



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería de Montes

Evaluación de la patogenicidad de
Heterobasidion annosum sobre *Picea abies*

Alumna: Claudia Pelegrín Carballo

Tutor: Julio Díez Casero

Septiembre 2014

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 DESCRIPCIÓN DEL HONGO PATÓGENO <i>HETEROBASIDION ANNOSUM</i> FR. BREF.	7
2.1.1 Taxonomía, hospedantes y distribución mundial.	8
2.1.2 Daños causados	11
2.1.3 Infección y ciclo biológico	11
2.1.4 Métodos de control.	13
2.2 EL HOSPEDANTE <i>PICEA ABIES</i> (L.) KARST.	15
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1 MATERIAL FÚNGICO	23
4.1.1 Aislamientos fúngicos	23
4.1.2 Subcultivo del hongo en medio de Extracto de Malta-agar.	23
4.1.3 Subcultivo del hongo en medio líquido (Hagem).....	25
4.2 MATERIAL VEGETAL.....	26
4.2.1 Esterilización de las semillas	26
4.2.2 Germinación de las semillas	27
4.3 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.....	27
4.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS.	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1 EVALUACIÓN DE LA NECROSIS EN LAS PLÁNTULAS DE <i>PICEA ABIES</i> TRAS LA INOCULACIÓN DE DISTINTOS AISLAMIENTOS DE <i>HETEROBASIDION PARVIPORUM</i>	33
5.2 MORTALIDAD GENERADA EN LAS PLÁNTULAS DE <i>PICEA ABIES</i>	42
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES.....	49
8. BIBLIOGRAFÍA	53

1. RESUMEN

La podredumbre radical es la enfermedad fúngica más dañina que afecta a la picea noruega (*Picea abies*) sobre todo en la zona sur de Finlandia. Aproximadamente en el 90% de los casos el agente causante de ello es un hongo patógeno llamado *Heterobasidion parviporum*. Este hongo, perteneciente a los basidiomicetos, tiene una importante repercusión económica y está ampliamente extendido en el hemisferio norte, afectando principalmente a coníferas. El objetivo de este estudio fue llevar a cabo una comparación del grado de virulencia producido por este patógeno (*Heterobasidion parviporum*) sobre picea noruega (*Picea abies*), trabajando para ello con aislamientos de origen finés y chino, debido a que así como en Finlandia supone un problema muy grave, en China parece no generar problemas y pérdidas tan importantes.

Con el fin de conocer el efecto de la inoculación de *H. parviporum* sobre plántulas de *Picea abies*, se establecieron tres puntos en el tiempo (3, 7 y 15 días) en los que se anotó la respuesta generada por la planta atendiendo al grado de la resultante necrosis en una escala de 0 a 4, siendo cero 0% de necrosis y cuatro 100% de necrosis, y se almacenó material fotográfico de cada plántula a través del microscopio. Se presupone que una mayor necrosis en la planta indica una mayor virulencia por parte del aislamiento fúngico determinado.

Se observó que las plántulas inoculadas presentaban con el paso del tiempo distintos grados de necrosis en la raíz mientras que en las utilizadas como control la necrosis fue nula. Además se observó una diferencia importante en cuanto a la patogenicidad entre unos aislamientos y otros, destacando por ser el más agresivo y causante de mayor mortalidad en las plántulas el aislamiento 03014 de origen finés con una diferencia significativa sobre los demás.

Los resultados indicaron que la patogenicidad de los aislamientos de origen chino es baja mientras que en los aislamientos de origen finés es bastante más elevada, llegando a generar este aislamiento un 40,7% de mortalidad. Pese a su extensa documentación, siguen existiendo muchos aspectos con respecto a este hongo que conviene ser estudiados en un futuro con el fin de llegar a conocer profundamente este patógeno forestal para su apropiado control.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Descripción del hongo patógeno *Heterobasidion annosum* Fr. Bref.

Heterobasidion annosum sensu lato (s.l.) es un hongo basidiomiceto perteneciente al orden Aphyllophorales de la familia Bondarzewiaceae (GARBELOTTO & GONTHIER, 2013). Este hongo fue descrito por primera vez por Fries en 1821, bajo el nombre de *Polyporus annosum*. Fue vinculado a las enfermedades de coníferas por Hartig en 1874, y re-nombrado *Fomes annosus* por H. Karsten. En 1888 Brefeld dio al hongo su nombre actual, *Heterobasidion annosum* (KOHL, 2007).

El complejo de especies de *Heterobasidion annosum sensu lato* consiste en cinco especies: tres de ellas aparecen en Europa (*Heterobasidion annosum sensu stricto*, *H. parviporum* y *H. abietinum*) y dos en Norte América (*H. irregulare* y *H. occidentale*) todas ellas con diferentes aunque parcialmente superpuestas preferencias de hospedante (DALMAN *et al.*, 2010).

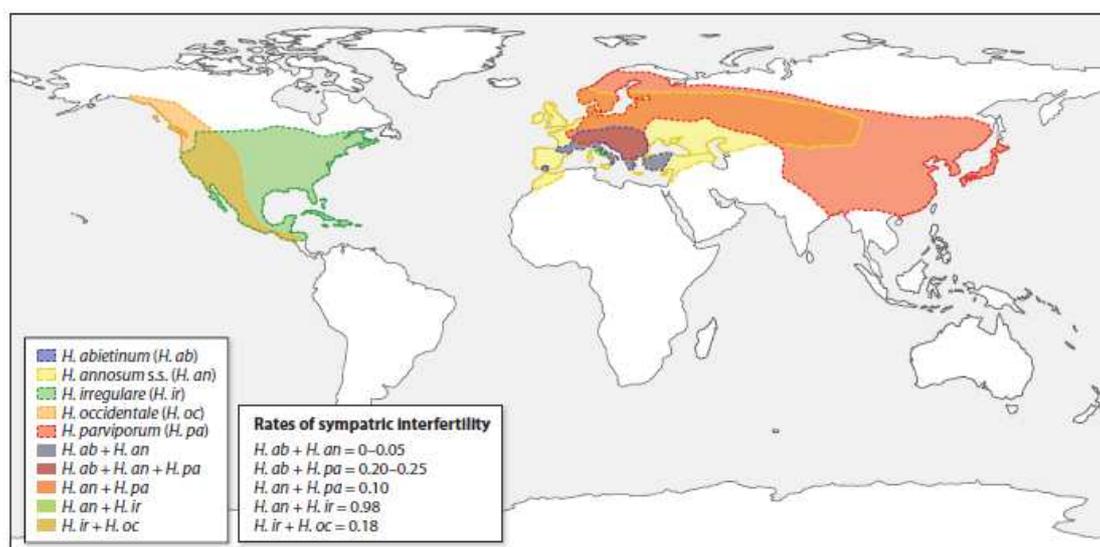


Figura 1. Distribución mundial de las especies de *Heterobasidion annosum s.l.* en relación con los diferentes grupos de interesterilidad (GARBELOTTO & GONTHIER, 2013).

El género *Heterobasidion* incluye algunos de los patógenos más virulentos de coníferas del mundo. En los últimos 40 años, *H.annosum s.l* ha sido objeto de más de 1.700 documentos científicos, lo que le convierte en uno de los patógenos forestales más intensivamente estudiados. La secuencia completa del genoma está disponible hoy en día, siendo así el primer patógeno basidiomiceto secuenciado (OLSON *et al.*, 2012).

Los cuerpos fructíferos de este hongo, llamados basidiocarpos, se crean a partir del micelio y son blanquecinos alrededor de los márgenes y de color marrón oscuro en la cara superior. Los basidiocarpos son aproximadamente 40 cm de diámetro y 3,5 cm de espesor. La superficie inferior del cuerpo fructífero está formada por poros visibles de entre 5 mm y 26 mm. Las esporas sexuales se crean a partir de los basidiocarpos, y son llamadas basidiosporas. En cambio, las conidiosporas ocurren en la etapa asexual y se producen en los conidióforos.



Figura 2. Cuerpos fructíferos (basidiocarpos) de *Heterobasidion annosum* que suelen ubicarse en la parte basal del tronco (KOHL, 2007).

2.1.1 Taxonomía, hospedantes y distribución mundial.

Heterobasidion annosum s.l es un patógeno con grandes repercusiones económicas cuyos huéspedes preferentes son las coníferas, aunque el hongo está considerado como polífago, estando descrito sobre al menos 200 especies diferentes en 31 géneros de coníferas, incluyendo *Abies*, *Acer*, *Larix*, *Malus*, *Picea*, *Pinus*, *Populus*, *Prunus*, *Quercus*, *Sequoia*... así como en alguna frondosa tales como *Alnus glutinosa* (Aliso), *Populus tremula x tremuloides* (Chopo), *Quercus robur* (Roble albar) y *Betula pendula* (Abedul) (JIMÉNEZ *et al.*, 2007).

En un principio, todos los hongos que compartían la ecología y morfología de este hongo eran clasificados como *Heterobasidion annosum*. Sin embargo, a través de ciertos experimentos y estudios se determinó la existencia de varios grupos de interesterilidad (Ig), tres de ellos se encuentran presentes en Europa:

Grupo P (*Heterobasidion annosum sensu stricto*, ataca preferentemente al género *Pinus*).

Grupo S (*H. parviporum* con preferencia por *Picea abies* como hospedante).

Grupo F (*H. abietinum* con preferencia por *Abies alba* como hospedante).

(KOHL, 2007).

Sin embargo, hay que decir que esta división no es absoluta. Así, en los bosques fineses, tanto *H. annosum* como *H. parviporum* son capaces de colonizar *Picea abies*, pero *H. annosum* lo hace con mucha menos frecuencia en comparación con *H. parviporum*. De hecho, *H. parviporum* se encuentra aproximadamente con una frecuencia 10 veces mayor que *H. annosum* en los bosques de píceas del sur y oeste de Finlandia (KORHONEN & PIRI, 1994). En general, este patógeno se encuentra muy extendido por el hemisferio norte (Figura 3) y como ya hemos dicho antes, se presenta con mayor frecuencia en gimnospermas (KOHL, 2007).

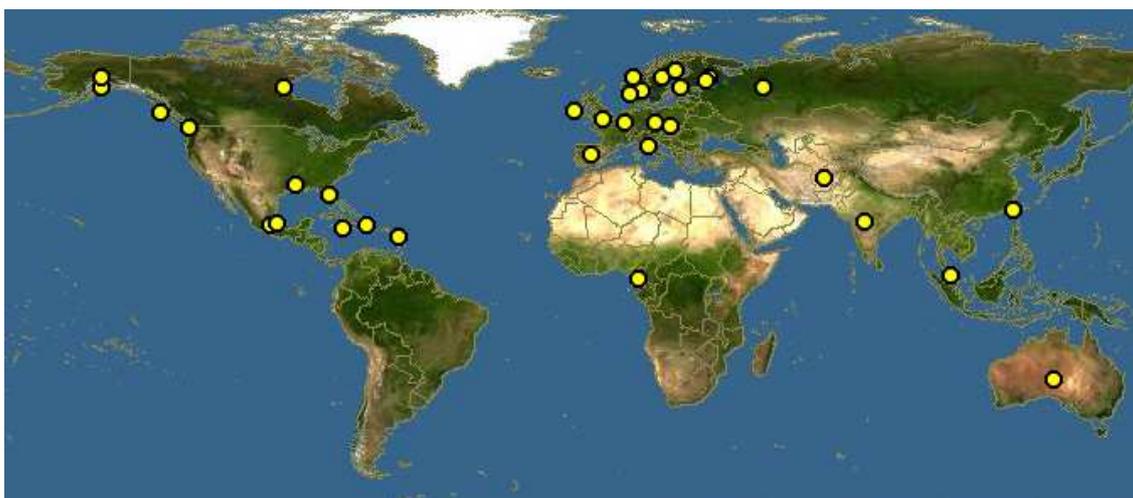


Figura 3. Países en los que se ha confirmado la existencia de *Heterobasidion annosum* s.l (Pickering, John. "Discover Life". 24 Mayo 2014. Disponible en web: <http://www.discoverlife.org/mp/20q>.

