

Adaptación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de especies *Armillaria* en Galicia.

PEDRO MANSILLA VAZQUEZ^{1,2} OLGA AGUÍN CASAL¹, ADELA ABELLEIRA ARGIBAY¹, M.^a JESÚS SAINZ OSÉS²

Resumen: En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al aplicar distintos métodos, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de fragmentos de restricción (RFLP), para la identificación de especies de *Armillaria* en muestras sintomáticas de diferentes cultivos en Galicia. De las metodologías ensayadas para la obtención de ADN_r amplificado, la mejor, desde el punto de vista económico y de eficacia, consistió en la extracción del ADN_r con un kit comercial, seguido por la amplificación del ADN extraído usando las bolitas "Ready to Go PCR beads". El ADN_r amplificado se cortó con las enzimas AluI, NdeI y BsmI, consiguiéndose, en un día, la determinación de las especies de *Armillaria* a partir de diferentes estructuras del hongo: esporas, micelio sobre planta, micelio en cultivo y rizomorfos. En las muestras analizadas, se confirmó la presencia de tres especies, dos de carácter altamente patógeno: *Armillaria mellea* y *Armillaria ostoyae*, y otra con carácter saprófito o parásito de debilidad: *Armillaria gallica*.

(1) Estación fitopatológica "Do Areeiro". Subida a la Robleda s/n. 36153 Pontevedra.

(2) Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo.

Palabras clave: ADN, *Armillaria* spp., fragmentos de restricción (RFLP), identificación, PCR

INTRODUCCIÓN

Actualmente se incluyen en el género de hongos basidiomicetos *Armillaria* (Fr.: Fr.) Staude unas cuarenta especies, que están distribuidas por todo el mundo (Watling et al., 1991). En Europa se han descrito siete. Cinco de ellas tienen anillo en su cuerpo fructífero: *A. mellea* (Vahl:Fr.) Kummer *sensu stricto*, *A. borealis* Marxmüller y Korhonen, *A. cepistipes* Velenovsky, *A. ostoyae* (Romagnesi) Herink, *A. gallica* Marxmüller y Romagnesi; y las otras dos carecen de anillo: *A. tabescens* (Scopoli:Fries) Emel y *A. ectypa* (Fries) Lamoure.

Armillaria mellea y *Armillaria ostoyae* se consideran altamente patógenas mientras que el resto de las especies europeas se definen como parásitos de debilidad o saprófitos (Rishbeth, 1982; Roll-Hansen, 1985; Legrand y Guillaumin, 1993; Termorshuizen y Arnolds, 1994). Las especies patógenas

causan una enfermedad que afecta al sistema radicular de un amplio número de hospedadores que se conoce, de manera común, como podredumbre blanca de la raíz (Fig. 1).

Para poder efectuar medidas de control razonables y eficaces que puedan minimizar o reducir los daños ocasionados por esta enfermedad, es necesario efectuar una identificación rápida del hongo. Desafortunadamente, la diferenciación de las especies de *Armillaria* por métodos tradicionales, tanto en campo como en laboratorio, plantea muchas dificultades ya que se basa en características morfológicas del micelio, de los rizomorfos y de los cuerpos fructíferos que apenas varían entre especies o son difíciles de apreciar (Guillaumin y Berthelay, 1981). Se han desarrollado distintos métodos para poder realizar una determinación eficaz en pocos días. El más utilizado ha sido el método de compatibilidad (Korhonen, 1978; Guillaumin y Berthelay, 1981), en el que el aisla-



Figura 1: Podredumbre blanca de la raíz provocada por *Armillaria ostoyae* en una muestra de *Pinus* sp.

miento fúngico, que se quiere identificar, se enfrenta con cepas haploides conocidas de *Armillaria*, pero también se han propuesto métodos serológicos y electroforéticos (Lung-Escarmant et al., 1985), la técnica ELISA (Priestley et al., 1994) o la utilización de perfiles enzimáticos (Bragaloni et al., 1997). Sin embargo, la mayoría de estos métodos presentan limitaciones que desaconsejan su utilización en los laboratorios de diagnóstico. Así, el método de compatibilidad, que se está utilizando en la mayoría de los laboratorios, requiere que el micelio del hongo tenga que estar aislado en un medio de cultivo y, además, tarda entre 4 y 5 semanas en proporcionar resultados, que, en muchos casos, son ambiguos y subjetivos (Harrington y Wingfield, 1995).

El desarrollo de la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en 1986 permi-



Figura 2: Basidiocarpos o setas de *Armillaria ostoyae*.

tió amplificar de forma exponencial secuencias de ADN específicas por síntesis "in vitro". La adaptación de esta metodología ha supuesto un enorme avance en el campo de la sistemática de hongos, facilitando la detección y determinación de especies fúngicas en un tiempo muy reducido en comparación con los métodos existentes hasta ese momento (Henson y French, 1993; Edel, 1998).

