

**NUEVAS
PERSPECTIVAS
SOBRE LA
HISTOPATOLOGÍA
DE LA INFECCIÓN
DE *PINUS RADIATA*
POR *FUSARIUM
CIRCINATUM***

noemí martín rodrígues

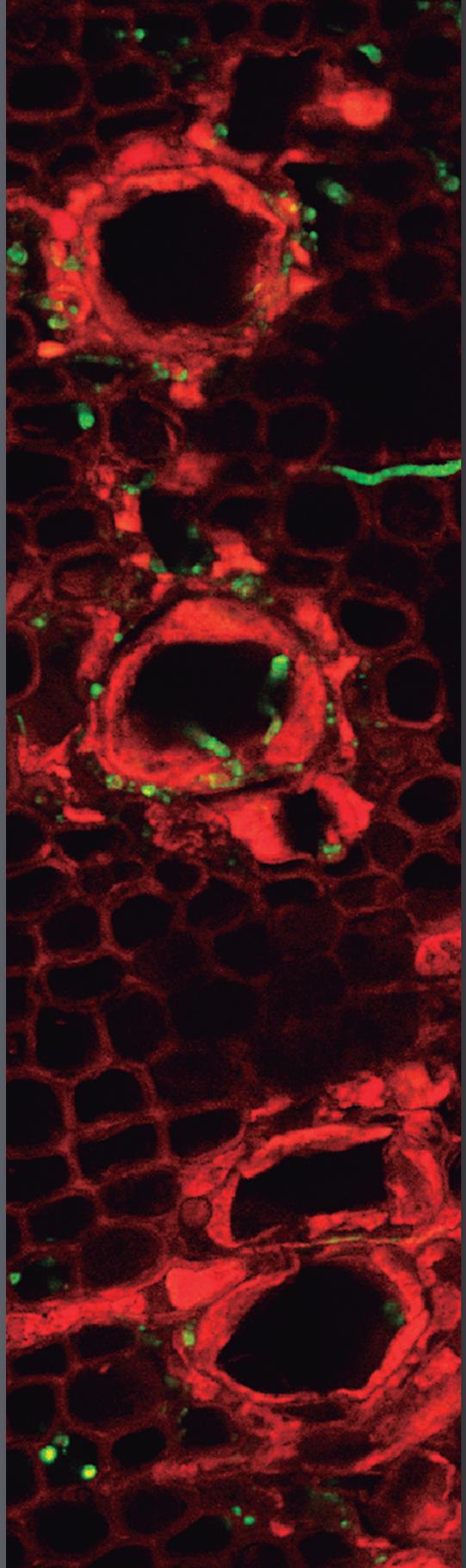
LEIOA, 2015

eman ta zabal zazu



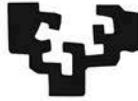
Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



© Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU)
- *Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Argitalpen Zerbitzua*
- University of the Basque Country - UPV/EHU Press
- **ISBN: 978-84-9082-319-4**

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Departamento de Biología Vegetal y Ecología
(Facultad de Ciencia y Tecnología)

Tesis doctoral

**Nuevas perspectivas sobre
la histopatología de la infección
de *Pinus radiata*
por *Fusarium circinatum***

Noemí Martín Rodrigues

Dirigida por:

Dra. Miren K. Duñabeitia

Dra. Amaia Ortiz Barredo

eman ta zabal zazu



UPV EHU



Leioa 2015

Diseño y maquetación: Belén Alcalde y Enrique Sadornil

Imagen de portada: En el leño de una plántula de *Pinus radiata* infectada por *Fusarium circinatum* pueden verse varios conductos resiníferos traumáticos que han sido invadidos por el patógeno.

Imagen de contraportada: Conductos resiníferos en el leño de un tallo sano de pino radiata.

*A mi madre, origen de replicación y fuerza motriz de la colonia.
Y a Nabia, vector para la transformación de mi vida.
Sin vosotras no hubiera sido posible.*

AGRADECIMIENTOS

Mi madre siempre me decía: “Es de bien nacidos, ser agradecidos” y verdaderamente en estos momentos me doy cuenta de que tengo mucho que agradecer. Seguramente no consiga reflejar ni una milésima parte del cúmulo de sensaciones que vienen a mí en estos momentos... seguramente no estén todos los que son... seguramente unas pocas palabras no paguen lo afortunada que me siento por toda la ayuda que he recibido. Así que, simplemente empezaré.

Gracias a los organismos públicos que han financiado este trabajo, que en mi caso concreto han sido: la Junta de Castilla y León, el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y el Gobierno Vasco.

Gracias al Dr. Fernández Avalos del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, por la GFP que tanta luz ha aportado a mi trabajo.

*Gracias a la Dra. Eugenia Iturriza de Neiker por el suministro de la cepa de *Fusarium circinatum*.*

Gracias también a la Universidad de Salamanca, a Neiker y a la Universidad del País Vasco, por ser mis centros de acogida. Claro está que en unos sitios siempre te acogen mejor que en otros... pero en todos ellos he aprendido muchas cosas. Me siento muy afortunada porque el destino quiso darme una buena formación en Fitopatología de tal modo que he podido trabajar en el grupo de investigación de Genética de Hongos Filamentosos del Dr. Arturo Pérez Eslava, en el Departamento de Producción y Protección Vegetal de Neiker dirigido por la Dra. Amaia Ortiz Barredo y en el Departamento de Fisiología Vegetal de la UPV con la Dra. Carmen González Murua en cabeza. Los hongos, las plantas, el ambiente: el conocido triángulo de la enfermedad. Pero no hablemos de enfermedades, sigamos con los agradecimientos.

En el transcurso de estos años, he compartido muchas experiencias con muchas personas. Todas ellas han sido provechosas: las buenas experiencias, por buenas. Las malas experiencias, por reveladoras. Es imposible nombrarlos a todos.

Esta aventura comenzó en Salamanca. Yo diría que es de donde más me he llevado. Gracias a Brisa, a Choni, a Cati y a Raúl por ser los mejores compañeros que se puede tener, por compartir conmigo todo vuestro conocimiento, por quererme mucho en el peor momento de mi vida y ayudarme a superarlo. Sobre todo gracias

a Brisa por ser mi inspiración y porque su ayuda ha llegado hasta el final de esta tesis. Recuerdo también con mucho cariño a Chelu, a Topo, a Bea, David, Elvira, Elena, Norman... gracias a todos, sin olvidar a Oscar, la mejor persona que conocí en Salamanca.

A Santi, mi segundo de a bordo en Neiker. Una parte de esta tesis es tuya, por todas las horas que pasamos charlando acerca de Fusarium y la mejora genética... Muchas gracias por haber compartido tu conocimiento conmigo.