Los resultados de varios estudios indican que *H. parviporum* tiene también una amplia distribución en el territorio chino (Figura 4). Se aprecia una estrecha franja en la distribución de las principales especies hospedantes (*Abies* y *Picea*) entre el nordeste y la China central, y este espacio parece ser más una consecuencia de talas forestales intensivas que se han ido llevando a cabo durante siglos que una ausencia en la distribución natural de estos árboles (WU, 1999).

Las coníferas nativas que actúan como hospedante de *H. parviporum* en China son numerosas. Se incluyen sobre todo especies de *Abies* y *Picea* pero también de *Tsuga*, *Larix* y *Pinus*. Además de las coníferas, este hongo ha sido determinado en *Populus* muertos en la provincia de Jilin (DAI & KORHONEN, 1999; DAI *et al.*, 2003).

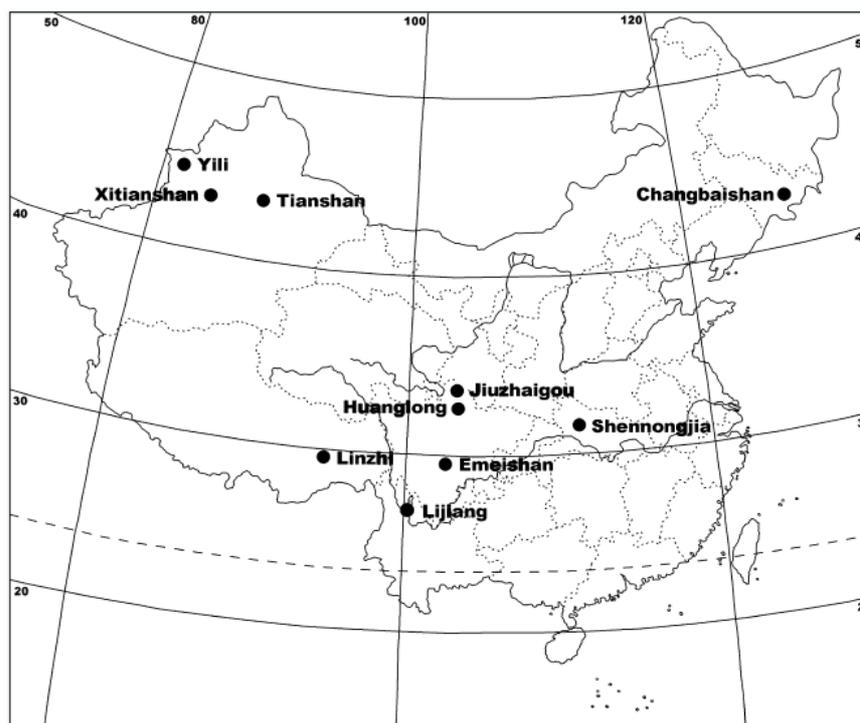


Figura 4. Registros de *Heterobasidion parviporum* en China (DAI *et al.*, 2006).

En España la magnitud de su incidencia hasta ahora es desconocida, aunque sí que es cierto que cada vez aparecen más citas de *Heterobasidion* spp (PRIETO-RECIO *et al.*, 2013). En la Península se está determinando una trascendencia considerable en *Pinus pinaster*. En los últimos años, este pino mediterráneo ha ido decayendo y elevándose su mortalidad en muchos bosques del centro de la Península Ibérica, como parecen indicar los test de patogenicidad desarrollados (PRIETO-RECIO *et al.*, 2013). Hoy en día ya hay varios focos y su posible expansión es rápida, eficaz y peligrosa. Algunos estudios recientes en el País Vasco lo han detectado en *Pinus radiata*, *P. sylvestris*, *P. pinaster*, *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies* donde podría suponer un problema mayor de lo que se creía hasta ahora (MESANZA & ITURRITXA, 2013).

Además, los daños en *Abies pinsapo* causados por el grupo F de *Heterobasidion annosum* son relevantes en nuestro país al estar desarrollándose en áreas emblemáticas de la Península Ibérica como la Sierra de las Nieves (Málaga), Sierra de Grazalema (Cádiz) y Los Reales de Sierra Bermeja (Málaga) según muestra un censo de focos de dicho hongo (NAVARRO CERRILLO *et al.*, 2003).

2.1.2 Daños causados

La podredumbre de la raíz causada por el basidiomiceto *Heterobasidion annosum s.l* genera unas pérdidas económicas en Europa que se estiman en 800 millones de euros anuales (WOODWARD *et al.*, 1998).

Este patógeno puede provocar la muerte de los pies afectados a la vez que severas pérdidas en su volumen maderable. En general, los pies infectados sufren problemas de anclaje, a causa de la degradación de sus raíces gruesas de sujeción, con lo que quedan predispuestos al derribo por efecto del viento o del peso de la nieve (SMITH *et al.*, 1992), siendo ésta la causa principal de muerte de los árboles afectados. Los basidiomicetos consumen en primer lugar la lignina, y después la celulosa y la hemicelulosa, siendo capaces de destruir con el tiempo la estructura completa de la madera (RAYNER & BODDY, 1988).

De acuerdo con las estimaciones de KORHONEN *et al.*, (2010), el 75% de los daños causados en píceas noruegas (*Picea abies*) en Finlandia son debidos a *Heterobasidion parviporum*.

Uno de los problemas es que este hongo muestra síntomas aéreos en el árbol infectado cuando ya lleva un tiempo instalado en la raíz y además estos síntomas son genéricos y carecen de valor de diagnóstico, ya que otros patógenos pueden producir síntomas similares (NAVARRO CERRILLO *et al.*, 2003). Por ello se asume que si dicho hongo está establecido en un determinado rodal, habrá bastantes más árboles afectados de los que pueden estimarse a simple vista (SINCLAIR *et al.*, 1987). Generalmente el desarrollo de la enfermedad presenta distinto aspecto en función de la especie afectada; de hecho, todos los árboles atacados presentan podredumbre radical, pero las siguientes fases de la colonización varían en función del huésped (JIMÉNEZ *et al.*, 2007).

2.1.3 Infección y ciclo biológico

H. annosum s.l. puede colonizar árboles tanto muertos como vivos (OLSON Å., 2012), aunque tiene menos posibilidades de vegetar en el suelo y de colonizar materiales leñosos ya muertos debido a la competencia de la microflora saprófita (JIMÉNEZ *et al.*, 2007).

En la mayoría de los casos *H. annosum s.l* no tiene capacidad de infectar árboles sanos intactos debido a sus métodos de resistencia activa y pasiva; sin embargo, es un colonizador con gran éxito en superficies frescas de madera (REDFERN & STENLID, 1998).

Prácticas habituales de la gestión forestal, tales como las claras o la corta final, son aprovechadas por este hongo para colonizar los tocones, principal punto de entrada a través del cual llevadas por el viento las basidioesporas de *H. annosum s.l* infectan el material maderable existente en nuevas áreas (REDFERN & STENLID, 1998). A través de los injertos que existen entre las raíces de los árboles, el hongo coloniza árboles vivos y se expande por toda la masa mediante las raíces (REDFERN & STENLID, 1998). Cuando se realiza una repoblación o se regenera el bosque, los pies jóvenes se infectan al entrar en contacto con los restos de tocones y sistemas radicales infectados de la rotación anterior (STENLID, 1987). El grado de enfermedad puede incrementar rotación tras rotación si no se aplican las medidas de control adecuadas.

El hongo tiene la capacidad de infectar células vivas, lo cual le da una ventaja sobre otros hongos que compiten con él (RAYNER & BODDY, 1988). Hay un periodo limitado de susceptibilidad en el que la infección es posible: tocones de picea europea permanecen susceptibles durante menos de un mes (REDFERN & STENLID, 1998) a partir del cual la competición con otros hongos como *Phlebiopsis gigantea* es demasiado fuerte para que sobreviva *H. annosum s.l*, por ello se utiliza este hongo entre otros como controlador biológico.

H. annosum s.l no puede crecer en el suelo, pero es capaz de sobrevivir durante décadas en las raíces, de infectar árboles vecinos e incluso de infectar plántulas de la siguiente generación (REDFERN & STENLID, 1998). La temperatura y la humedad son los factores principales que influyen en la producción de basidioesporas (REDFERN & STENLID, 1998). En climas boreales, *H. annosum s.l* produce basidioesporas principalmente durante el verano, ya que se encuentran inactivas a temperaturas bajo cero (KALLIO, 1970). En condiciones de humedad, el hongo también produce conidioesporas (KORHONEN & STENLID, 1998). Hay dos grandes diferencia entre basidioesporas y conidioesporas:

- 1) Las conidioesporas asexuales tienen menos diversidad genotípica que la basidioesporas ya que en éstas la reproducción es sexual, a través de meiosis.
- 2) La producción de basidioesporas en el basidiocarpo es más efectiva que la de las conidioesporas en los conidióforos (KORHONEN & STENLID, 1998).

Si comparamos con otros políporos, veremos que es inusual que se formen conidióforos (KORHONEN & STENLID, 1998); permitiendo de esta manera que las hifas de *H. annosum* s.l. sean fácilmente reconocibles.



Figura 5. Conidióforos de *H. parviporum* visibles en las raíces de plántulas de *Picea abies* inoculadas con un aislamiento de origen finés de dicho hongo con el detalle de los conidióforos de la fase anamórfica (*Spiniger* spp.) del hongo en distintos aumentos.

2.1.4 Métodos de control.

La prevención es la mayor estrategia para controlar *Heterobasidion annosum*. Después de apearse el árbol, y sobre todo cuando las operaciones forestales coinciden con los períodos de esporulación, los tocones deberían ser inmediatamente tratados con agentes de control químico o biológico. Tetraborato de sodio decahidratado (BORAX), octoborato de sodio tetrahidratado (DOT), urea o el hongo de control biológico *Phlebiopsis gigantea* han probado ser efectivos y ampliamente usados en las

prácticas forestales dentro de los programas de tratamiento de tocones manual o mecánicamente (GARBELOTTO & GONTHIER, 2013).

Phlebiopsis gigantea es un hongo saprófito utilizado como ya hemos dicho para el control biológico de *H. annosum* con un interesante modo de acción. Las hifas de este hongo antagonizan las hifas de *Heterobasidion spp.* (y de otros hongos) a través del contacto, dicho fenómeno es conocido como “interferencia hifal”. Cualquier hifa de *H. annosum* que contacta con una hifa de *P. gigantea* muestra una rápida y localizada disrupción: el protoplasma se desorganiza y la integridad de su membrana es afectada. En la siguiente foto (Figura 6) se puede observar como las hifas de *H. annosum* han crecido hacia las hifas de *P. gigantea* y han absorbido el tinte añadido en el plato de agar, mientras que si la integridad de la membrana fuera normal excluirían este tinte (DEACON, 2006).

Varias formas de actuación han sido identificadas en el control biológico a través de hongos (BRIMNER & BOLAND, 2003). Así, la supresión del patógeno puede llevarse a cabo a través de ataque directo (micoparasitismo) o mediante la secreción de metabolitos antibióticos por el agente del control biológico. Además, el uso de estos hongos de control puede reducir el crecimiento del patógeno mediante la competición por recursos o interacciones mutualistas con la planta hospedante. Un análisis de ADOMAS & ASIEGBU (2006) confirma que es la competición por los recursos el principal modo de interacción entre *H. parviporum* y *P. gigantea* (ciertas proteínas presentes entre los nutrientes destacaron por ser la razón principal de esta competitividad).