La publicación por Anderson y Stasovski (1992) de la secuencia de la región intergénica (IGS) del ADN ribosomal (ADNr) para la mayor parte de las especies de *Armillaria* situadas en el hemisferio norte facilitó la puesta a punto de la técnica PCR, en combinación con el análisis de fragmentos de restricción (RFLP), para la diferenciación de especies tanto europeas como americanas (Harrington y Wingfield, 1995; Baur et al., 1997). Esta diferenciación mediante PCR se ha realizado principalmente sobre micelio cultivado en placa de especies previamente identificadas por otros métodos. Sin embargo, sería importante desarrollar estas técnicas para el diagnóstico rápido de *Armillaria* en material recogido en campo.

El objetivo de este trabajo fue adaptar y aplicar la técnica PCR-RFLP para la detección e identificación de especies de *Armillaria* en muestras sintomáticas de diferentes cultivos en Galicia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron treinta muestras, que mostraban síntomas de podredumbre blanca de la raíz, procedentes de un amplio rango de especies hospedadoras (ornamentales, frutales, coníferas, frondosas y vid). Parte de las muestras procedían de consultas recibidas en nuestro laboratorio y el resto de muestreos realizados en diversas zonas de Galicia. Se

incluyeron además dos controles haploides, uno de *A. mellea* y otro de *A. gallica*, facilitados por el Dr. Jean Jacques Guillaumin (INRA, Clermont-Ferrand, Francia). Para el análisis, y dependiendo de las características de cada muestra, se utilizaron distintas fuentes de material fúngico: esporas (Fig. 2), rizomorfos sobre las raíces (Fig. 3), micelio en corteza o micelio en placa. El micelio en

Cuadro 1. Código, especie hospedadora, procedencia y origen del material fúngico de las muestras estudiadas.

Código	Especie hospedadora	Procedencia	Material fúngico
E198	<i>Evonymus japonica</i>	Pontevedra	esporas
M198	<i>Malus domestica</i>	Pontevedra	esporas
R198	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Allariz (Orense)	esporas
A199	<i>Acacia</i> sp.	Pontevedra	esporas
R63399	<i>Quercus robur</i>	La Coruña	esporas
M298	<i>Magnolia grandiflora</i>	Lourizán (Pontevedra)	esporas
P198	<i>Pinus pinaster</i>	Pontevedra	esporas
V198	<i>Vitis</i> sp.	Cambados (Pontevedra)	rizomorfos
T25699	<i>Thuja</i> sp.	Pontevedra	rizomorfos
R60199	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Vigo (Pontevedra)	rizomorfos
A60199	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Vigo (Pontevedra)	rizomorfos
A601299	<i>Acacia melanoxylum</i>	Vigo (Pontevedra)	micelio en placa
V1499	<i>Vitis</i> sp.	Cambados (Pontevedra)	micelio en placa
V1796	<i>Vitis</i> sp.	Arbo (Pontevedra)	micelio en placa
V295	<i>Vitis</i> sp.	Cambados (Pontevedra)	micelio en placa
V3699	<i>Vitis</i> sp.	Meis (Pontevedra)	micelio en placa
V61898	<i>Vitis</i> sp.	Cambados (Pontevedra)	micelio en placa
P53199	<i>Pinus pinaster</i>	Lugo	micelio en placa
V2849	<i>Vitis</i> sp.	Puentearreas (Pontevedra)	micelio en placa
P43799	<i>Pinus</i> sp.	Esgos (Orense)	micelio en placa
H57099	<i>Hydrangea</i> sp.	Poio (Pontevedra)	micelio en corteza
V17699	<i>Vitis</i> sp.	Orense	micelio en corteza
V56598	<i>Vitis</i> sp.	Celanova (Orense)	micelio en corteza
VR98	<i>Vitis</i> sp.	Pontevedra	micelio en corteza
V22799	<i>Vitis</i> sp.	Crecente (Pontevedra)	micelio en corteza
V31599	<i>Vitis</i> sp.	Salvaterra do Miño (Pontevedra)	micelio en corteza
V7199	<i>Vitis</i> sp.	Villagarcía (Pontevedra)	micelio en corteza
C20399	<i>Prunus domestica</i>	Lourizán (Pontevedra)	micelio en corteza
P53199	<i>Pinus pinaster</i>	Lugo	micelio en corteza
K46999	<i>Actinidia deliciosa</i>	Porriño (Pontevedra)	micelio en corteza
D5	Control haploide <i>A. mellea</i>	Francia	micelio en placa
E6	Control haploide <i>A. gallica</i>	Francia	micelio en placa



Figura 3: Rizomorfos de *Armillaria mellea* sobre las raíces de una muestra de *Actinidia deliciosa*

placa (Fig. 4 y 5) se obtuvo para nueve de las treinta muestras estudiadas, cultivando fragmentos de material vegetal colonizado o micelio subcortical sobre el medio de cultivo selectivo BDS (Worral, 1991) o el general AM (1.5% agar, 2% extracto de malta). La procedencia y código de las muestras, especie hospedadora y origen del material fúngico se muestran en el cuadro 1.

