREZ-SIERRA, A., WHITEHEAD, M., WHITEHEAD, D. 1999. Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species. *Mycol. Res.*, **103**: 1631-1636.
- ROMAGNESI H., MARXMÜLLER H. 1983. Étude complémentaire sur les *Armillaires* annelées. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France*, **99**: 310-321.
- SICOLI G., ANNESE V., GIOIA T., LUISI N. 2002. *Armillaria* pathogenicity tests on oaks in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, **84** (2): 107-111.
- TERMORSHUIZEN A.J., ARNOLDS E. J. M. 1987. On the nomenclature of the European species of the *Armillaria mellea* group. *Mycotaxon*, **30**: 101-116.
- TSAI YL, OLSON BH. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol.* Apr. **57** (4):1070-1074
- TORREL, A. 1998. Podredumbre de la raíz (*Armillaria mellea* Vahl, *Rosellinia necatrix* Hartig). En: Los parásitos de la vid. Estrategia de protección razonada. 4ª edic. Ed. MAPA/Mundi-Prensa, pp. 182-187.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR protocols: a guide to methods and application. Academic Press, San Diego (CA, USA), pp. 315-322.

(Recepción: 26 diciembre 2005)

(Aceptación: 15 marzo 2006)