

Podredumbre cúbica en *Cupressus macrocarpa* causada por *Laetiporus sulphureus*

M. P. MARTÍN, F. GARCÍA-FIGUERES y C. MONTÓN

Mediante métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y a partir de micelio estéril, se ha identificado a *Laetiporus sulphureus* como el agente causante de la podredumbre cúbica en *Cupressus macrocarpa*. Se describen los protocolos de extracción, amplificación y secuenciación utilizados.

M.P. MARTÍN. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Plaza de Murillo 2, 28014 Madrid.
F. GARCÍA-FIGUERES y C. MONTÓN. Unitat Sanitat Vegetal, Servei de Sanitat Agrària. Via Circulació Nord, Tram VI, Cant. C/3, Zona Franca, 08040 Barcelona.

Palabras clave: *Cupressus macrocarpa*, *Laetiporus sulphureus*, ITS rDNA, PCR, secuenciación.

INTRODUCCIÓN

En enero de 1999, se observó en los parques y jardines de Barcelona un debilitamiento de los cipreses de Monterey (*Cupressus macrocarpa* Hartweg). Tras varios análisis, no se observó ningún signo apreciable para su diagnóstico y se decidió arrancar los árboles afectados. Se hicieron secciones del tronco, observándose síntomas de podredumbre cúbica, similares a los descritos por GOIDADNICH (1964) en coníferas, principalmente abetos, producidos por *Gyrophana lacrymans* (Wulf.) Pat.

Las técnicas moleculares basadas en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), son una herramienta muy buena para la detección e identificación de distintos patógenos de plantas, tal y como queda reflejado en algunos de los últimos trabajos publicados en *Mycological Research* sobre métodos rutinarios para la identificación de las especies de *Armillaria* (PÉREZ SIERRA, WHITEHEAD y WHITEHEAD, 1999) o el diseño de iniciadores específi-

cos para la detección de *Verticillium dahliae* Kleb. (LI et. al., 1999). Desde 1998, estas técnicas se han incorporado en el Laboratorio de Sanidad Agraria (Generalitat de Catalunya) para la identificación y seguimiento de distintos patógenos como, los agentes que producen la enfermedad conocida como "la aceituna jabonosa" (MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES, 1999). En este trabajo describimos los métodos de extracción, amplificación y secuenciación que nos han permitido llegar a la identificación del hongo causante de la podredumbre cúbica en los cipreses analizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción del DNA

A partir de unos 20 mg de micelio aislado de las secciones del tronco de uno de los cipreses afectados por la podredumbre cúbica (Fig.1) se efectuó la extracción del DNA mediante un kit comercial (E.Z.N.A. Fungal® DNA Miniprep Kit, Omega Bio-



Fig. 1. - Detalle del tronco de uno de los cipreses afectado por la podredumbre cúbica.

tech). Se siguieron las instrucciones del fabricante, pero sin añadir β -mercaptoetanol ni RNase (MARTÍN y GARCÍA-FIGUERES, 1999). El DNA se resuspendió en 100 μ l de agua estéril (FLUKA, Ref. 95395).

Amplificación del DNA

Se emplearon el par de iniciadores ITS1F/ITS4 (WHITE *et al.*, 1990; GARDES y BRUNS, 1993), para obtener copias de la región de transcripción interna 1 (ITS1), de la subunidad 5.8S y de la región de transcripción interna 2 (ITS2) del rDNA. Las amplificaciones de las extracciones se efectuaron por duplicado y mediante reacciones individuales con Ready-to-Go®PCR Beads (Amersham-Pharmacia Biotech) siguiendo las condiciones de amplificación mencionadas en MARTÍN y WINKA (2000). Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % (SERVA) en tampón TAE durante 30 min a 5 V cm^{-1} . El DNA se tiñó con bro-

muro de etidio incluido en los geles de agarosa (0.4 mg ml^{-1}).

Previo a efectuar las reacciones de secuenciación, los amplímeros se han purificado mediante un kit comercial (E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit (Omega-Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA se ha resuspendido en 40 ml de agua FLUKA estéril.