La amplificación del ADN r fúngico de cada muestra para el análisis PCR-RFLP se llevó a cabo, de forma paralela, mediante dos procedimientos: sin o con extracción previa del ADN. En ambas técnicas, se utilizaron como cebadores dos oligonucleótidos, recomendados por Anderson y Stasovski (1992) para *Armillaria*, sintetizados por Perkin-Elmer (Madrid): LR12R y O-1. La secuencia del cebador LR12R es 5'-CTGA-ACGCCTCTAAGTCAGAA-3' (Veldman et al., 1981) y la de O-1 5'-AGTCC-TATGGCCGTGGAT-3' (Duchesne y Anderson, 1990).

Para la PCR en la que no se realizó extracción previa del ADN, con la punta de una pipeta estéril se raspó la superficie bien del micelio que crecía en medio BDS o en AM, bien del micelio situado entre la corteza y la madera de una planta infectada, de esporas o de fragmentos de rizomorfos (según la mues-

tra). El material fúngico, así obtenido, se introdujo en un tubo Eppendorf estéril al que previamente se habían añadido los siguientes componentes para llevar a cabo la reacción en un volumen final de 100 μ l: 2 μ l de cada dNTP 0,2 mM, 10 μ l del tampón 10x PCR, 1 μ l de cada cebador (0,1-1 mM), 0,5 μ l de Taq polimerasa (2,5 U/100 μ l) y 16 μ l Cl_2 Mg 4 mM (GeneAmp® PCR Core Reagents, Perkin Elmer), completando con agua (Waterohm, Sigma Chemical). Se añadieron también unas gotas de aceite mineral (Sigma Chemical) para evitar la evaporación a temperaturas altas.

Para la PCR con obtención previa del ADN, la extracción se realizó a partir de diferentes estructuras fúngicas (esporas, micelio sobre planta, micelio en cultivo y rizomorfos) aisladas de las muestras, siguiendo el protocolo corto estándar del kit "EZNA fungal DNA miniprep" (Omega Biotek) pero sin añadir RNasa ni mercaptoetanol (Martin y Torres, 1998). En un tubo Eppendorf estéril, se pesaron entre 10-40 mg de la muestra fúngica correspondiente que se centrifugaron sucesivamente con los diferentes tampones del kit. El sobrenadante obtenido se pasó a una columna Hibind DNA que se centrifugó a 16000 rpm. Tras la centrifugación, se añadieron a la columna 100 microlitros de agua a 65°C y se centrifugó de nuevo para recoger el ADN. Se obtiene así una solución de 100 μ l



Figura 4: Micelio de *Armillaria mellea* en el medio de cultivo BDS.

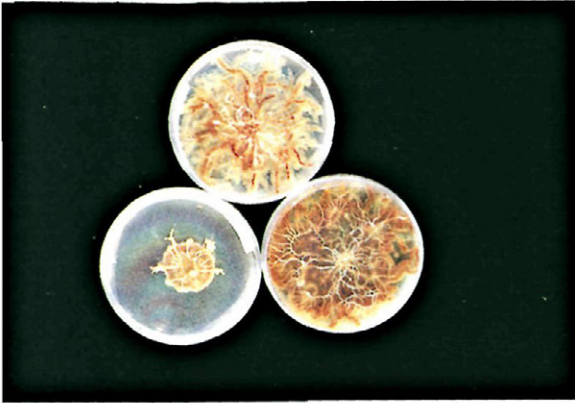


Figura 5: Visión posterior del crecimiento del micelio en el medio de cultivo BDS de las tres especies detectadas en las muestras analizadas: *Armillaria mellea* (parte superior), *Armillaria gallica* (parte inferior derecha) y *Armillaria ostoyae* (parte inferior izquierda).

que contiene entre 2-10 ng de ADN, que se utiliza como ADN molde para la amplificación. Un microlitro de la solución se introdujo en un tubo Eppendorf que contenía una bolita "Ready to Go PCR beads" (Amersham-Pharmacia) y 0,5 μ l de cada cebador (10 pmol/ μ l), completando con agua hasta un volumen final de 25 μ l. Las bolitas "PCR beads" incluyen todos los reactivos necesarios para la reacción menos los cebadores y el agua. Al igual que en el procedimiento anterior, se añadieron unas gotas de aceite mineral para evitar la evaporación a temperaturas altas.