A Isi, por abrirme la puerta de tu corazón desde el primer momento que nos vimos. A Ernesto y Gorka, por el apoyo moral recibido y las risas compartidas. A Marina, Javi, Raquel, Judith, Ziortza, Iratxe, Ana, Deiene, Claudia... por buena gente. A Maite, Eugenia Sanz y Txekos, por estar siempre dispuestos a echar una mano.

Gracias a mi pequeño grupo de trabajo en la UPV: Miren, Joseba y la recién incorporada Marta. Ha sido un placer trabajar con vosotros y, sinceramente espero que nuestros caminos no se separen aquí. Muchas gracias también a Isabel Salcedo por todas las horas invertidas escudriñando cada imagen de microscopía y por tus valiosas aportaciones. Gracias a Igor, María, Izkander, Izargi, Ximena... por los buenos ratos compartidos. De la UPV, quiero destacar especialmente la figura de Miren... bendigo el día en que nos conocimos y empezamos juntas esta andanza. Por todo lo que me has apoyado, comprendido y ayudado. Has sido la figura clave en este proyecto, yo diría que algo similar a una madre científica. Has estado siempre disponible, siempre pendiente, siempre accesible. Y siempre con gesto y palabra amable. Eso, en este mundillo, no tiene precio.

A David Fogarty, por haberme enseñado lo que nadie supo enseñarme. ¡No sabes cuánto te lo agradezco! A Ricardo Andrade y los "chicos de microscopía". Pocas veces he visto un servicio tan efectivo y encima, con un ambiente tan agradable. Puedo decir con la boca grande que ha sido un verdadero placer. A Belén y Quique por la maquetación de la tesis, por haberme ayudado sin dudar en este momento tan delicado. Este tipo de cosas sólo las hacen los amigos de verdad. A Íñigo, por sus traducciones exprés. A Berta, por ser y estar siempre ahí.

A Endika, por la ayuda prestada en todos los ámbitos en que ha ido desarrollándose esta tesis. Por ser mi chispa en la vida. Por darme a nuestra querida Pitusi. Y por supuesto, gracias a Alazne e Izaskun por vuestro buen rollo, por comprender todas mis ausencias. Porque no imagino mejores hermanas para Nabia.

Gracias a mi hermano, por confiar en mí desde el principio al final. Por ser el mejor hermano del mundo.

Y gracias a mi padre, por haberme transmitido algo de su santa paciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE ABREVIACIONES	11
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN	19
1. LA PLANTA HUÉSPED: <i>PINUS RADIATA</i> D. DON.	21
1.1. Anatomía del género <i>Pinus</i>	25
1.1.1. Anatomía del tallo.	25
1.1.2. Anatomía de la raíz.	31
1.2. Mecanismos de respuesta de los pinos al ataque patógeno.	32
2. EL CHANCRE RESINOSO DE LOS PINOS Y SU AGENTE CAUSAL: UNA PERSPECTIVA HISTÓRICA.	33
3. LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.	46
4. LA BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.	48
4.1. La microscopía aplicada a la fitopatología.	48
4.2. La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real como herramienta de estimación de la biomasa fúngica <i>in planta</i>	50
4.2.1. Principios teóricos de la cuantificación mediante qPCR.	52
4.2.2. Métodos de cuantificación.	55
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. ORGANISMOS.	63
1.1. Plantas.	63
1.1.1. <i>Pinus radiata</i> D. DON.	63
1.2. Hongos.	63
1.2.1. <i>Fusarium circinatum</i> Nirenberg et O'Donnell	63
1.3. Bacterias.	64
1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	64
1.3.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	64
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	64
2.1. <i>Pinus radiata</i>	64

2.1.1.	Germinación y crecimiento en invernadero.	64
2.1.2.	Ensayos de infección en invernadero de protección biológica. ...	65
2.2.	<i>Fusarium circinatum</i>	65
2.2.1.	En medio líquido.	66
2.2.2.	En medio sólido.	66
2.3.	<i>Escherichia coli</i>	66
2.4.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
3.	MANIPULACIÓN DE <i>FUSARIUM CIRCINATUM</i>	68
3.1.	Obtención de cultivos monospóricos.	68
3.2.	Conservación de aislados.	69
3.3.	Recolección de micelio.	70
3.4.	Recolección de conidios.	70
3.4.1.	Método para obtener grandes cantidades en medio líquido.	70
3.4.2.	Método rápido a partir de cultivo en placa.	71
4.	OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	72
4.1.	ADN genómico de la planta.	72
4.2.	ADN genómico del hongo.	72
4.2.1.	DNeasy Plant mini Kit, de Qiagen.	73
4.2.2.	Método "TENSP".	73
4.2.3.	Método "CETAB".	74
4.2.4.	Método rápido a partir de cultivo en placa.	75
4.3.	ADN de plásmidos.	76
4.3.1.	High Pure Isolation Kit.	76
4.3.2.	Lisis alcalina.	77
4.3.3.	Cracking de colonias.	77
5.	MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	78
5.1.	Tratamiento con enzimas de restricción.	78
5.2.	Ligaciones.	79
5.3.	Electroforesis en geles de agarosa.	80
5.3.1.	Electroforesis lineal de ADN.	80
5.3.2.	Recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.	81
5.4.	Recuperación de fragmentos de ADN a partir de suspensiones líquidas.	81
5.5.	Cuantificación de ácidos nucleicos.	82
6.	VECTORES DE CLONACIÓN: PÁSMIDOS.	82
6.1.	pBluescript II KS (-).	83
6.2.	pBHt1.	84
6.3.	pgpdAsGFP.	85
7.	TRANSFORMACIONES BACTERIANAS.	86
7.1.	<i>Escherichia coli</i>	87

7.1.1. Mediante choque térmico.	87
7.1.2. Mediante electroporación.	89
7.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	90
7.2.1. Mediante electroporación.	90
8. TRANSFECCIÓN: TRANSFORMACIÓN FÚNGICA.	91
8.1. Transformación de <i>Fusarium circinatum</i> mediante el método de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	91
8.1.1. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	91
8.1.2. Preparación de <i>Fusarium circinatum</i>	92
8.1.3. Co-cultivo de <i>A. tumefaciens</i> con esporas de <i>F. circinatum</i>	92
8.2. Análisis de la estabilidad mitótica de los transformantes.	93
9. ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTA.	94
9.1. Inoculación aérea.	94
9.1.1. Preparación del inóculo.	94
9.1.2. Procedimiento.	94
9.1.3. Evaluación de la sintomatología.	97
9.1.4. Índice de progresión de la enfermedad.	97
9.2. Inoculación en sustrato.	98
9.2.1. Preparación del inóculo.	98
9.2.2. Procedimiento.	99
9.2.3. Evaluación de la sintomatología.	100
10. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS.	101
10.1. Equipamiento óptico.	101
10.1.1. Microscopía óptica convencional.	102
10.1.2. Microscopía de fluorescencia.	102
10.1.3. Microscopía confocal láser de barrido.	102
10.2. Preparación de las muestras.	103
10.3. Procesamiento de las imágenes digitales.	103
11. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.	104
11.1. PCR clásica o convencional.	105
11.1.1. Diseño de oligonucleótidos.	105
11.1.2. Condiciones.	107
11.2. PCR cuantitativa a tiempo real.	108
11.2.1. Diseño de oligonucleótidos.	110
11.2.2. Condiciones.	112
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	113
RESULTADOS	115
1. TRANSFORMACIÓN DE <i>FUSARIUM CIRCINATUM</i> CON EL GEN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE.	117