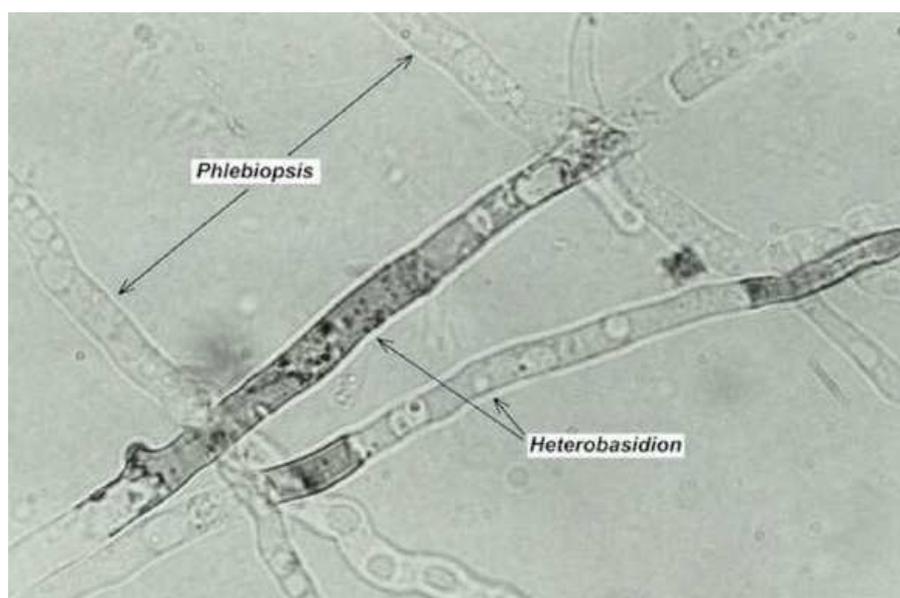


Figura 6. Interferencia hifal de *H. annosum* con *P. gigantea* in vitro (DEACON, 2006).

Si bien *P. gigantea* es el más conocido y el que mejor respuesta ha mostrado en numerosos estudios, existen otros hongos para el control biológico de *Heterobasidion* como son *Botrytis cinerea*, *Glioceladium deliquescens*, *Trichoderma viride* o *Verticicladiella procera*. (Interesante vídeo de Jonás Oliva, enlace web: <http://vimeo.com/16208138>).

La cara interna de la corteza es colonizada por el hongo que poco a poco se va extendiendo hacia el sistema vivo de raíces y posteriormente invade la albura (KARLSSON & SWEDJEMARK, 2004). *H. annosum s.l* tiene la habilidad de producir ciertos metabolitos que inhiben la biosíntesis de proteínas en el protoplasma de *Picea abies* (KARLOVSKY, 1999). Sin embargo, los árboles también son capaces de defenderse ellos mismos, y el hongo deberá traspasar esas defensas que pueden ser constitutivas e inducidas. Las constitutivas están presentes en todas las células e incluyen barreras químicas y/o morfológicas que previenen la penetración y colonización de hongos. Las defensas inducidas se activan con la presencia del patógeno (MERRILL, 1992).

De acuerdo con SWEDJEMARK (1995), los compuestos fenólicos de la corteza de *Picea abies* tienen un efecto inhibitor en la germinación de esporas y el crecimiento hifal. En gimnospermas las heridas o la infección estimula la producción de resina (PEARCE, 1996). El duramen de *Picea abies* contiene menos cantidades de oleoresinas y otras sustancias inhibitoras, en comparación por ejemplo con *Pinus sylvestris* lo que la convierte en una especie más susceptible a la pudrición del interior de la madera (SHAIN, 1971).

2.2 El hospedante *Picea abies* (L.) Karst.

Picea abies, la píceas común, píceas de Noruega o píceas europea (en inglés conocida como Norway Spruce) es una conífera de la familia de las pináceas que no pertenece realmente al género *Abies*, los abetos, por lo que en ocasiones se le llama también "abeto" falso o incluso "abeto" rojo. Es originaria de toda Europa, desde los países nórdicos hasta los Balcanes, suele formar bosques, conviviendo frecuentemente con el alerce.

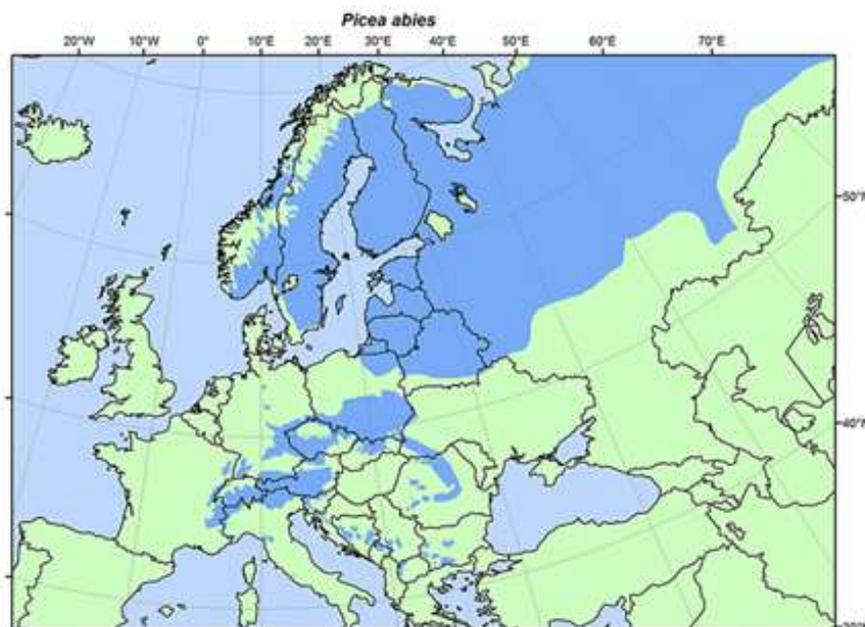


Figura 7. Mapa distribución *Picea abies* en Europa. Fuente: www.euforgen.org.

Generalmente los árboles más vigorosos son más resistentes a los ataques de insectos y hongos. Por el contrario, también se ha sugerido que el incremento de crecimiento puede conllevar una merma de la resistencia del árbol, ya que el crecimiento y la resistencia están compitiendo por los mismos recursos dentro del árbol (BAIER *et al.*, 2002). Observaciones en sitios infectados naturalmente indican que las infecciones de *Heterobasidion parviporum* son más frecuentes en árboles con gran diámetro en el tronco (PIRI *et al.*, 1990).

Esta especie (*Picea abies*) tiene raíces superficiales (SARVAS, 1964; VALKONEN, 2005) lo que le hace vulnerable a fuertes vientos (KÄRKKÄINEN, 2007). El crecimiento de picea noruega en masas mixtas se recomienda en algunos casos con el fin de evitar la propagación de infecciones a través de sus raíces (PIRI *et al.*, 1990; KÄRKKÄINEN, 2007).

Los tres mecanismos principales envueltos en la pérdida de crecimiento por este hongo son: muerte de la mayoría de las principales raíces, reducción de la habilidad de los árboles para tomar agua y nutrientes y la formación de una zona de reacción (BENZ-HELLGREN & STENLID, 1995). La llamada zona de reacción es una respuesta activa del hospedante ante una herida o infección. Contiene parénquima muerto y se produce en la albura antes de que se propague el patógeno (SHAIN, 1971).

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es conocer la patogenicidad de *Heterobasidion annosum sensu lato* sobre *Picea abies*. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a) Conocer la patogenicidad del aislamiento *Heterobasidion parviporum* de origen finés sobre *Picea abies*.
- b) Conocer la patogenicidad de los distintos aislamientos de *H. parviporum* asiáticos sobre *P. abies*.
- c) Comparar el poder patogénico de ambos grupos geográficos de aislamientos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material fúngico

4.1.1 Aislamientos fúngicos

Este estudio está enfocado en el hongo *Heterobasidion parviporum* básicamente por dos razones: 1) En el sur y oeste de Finlandia, dicho hongo es nueve veces más común que *H. annosum* y 2) *Picea abies* como hospedante es más susceptible que las demás especies arbóreas económicamente importantes en Finlandia (PIRI *et al.*, 1990).

El aislamiento finés de *Heterobasidion parviporum* que forma parte de este estudio (número de referencia 03014) fue obtenido por cortesía del Dr. Kari Korhonen (Finnish Forest Research Institute, METLA).

Los aislamientos de origen chino utilizados fueron cortesía del Prof. Yuncheng Dai del Instituto de microbiología de la Universidad de Beijing, cuyos números de referencia son 0915001, 0915003, 0915005, 0916005, 0916009 y 99020/VE.

En Finlandia se han llevado a cabo numerosos estudios y se ha recogido mucha información y datos relevantes sobre *Heterobasidion* spp, sin embargo, su situación en China se encuentra mucho más indocumentada, por lo que resultaba más interesante y se dio más importancia a estudiar tantos aislamientos asiáticos como fuera posible. El aislamiento de origen finés fue utilizado básicamente como control para poder realizar una comparación de la patogenicidad entre las distintas regiones geográficas pero no se centra en él el interés de este estudio.

4.1.2 Subcultivo del hongo en medio de Extracto de Malta-agar.

Estas cepas fueron dadas cultivadas en placas petri por los Institutos anteriormente citados, por lo que primeramente fueron puestas a cultivar en unas nuevas placas con extracto de malta-agar (MEA) para mi posterior uso personal y almacenaje.

Con fin de obtener cinco placas petri de cada aislamiento realizamos un subcultivo de cada uno sobre extracto de malta-agar, por lo tanto, dado que contamos con siete aislamientos fue necesario preparar 35 placas petri con MEA.

Cada litro de MEA está constituido por 10 g de agar y 10 g extracto de malta-agar, que se depositaron en una botella de vidrio borosilicato, la cual se enrasó con agua destilada hasta llegar a un litro. Después, se introdujo en el autoclave, el cual permite realizar una correcta esterilización, donde estuvo unos 40 minutos a más de 100°C de temperatura. Transcurrido este tiempo, esperamos hasta que rebaje su temperatura y finalmente se reparte homogéneamente en placas petri, todo ello dentro de la cámara de flujo con el fin de evitar todo tipo de contaminación que no nos interesa. Pasados uno o dos días, el ME Agar se encuentra solidificado en el plato adquiriendo así forma de gel y listo para su uso.

Una vez solidificadas las 35 placas petri con extracto de malta-agar, realizamos el subcultivo de los aislamientos, el cual consiste en efectuar con un bisturí esterilizado una serie de cuadraditos de aproximadamente 1 cm² en el gel agar del aislamiento con el que estoy trabajando y poner uno en el centro de cada placa petri con la solución de MEA preparada anteriormente. Después, lo aílo bien con parafilm para evitar su desecación y tras escribir la fecha y el número de cepa del que se trata en cada caso lo dejo reposar en un lugar con oscuridad media durante 15-20 días. Así con todos y cada uno de los aislamientos con los que voy a trabajar.

Transcurrido este tiempo, se puede observar como el hongo ha ido creciendo y expandiéndose sobre la solución de MEA de la placa petri.



Figura 8. Cultivo de *H.parviporum* en placa petri (KOHL, 2007).

4.1.3 Subcultivo del hongo en medio líquido (Hagem)

Los aislamientos previamente cultivados en placas petri con extracto de malta-agar fueron subcultivados esta vez en medio líquido, en este caso, Hagem. Tras los cálculos correspondientes, se estima utilizar casi 1 litro de disolución Hagem para cada aislamiento, ya que de cada uno vamos a hacer subcultivo en siete matraces Erlenmeyer con 100-150 ml de Hagem; por lo tanto usaremos aproximadamente siete litros de Hagem. Subcultivamos cada aislamiento en siete matraces debido a que vamos a trabajar en tres puntos en el tiempo (3, 7 y 15 días), así que por precaución hacemos dos matraces para cada punto en el tiempo y uno más simplemente por si acaso.

Cada litro de disolución de Hagem contiene 5 g de glucosa, 5 g de extracto de malta, 0.5 g de NH_4NO_3 , 0.5 g de KH_2PO_4 y 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que se depositaron en una botella de vidrio borosilicato, la cual se enrasó con agua destilada. Una vez hecho esto, medimos el pH ya que nos interesa que sea 5. Por ello, con ayuda de una pipeta añadimos NaOH si queremos aumentar el pH y HCl si queremos disminuirlo, tanteando hasta llegar al pH deseado, es decir, cinco. Con el pH ya bien calibrado, introducimos la botella en el autoclave 40 minutos a unos 120°C de temperatura.