En cada prueba se incorporó un control negativo (sin ADN) para comprobar la ausencia de contaminación en el proceso de amplificación.

Además de estos dos procedimientos para la amplificación del ADN, se hicieron combinaciones de ambas técnicas con la finalidad de encontrar el sistema más efectivo y económicamente más rentable. Se probó el proceso sin extracción previa del ADN pero incorporando las bolitas "Ready to Go PCR beads", así como el proceso de extracción de ADN con el kit "GeneAmp® PCR Core Reagents" (Perkin- Elmer).

Una vez preparado el ADN para la amplificación, tanto por los dos procedimientos

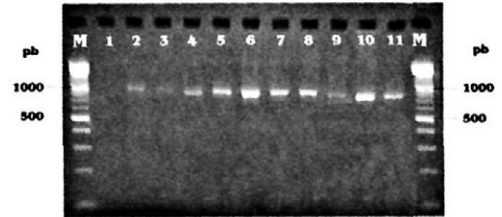


Fig. 6.a

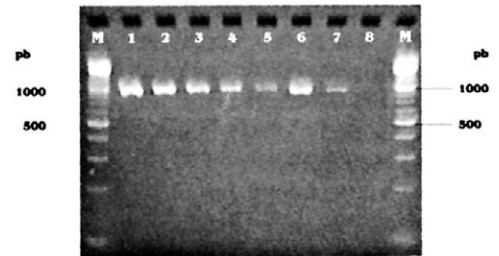


Fig. 6.b

Figura 6: a) Gel de agarosa mostrando ADN_r amplificado de *Armillaria* sp. obtenido usando los cebadores LR12R y O-1, sin extracción previa del ADN en 10 de las muestras estudiadas. Calle 1: control sin ADN, M= marcador de 100 pb. b) Gel de agarosa mostrando ADN_r amplificado de *Armillaria* sp. con extracción previa del ADN en 7 de las muestras estudiadas. Calle 8: control sin ADN, M=marcador de 100pb

descritos como por sus combinaciones, la técnica de análisis PCR-RFLP se hace común para todos ellos.

Para las amplificaciones de PCR, se utilizó un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) con las condiciones propuestas por Harrington y Wingfield (1995) y modificadas por Pérez et al. (1999): una desnaturalización inicial del ADN de 95 segundos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 60 segundos a 60°C para el anillamiento de los cebadores, 120 segundos a 72°C para la elongación y 60 segundos a 95°C para la desnaturalización de las cadenas, finalizando con una elongación final durante 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Tras eliminar el aceite, se mezclaron 10 μ l del producto de la reacción de cada muestra con 2 μ l del tampón de carga (40% de

sacarosa, 0.25% de bromofenol) y se depositaron en un pocillo del gel de agarosa al 2% (p/v) en tampón 1x TBE (Tris-ClH 0,89 M, ácido bórico 0,89 M y EDTA 0,02 M, pH 8.4). El gel se sumergió en una cubeta con tampón 1x TBE y se llevó a cabo una electroforesis a 100 voltios durante 30 minutos. En cada prueba se utilizó un control negativo y un marcador de 100 pb (Marcador XIV, Roche Diagnostic).

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Una vez comprobada la amplificación, se llevó a cabo el análisis de RFLP. El ADN se cortó con las endonucleasas de restricción AluI, NdeI y BsmI (Roche Diagnostics), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. En el cuadro 2, se presentan los

tamaños de los fragmentos de restricción producidos por los tres enzimas sobre el fragmento LR12R-O1 de distintas especies de *Armillaria* según Harrington y Wingfield (1995) y Pérez et al. (1999). Con AluI, se diferencian 12 patrones RFLP distintos: patrones 1 y 2 de *A. borealis*, patrones 1 y 2 de *A. cepistipes*, patrones 1 y 2 de *A. mellea*, patrones 1 y 2 de *A. tabescens*, patrones 1, 2 y 3 de *A. gallica* y un patrón de *A. ostoyae*. Sin embargo, *A. ostoyae*, *A. cepistipes* (patrón 2) y *A. borealis* (patrón 1) presentan los mismos fragmentos de restricción (310 ó 305, 200 y 135 pb). Estas tres especies se diferencian utilizando las enzimas NdeI y BsmI. La enzima NdeI corta el ADN amplificado de *A. borealis* y *A. ostoyae*, dando lugar a dos fragmentos de 550 ó 565 y 370 ó 380 pb, pero no corta el ADN de *A. cepistipes*. La enzima BsmI corta el ADN

Cuadro 2. Tamaños en pares de bases de los RFLP producidos por las endonucleasas de restricción AluI, NdeI y BsmI sobre el fragmento LR12R-O1 de *Armillaria* según Harrington y Wingfield (1995) y *Pérez et al. (1999).