1.1. Construcción del vector de transformación pNMk2.	117
1.1.1. Comprobación mediante restricción enzimática.	120
1.1.2. Comprobación mediante PCR.	122
1.2. Transformación de <i>Fusarium circinatum</i> mediante el sistema de cocultivo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	122
1.3. Análisis de los transformantes.	123
1.3.1. Detección del gen <i>sgfp</i> en el genoma fúngico mediante PCR. .	123
1.3.2. Detección de la proteína <i>sgfp</i> por microscopía.	124
1.3.3. Homogeneidad y estabilidad genética.	125
1.3.4. Caracterización fenotípica del transformante Fc-GFP1.	126
 2. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE <i>FUSARIUM CIRCINATUM</i> TRAS LA INOCULACIÓN EN EL TALLO DE <i>PINUS RADIATA</i>	131
2.1. Evaluación macroscópica de la sintomatología.	132
2.1.1. Incidencia de los síntomas de la enfermedad a lo largo del proceso de infección.	132
2.1.2. Cantidad de resina exudada.	134
2.2. Variación de la biomasa fúngica a lo largo del proceso de infección. .	135
2.2.1. Análisis y selección de los cebadores usados en la PCR cuantitativa. .	136
2.2.2. Rectas patrón para la cuantificación de ADN del patógeno y de su planta hospedadora.	139
2.2.3. Curva de crecimiento de <i>Fusarium circinatum in planta</i>	140
2.3. Evaluación a nivel histológico.	142
2.3.1. Progresión radial de la colonización del tallo.	143
2.3.2. Progresión vertical de la colonización del tallo.	150
2.3.3. Alteración de los conductos resiníferos.	155
 3. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE <i>FUSARIUM CIRCINATUM</i> TRAS LA INOCULACIÓN EN EL SUSTRATO DE CRECIMIENTO DE <i>PINUS RADIATA</i> . .	161
3.1. Síntomas visibles de la enfermedad en la parte aérea de las plantas. .	161
3.2. Evaluación histológica de la interacción planta-patógeno.	163
3.2.1. Llegada del inoculo al sistema radicular de la planta.	165
3.2.2. Adhesión del patógeno a la raíz de la planta huésped.	165
3.2.3. Penetración y colonización de la raíz.	168
3.2.4. Invasión y colonización de la raíz principal, el cuello de la raíz y el tallo.	175
3.2.5. Obstrucción del xilema de los pinos.	179
3.3. Arquitectura radical.	182
 DISCUSIÓN	185
1. GENERACIÓN DE TRANSFORMANTES GFP DE <i>PINUS RADIATA</i>	188
2. INOCULACIÓN EN EL TALLO.	189
3. INOCULACIÓN EN EL SUSTRATO.	199
4. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.	208
 CONCLUSIONES	213
 BIBLIOGRAFÍA	219

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hábito de crecimiento de árboles adultos de <i>Pinus radiata</i>	22
Figura 2. <i>Pinus radiata</i> en el País Vasco.	24
Figura 3. Xilema secundario de <i>Pinus sp.</i>	26
Figura 4. Corte transversal del tallo de <i>Pinus taiwanensis</i>	27
Figura 5. Diagrama tridimensional de un cubo de xilema de <i>Pinus halapensis</i>	28
Figura 6. Traqueidas axiales de <i>Pinus sp.</i>	29
Figura 7. Disposición de los tejidos en el tallo de <i>Pinus sp.</i>	30
Figura 8. Disposición de los tejidos en la raíz de <i>Pinus sp.</i>	31
Figura 9. Chancro resinoso en el tronco de <i>Pinus radiata</i>	34
Figura 10. Primeros rasgos identificativos del agente causal del chancro resinoso de los pinos.	35
Figura 11. Conidióforo con polifálidas.....	35
Figura 12. Árbol filogenético del complejo de especies de <i>Gibberella fujikuroi</i>	41
Figura 13. Curvas de cinética de la reacción propias de la PCR cuantitativa para distintas muestras con diferente cantidad de ADN.....	53
Figura 14. Cinética de la reacción de amplificación en escala semilogarítmica.....	54
Figura 15. Mapa del plásmido pBluescript II KS (+/-).....	83
Figura 16. Esquema representativo de la obtención de pBHt1	84
Figura 17. Mapa del plásmido pgpdAsgfp.....	85
Figura 18. Ensayo de inoculación del sustrato de crecimiento de plántulas de <i>Pinus radiata</i> con micelio de <i>Fusarium circinatum</i>	99
Figura 19. Esquema de la construcción del plásmido pNMk2	118
Figura 20. Mapa de pNMk2	119
Figura 21. Digestiones enzimáticas del plásmido pNMk1	121
Figura 22. Digestiones enzimáticas del plásmido pNMk2.....	121
Figura 23. Comprobación de la presencia de los genes <i>sgfp</i> y <i>hph</i> en la secuencia del plásmido pNMk2 mediante PCR.....	121