El Hagem es un medio líquido, no se va a solidificar, por lo que tras sacarlo del autoclave esperamos pacientemente a que alcance una temperatura ambiente para que no dañe al hongo. Por último, realizamos el subcultivo dentro de la cámara de flujo, introduciendo en cada matraz Erlenmeyer con 100-150 ml de Hagem, un rectángulo de aproximadamente 2 cm² de distintas placas petri en las que hemos cultivado en MEA el hongo *H. parviporum*. Tapamos el matraz con papel de aluminio y lo dejamos reposar a oscuras entre 15 y 20 días.

Transcurrido este tiempo, el hongo ya estará preparado para su inoculación en las plántulas de píceas una vez que pase por el homogenizador como explicaremos más adelante.

4.2 Material vegetal

Las semillas utilizadas fueron de la especie *Picea abies*, todo el lote fue proporcionado por el METLA (Finnish Forest Research Institute) y su número de identificación es: R01-00-0902 E461 SV.388 63/2.

El identificador “E” indica que las semillas proceden del sur de Finlandia, paralelo 62 norte, es decir, 62 grados al norte del plano ecuatorial de la Tierra. El estudio se realizó con plántulas de aproximadamente 6 cm de longitud ya que quería verse el efecto de la infección del hongo sobre la raíz de las mismas.

4.2.1 Esterilización de las semillas

La esterilización de las semillas se realizó en varias tandas debido a que se manejaba de una cantidad importante de ellas y no era necesario tener todas germinadas exactamente al mismo tiempo dado que la posterior inoculación también iba a realizarse a lo largo de varios días.

Para saber qué cantidad de semillas necesitábamos germinar realizamos una serie de cálculos sencillos. Para un aislamiento vamos a trabajar con 9 placas petri (6 inoculadas con el hongo y 3 controles con agua) por cada punto en el tiempo, que como ya hemos dicho anteriormente tenemos tres (a los 3, a los 7 y a los 15 días), por lo tanto utilizaremos 27 placas petri por cada aislamiento. Cada una de estas placas contendrá 10 plántulas de *Picea abies*, es decir, para un aislamiento necesitamos 270 plántulas. Trabajamos con 7 aislamientos por lo tanto $270 \times 7 = 1890$ plántulas de *Picea abies* germinadas necesitamos en total. Suponiendo un índice de germinación del 70% ponemos a germinar 3000 semillas redondeando a lo alto para asegurarnos de tener suficientes, esto es, 6 tandas, una por día durante días continuos, poniendo a germinar 500 semillas cada vez.

Primero cubrimos las semillas a germinar con H_2O_2 30% en un vaso de precipitados y lo removemos con el agitador magnético durante exactamente 13 minutos. En la cámara de flujo colocamos un embudo Büchner sobre un matraz Erlenmeyer, de modo que pasados los 13 minutos volcamos el vaso con las semillas sobre el embudo para separar el peróxido de hidrógeno de las semillas, y para asegurar la correcta eliminación del peróxido de hidrógeno de las semillas, realizamos varios enjuagues con agua destilada (3 - 4 litros de agua destilada por cada tanda de semillas).

4.2.2 Germinación de las semillas

La germinación de las semillas se realizó sobre placas petri de agar 1% previamente elaborado, es decir, 10g de agar por litro con agua destilada. Suponiendo la colocación de 30 semillas a germinar en cada placa petri, necesitaremos 17 placas por cada tanda de semillas, es decir, 102 placas petri con agar 1% para las 6 tandas.

Tras la esterilización de una tanda de semillas, en la cámara de flujo y con ayuda de unas pinzas esterilizadas, colocamos pacientemente una por una 30 semillas por placa de agar 1%, intentando que se encuentren lo más espaciadas posible entre ellas, la sellamos con parafilm para evitar su desecación, marcamos con rotulador permanente todo lo necesario (nombre, fecha y especie) y llevamos los platos a la cámara de germinación, donde se mantendrán con luz y temperatura regulada automáticamente durante los próximos 15 días.

4.3 Pruebas de patogenicidad.

Para efectuar las pruebas de patogenicidad, cada día se realizará la inoculación de dos cepas y de un solo punto en el tiempo (como ya hemos dicho, cada aislamiento se va a estudiar a los 3, 7 y 15 días de la inoculación). El método fue el siguiente, en una placa petri con agar 1% se colocó un filtro circular cortado a la mitad, humedecido con agua destilada, en la parte inferior de la placa. Después 10 plántulas de *Picea abies* se colocaron paralelamente sobre él en fila, colocando las raíces sobre el filtro y la parte aérea fuera del filtro apoyada sobre el gel agar. Así con 9 placas petri; 6 de ellas (A-F) inoculadas con el hongo, y 3 (G-I) con agua para utilizarlas como control.

Sobre las raíces de las 10 plántulas se repartieron 2 ml de hongo homogeneizado (la homogenización se explica posteriormente) con una pipeta. Una vez hecho esto, colocamos encima de las plántulas infectadas la otra mitad del filtro humedecido. Por último, tapamos la placa petri, sellamos con parafilm y especificamos claramente con qué aislamiento hemos trabajado (su número), la fecha de infección, su letra (A-I) y el número de días (3, 7 ó 15) que permanecerá almacenado hasta que llegue la hora de anotar los resultados de necrosis correspondientes a través del microscopio.



Figura 9. (Izq). Detalle de la colocación de 10 plántulas sobre la mitad de un filtro en una placa petri con agar 1%.

(Dcha). Resultado final tras la inoculación de las plántulas con los detalles a escribir; nº de aislamiento, fecha, plato A-I y días que permanecerá en la cámara con luz y temperatura automáticas.

Antes de llevar las placas petri a que pasen el tiempo necesario en la cámara de luz y temperatura automática, colocamos papel de aluminio alrededor de la mitad inferior, es decir, donde se encuentran las raíces, para de esta forma mantenerlas siempre a oscuras (como ocurriría en la naturaleza).

Como paso previo a la inoculación, ya mencionado anteriormente, es necesario realizar una homogenización del hongo, ya que tras su subcultivo en medio líquido, nos interesa separar lo máximo posible el micelio del medio de cultivo. Para ello retiramos del matraz que contiene el hongo la mayor cantidad posible de Hagem vertiéndolo en un vaso de precipitados. Lo que queda lo pasamos a un tubo Falcon de 50 ml, enrasamos con agua destilada hasta los 20 ml y lo introducimos en la centrifugadora 3 minutos a 3000 rpm, con el fin de seguir separando lo máximo posible el micelo del medio de cultivo, repetimos esta operación de la centrifugadora varias veces hasta asegurar la limpieza del hongo. Hecho esto, enrasamos por última vez el tubo falcon hasta los 20 ml y poniéndolo en el homogenizador obtenemos una dilución con el hongo totalmente uniforme que poder aplicar en la raíz de las plántulas de manera equitativa.

Pasados los días necesarios, ya sean 3, 7 ó 15, el procedimiento para evaluar los daños producidos en las plántulas es el mismo. Abrimos una a una las nueve placas de un determinado aislamiento nombradas de la letra A a la I alfabéticamente, retiramos el medio filtro que mantenía sepultadas a las raíces, separamos con un bisturí la raíz de la parte aérea de cada una de las 10 plántulas de la placa, las

colocamos en un portaobjetos y observamos a través del microscopio con aumento 4x y 10x. De cada raíz tomamos fotos con la cámara integrada del microscopio, anotamos observaciones destacables y asignamos el grado de necrosis presente de 0 a 4, siendo 4 necrosis total y 0 la ausencia absoluta de necrosis.

A la hora de sacar conclusiones nos apoyamos no sólo en el grado de necrosis observado en cada plántula, la mortalidad producida y el material fotográfico, sino también en estudios anteriores tales como el de LAKOMY *et al.* (2011) que trabajó con un grupo de aislamientos fineses de este hongo sobre *Picea abies* o el de DAI *et al.* (2006) en el que encontramos registros interesantes sobre este hongo en China.

4.4 Análisis de los datos.

Para evaluar la patogenicidad de los distintos aislamientos de *H. parviporum* la raíz de cada plántula fue observada a través del microscopio y fotografiada, con el fin de conservar soporte fotográfico en un futuro, a través del programa *SISgetIT*.

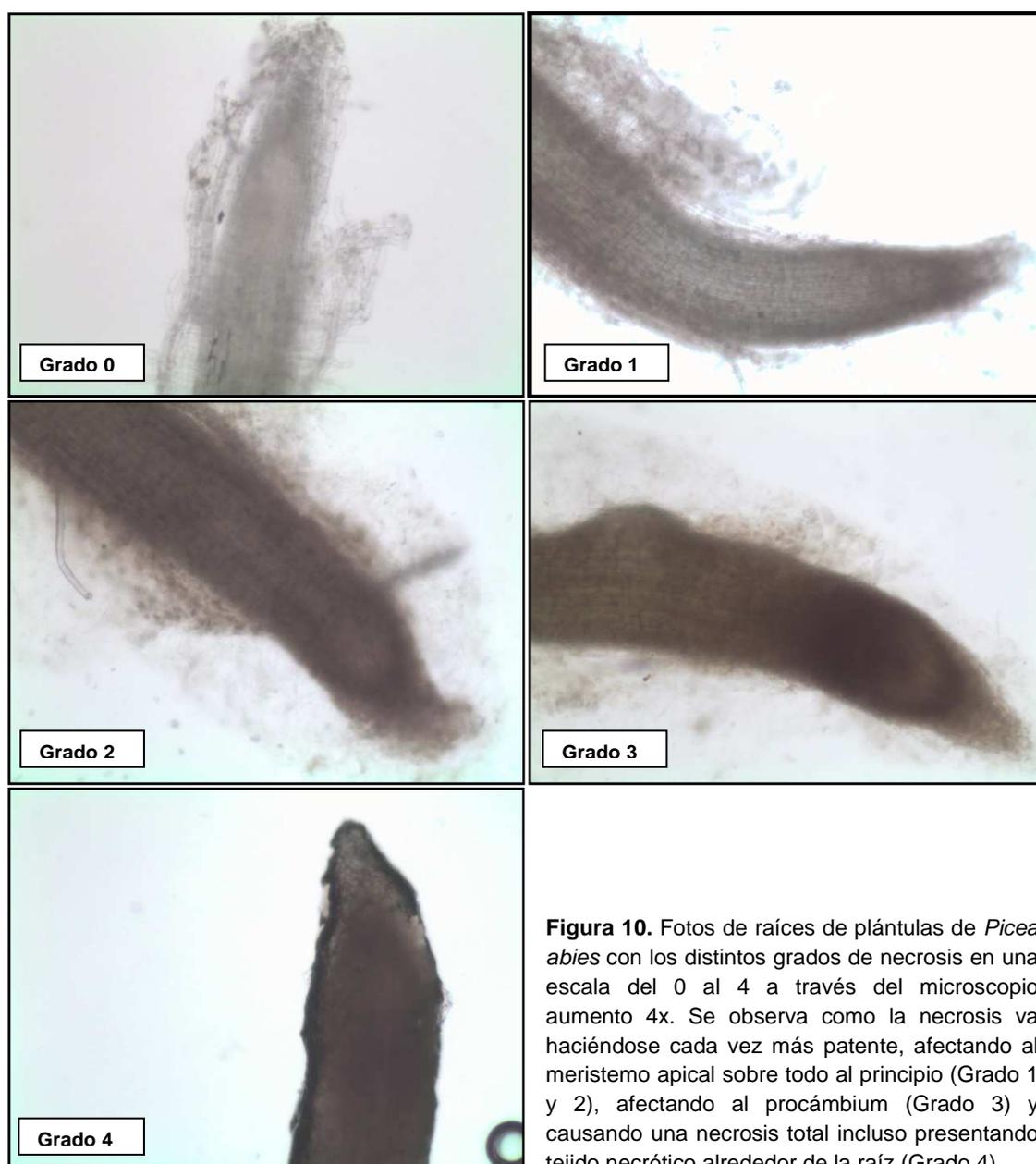
El programa utilizado a la hora de representar los datos mediante gráficas fue *Statgraphics Centurion XVI.II*, proporcionado por la plataforma informática de la Universidad de Valladolid. El grado de necrosis generado en las plántulas tras su inoculación se analizó a través de ANOVAs ($p < 0.05$) determinando las diferencias significativas entre las plántulas inoculadas con el hongo y las plántulas utilizadas como controles, así como el período de tiempo en el que las diferentes medidas fueron tomadas. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente.