Especie	Patrón	AluI	NdeI	BsmI
<i>A. borealis</i>	1	310, 200, 135 305,200,135*	550, 370 550,370*	-
	2	310, 200, 104 305,200,100*		
<i>A. cepistipes</i>	1	399, 200, 183 400,200,190*	-	-
	2	310, 200, 135 305,200,135*		
<i>A. ostoyae</i>	1	310, 200, 135 310,200,135*	550, 370 565,380*	620, 300 600,300*
<i>A. mellea</i>	1	490,180 320,180,155*		
	2	350, 155 320,155*		
<i>A. gallica</i>	1	582, 240 400,240,190*		
	2	399, 240, 183 390,230,190*		
	3	- 400,250,240,190*		
<i>A. tabescens</i>	1	430, 240 430,240*		
	2	320, 240, 100 -		

de *A. ostoyae*, dando dos fragmentos de 620 ó 600 y 300 pb respectivamente, y no corta el de las otras dos especies.

Para el análisis con la endonucleasa AluI, 10 µl de la reacción de amplificación se mezclaron con 0,5 µl de la enzima, manteniéndose la mezcla a 37°C durante 1 hora. Para el análisis con las enzimas NdeI y BsmI, se realizó previamente una purificación del ADN amplificado con el kit "High Pure PCR Product Purification" (Roche Diagnostic), siguiendo el protocolo estándar recomendado por el fabricante. Usando los tubos "High Pure Filter", se mezcló la reacción de amplificación con un primer tampón (1/5 v/v) y se realizó una centrifugación a 16000 rpm. Se aplicó el tampón de lavado y se volvió a centrifugar, obteniendo una solución de 50 µl conteniendo el ADN purificado. Diez microlitros de esta solución se mezclaron con 0,5 µl de la enzima NdeI (manteniéndose a 37° C durante 1 h) o con 0,5 µl de la enzima BsmI (a 65° C durante 2 h.).

Los fragmentos digeridos por las tres enzimas se analizaron por electroforesis a 100 voltios durante 30 minutos en gel de agarosa al 3% sobre tampón 1x TBE, teñido con bromuro de etidio. En cada prueba se utilizó un control negativo y un marcador de 100 pb (Marcador XIV, Roche Diagnostic). Las imágenes del gel se capturaron con cámara de video y se archivaron en ordenador para ser analizadas con el programa de densiometría 1D-Manager (TDI- Madrid).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 6, se muestran geles de agarosa con los productos de PCR obtenidos usando los cebadores LR12R y O-1, con y sin extracción previa del ADN, en varias de las muestras estudiadas. Geles similares con ADNr amplificado se obtuvieron para todas las demás muestras. En los controles negativos, como era de esperar, no se observó ninguna amplificación. La amplificación del ADNr de *Armillaria* se consiguió con los dos procedimientos utilizados (sin o con extrac-

ción previa del ADN), aunque con distinta eficacia.

El proceso sin extracción (utilizando el kit "GeneAmp® PCR Core Reagents" de Perkin Elmer) presentó una alta eficacia cuando el material fúngico consistió en esporas y micelio en placa, si bien, para garantizar el éxito del método, fue necesario realizar entre 3 y 4 repeticiones por muestra. Esto encarece significativamente el análisis, que se estima en unas 450 pts por reacción (1350-1800 pts por muestra). Cuando el ADN se amplificó de muestras extraídas directamente de la corteza y de los rizomorfos, el porcentaje de éxito fue bastante inferior; lo mismo ocurrió cuando realizamos el proceso sin extracción pero usando las "PCR beads", solo que, en este caso, el precio por reacción se estima en torno a las 250 pts.

Cuando se realizó la extracción previa del ADN con el kit "EZNA fungal DNA miniprep" de Omega Biotek y el kit "GeneAmp® PCR Core Reagents" de Perkin Elmer, no obtuvimos ningún resultado positivo. Sin embargo, la utilización del kit "EZNA" con

Cuadro 3. Especies de *Armillaria* identificadas mediante la técnica PCR-RFLP en las muestras sintomáticas de diferentes cultivos en Galicia y en los controles haploides.