Figura 24. Esquema representativo del sistema de transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	123
Figura 25. Comprobación de la integración del gen <i>sgfp</i> en el genoma de <i>Fusarium circinatum</i> mediante PCR.	124
Figura 26. Expresión de la proteína <i>sgfp</i> en el citoplasma de las células de <i>Fusarium circinatum</i> .	125
Figura 27. Crecimiento vegetativo de la estirpe silvestre de <i>Fusarium circinatum</i> y de su transformante.	126
Figura 28. Tasa de crecimiento de las colonias procedentes de la estirpe silvestre de <i>Fusarium circinatum</i> y de su transformante.	127
Figura 29. Índice de Progresión de la Enfermedad.	131
Figura 30. Evolución temporal de la incidencia de los síntomas de enfermedad tras la inoculación del tallo de <i>Pinus radiata</i> con <i>Fusarium circinatum</i> .	133
Figura 31. Cantidad de resina exudada por plántulas de <i>Pinus radiata</i> inoculadas con <i>Fusarium circinatum</i> .	135
Figura 32. Curvas de disociación realizadas sobre el producto final de las PCR.	138
Figura 33. Rectas patrón asociadas a las secuencias diana en el genoma de <i>Fusarium circinatum</i> y de <i>Pinus radiata</i> .	139
Figura 34. Curva de crecimiento de <i>Fusarium circinatum</i> durante la colonización del tallo de <i>Pinus radiata</i> .	141
Figura 35. Aspectos generales de la colonización de <i>Pinus radiata</i> por <i>Fusarium circinatum</i> durante diferentes fases de la infección.	144
Figura 36. Colonización de las capas más externas de <i>Pinus radiata</i> después de la inoculación con <i>Fusarium circinatum</i> .	146
Figura 37. Colonización del xilema de <i>Pinus radiata</i> por <i>Fusarium circinatum</i> .	147
Figura 38. Colonización de la médula de <i>Pinus radiata</i> después de la inoculación con <i>Fusarium circinatum</i> .	147
Figura 39. Conidióforos de <i>Fusarium circinatum</i> en la médula de <i>Pinus radiata</i> .	149
Figura 40. Distribución polarizada de la presencia de <i>Fusarium circinatum</i> en el xilema de <i>Pinus radiata</i> así como de los conductos resiníferos afectados.	151
Figura 41. Progresión vertical de <i>Fusarium circinatum</i> a lo largo del tallo de <i>Pinus radiata</i> .	152
Figura 42. Conductos resiníferos de <i>Pinus radiata</i> .	155
Figura 43. Traza foliar de <i>Pinus radiata</i> .	156
Figura 44. Conducto resinífero cortical de <i>Pinus radiata</i> .	157

Figura 45. Plantas control de <i>Pinus radiata</i>	158
Figura 46. Conductos resiníferos traumáticos en <i>Pinus radiata</i> tras la inoculación con <i>Fusarium circinatum</i>	159
Figura 47. Variación en la densidad media de conductos resiníferos presentes en el xilema de <i>Pinus radiata</i> tras la inoculación con <i>Fusarium circinatum</i>	160
Figura 48. Evolución temporal de la incidencia de los síntomas de enfermedad en la parte aérea de <i>Pinus radiata</i> cuyo sustrato de crecimiento había sido inoculado con micelio vegetativo de <i>Fusarium circinatum</i>	162
Figura 49. Análisis de la rizosfera y de las raíces de <i>Pinus radiata</i> tras la inoculación del sustrato de crecimiento de las plantas con <i>Fusarium circinatum</i>	164
Figura 50. Estadios iniciales en la colonización de la superficie radical de <i>Pinus radiata</i> por <i>Fusarium circinatum</i>	166
Figura 51. Estructuras relacionadas con la reproducción asexual de <i>Fusarium circinatum</i> en la superficie de las raíces de <i>Pinus radiata</i>	167
Figura 52. Raíz necrótica de <i>Pinus radiata</i>	168
Figura 53. Fenómenos relacionados con la penetración de <i>Fusarium circinatum</i> en las raíces de <i>Pinus radiata</i>	169
Figura 54. Penetración de <i>Fusarium circinatum</i> en las raíces de <i>Pinus radiata</i> , a través de los pelos radiculares.....	170
Figura 55. Colonización de la raíz de <i>Pinus radiata</i> por <i>Fusarium circinatum</i>	171
Figura 56. Invasión del tejido vascular de la raíz de <i>Pinus radiata</i> por <i>Fusarium circinatum</i>	172
Figura 57. Representación esquemática de la secuencia temporal en que se detecta, en las distintas regiones del cuerpo de <i>Pinus radiata</i> , a la cepa de <i>Fusarium circinatum</i> que expresa la proteína verde fluorescente.	174
Figura 58. Colonización de la raíz principal de <i>Pinus radiata</i> por <i>Fusarium circinatum</i>	176
Figura 59. Progresión vertical de la infección del cuerpo primario de <i>Pinus radiata</i> , desde la raíz principal hacia el tallo.	178
Figura 60. Colonización del cuello de la raíz de <i>Pinus radiata</i> por <i>Fusarium circinatum</i>	179
Figura 61. Fenómenos relacionados con la obstrucción del xilema de <i>Pinus radiata</i> después de haber inoculado su sustrato de crecimiento con <i>Fusarium circinatum</i>	180
Figura 62. Arquitectura del sistema radical de plántulas de 1 año de edad de <i>Pinus radiata</i>	183

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala de severidad, con valores del 1 al 5, aplicada para la valoración de los síntomas de enfermedad visibles en las plántulas de pino inoculadas en el tallo con esporas de <i>Fusarium circinatum</i>	95
Tabla 2. Escala, con valores del 0 al 3, aplicada en la valoración de la cantidad de resina exudada por las plántulas de <i>Pinus radiata</i> inoculadas en el tallo con esporas de <i>Fusarium circinatum</i>	96
Tabla 3. Escala, con valores del 1 al 4, usada en la valoración de los síntomas de la parte aérea de las plántulas de <i>Pinus radiata</i> tras la inoculación de su sustrato de crecimiento con <i>Fusarium circinatum</i>	100
Tabla 4. Parejas de cebadores escogidos o diseñados específicamente para la detección e identificación de secuencias de ADN en el presente trabajo.....	106
Tabla 5. Resultado de los ensayos de infección realizados con esporas de <i>Fusarium circinatum</i> sobre el tallo de <i>Pinus radiata</i> de 1 año y evaluados durante 8 semanas según una escala numérica (1-5) que valora el grado de severidad de los síntomas.....	129
Tabla 6. Parámetros de las ecuaciones de regresión de las rectas patrón de ADN de <i>Fusarium circinatum</i> y de <i>Pinus radiata</i>	140

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNr	ADN ribosómico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i> , polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
AMPR	Gen de resistencia a la ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNasa	Ribonucleasa
Ca	Cambium
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> , virus del mosaico de la coliflor
CAD	Cinamil alcohol deshidrogenasa
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> , microscopio confocal láser de barrido
Co	Córtex
CR	Conductos resiníferos
Ct	<i>Cycle threshold</i> , ciclo umbral
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
ddi	Días después de la inoculación
dNTP	Desoxinucleótido-5'-trifosfato
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EPPO	<i>European and mediterranean plant protection organization</i>
F	Floema
FAO	Organización de la naciones unidas para la alimentación y la agricultura