Además, para analizar y representar los datos en cuanto a mortalidad se refiere, consideramos como muertas las plántulas que presentan un grado de necrosis en la raíz de 4, es decir, un 100%; ya que aunque biológicamente hablando presenten parte del hipocótilo vivo (su parte aérea), fisiológicamente están ya muertas (la raíz no es funcional).

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación de la necrosis en las plántulas de *Picea abies* tras la inoculación de distintos aislamientos de *H. parviporum*.

El grado de necrosis observado en las raíces de las plántulas se reflejó a través de una escala de 0 (0% de necrosis) a 4 (necrosis total, 100%), utilizando para determinar dicho grado un microscopio con aumento 4x y 10x. Con la cámara integrada del microscopio fotografiamos las raíces de la mejor forma posible (Figura 10), y a través de lo que se observa en el microscopio se determinó el grado de necrosis.



La tabla de datos donde se muestran los valores de necrosis a los 3 días, 7 días ó 15 días a partir de la inoculación se ha incluido en el Anejo 1. Realizando la media del grado de necrosis de las plántulas inoculadas con el hongo y las plántulas utilizadas como control para cada punto en el tiempo, obtenemos la tabla que se muestra a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Media del grado de necrosis observado en las plántulas para cada punto en el tiempo (3, 7, 15 días) según su tratamiento (inoculación con *Heterobasidion parviporum* o control con agua) para cada aislamiento.

Aislamiento	Tratamiento	Punto en el tiempo		
		3días	7días	15días
03014	Inoculadas	0,1	2,73	3,32
	Control	0,0	0,03	0,0
0915001	Inoculadas	1,32	2,13	2,1
	Control	0,0	0,0	0,0
0915003	Inoculadas	0,15	2,32	2,95
	Control	0,0	0,0	0,06
0915005	Inoculadas	1,38	2,55	2,57
	Control	0,0	0,0	0,0
0916005	Inoculadas	0,12	2,70	2,78
	Control	0,0	0,0	0,0
0916009	Inoculadas	1,13	1,68	2,13
	Control	0,0	0,0	0,0
99020VE	Inoculadas	0,95	0,67	1,95
	Control	0,0	0,0	0,0

La representación de esta tabla a través de gráficas lineales de los distintos tratamientos, con una variable independiente (tiempo) y una variable dependiente (grado de necrosis) da lugar a la Figura 11 que se muestra a continuación.

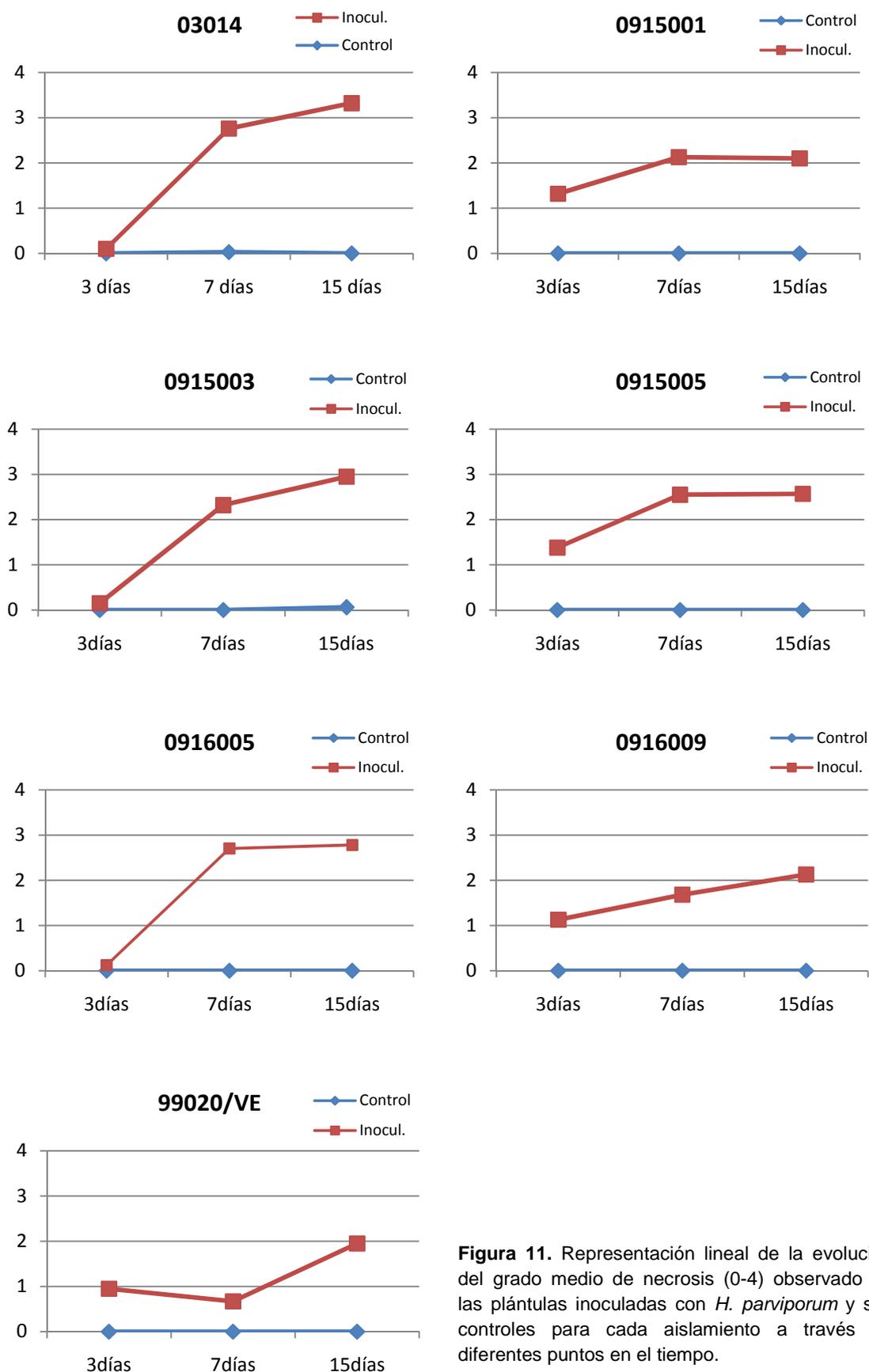


Figura 11. Representación lineal de la evolución del grado medio de necrosis (0-4) observado en las plántulas inoculadas con *H. parviporum* y sus controles inoculadas para cada aislamiento a través de diferentes puntos en el tiempo.

Estas medias de necrosis han sido calculadas a partir de la necrosis individual de cada plántula de las placas petri, es decir, 10 plántulas por placa y 9 placas por aislamiento en cada punto en el tiempo, esto es, 270 plántulas en total para cada aislamiento. A simple vista muchas veces es fácil distinguir a través del aspecto de las raíces las plántulas que han sido inoculadas de las utilizadas como control (Figura 12).



Figura 12. (Izq) Placa petri con plántulas de *P. abies* 3 días después de ser inoculadas con *H. parviporum*.
(Dcha) Placa petri con plántulas de *P. abies* utilizadas como control con agua.

En algunas plántulas, sobre todo las inoculadas con el aislamiento 03014 que ha demostrado ser el más agresivo, el micelio de *H. parviporum* se extendió por ellas pudiendo observar a través del microscopio sus conidios (Figura 13).



Figura 13.(Izq) Plántulas de *Picea abies* a los 15 días tras la inoculación con *H. parviporum* que presentan una necrosis y podredumbre de las raíces muy elevada así como una gran extensión del micelio de dicho hongo.
(Dcha) Detalle aumentado de los conidios de *H. parviporum*.

Realizando análisis de varianza a través de ANOVAs simples aplicamos un procedimiento de comparación múltiple de los valores medios de necrosis generada a los 3, 7 y 15 días entre los distintos aislamientos y sus controles (Figura 14). Para determinar qué valores medios muestran diferencias significativas entre ellos nos basamos en las Pruebas de Rangos Múltiples que establecen una serie de grupos homogéneos que quedan reflejados mediante las letras situadas encima de las barras del diagrama (Figura 15), perteneciendo al mismo grupo, es decir, sin diferencias significativas entre ellos, cuando poseen la misma letra. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

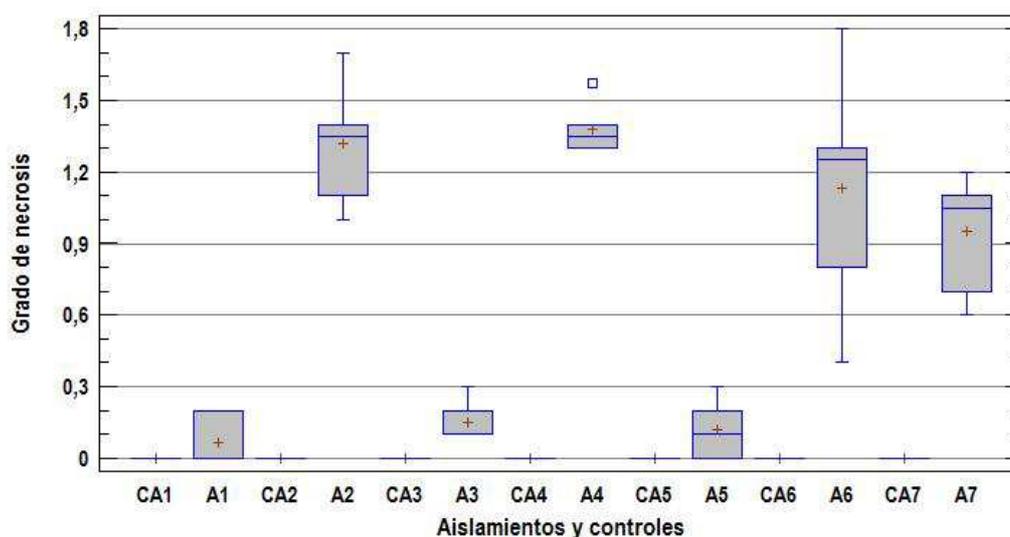


Figura 14. Diagrama de cajas representando el grado medio de necrosis (0-4) para los distintos aislamientos y sus controles a los 3 días del tratamiento (inoculación y control). Las barras de error indican la desviación estándar, y el significado del eje X tanto de esta Figura como de las siguientes viene determinado como:

CA1 = Control A1	A1 = 03014
CA2 = Control A2	A2 = 0915001
CA3 = Control A3	A3 = 0915003
CA4 = Control A4	A4 = 0915005
CA5 = Control A5	A5 = 0916005
CA6 = Control A6	A6 = 0916009
CA7 = Control A7	A7 = 99020/VE

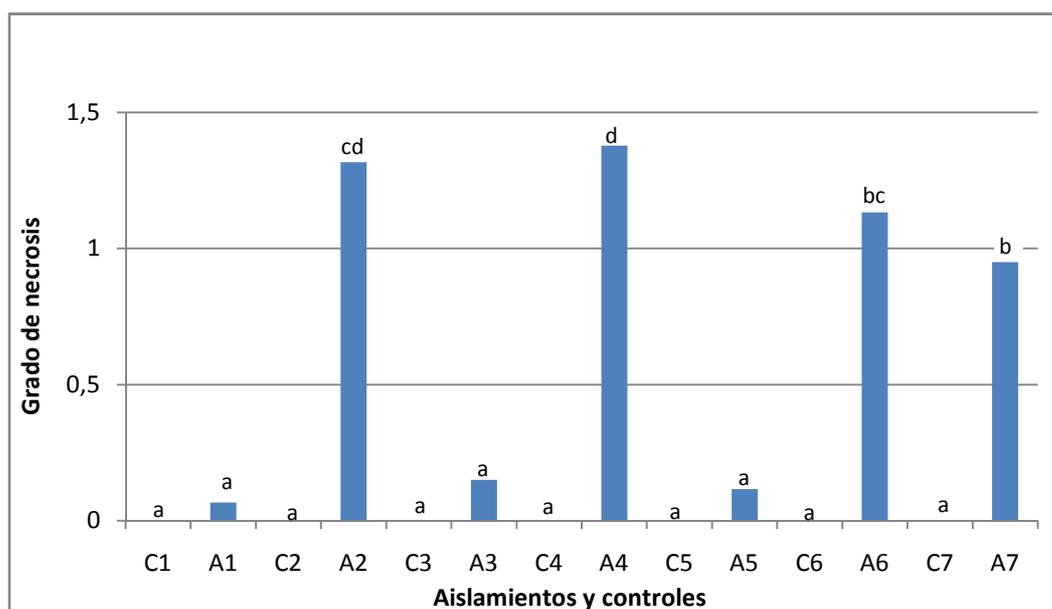


Figura 15. Valores medios de necrosis (0-4) de cada aislamiento y su control, a los 3 días del tratamiento, con sus distintos grupos homogéneos que determinan cuáles muestran diferencias significativas entre ellos con un riesgo del 5%.