Especie hospedadora	Especie de <i>Armillaria</i> identificada
<i>Evonymus japonica</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Malus domestica</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Acacia</i> sp.	<i>A. mellea</i>
<i>Quercus robur</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Magnolia grandiflora</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Vitis</i> sp.	<i>A. mellea</i> , <i>A. gallica</i>
<i>Thuja</i> sp.	<i>A. gallica</i>
<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>A. gallica</i>
<i>Acer pseudoplatanus</i>	<i>A. gallica</i>
<i>Pinus pinaster</i>	<i>A. ostoyae</i>
<i>Pinus</i> sp.	<i>A. ostoyae</i>
<i>Hydrangea</i> sp.	<i>A. mellea</i>
<i>Prunus domestica</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Actinidia deliciosa</i>	<i>A. mellea</i>
<i>Acacia melanoxylum</i>	<i>A. gallica</i>
Control haploide <i>A. mellea</i>	<i>A. mellea</i>
Control haploide <i>A. gallica</i>	<i>A. gallica</i>

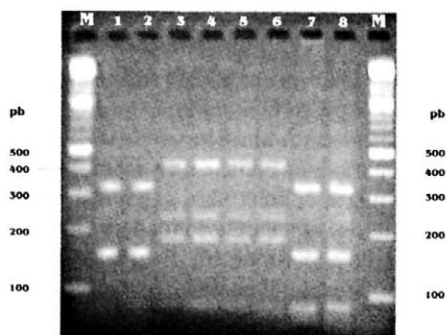


Figura 7: Bandas de restricción de aislamientos de *Armillaria* sp. en ocho de las muestras estudiadas, tras el tratamiento con la enzima AluI y electroforesis en gel de agarosa. Las calles 1, 2, 7 y 8 se corresponden con *Armillaria mellea* y las 3, 4, 5 y 6 con *Armillaria gallica*. M= marcador de 100 pb.

las “PCR beads” determinó un porcentaje muy alto de éxito en la amplificación utilizando una o dos repeticiones por muestra, aunque en este caso el precio por reacción se estimó en unas 550 pts. Con esta última técnica, la amplificación fue satisfactoria en todas las muestras, independientemente del material fúngico utilizado (esporas, rizomorfos, micelio en planta o micelio en cultivo).

Los cebadores elegidos amplificaron un fragmento de ADN de aproximadamente 900 pb de longitud (920 pb en el caso de *A. gallica* y *A. ostoyae*, y 875 pb para *A. mellea*), que se corresponde con la región IGS situada entre el final 3' del ARN de la subunidad ribosomal grande y el final 5' del gen del ARN ribosómico 5S (Harrington and Wingfield, 1995; Baur et al, 1998; Prospero et al, 1998). La diferencia en el tamaño del fragmento de ADN amplificado entre las tres especies no es suficiente para diferenciarlas, siendo un criterio inexacto para utilizar de forma rutinaria en cualquier diagnóstico (Pérez et al., 1999). Es por esto que se hace necesario complementar la técnica PCR con el análisis RFLP.

El análisis de la longitud de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima AluI en las muestras en las que hubo amplificación dió lugar a 3 patrones diferentes:

- 320-155 pb, que se corresponde con la especie *Armillaria mellea* (patrón 2).
- 400-240-190 pb, que se corresponde con la especie *Armillaria gallica* (patrón 1).
- 310-200-135pb, que se puede corresponder con *Armillaria ostoyae*, *Armillaria borealis* (patrón 1) y *Armillaria cepistipes* (patrón 2).

En la Fig. 7, se muestran las bandas de restricción obtenidas con la enzima AluI en ocho de las muestras estudiadas, mostrando cuatro de ellas el patrón que se corresponde con *A. mellea* y las otras cuatro, el patrón de *A. gallica*. En la Fig. 8, también con la enzima AluI, se observa el patrón de *A. mellea* en siete muestras mientras que una de ellas presenta el patrón c. En esta muestra y en todas las que presentaron el patrón c, se analizaron además los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas BsmI y NdeI. La enzima NdeI cortó el ADN en dos fragmentos de 550 y 370 pb, mientras que con la enzima BsmI aparecieron dos fragmentos de 620 y 300 pb. Comparando nuestros resultados con los de Harrington y Wingfield (1995) y Pérez et al.

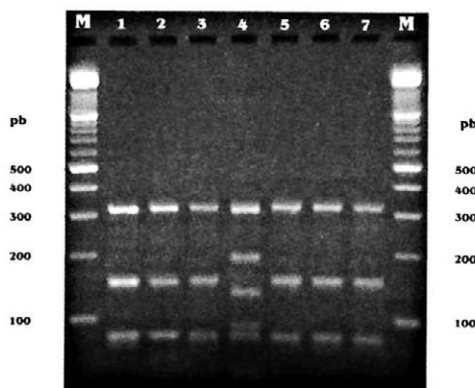


Figura 8: Bandas de restricción de aislamientos de *Armillaria* sp. en siete de las muestras estudiadas, tras el tratamiento con la enzima AluI y electroforesis en gel de agarosa. Mediante el análisis con las enzimas NdeI y BsmI, se confirmó que el patrón RFLP de la calle 4 correspondía a *Armillaria ostoyae*. Las otras seis calles muestran el patrón de *Armillaria mellea*. M= marcador de 100 pb.