Fc-GFP1	Transformado de <i>Fusarium circinatum</i> con el gen de la proteína verde fluorescente
Fc-WT	<i>Wild type</i> , estirpe silvestre de <i>Fusarium circinatum</i>
fg	Femptogram
g	Gramo
G	Guanina
gpdA	Gen de <i>Aspergillus nidulans</i> que codifica la enzima GPD
GPD	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente
h	Hora
ha	Hectárea
hph	Gen de resistencia a la higromicina
IFN3	Tercer inventario forestal nacional
IGS	<i>Intergenic spacer region</i> , región espaciadora intergénica
IPE	Índice de progresión de la enfermedad
KANR	Gen de resistencia a la kanamicina
Kb	Kilobases
k	Kilo
l	Litro
LB	Left T-border, borde de integración izquierdo
m	Metro
M	Médula
MC	Madera de compresión
MCS	<i>Multiple cloning site</i> , multidiana de restricción
mg	Miligramo
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nly	Gen <i>Needly</i>
p	Peso
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , tampón salino
PC	Parénquima cortical
PFA	Paraformaldehído
pg	Picogram

pKS	Plásmido pBluescript II KS
R	Radios medulares
RB	<i>Right T-border</i> , borde de integración derecho
PCR	<i>Polimerasa Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PDA	<i>Potato dextrose agar</i> , caldo de patata con agar (medio de cultivo)
PDB	<i>Potato dextrose broth</i> , caldo de patata (medio de cultivo)
PEG	Polietilenglicol
PI	Punto de inoculación
PR	Pelos radiculares
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	<i>quantitative</i> PCR, PCR cuantitativa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
<i>sgfp</i>	<i>Synthetic green fluorescent protein gene</i> , gen sintético de la proteína verde fluorescente
TA	Traqueida axial
T-DNA	<i>Transferable DNA</i> , ADN de transferencia
T _m	<i>Melting Temperature</i> , temperatura de fusión
TR	Traqueida radial
trpC	Gen que codifica una enzima bifuncional en la biosíntesis del triptófano
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UBIQ	Ubiquitina
Var	Variedad
VCG	<i>Vegetative compatibility group</i> , grupo de compatibilidad vegetativa
X	Xilema
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol b-D-galactosido
XP	Xilema primario
XS	Xilema secundario
y cols.	y colaboradores

RESUMEN

El “chancro resinoso de los pinos” es una enfermedad causada por *Fusarium circinatum* (Nirenberg *et* O’Donnell), un hongo ascomiceto patógeno que afecta a más de 50 especies de pino en todo el mundo. Una de las especies más susceptibles al ataque de este patógeno es precisamente la conífera más extensamente cultivada a nivel mundial: *Pinus radiata* D. Don. El desequilibrio ecológico que supone esta enfermedad ha supuesto una gran repercusión a nivel socio-económico que ahora, interesa atajar. La mejor manera de enfrentar un reto de este alcance es aumentar el conocimiento acerca del problema en cuestión y en este sentido la presente tesis pretende contribuir a mejorar la comprensión de los mecanismos que subyacen a la interacción patogénica establecida entre estos organismos. Con tal fin, se investigó la dinámica espacial y temporal del proceso de infección *in planta* durante las interacciones compatibles entre *P. radiata* y *F. circinatum* que conducen al desarrollo de la enfermedad del chancro resinoso.

En primer lugar se generó un transformante de *F. circinatum* que portara y expresara eficazmente el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Dicho transformante, junto con técnicas de microscopía de fluorescencia avanzadas como la microscopía confocal, demostró ser un marcador idóneo para monitorizar la infección *in planta*. De esta forma, se estudió la secuencia de eventos que tienen lugar desde la inoculación del patógeno en el tallo o en el sustrato de crecimiento de las plántulas hasta que estas mueren a causa de la infección. Además, también se caracterizó la curva de crecimiento del patógeno *in planta* a lo largo del proceso de infección. Para ello, se cuantificó la cantidad de ADN de *F. circinatum* en relación a la cantidad de ADN de *P. radiata* mediante un protocolo de PCR cuantitativa que permitió detectar cantidades del orden de 0.01 pg de ADN patógeno a partir de muestras complejas como son el tallo de los pinos.

Se diferenciaron tres fases en la curva de crecimiento del patógeno durante la colonización del tallo: en un inicio, la biomasa del patógeno aumentó exponencialmente en concurrencia con la colonización de la corteza y el floema; después, se produjo una desaceleración en el ritmo de crecimiento fúngico que coincidió con la producción de estructuras conidiogénicas en la capa más profunda del tallo de los pinos; finalmente, el patógeno alcanzó su capacidad de carga en el momento en que aparecieron los primeros síntomas de marchitamiento en las plantas.

La dinámica espacial de la infección en el tallo sigue un patrón definido por la accesibilidad de los recursos nutritivos del huésped, el cual invadió inicialmente los tejidos más accesibles y ricos en nutrientes, esto es: el floema y el parénquima. Este último tejido está presente tanto en el córtex como en la médula y en los radios medulares de los pinos.

En la colonización horizontal sobresalió la rápida invasión de la parte central del pino (constituido por parénquima medular) a través de los radios medulares y la invasión del floema y la zona cambial, a modo de anillo, circunvalando el tallo.

En el caso de la colonización vertical la infección progresó por esas mismas vías tanto hacia arriba como hacia abajo en el tallo, pero además, destaca la propagación del patógeno a través del xilema, por medio tanto de las traqueidas axiales como de los conductos de resina.

Los conductos de resina jugaron un papel clave en el transcurso de la infección. Se constató que el número de conductos resiníferos en el xilema aumentó en respuesta a la infección por *F. circinatum*, al igual que aumentó la cantidad de resina exudada por la planta. Se comprobó que dicho aumento estaba proporcionalmente relacionado con la susceptibilidad de cada planta al patógeno. Además, *F. circinatum* demostró tolerar la resina siendo frecuente observar al hongo dentro de los conductos resiníferos de los pinos. Estos resultados plantean la intrigante posibilidad de que la generación de nuevos conductos resiníferos puede suponer un mayor beneficio para el hongo que para la planta.

Tanto los análisis de qPCR como el estudio histopatológico mediante microscopia confocal, indicaron que el marchitamiento de la parte aérea de la planta, que es el síntoma típico de la enfermedad causada por *F. circinatum*, se debe a tres eventos que de forma combinada causan el bloqueo del suministro de agua. Estos eventos son: la obstrucción de las traqueidas por las hifas y las esporas patógenas, el colapso generalizado de la red de células vivas del xilema y la estimulación de la producción de resina que taponan el xilema.

Por otro lado, el análisis a fondo de la infección de las raíces de *P. radiata* por *F. circinatum* ha revelado características en la conducta de este patógeno hasta ahora desconocidas. Por ejemplo, se visualizaron hifas exploradoras de *F. circinatum*, surgidas de una fuente de inóculo distante del sistema radicular de los pinos, que llegaban hasta la superficie de las raíces y se adherían a ella.

El patógeno, una vez unido a la superficie radicular, era capaz de penetrar la rizodermis sin que se diera la necesidad de un daño previo en la planta. Así, no sólo se observó al patógeno concentrado en torno a heridas naturales de la planta, como son los sitios de emergencia de nuevas raíces laterales (penetración indirecta), sino que también se encontraron indicios que sugieren la penetración directa de superficies celulares intactas. Después de esta fase inicial en el establecimiento de la infección, *F. circinatum* creció y proliferó con éxito en las raíces de los pinos.

