

## Identificación molecular de *Oxyporus latemarginatus* (Basidiomycotina) en palmeras

M.P. MARTÍN, C. MONTÓN

La secuencia de las regiones ITS del rDNA obtenida de micelio estéril procedente de un tocón, ha permitido identificar a *Oxyporus latemarginatus* como el agente causante de la podredumbre en las palmeras de la especie *Phoenix canariensis*.

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

**Palabras clave:** *Phoenix canariensis*, podredumbre, ITS rDNA, PCR, secuenciación.

### INTRODUCCIÓN

En la Villa Olímpica de Barcelona se plantaron en 1991 palmeras procedentes del Maghreb. En enero de 1997, y tras unas fuertes tormentas, algunas de estas palmeras cayeron, sin mostrar signos previos de debilitamiento. Tal y como se muestra en la Fig. 1, cuando los troncos se cortaron transversalmente se observaron micelios blanquecinos. Por su estudio morfológico sólo se pudo precisar que las hifas pertenecían a un Basidiomicete.

De acuerdo con FARR *et al.* (1989), *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *A. tabescens* (Scop.) Emel, *Ganoderma zonatum* Murrill, *Oxyporus latemarginatus* (Durieu & Mont.) Donk y *Schizopora paradoxa* (Schrad.) Donk son los únicos basidiomicetes que producen podredumbre en las palmeras.

Como se demostró en trabajos previos (MARTÍN y GARCÍA-FIGUERAS, 1999; MARTÍN *et al.*, 2000), los métodos moleculares y, en particular, la secuenciación de determinadas

regiones del rDNA permiten detectar e identificar patógenos de plantas en muchas ocasiones con una seguridad del 100%. Nuestro objetivo en el presente estudio fue identificar, mediante dichas técnicas el hongo aislado de las secciones transversales de las palmeras.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Extracción del DNA

A partir de unos 20 mg de micelio aislado de una de las secciones de un tronco (muestra N° 27175 Unitat Sanitat Vegetal, depositada en parte en el herbario MA-Fungi 49406), se efectuó la extracción del DNA mediante un kit comercial diseñado para hongos de acuerdo con MARTÍN y GARCÍA-FIGUERAS (1999). El DNA se resuspendió en 100 µl de agua estéril ultrapura.

#### Amplificación y secuenciación del DNA

Las amplificaciones se efectuaron por duplicado mediante reacciones individuales

siguiendo las condiciones de amplificación mencionadas en MARTÍN y WINKA (2000). 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 se emplearon el par de iniciadores ITS1F/ITS4 (WHITE *et al.*, 1990; GARDES y BRUNS, 1993). Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % en tampón TAE durante 30 min a 5 V cm<sup>-1</sup>. El DNA se tiñó con bromuro de etidio incluido en los geles de agarosa (0.4 mg µl<sup>-1</sup>).

Previo a la reacción de secuenciación, y siguiendo las instrucciones del fabricante, los amplímeros se purificaron mediante columnas. El DNA se resuspendió en 40 µl de agua ultrapura estéril. Las dos cadenas de DNA se secuenciaron por separado con los iniciadores ITS1F e ITS4.

Para obtener la secuencia consenso y efectuar el análisis de la misma con secuen-

cias procedentes del GenBank (National Center of Biological Information, NCBI) hemos utilizado los programas y la metodología descritos en MARTÍN *et al.*, (2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como en otros estudios previos (MARTÍN *et al.*, 2000), a partir del micelio estéril, no fue posible identificar el patógeno; sólo la presencia de fíbulas nos confirmó que se trataba de un basidiomicete.

Respecto al análisis molecular, los amplímeros obtenidos presentaron una longitud de unas 800 bp. Los electroferogramas de las secuencias fueron muy buenos por lo que la secuencia consenso completa no presentó ambigüedades (sin "N"). Esta secuencia se ha depositado en el Banco Genético (EMBL) con el número de acceso AF232721. Al efectuar el análisis de comparación, mediante BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) la secuen-



Figura 1: Detalle del tronco de una de las palmeras afectadas.

cia de *Oxyporus lateromarginatus* (AF163047) dio el valor de similitud de E= 0.0. En la Fig. 2 se muestra el alineamiento obtenido tras la búsqueda BLAST entre la secuencia obtenida en este estudio y la de *O. lateromarginatus*.