(1999), confirmamos que el patrón c se correspondía con la especie *Armillaria ostoyae*. Hay que señalar que los análisis RFLP realizados con la enzima BsmI se hicieron siempre por duplicado, aún para cada repetición de la muestra, ya que algunas veces esta enzima no reconoce algunas cepas de *Armillaria ostoyae* (Harrington and Wingfield, 1995).

Las especies de *Armillaria* identificadas en los diferentes cultivos, tras el análisis de PCR-RFLP, se relacionan en el cuadro 3. Se han detectado tres de las siete especies descritas en Europa. En la mayor parte de las muestras analizadas, se identificó la especie *Armillaria mellea*, localizada en un amplio rango de hospedadores (ornamentales, frutales, frondosas y vid). Resultados similares encuentran otros autores, como Risbeth (1982) en el sur de Inglaterra o Sicoli et al. (1993) en el sur de Italia.

Armillaria ostoyae solo se identificó en tres de las muestras, concretamente en muestras sintomáticas de pino. Esta especie de *Armillaria* parece tener cierta afinidad por las coníferas, como lo apoyan nuestros resultados y también los de Risbeth (1982), Legrand y Guillaumin (1993) y Termorshuizen y Arnold (1994).

En cinco de las muestras se detectó la presencia de *A. gallica*, que ha sido aislada, sobre distintas especies, en varios países europeos (Risbeth, 1982; Sicoli et al., 1993; Termorshuizen y Arnold, 1994). Es interesante resaltar que, en el presente estudio, se observó la presencia de *A. gallica* en vid (además de *A. mellea*) cuando, en otros países con zonas vitivinícolas importantes (Francia, Italia, Portugal), la única especie aislada que se menciona, hasta la fecha, ha sido *A. mellea* (Guillaumin, 1986). Aunque el comportamiento patológico de *A. gallica* está determinado como saprófito o parásito de debilidad, sería interesante comprobar cual es realmente su actividad en los viñe-

dos gallegos.

En todos los estudios mencionados sobre las especies de *Armillaria* encontradas en Europa, la identificación del hongo se ha realizado mediante el método de compatibilidad. Es excepción el trabajo de Prospero et al. (1998) en el que ya se utiliza la técnica PCR para determinar las especies de *Armillaria* aisladas en vid. La tendencia actual es la de utilizar la técnica PCR para la identificación, como lo demuestran las recientes publicaciones de Baur et al. (1998) y de Pérez et al. (1999).

En conclusión, con este trabajo se ha conseguido poner a punto la técnica PCR-RFLP, con o sin extracción previa del ADN, para la identificación rápida, en un día, y fiable de especies de *Armillaria* en muestras sintomáticas. Este género ha causado numerosos problemas taxonómicos a lo largo de los años por no disponer de un sistema claro para la determinación de las especies, ya que, con la metodología de identificación más utilizada hasta este momento, el método de compatibilidad, se obtienen resultados muy ambiguos y se necesitan entre 4 y 5 semanas. La determinación por PCR se puede hacer, además, a partir de esporas, rizomorfos, micelio aislado en placa o directamente del micelio situado entre la corteza y la madera de una planta afectada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con un proyecto INTERREG II. Los autores queremos agradecer al Dr. Jean Jacques Guillaumin (INRA, Clermont Ferrand, Francia) el proporcionarnos las cepas haploides control de *A. mellea* y *A. gallica*. Nuestro agradecimiento también para Ana Pérez (Royal Horticultural Society, Inglaterra) por su ayuda en la puesta a punto de la técnica PCR-RFLP.

Abstract: Several methods based on the use of the polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) have been tested to identify *Armillaria* species in symptomatic samples from different cultivated plants in Galicia. DNAr extraction with a commercial kit, followed by DNA amplification with the "Ready to Go PCR beads", was the most efficient method to get amplified DNA and showed also the best results from an economic point of view. The PCR-amplified DNAr was then cut by three enzymes (AluI, NdeI and BsmI), the restriction fragments obtained allowing the identification of *Armillaria* species in only one day whatever the fungal structure analyzed: spores, mycelium on wood, mycelium in culture or rhizomorphs. Three *Armillaria* species were identified in samples: *Armillaria mellea* and *Armillaria ostoyae*, both highly aggressive pathogens, and *Armillaria gallica*, considered saprophyte or weak parasite.