Hemos demostrado que *F. circinatum* es capaz de propagarse desde el sistema radicular de los pinos hasta las partes aéreas de la planta. Esto sucedió a través de dos vías predominantes: el floema y el xilema. Como ya se ha mencionado, el floema, que transporta la savia elaborada, constituye una fuente de alimento fácil para el patógeno, así que fue habitual encontrar este tejido completamente colapsado por hifas de *F. circinatum*. De la misma manera que sucedió cuando se inoculó al patógeno en el tallo de los pinos, el patógeno invadía también los tejidos limítrofes al floema, esto es, el parénquima cortical hacia el exterior de la planta y la zona cambial hacia el interior de la planta. En consecuencia, el patógeno colonizaba un anillo de tejido vegetal (córtex-floema-cambium) que iba bordeando el cuerpo de la planta, contribuyendo a su estrangulamiento.

Por otro lado, la colonización de las traqueidas del xilema primario y secundario permitió al hongo acceder a las reservas de alimentos del huésped que se almacenan en los tejidos localizados más internamente, esto es, la médula, el parénquima de los radios medulares y el epitelio de los canales resiníferos. Cabe destacar que se detectaron esporas de origen asexual (micro y macroconidios) dentro de las traqueidas de los pinos, y que la conidiación parece contribuir a la diseminación del patógeno dentro de la planta.

Al final del ensayo de infección en raíz, solo el 15% de las plantas había sobrevivido, un resultado similar al índice de supervivencia mostrado tras la inoculación en tallo, que estuvo en torno al 10-15%. El análisis de la arquitectura del sistema radical que se hizo a las plantas enfermas reveló que solo habían resultado significativamente dañadas las raíces más finas, es decir, aquellas con diámetro inferior a 0,5 mm. Nuestros resultados sugieren que el declive de la planta tuvo más que ver con el aumento de la resistencia al flujo de agua, ocasionado por el colapso del sistema vascular, que con una reducción en la absorción de agua, debida a un sistema radicular deteriorado.

INTRODUCCIÓN

1



La presente tesis es una valiosa contribución a la prevención, el combate y el control de una plaga que perjudica gravemente a nuestra sociedad tanto desde el punto de vista económico como, y sobre todo, ecológico. Los bosques y plantaciones de pino radiata y otras 56 especies de pino sufren graves daños originados por el hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg *et* O'Donell. En esta introducción, primero se expondrá la importancia del huésped de esta interacción patogénica y a continuación se presentará al patógeno citando, desde una perspectiva histórica, ciertos hitos relevantes desde su descubrimiento como agente causal de la enfermedad del chancro resinoso de los pinos, y desde una visión actual, sus principales características morfofisiológicas y epidemiológicas. Además, se intentará introducir al lector en los términos relacionados con la histopatología que se tratarán en los siguientes apartados de la tesis. Finalmente, se describirán las técnicas empleadas en esta investigación y los objetivos que se han pretendido alcanzar con la misma.

1. LA PLANTA HUÉSPED: *PINUS RADIATA* D. DON.

Pinus radiata D. Don. es una planta vascular que produce semillas (espermatófito) desnudas (gimnosperma) perteneciente al grupo de las coníferas y, dentro de este, a la familia de las pináceas. Las coníferas son el grupo más exitoso de gimnospermas dado que aparecen en el Carbonífero (Paleozoico), se desarrollaron ampliamente durante el Mesozoico y han sobrevivido hasta nuestra era (Neozoico). Aunque en la actualidad han sido reemplazadas en muchos lugares por las angiospermas, todavía son dominantes en los bosques de coníferas que habitan en zonas frías y templadas, principalmente en el hemisferio norte.

Pinus radiata, denominado vulgarmente pino radiata, pino de Monterey o pino insigne se caracteriza por ser un árbol de media talla, que alcanza una altura de 20 a 30 m. Su corteza, de color pardo oscuro,

es gruesa y profundamente agrietada. Su porte es regular, piramidal en la juventud, y con la edad se va ensanchando, haciéndose globoso y truncado. El sistema radical es somero, presentándose poco desarrollado en comparación con la parte aérea. Las acículas son de color verde, largas y generalmente envainadas en los fascículos (braquiblastos) en grupos de tres en tres, característica que le diferencia de otras especies de pino que solo presentan dos. Las piñas son ovoides y tienen carácter serótino, esto es, que permanecen sujetas al árbol durante muchos años sin que la semilla pierda viabilidad (Fernández-Manso y Sarmiento-Maillo, 2004). Sólo se abren temporalmente, cuando hace un fuerte calor, soltando parte de los piñones y volviendo a cerrarse después.

Esta conífera crece mejor en zonas con abundantes precipitaciones (superiores a los 900 mm/año) repartidas durante todo el año y en zonas sin sequía estival pronunciada y sin temperaturas demasiado frías. No tolera los suelos encharcados, prefiriendo suelos bien drenados, de textura franco-arenosa y algo ácidos, situados preferentemente sobre laderas o fondos de valle. Se desarrolla bien en altitudes inferiores a los 700 m sobre el nivel del mar (Dans del Valle y cols., 1999; Rodríguez y cols., 2006). Puede sobrepasar los 150 años de vida, pero en las plantaciones los turnos de corta máximos son de 30-35 años.

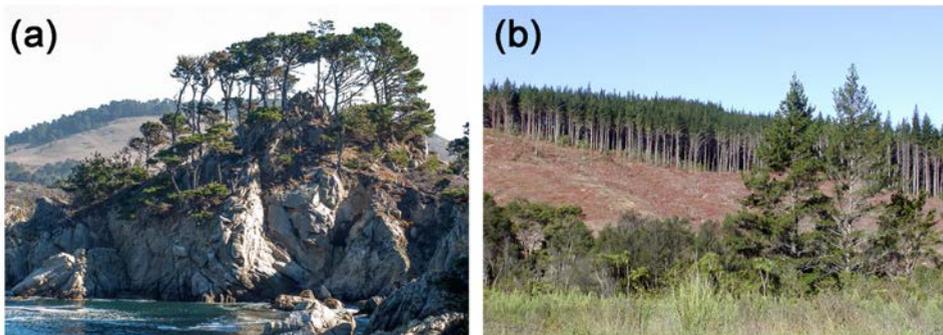


Figura 1. Hábito de crecimiento de árboles adultos de *Pinus radiata*. (a) Hábito en origen: Point Lobos State Park, California. (b) Hábito en plantación: Nueva Zelanda. Por: C.J. Earle, 2014, www.conifers.org/pi/Pinus_radiata.php.