**CONCLUSIÓN**

Aplicando técnicas moleculares ha sido posible identificar el micelio estéril aislado de los tocones como perteneciente a la espe-

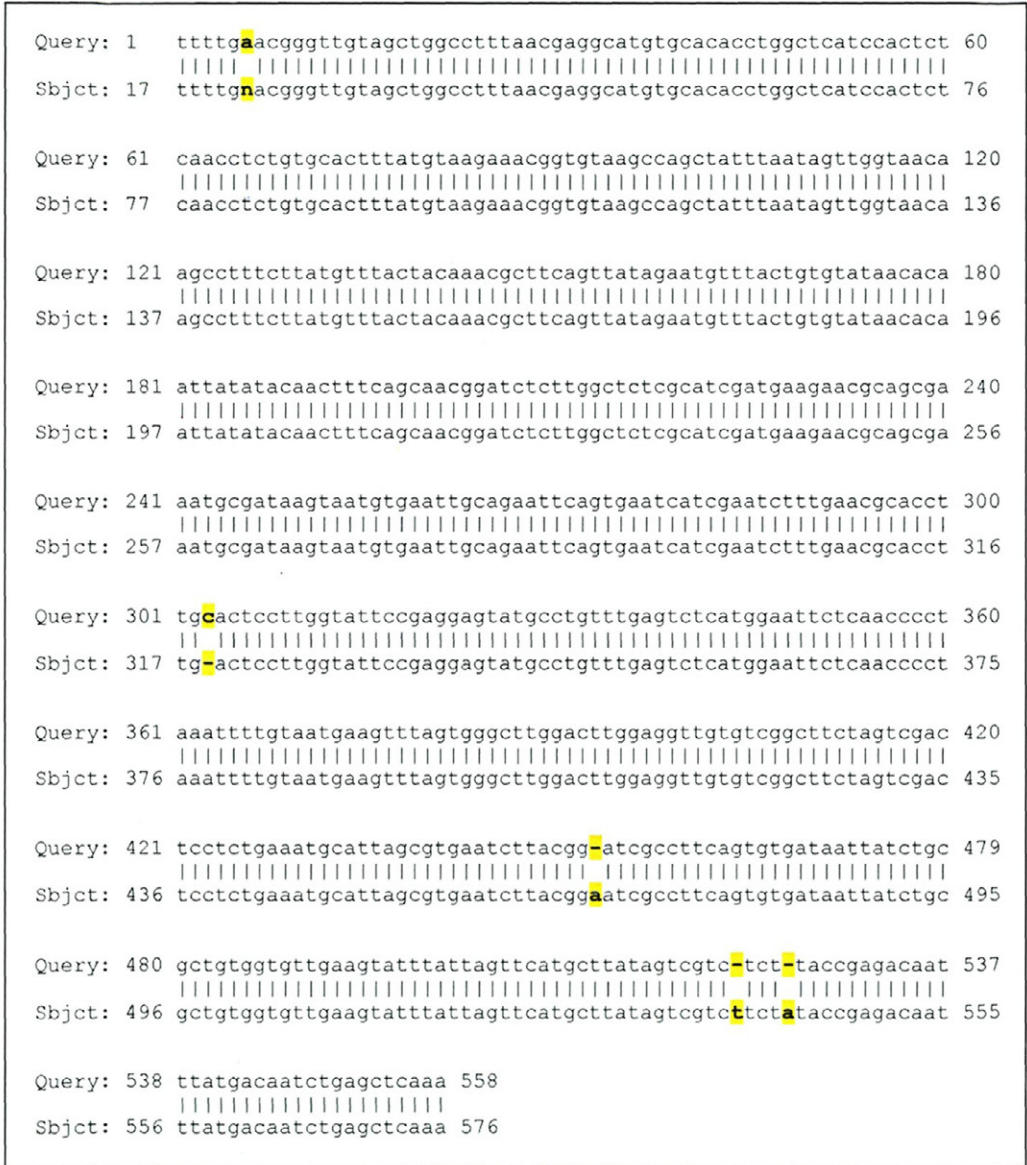


Figura 2: Alineamiento obtenido tras la búsqueda de BLAST, entre la secuencia del micelio aislado de las palmeras AF232721 (Query) y la secuencia homóloga de *Oxyporus lateromarginatus* AF068925 (Sbjct). En amarillo se indican las posiciones en las que difieren las dos secuencias.

cie *Oxyporus latemarginatus*. El hecho de que esta especie se ha citado como una de las causantes de la podredumbre en palmeras, y el alto porcentaje de similitud obtenido de las regiones ITS incluido la subunidad 5.8S del rDNA, nos permiten concluir que esta especie podría ser la causante de la podredumbre en las palmeras analizadas.

## 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., MONTÓN, C. 2004. Molecular identification of *Oxyporus latemarginatus* (Basidiomycotina) isolated from palms *Bol. San. Veg. Plagas* **30**: 93-96.

The ITS rDNA sequence obtained from steril mycelia has allowed to identify to *Oxyporus latemarginatus* as the causal agent of the wood rot in palms (*Phoenix canariensis*).

**Key words:** *Phoenix canariensis*, *Oxyporus latemarginatus*, wood rot, ITS rDNA, PCR, sequencing.

## REFERENCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, 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.; 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.
- 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.
- 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* **26**: 99-102.
- 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: 8 abril 2003

Aceptación: 22 septiembre 2003