Keywords: *Armillaria* spp., DNA, identification, PCR, restriction fragments (RFLP)

REFERENCIAS

- ANDERSON J.B. y STASOVSKI E. 1992. Molecular phylogeny of Northern Hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84: 505-516.
- BAUR M., BLAUENSTEIN H., HEINIGER U. Y RIGLING D. 1997. Evaluation of a PCR-based identification method for *Armillaria* species occurring in Switzerland. En: Root and Butt Rots of Forest Trees (9th International Conference on Root and Butt Rots). INRA Editions, Les Coloques n° 89: 435. Carcans, France.
- BRAGALONI M., ANSELMINI N. y CELLERINO G.P. 1997. Identification of european *Armillaria* species by analysis of isozyme profiles. *European Journal of Forest Pathology* 27: 147-157.
- DUCHESNE L.C. y ANDERSON J.B. 1990. Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria*. *Mycological Research* 94: 266-269.
- EDEL V. 1998. Use of PCR and RFLP in fungal systematics. En: Chemical Fungal Taxonomy. Eds. J.C. Frisvad, P.D. Bridge y D.K. Arora. pp. 51-76. Marcel Dekker, Inc. USA.
- GUILLAUMIN J.J. y BERTHELAY S. 1981. Détermination spécifique des Armillaires par la méthode des groupes de compatibilité sexuelle. Spécialisation écologique des espèces françaises. *Agronomie* 1 (10): 897-908.
- GUILLAUMIN J.J. 1986. Le pourridie. *Phytoma* 382, 321-341.
- HARRINGTON T.C. y WINGFIELD B.D. 1995. A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* 87 (2): 280-288.
- HENSON J.M. y FRENCH R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31: 81-109.
- KORHONEN K. 1978. Interfertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. *Karstenia* 18: 31-42.
- LEGRAND P. y GUILLAUMIN J.J. 1993. *Armillaria* species in the forest ecosystems of the Auvergne (Central France). *Acta Ecologica* 14 (3): 389-403.
- LUNG-ESCAUMANT B., MOHAMMED C. y DUNEZ J. 1985. Nouvelles méthodes de détermination des Armillaires européens: Immunologie et électrophorèse en gel de polyacrylamide. *European Journal of Forest Pathology* 15: 278-288.
- MARTIN M.P. y TORRES E. 1998. Evaluación de los métodos de extracción y amplificación del DNA por PCR para la detección de fitoplasmas en viña. Libro de Resúmenes del IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Ed. Sociedad Española de Fitopatología. Salamanca. p. 83.
- PÉREZ A., WHITEHEAD D. y WHITEHEAD M. 1999. Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species. *Mycological Research* 103: 1631-1636.
- PRIESTLEY R., MOHAMMED C. y DEWEY F.M. 1994. The development of monoclonal antibody-based ELISA and dipstick assays for the detection and identification of *Armillaria* species in infected wood. En: Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification. Eds. A. Schots, F.M. Dewey y R. Oliver. pp:149-156. CAB-International. Oxford, UK.
- PROSPERO S., RIGLING D., GIUDICI F. y JERMINI M. 1998. Détermination des espèces d'armillaire responsables du pourridié-agric de la vigne au Tessin. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 30 (5): 315-319.
- RISHBETH J. 1982. Species of *Armillaria* in southern England. *Plant Pathology* 31: 9-17.
- ROLL-HANSEN F. 1985. The *Armillaria* species in Europe. A literature review. *European Journal of Forest Pathology* 15: 22-31.
- SICOLI G., LUISI N. y MANICONE R.P. 1993. *Armillaria* species occurring in southern Italy. En: Proceedings of the Eighth International Conference on Root and Butt Rots. Eds. M. Johansson y J. Stenlid. pp. 383-387. Wik (Suecia) y Haikko (Finlandia).
- TERMORSHUIZEN A.J. y ARNOLDS J.M. 1994. Geographical distribution of the *Armillaria* species in The Netherlands in relation to soil type and hosts. *European Journal of Forest Pathology* 24: 129-136.
- VELDMAN G.M., KLOOTWIJK J., de REGT V.C.H.F. y RUDI R.J. 1981. The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. *Nucleic Acids Research* 9: 6935-6952.
- WATLING R., KILE G.A. y BURDSALL H.H. JR. 1991. Nomenclature, taxonomy and identification. En: *Armillaria* Root Disease. United States Department of Agriculture. Forest Service. Agriculture Handbook n° 699: 1-9.
- WORRAL J.J. 1991. Media for selective isolation of Hymenomycetes. *Mycologia*, 83 (3), pp.296-302.