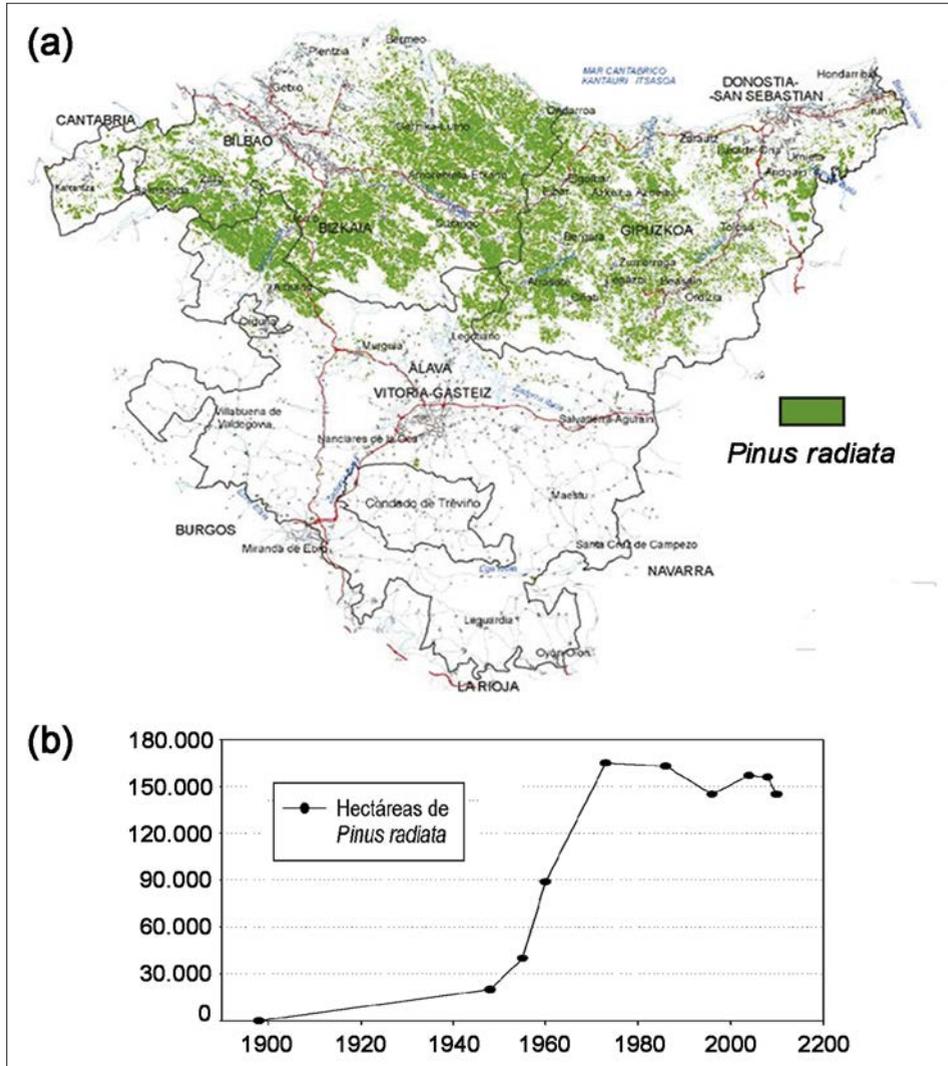
El pino radiata es un árbol originario de la costa Pacífica de Norteamérica (Fig. 1a), cuya área natural, de unas 6.000 ha, está restringida a tres poblaciones costeras en California (Año Nuevo, Monterrey y Cambria) y a dos pequeñas poblaciones de las islas mejicanas de Guadalupe y Cedros (Aragónés y cols., 1994; Wu y cols., 2007).

Desde finales del siglo XIX, y debido principalmente al rápido crecimiento que muestra como especie para la repoblación forestal de zonas con clima templado-húmedo (Scot, 1961, 1962), comenzó a difundirse artificialmente por varios continentes hasta convertirse en la actualidad en la conífera más extensamente cultivada a nivel mundial (Fig. 1b). Los países que cuentan con la mayor superficie de esta conífera son Chile, Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica y España, aunque existen otros con una pequeña pero significativa superficie como Italia, Kenia, Argentina y Uruguay (FAO, 2001). Se estima que la superficie total mundial ocupada por esta conífera asciende a unos 4 millones de ha (Nowak, 1993; Eldridge, 1997; Libby, 1997; Lavery y Mead, 1998; Michell, 2004).

Su gran expansión a nivel mundial ha sido propiciada, además de por su gran tasa de crecimiento, por la precocidad con que alcanza los máximos de producción en volumen, las características favorables de su madera para la utilización en pasta de papel y madera de sierra, las posibilidades de recoger grandes cantidades de semilla, su fácil propagación, su gran plasticidad y flexibilidad silvícola, así como la diversidad genética que presenta dentro de sus poblaciones naturales, lo que permite desarrollar programas de mejora y seleccionar genotipos adecuados para diferentes ambientes (Dans del Valle y cols., 1999). Además, se considera que la introducción del pino radiata, como especie productiva, en países de la costa pacífica (Chile, Nueva Zelanda y Australia) ha generado un importante desarrollo del sector forestal en estos países debido a la demanda de madera de los países asiáticos en desarrollo (Lewis y cols., 1993; Sutton, 1999).

En España la primera cita de *P. radiata* la realiza Cavanilles (1858) en un jardín botánico de Lekeitio (Guipúzcoa). En la actualidad, siendo

Figura 2. *Pinus radiata* en el País Vasco. (a) Distribución de pino radiata. En: Inventario Forestal de la CAPV, por: Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, 2010. (b) Evolución de la superficie de pino radiata. Adaptación de: *Diplodia pinea* y *Fusarium circinatum*, principales hongos de chancro en las masas forestales de *Pinus radiata* del País Vasco (p7), por I. García, 2011.



la conífera exótica más utilizada en repoblaciones, se encuentra distribuida principalmente por la Cornisa Cantábrica, donde se ha adaptado perfectamente al clima atlántico (Crecente-Campo, 2008), pero también en algunas provincias como Tenerife, León o Málaga.

En el País Vasco el pino radiata ocupa un 42% de su superficie arbolada, lo que la convierte en la especie forestal dominante del paisaje de este territorio (Inventario Forestal Nacional 3; Michel, 2004). Desde su introducción como especie para la repoblación forestal, a principios del siglo XX, la superficie ocupada por el pino radiata ha aumentado considerablemente y, en los últimos años, parece mantenerse estable en cifras en torno a las 150.000 ha (Fig. 2). Los estudios económicos sobre la producción de madera y rentabilidad económica estiman que la producción anual de madera se aproxima a los 1.800.000 m³, con una producción media de 331,67 m³/ha (Garayo, 1991; Michel, 2004).