Estas mismas gráficas con sus correspondientes diferencias significativas entre aislamientos y controles se determinaron a los 7 días y a los 15 días del tratamiento (inoculación o control) tal y como se muestra en las Figuras 16 - 19.

Además, puesto que el valor P obtenido con el programa *Statgraphics* es menor que 0,05 cuando comparamos los datos a los 3 días con los de 7 días, de 7 con 15 días y de 15 con 3 días, sabemos que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del grado de necrosis observado entre los distintos puntos en el tiempo, con un nivel del 95% de confianza.

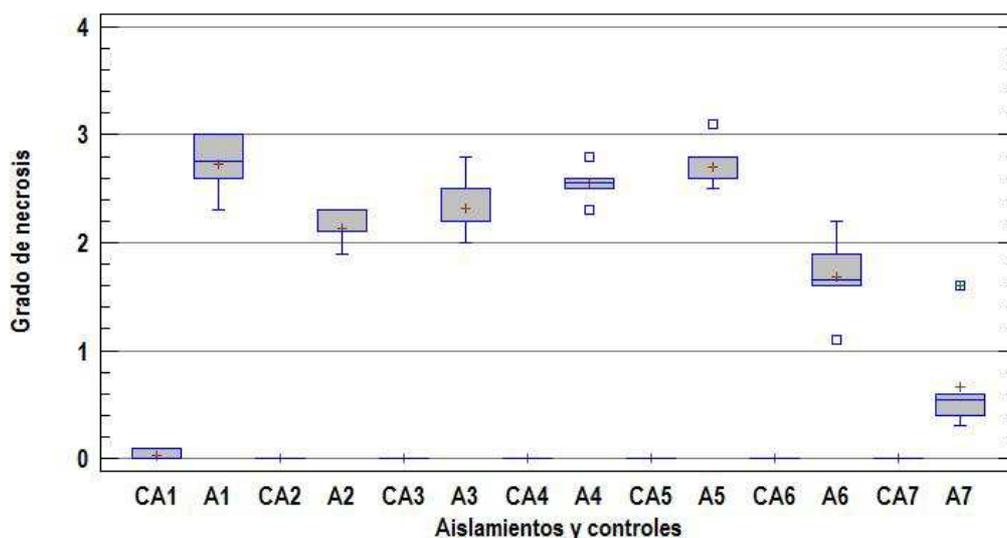


Figura 16. Diagrama de cajas representando el grado medio de necrosis (0-4) para los distintos aislamientos y sus controles a los 7 días del tratamiento (inoculación y control). Las barras de error indican la desviación estándar.

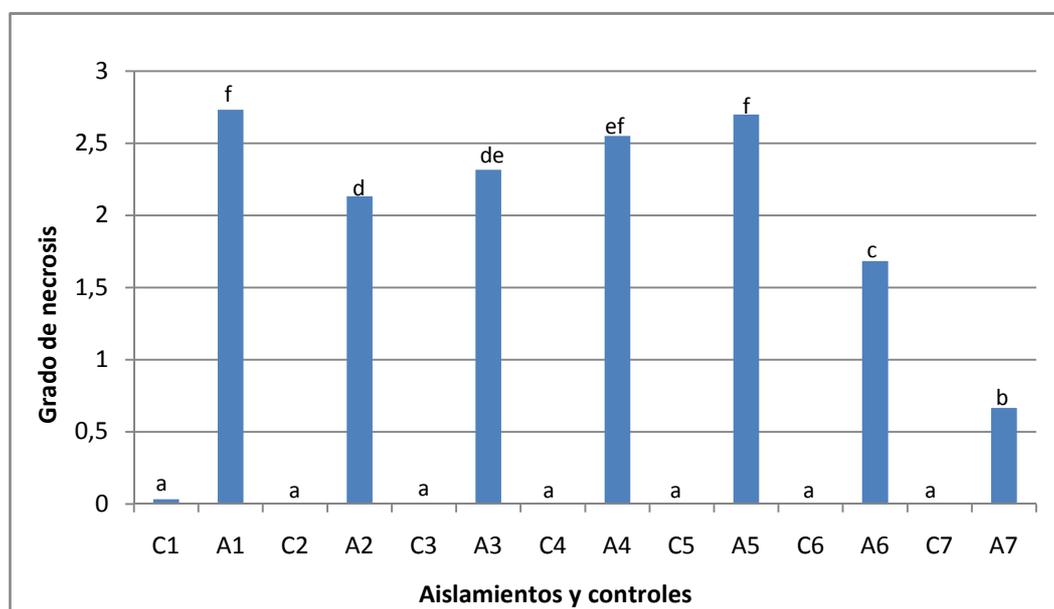


Figura 17. Valores medios de necrosis (0-4) de cada aislamiento y su control, a los 7 días del tratamiento, con sus distintos grupos homogéneos que determinan cuáles muestran diferencias significativas entre ellos con un riesgo del 5%.

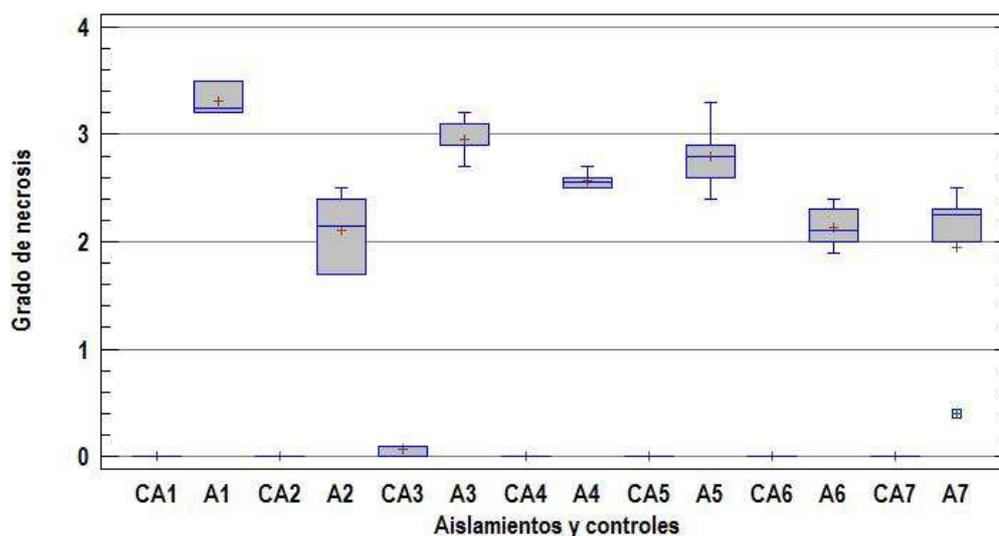


Figura 18. Diagrama de cajas representando el grado medio de necrosis (0-4) para los distintos aislamientos y sus controles a los 15 días del tratamiento (inoculación y control). Las barras de error indican la desviación estándar.

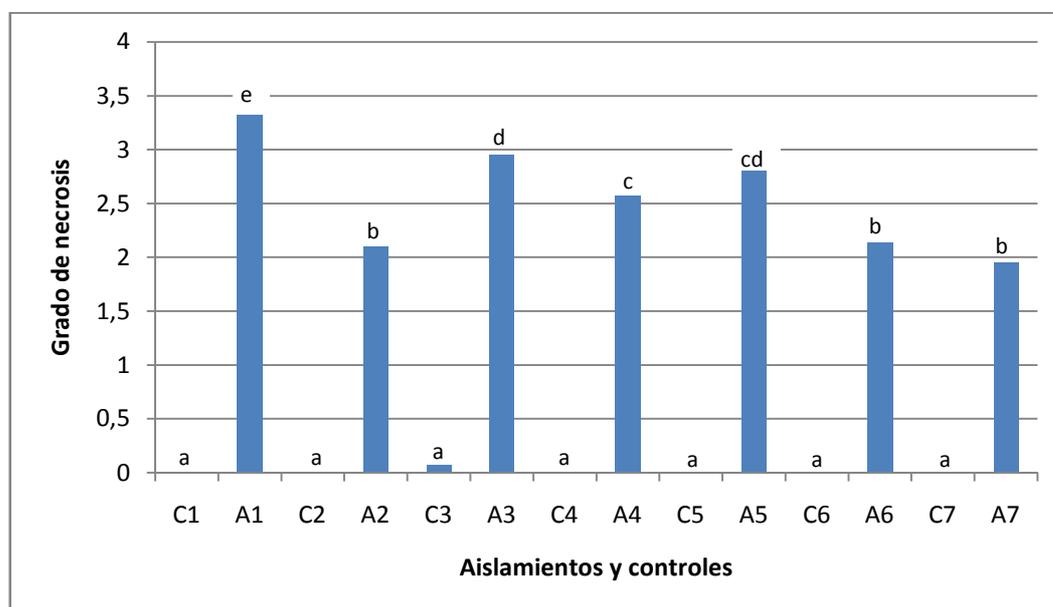


Figura 19. Valores medios de necrosis (0-4) de cada aislamiento y su control, a los 15 días del tratamiento, con sus distintos grupos homogéneos que determinan cuáles muestran diferencias significativas entre ellos con un riesgo del 5%.

Teniendo en cuenta solamente las plantas inoculadas con el hongo *Heterobasidion parviporum*, puesto que las utilizadas como control han generado una respuesta necrótica prácticamente nula, contamos con un número de 60 plántulas para cada punto en el tiempo y aislamiento, cada una con su respectiva respuesta en forma de necrosis (Figura 20).