Secuenciación

Para cada amplímero purificado, se han secuenciado las dos cadenas por separado, con los iniciadores ITS1F e ITS4 y ABI Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit con AmpiTaq® DNA Polymerase (Perkin Elmer Applied Biosystem). Tras la reacción de secuenciación, se procedió a la purificación de los productos mediante acetato de sodio y alcohol, uno de los procedimientos recomendados por Perkin Elmer, para la posterior electroforesis en un Abi Prism 310 (Foster city, CA, USA).

Para obtener la secuencia consenso se procedió a comparar los electroferogramas de la secuencia directa (reacción de secuenciación con ITS1F) y la reversa-complementaria (reacción de secuenciación con ITS4) mediante el programa informático Sequence Navigator™ Sequence Comparison (Perkin Elmer). Posteriormente, se hizo una búsqueda de las secuencias consenso mediante BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) en el National Center of Biological Information (NCBI).

Las secuencias obtenidas en este estudio, se han comparado con secuencias homólogas obtenidas del Banco Genético (EMBL), mediante los programas informáticos Sequence Navigator™ Sequence Comparison (Perkin Elmer) y SeqAqq.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del micelio estéril, no fue posible identificar el patógeno; sólo la presen-

cia de fibulas nos confirmó que se trataba de un basidiomicete. FARR *et al.* (1989) mencionan 18 especies de basidiomicetes que afectan a cipreses; en particular, distintas podredumbres en los *Cupressus macrocarpa* de California son causadas por *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kumm., *Coniophora puteana* (Schum.: Fr.) Karst., *Gloephyllum sepiarium* (Wulf.: Fr.) Karst., *Postia stiptica* (Pers.: Fr.) Jül., *Steccherinum ochraceum* (Pers. apud Gmelin: Fr.) S.F. Gray y *Trametes versicolor* (Fr.) Pil.

Respecto al análisis molecular de los aislados de Barcelona, los amplímeros obtenidos presentaron una longitud de unas 550 bp. Los electroferogramas de las secuencias fueron muy buenos (Fig. 2), por lo que la secuencia consenso completa no presentó ambigüedades, sin "N". En la búsqueda en el Banco Genético (NCBI) mediante BLAST, cuatro secuencias pertenecientes a *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Mur. dieron el valor más alto de similitud; en dos de ellas, las secuencias con el número del Banco Genético AF068925 y AF068924, el valor E fue 0.0. Este valor indica que la probabilidad de que la similitud entre las secuencias sea debida al azar es 0. En particular, el alineamiento entre la secuencia consenso obtenida de nuestros aislados y la secuencia AF068925 (Fig. 3), muestra que ambas secuencias son casi idénticas; sólo se diferencian en las zonas ambiguas ("N") de AF068925. La secuencia consenso obtenida en este trabajo se ha depositado en el Banco Genético (EMBL) con el número de acceso AF229196.

En la Península Ibérica, de acuerdo con la base de datos bibliográfica consultada de Flora Micológica Ibérica (Lado, 2000), *Laetiporus sulphureus* se ha descrito creciendo en un amplio rango de huéspedes (149 citas publicadas), tanto de planifolios como de coníferas. En particular tres de ellas, mencionan a especies de *Cupressus* como huésped.

CONCLUSIÓN

Las técnicas moleculares aquí descritas son una muy buena herramienta, para llegar a la identificación de micelios estériles, sin

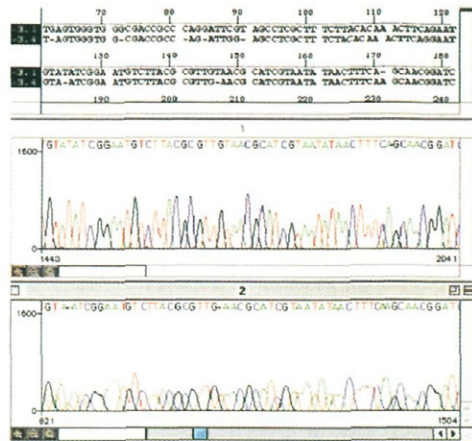
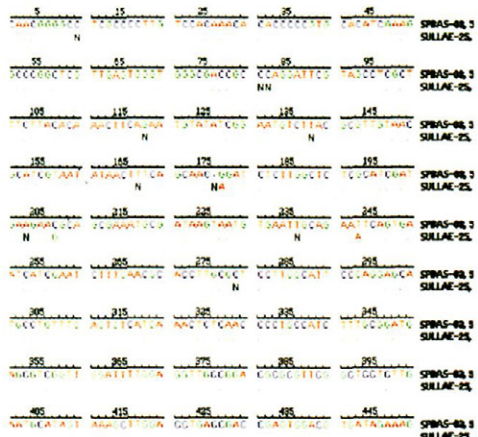