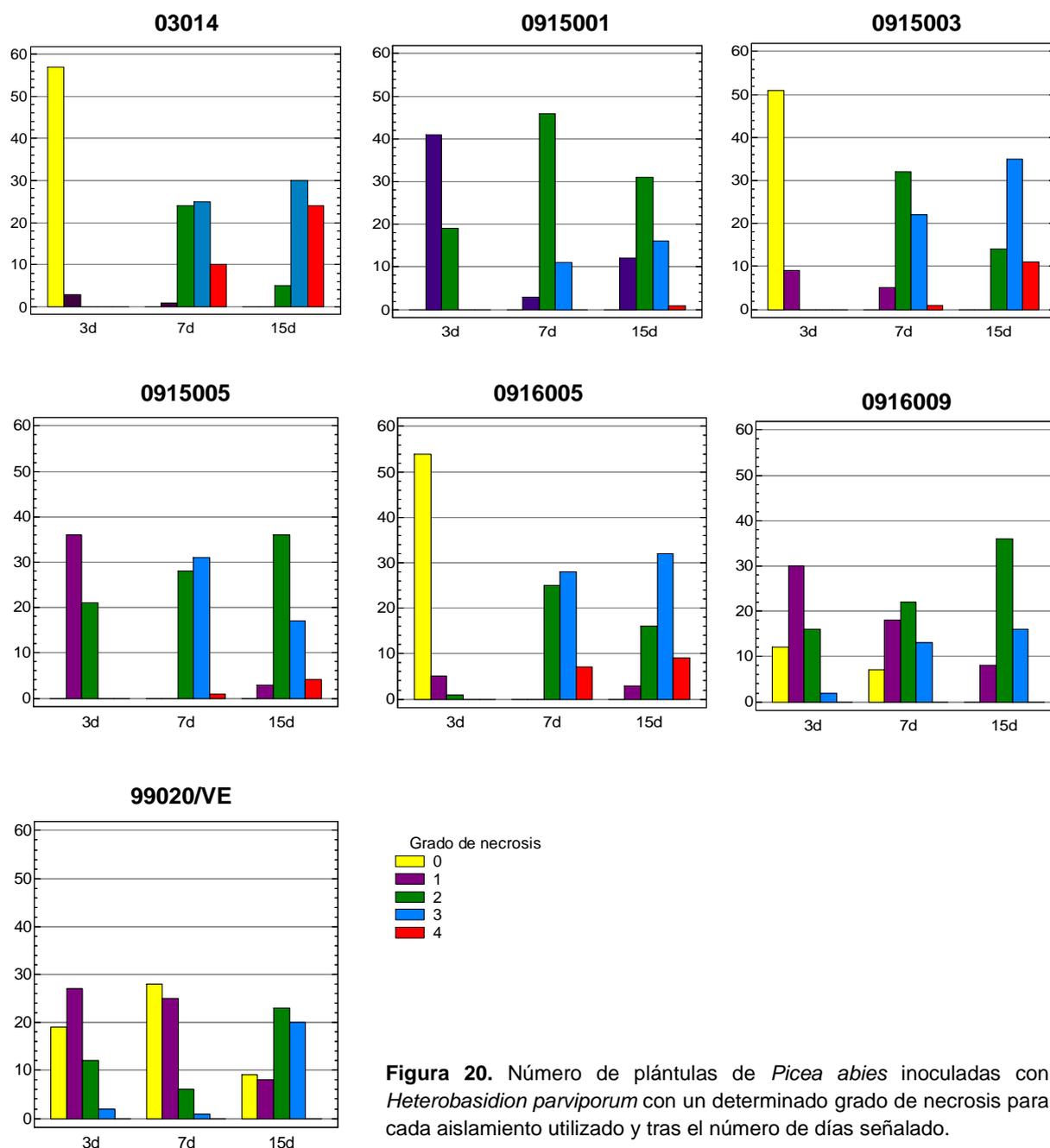


Figura 20. Número de plántulas de *Picea abies* inoculadas con *Heterobasidion parviporum* con un determinado grado de necrosis para cada aislamiento utilizado y tras el número de días señalado.

5.2 Mortalidad generada en las plántulas de *Picea abies*.

Como ya hemos mencionado anteriormente las plántulas que presentan el último grado de necrosis, el más elevado, suponemos que ya es imposible que se recuperen por lo que lo consideramos que podemos analizarlas como mortalidad. Obteniendo el porcentaje de plántulas que llegan a alcanzar la mortalidad en el tiempo estudiado tras la inoculación del hongo, obtenemos la Figura 21, donde se puede apreciar claramente la agresividad del aislamiento de origen finés 03014 con respecto a los demás aislamientos estudiados, sobre todo algunos que no provocan ni una sola muerte a las plántulas.

La Prueba de Rangos Múltiples establece qué valores muestran diferencias significativas entre ellos, determinando una serie de grupos homogéneos que quedan reflejados mediante las letras situadas encima de las barras del diagrama, perteneciendo al mismo grupo, es decir, sin diferencias significativas entre ellos, cuando poseen la misma letra.

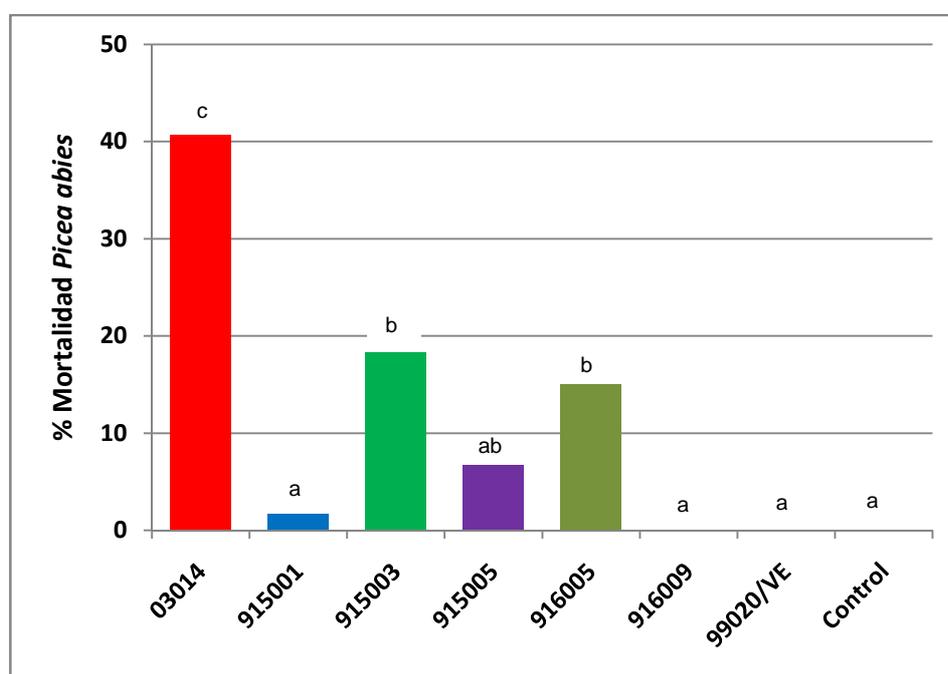


Figura 21. Porcentaje de mortalidad generada en las plántulas de *Picea abies*, considerado mortalidad el grado de necrosis 4, para los diferentes aislamientos utilizados y control. Los distintos grupos homogéneos (a, ab, b, c) determinan las diferencias significativas entre ellos con un riesgo del 5%.

6. DISCUSIÓN

La Picea noruega [*Picea abies* (L.) Karst.], es una de las especies más importantes de la industria forestal en Europa, pero desafortunadamente sufre año tras año impactantes pérdidas económicas debido a que un gran número de masas de esta especie padecen la infección de uno de los principales patógenos forestales, *Heterobasidion parviporum* (Fr.) Niemelä & Korhonen. Este hongo basidiomiceto pertenece a un complejo de especies llamado *Heterobasidion annosum* sensu lato, el cual incluye otras dos especies de *Heterobasidion* en Europa además de *H. parviporum*, con distinto pero solapado rango de hospedantes. *H. parviporum* es un hongo muy estudiado especialmente en países nórdicos como Finlandia, sin embargo, resulta interesante que en otros países como China no se encuentra tan documentado y parece presentarse de una manera mucho menos agresiva, de ahí el interés de este estudio.

Este estudio ha permitido conocer la diferencia en la respuesta generada por plántulas de *Picea abies* inoculadas con distintos aislamientos de *H. parviporum* de origen finés y chino, así como la variabilidad existente en la patogenicidad de estos últimos.

Se observó que el hongo *Heterobasidion parviporum* presentó una gran agresividad sobre las plántulas, ocasionando daños con gran rapidez. En algún aislamiento como el 0915001 ya a los 3 días de la inoculación empezaron a observarse cambios con respecto a las plántulas utilizadas como control, aunque es a partir de los 7 días tras la inoculación cuando la diferencia entre la necrosis de las plantas inoculadas y sus controles es perfectamente visible en todos los aislamientos. Estos resultados están totalmente en línea con el estudio de JOHANSSON *et al.*, (2004) que puso atención a las reacciones iniciales causadas en plántulas de picea noruega y pino silvestre tras la inoculación de *H. parviporum* y *H. annosum*, citando que a los tres días tras la inoculación, la actividad en las píceas desaparece al mismo tiempo que la necrosis va aumentando y siendo cada vez más profunda. Y en el artículo de ASIEGBU *et al.*, (1994) la concentración de esporas de *H. parviporum* causó invasión y necrosis a las plántulas de *Picea abies* a las 48-72 horas. Además, artículos como el de KERIÖ (2011), señalan que el daño producido en las plántulas es mayor al entrar en contacto con el hongo mediante infección que al contactar debido a una herida como ocurre fácilmente en el monte debido a las tareas forestales. Estos datos indican una rápida actuación de *H. parviporum* sobre su hospedante, lo que sumado a su facilidad de expansión y a su elevada patogenicidad nos invita a tener en

cuenta la importancia de prevención y control de este patógeno, ya sea mediante agentes químicos o control biológico a través de hongos como *Phlebiopsis gigantea* como se ha explicado en el apartado de metodología. El presente estudio fue llevado a cabo en el laboratorio, por lo que al interpretar los resultados es importante recordar que el micelo de los hongos en un medio estéril de agar-malta puede comportarse de manera algo diferente de la que sería en un bosque, donde están expuestos a la competencia con otros microbios y a las reacciones de defensa del hospedante.

De los siete aislamientos de *H. parviporum* utilizados en este ensayo, el que estuvo caracterizado por una mayor respuesta necrótica y mortalidad sobre las plántulas de *Picea abies* (considerando como mortalidad el alcanzar el grado máximo de necrosis) fue con una diferencia significativa el de origen finés (número de referencia 03014), el cual alcanzó una mortalidad del 40.7%. Sin embargo, en los aislamientos de origen chino la mortalidad varía entre el 0 y el 18,3%. No solamente es mucho menor, sino que además, dos de ellos generan una mortalidad nula y uno prácticamente nula. Para descartar la idea de que la agresividad de este patógeno de origen finés sea propia únicamente de este aislamiento en concreto, nos apoyamos en otros documentos anteriores como por ejemplo el estudio llevado a cabo por LAKOMY *et al.*, (2011) acerca de la virulencia de *H. parviporum* sobre *Picea abies* en Finlandia, en el cual se utilizaron 9 aislamientos y presentaron una mortalidad que varía entre el 16% y el 80%, es decir, claramente generan una mortalidad superior a la de los aislamientos de origen chino utilizados en este estudio (0915001, 0915003, 0915005, 0916005, 0916009, 99020/VE). A través de los datos obtenidos, comparando individualmente la respuesta generada por cada aislamiento podemos establecer el siguiente orden en función de su nivel de patogenicidad:

03014 > 0916005 > 0915003 > 0915005 > 0915001 > 0916009 > 99020VE

Estos datos indican que *Heterobasidion parviporum* es un patógeno menos agresivo en China que en Europa. El centro de diversificación de *H. parviporum* parece estar en el Asia oriental por lo que este hongo probablemente ha existido durante mucho tiempo junto a árboles hospedantes locales. Como consecuencia, una firme relación puede haberse desarrollado entre ellos, un equilibrio entre patógeno y hospedantes de la zona, expresándose así como una relativa baja patogenicidad del hongo. Por otra parte, la mayoría de los bosques de coníferas en China se encuentran en las montañas y no sufren un aprovechamiento forestal tan intensivo como ocurre en Europa. Este hecho seguramente sea una de las razones para la aparente menor

patogenicidad de *H. parviporum* en esta zona, ya que la infección a través de heridas es una de las principales vía de expansión de este patógeno. Sería interesante disponer de más datos sobre la frecuencia de *Heterobasidion* spp. en árboles vivos en China, pero es difícil de investigar debido a que muchos de estos bosques se encuentran protegidos (DAI *et al.*, 2006).

Artículos anteriores como el de DAI *et al.*, (2004) establecieron a través de ensayos de apareamiento que varias muestras de *Heterobasidion annosum* sensu lato recogidas en Xinjiang (China) no sólo pertenecían a *H. parviporum*, sino que además la compatibilidad de los homocariones de Xinjiang con los homocariones de *H. parviporum* procedentes de Europa era del 100%. Sabiendo esto, la diferencia de patogenicidad que presentan unos y otros probablemente sea debido a su relación con los hospedantes, el ambiente u otras variables.

Como hemos comentado, *H. parviporum* está poco estudiado y documentado en China, por lo que consideramos importante seguir avanzando y profundizando en la línea de este trabajo. No obstante, a la hora de evaluar la patogenicidad de este hongo convendría tener en cuenta no sólo estos criterios cuantitativos (grado de necrosis y mortalidad generada), sino también las condiciones climatológicas, la competición con otros organismos, etc. Para ello sería interesante en un futuro llevar a cabo un experimento similar pero inoculando en campo, con el fin de conocer la agresividad de este hongo en el medio natural con el resto de variables que influyen en su comportamiento. Además convendría trabajar con un número mayor de aislamientos de origen finés y durante un tiempo prolongado ya que las masas son colonizadas por *Heterobasidion* spp. en diferentes grados a lo largo del tiempo. STENLID (1985) descubrió que unas masas de píceas noruegas habían sido colonizadas por este patógeno en un 12% – 17%, y RIEGER (1995) observó durante la década siguiente un incremento de árboles infectados del 7,5% al 33%.

Dentro del país nórdico es interesante destacar que de acuerdo con las conclusiones obtenidas tras el estudio de NIEMI (2011), el tipo de suelo donde crece la Pícea noruega prácticamente no afecta a su resistencia ante el ataque de este hongo ya se trate de turberas o suelo mineral. Esta serie de datos nos sugiere que todavía hay muchos otros aspectos con respecto a este hongo que conviene ser estudiados en un futuro con el fin de llegar a conocer profundamente a este interesante y peligroso patógeno forestal.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas mediante este estudio fueron las siguientes:

- a) La patogenicidad del aislamiento *Heterobasidion parviporum* de origen finés sobre *Picea abies* es bastante elevada. La mortalidad que genera en sólo 15 días a las plántulas inoculadas es del 40,7%; presentando una diferencia significativa con el resto de aislamientos provenientes de China.
- b) La patogenicidad de los distintos aislamientos *Heterobasidion parviporum* de origen asiático (China) sobre *Picea abies* varía de unos aislamientos a otros pero no excesivamente. De los 6 utilizados, 3 de ellos generaron una mortalidad prácticamente nula y los otros 3 no superaron el 18% de necrosis total sobre las plántulas inoculadas, es decir, la patogenicidad fue baja.
- c) A la hora de comparar el poder patogénico de ambos grupos geográficos de aislamientos de *Heterobasidion parviporum*, podemos afirmar que los aislamientos fineses de *H. parviporum* tienen un grado de patogenicidad más elevado. Esto puede deberse a la existencia de un equilibrio entre patógeno y hospedantes en la zona asiática que se traduce en una baja agresividad.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ADOMAS, A., & ASIEGBU, F. (2006). *Analysis of organ-specific responses of Pinus sylvestris to shoot (Gremmeniella abietina) and root (Heterobasidion annosum) pathogens*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69; p.140-152.
- ASIEGBU, F. O., DANIEL, G., & JOHANSSON, M. (1994). *Defence related reactions of seedling roots of Norway Spruce to infection by Heterobasidion annosum (Fr.) Bref.* University of Helsinki, Finlandia.: *Plant pathology* 45: 1-19.
- BAIER, P., FÜHRER, E., KIRISITS, T., & ROSNER, S. (2002). *Defence reactions of Norwayspruce against bark beetles and the associated fungus Ceratocystis polonica in secondary pure and mixed species stands*. *Forest Ecology and Management* 159: 73-86.
- BENZ-HELLGREN, M., & STENLID, J. (1995). *Long-term reduction in the diameter growth of butt rot affected Norway spruce, Picea abies*. *Forest Ecology Management* 74; 239–243.
- BLOMQVIST, A. (1891). *Suomen puulajit metsänhoidolliselta kannalta*. Keisarillisen senaatin kirjapaino. Helsinki. 165 s.
- BRIMNER, T., & BOLAND, G. (2003). *A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases*. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 100; p.3-16.
- DAI, Y.-C., KORHONEN, K., & ZHAO, J. (2004). *Heterobasidion parviporum identified by mating test from western Xinjiang of China*. *Fung. Sci.* 19(3–4): 77–81.
- DAI, Y., & KORHONEN, K. (1999). *Heterobasidion annosum group S identifies in northeastern China*. *Forest pathology* 29; 273-279.
- DAI, Y., VAINIO, E., HANTULA, J., NIEMELA, T., & KORHONEN, K. (2003). *Investigations on the Heterobasidion annosum complex in central and eastern Asia with the aid of mating tests and DNA fingerprinting*. *Forest pathology* 33; 269-286.
- DAI, Y., YUAN, H., WEI, Y., & KORHONEN, K. (2006). *New records of Heterobasidion parviporum in China*. *Forest pathology* 36; 287–293.
- DALMAN, K., OLSON, A., & STENLID, J. (2010). *Evolutionary history of the conifer root rot fungus Heterobasidion annosum sensu lato*. Blackwell Publishing.
- DEACON, J. (2006). *Obtenido de Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh*: <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/heterob.htm>
- DELATOUR, C., WEISSENBERG, K., & DIMITRI, L. (1998). *Heterobasidion annosum Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, UK. : CAB International. p. 143-166.
- G.FOSSDAL, C., YAKOVLEV, I. A., HIETALA, A., & SOLHEIM, H. (2007). *Rotkjuka fienden som kan etablere seg invendig i grana*. IUFRO Tree Biotechnology, 3-8 June, Portugal.

GARBELOTTO, M., & GONTHIER, P. (2013). Biology, Epidemiology and Control of Heterobasidion Species Worldwide. University of California, Berkeley: Annual Review of Phytopathology.

<http://www.discoverlife.org/mp/20q>. (s.f.).

JÄRVINEN, L. (1996). *Puulajit. Suomen Metsäyhdistys ry. Painotalo Miktor. Helsinki.*

JIMÉNEZ, J., TRAPERO, A., & SÁNCHEZ, M. (2007). La Podredumbre radical del pinsapo. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.

JOHANSSON, S., LUNDGRENAND, L., & ASIEGBU, F. (2004). *Initial reactions in sapwood of Norway spruce and Scots pine after wounding and infection by Heterobasidion parviporum and H. annosum.* Forest Pathology. Volume 34, pag 197–210.

KALLIO, T. (1970). Aerial distribution of the root-rot fungus *Fomes annosus* (Fr.). Finland: Acta Forestalia Fennica 107.

KALLIOKOSKI, T. (2011). *Root system traits of Norway spruce, Scots pine and silver birch in mixed boreal forests: an analysis of root architecture, morphology and anatomy.* Department of Forest Sciences. 67 p.

KÄRKÄINEN, M. (2007). *Puun rakenne ja ominaisuudet. Metsäkustannus Oy. Karisto.*

KARLOVSKY, P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. Natural Toxins 7; p.1-23.

KARLSSON, B., & SWEDJEMARK, G. (2004). *Genotypic variation in susceptibility following artificial Heterobasidion annosum inoculation of Picea abies clones in a 17-year-old field test.* Scandinavian Journal of Forest Research 19, p.103-111.

KERIÖ, S. (2011). *Resistance of Norway spruce (Picea abies) clones against Heterobasidion parviporum.* Finnish Forest Research Institute, Vantaa, Finland.: Seminar on Forest Pathology.

KOHL, L. M. (2007). *College of agriculture and life science.* Obtenido de http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/heterobasidion/heterobasidion_annosum.html

KORHONEN, K., & PIRI, T. (1994). The main hosts and distribution of the S and P groups of *Heterobasidion annosum* in Finland.

KORHONEN, K., & PIRI, T. (1994). The main hosts and distribution of the S and P groups of *Heterobasidion annosum* in Finland. In: Johansson, M. & Stenlid, J. (eds.). Proceedings of the Eight International Conference on Root and Butt Rots. Wik, Sweden and Haikko, Finland, August 9-16, 1993. Uppsala. p. 260-267.

KORHONEN, K., & STENLID, J. (1998). Biology of *Heterobasidion annosum*.

- KORHONEN, K., & STENLID, J. (1998). *Biology of Heterobasidion annosum*. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Huttermann A, eds. *Heterobasidion annosum, Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. .
- LAKOMY, P., KWASNA, H., & DALKE- SWIDERSKA, M. (s.f.). *The virulence of Heterobasidion parviporum population from Norway spruce stand*. Poznan University of Life Sciences: Silv. Colendar.2011, p. 27-36.
- MC DONALD, B., & LINDE, C. (2002). *Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance*. Annual Review of Phytopathology 40; p.349-379.
- MERRILL, W. (1992). Mechanisms of resistance to fungi in woody plants. A historical perspective. Berlin: Heidelberg. p.1-11.
- MESANZA, N., & ITURRITXA, E. (2013). Estructura de las poblaciones de *Heterobasidion annosum* en plantaciones de coníferas del País Vasco. *6º Congreso Forestal Español* . Sociedad Española de Ciencias Forestales.
- NAVARRO CERRILLO, R., CALZADO MARTÍNEZ, C., SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, M., LÓPEZ QUINTANILLO, J., & TRAPERO CASAS, A. (2003). Censo de focos de *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. En ecosistemas de pinsapo. *Boletín de Sanidad Vegetal*, 29; 581-592 .
- NIEMI, S. (2011). *Resistance of Norway spruce (Picea abies) to root and butt rot (Heterobasidion parviporum) in peatland and mineral soil* . Finlandia: University of Helsinki, Department of Forest Sciences.
- OLSON, Å. (2012). Insight into trade-off between wood decay and parasitism from the genome of a fungal forest pathogen. *New Phytologist* 194: 1001-1013.
- OLSON, A., AERTS, A., ASIEGBU, F., BELBAHRI, L., & BOUZID, O. (2012). *Trade-off between wood decay and parasitism: insights from the genome of a fungal forest pathogen*. *New Phytol*, 194; p.1001-1013.
- PEARCE, R. (1996). *Antimicrobial defences in the wood of living trees*. *New Phytologist* 132; p.203-233.
- PIRI, T., KORHONEN, K., & SAIRANEN, A. (1990). *Occurrence of Heterobasidion annosum in pure and mixed spruce stands in southern Finland*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 5: 113-125.
- PRIETO-RECIO, C., MARTÍN-GARCÍA, J., & DÍEZ, J. (2013). Pathogenicity of Spanish isolates of *Heterobasidion annosum* s. s. in *Pinus pinaster* seedlings. *Forest pathology*.
- RAYNER, A., & BODDY, L. (1988). *Fungal decomposition of wood*. Wiley Interscience publication.
- REDFERN, D., & STENLID, J. (1998). *Heterobasidionannosum Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, UK.: CAB International. p. 105-124.

- RIEGER, S. (1995). *Infection of Norway spruce (Picea abies) by Heterobasidion annosum in relation to tree age*. Eur. J. For. Path. 25, pag 357-365.
- SARVAS, R. (1964). *Havupuut*. WSOY. Porvoo, Finland; pág 518.
- SHAIN, L. (1971). *The response of sapwood of Norway spruce to infection by Fomes annosus*. Phytopathology 61; p.301-307.
- SINCLAIR, W., LYON, H., & JOHNSON, W. (1987). *Diseases of Trees and Shrubs*. Cornell University Press. London: Comstock Publishing Associates.
- SMITH, I. M., DUNEZ, J., LLELLIOTT, R. A., PHILLIPS, D., & ARCHER, S. A. (1992). *Inventory of gaps caused by Heterobasidion annosum (Fr.) Bref. in ecosystems of Abies pinsapo*. *Manual de enfermedades de las plantas*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- STENLID, J. (1985). *Population structure of Heterobasidion annosum as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility and isoenzyme patterns*. Can. J. Bot. 63, 2268-2273.
- STENLID, J. (1987). *Controlling and predicting the spread of Heterobasidion annosum from infected stumps and trees of Picea abies*. Scand. J. For. Res 2; 187-198.
- SWEDJEMARK, G. (1995). *Heterobasidion annosum root rot in Picea abies: variability in aggressiveness and resistance*. Swedish University of Agricultural Sciences.: Uppsala. 45 p.
- VALKONEN, S. (2005). *Puulajit*. In: *Rantala, S. Metsäkoulu*. 5th edition.
- WOODWARD, S., STENLID, J., KARJALAINEN, R., & HÜTTERMANN, A. (1998). *Heterobasidion annosum. Biology, Ecology, Impact, and Control*. Wallingford, UK.
- WU, Z. (1999). *The forests in China. Vol. 2. Coniferous Forests*. Beijing: Chinese Forestry Press pp. 586–1161.