Fig. 2. - Secuencias obtenidas con el iniciador ITS1F (directa) y con el iniciador ITS4 (reversa complementaria), y sus electroferogramas.

La secuencia consenso se obtiene tras revisar los electroferogramas; en este caso el final de la región ITS 1 y el inicio (.A.ACTTTTCAGCAACGGAT) de la subunidad 5.8S del rDNA.



tener que esperar a la presencia de los cuerpos fructíferos que puedan aparecer durante las épocas favorables a lo largo del año. Aplicando estas técnicas, será posible detectar las infecciones causadas por agentes patógenos antes de que la enfermedad sea irreversible.

El hecho de que *Laetiporus sulphureus* haya sido citado creciendo en cipreses y el valor E obtenido entre AF229196 y AF068925, nos permiten concluir que *Laetiporus sulphureus* es el causante de la podre-

dumbre cúbica en los cipreses de Monterey analizados.

AGRADECIMIENTOS

Al departamento de Micología Forestal y Patología (SLU, Sweden), por poner a disposición de M.P.M. los reactivos y el ABI Prism 310 con el que se obtuvieron las nuevas secuencias de este estudio.

ABSTRACT

MARTÍN, M.P.; GARCÍA-FIGUERES, F. y MONTÓN, C., 2000: *Laetiporus sulphureus*, the causal agent of cubic heart rot in *Cupressus macrocarpa*. *Bol. San. Veg. Plagas* — : 00:00.

The molecular methods based on the Polymerase Chain reaction (PCR) have allowed to identified from steril mycelia to *Laetiporus sulphureus* as the casual agent of the heart rot in *Cupressus macrocarpa*. Extraction, amplification and sequencing protocols are described.

Key words: *Cupressus macrocarpa*, *Laetiporus sulphureus*, ITS rDNA, PCR sequencing.

REFERENCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAUMLEFFER, A.A.; ZHAN, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. y LIPMAN, D.J. 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, **25**: 3389-3402.
- FARR, D.F.; BILLIS, G.F.; CHAMURIS, G.P. y ROSSMAN A.Y. 1989: *Fungi on Plant and Plant Products in the United States*. A.P.S. Press
- GARDES, M. y BRUNS, T. 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**:113-118.
- GOIDANICH, G., 1964: *Manuale di patologia Vegetale*. Ed. Agricole. Bologna.
- LADO, C.; 2000: CENSOMYX: Base de datos de las citas ibéricas publicadas de Afiloforales. CSIC, Real Jardín Botánico.
- LI, K.-N.; ROUSE, D.I.; EYESTONE, E.J. y GERMAN, T.L., 1999: The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. *Mycological Research*, **103** (11): 1361-1368.
- MARTÍN, M.P. y GARCÍA-FIGUERES, F., 1999: *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology*, **103** (2): 203-208.
- MARTÍN, M.P. y WINKA, K., 2000: Alternative methods of extracting and amplifying DNA from lichens. *Lichenologist*. **32**(2): 189-196.
- PÉREZ SIERRA, A.; WHITEHEAD, D.S. y WHITEHEAD, M.P., 1999: Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species. *Mycological Research*. **103**(12): 1631-1636.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.B y TAYLOR, J.W., 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. (M.A. Innis, D.H. David, J.J. Shinsky & T.J. White, eds). 315-322. New York: Academic Press.

(Recepción: 31 enero 2000)
(Aceptación: 20 abril 2000)