1.1. ANATOMÍA DEL GÉNERO PINUS

Se piensa que las plantas primitivas se originaron en los mares donde fenómenos como la transpiración, la marchitez o la sequía no existen por naturaleza. Cuando las plantas comienzan a poblar la tierra, hace unos 450 millones de años, surgen dos problemas principales: por un lado, la necesidad de adquirir y mantener un suministro adecuado de agua para sus funciones vitales y, por otro lado, la necesidad de un soporte para su estructura. La superación de estas dificultades trajo consigo la principal diferenciación anatómica de las plantas: el desarrollo, a lo largo de un eje principal, de un tallo aéreo que sostiene a ramas y hojas, y el desarrollo bajo tierra de las raíces, característicamente muy ramificadas (Schweingruber, 2006).

1.1.1. ANATOMÍA DEL TALLO

En el tallo de ejemplares del género fósil *Rhynia*, datados del Devónico, se puede diferenciar una epidermis con cutícula que envuelve el tejido parenquimático y un simple haz vascular. Esta estructura anatómica aparentemente muy simple, en realidad, incluye todos los elementos contemporáneos en el cuerpo de las plantas vasculares. En estas los tejidos vegetales están organizados en tres grandes unidades conocidas como Sistemas de Tejidos, que son:

- **el sistema de tejidos dérmicos** (con función protectora): epidermis y peridermis.
- **el sistema de tejidos fundamentales** (que ejercen una función de almacenaje): parénquima, colénquima y esclerénquima.
- **el sistema de tejidos vasculares** (con una función conductora): xilema y floema.

Estos tres sistemas de tejidos, además de los tejidos meristemáticos, forman parte de la estructura tanto de la raíz como del tallo y de las hojas en el cuerpo de las plantas vasculares, lo cual revela la continuidad de esa organización básica ya presente en las primeras conquistadoras de la tierra.

Las plantas vasculares se conocen también como traqueófitas, término que deriva del vocablo griego *trakheia* (conducto áspero) en referencia a las traqueidas. Las traqueidas son células alargadas, altamente especializadas y de longevidad muy corta que pierden rápidamente el contenido celular transformándose en tubos huecos de paredes lignificadas que conducen la sabia bruta y sirven de sostén al cuerpo de la planta (Fig. 3).

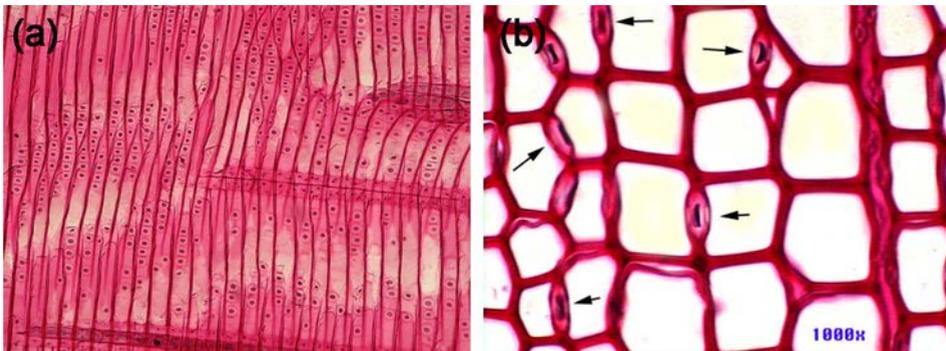


Figura 3. Xilema secundario de *Pinus sp.* (a) Sección radial que muestra la forma alargada y puntiaguda de las traqueidas y donde se aprecian las punteaduras areoladas. Por: MAB, 2011, www.flickr.com/photos/plantdiversity/6212482196. (b) Sección transversal en que se distinguen las punteaduras areoladas que comunican las paredes radiales de las traqueidas. En: 2011, <http://botit.botany.wisc.edu/Anatomy/Glossary/images/pinepits.jpg>.

Tanto el xilema como el floema del cuerpo primario de la planta, también llamados xilema y floema primarios, se forman por la diferenciación continua de nuevos elementos a partir del procambium. El procambium es un tejido meristemático que se diferencia ya en el embrión, y se produce continuamente a partir de los meristemos apicales.

La habilidad de producir xilema secundario, que apareció con las gimnospermas en el Carbonífero, marcó otro gran hito en la evolución de las plantas terrestres pues permitió la formación de un tronco consistente capaz de conducir suficiente agua hacia la copa. El desarrollo del crecimiento secundario implicó la reorganización de los haces vasculares que pasaron de ser cerrados a abiertos. Esto significa que una vez que se han formado el xilema y el floema primarios a partir del procambium, este se diferencia dando lugar al cambium vascular.

El cambium vascular está formado por células meristemáticas que, mediante divisiones periclinales, se diferencian para formar las células del xilema y floema secundarios. Así, a partir del cambium, el floema secundario se forma centrífugamente hacia la superficie de la planta. A la inversa sucede con el xilema secundario que se forma, a partir del cambium centrípetamente, hacia el interior de la planta. (Fig. 4). Por lo tanto, la actividad del cambium vascular produce en el xilema unos anillos de crecimiento anuales que quedan internos al propio meristemo,

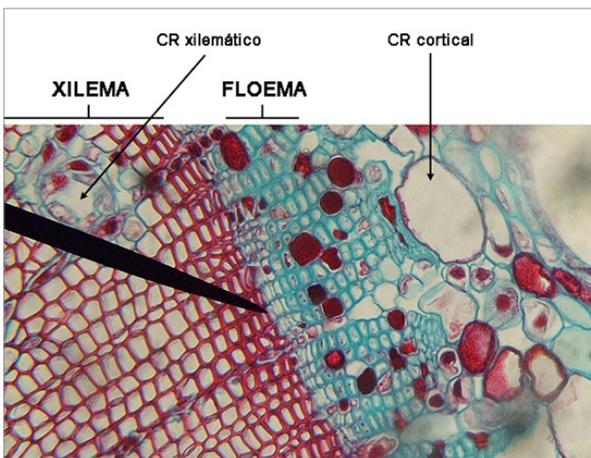


Figura 4. Corte transversal del tallo de *Pinus taiwanensis*. La punta de la manecilla señala la zona cambial situada entre el xilema (mostrado en rojo a la izquierda de la imagen) y el floema (que se distingue en azul a la derecha de la imagen). CR, conducto resinífero. Imagen adaptada de: Shihchuan, 2009, <https://www.flickr.com/photos/epingchris/4569896745/in/photostream/>

por lo que el cambium vascular progresivamente se aleja del eje del tallo. Esto es lo que produce el crecimiento en grosor de los tallos. Se piensa que la adquisición del crecimiento secundario permitió que las plantas invadieran los hábitats secos del continente (Schweingruber y cols., 2006).

El leño o el xilema de las coníferas suele denominarse madera blanda (*softwood*) en contraposición a la madera dura (*hardwood*) de las angiospermas. Esto se debe a que, al estar compuesto únicamente por traqueidas y parénquima, es un leño muy homogéneo (Fig. 5). Así, en el xilema del género *Pinus* encontramos los siguientes elementos:

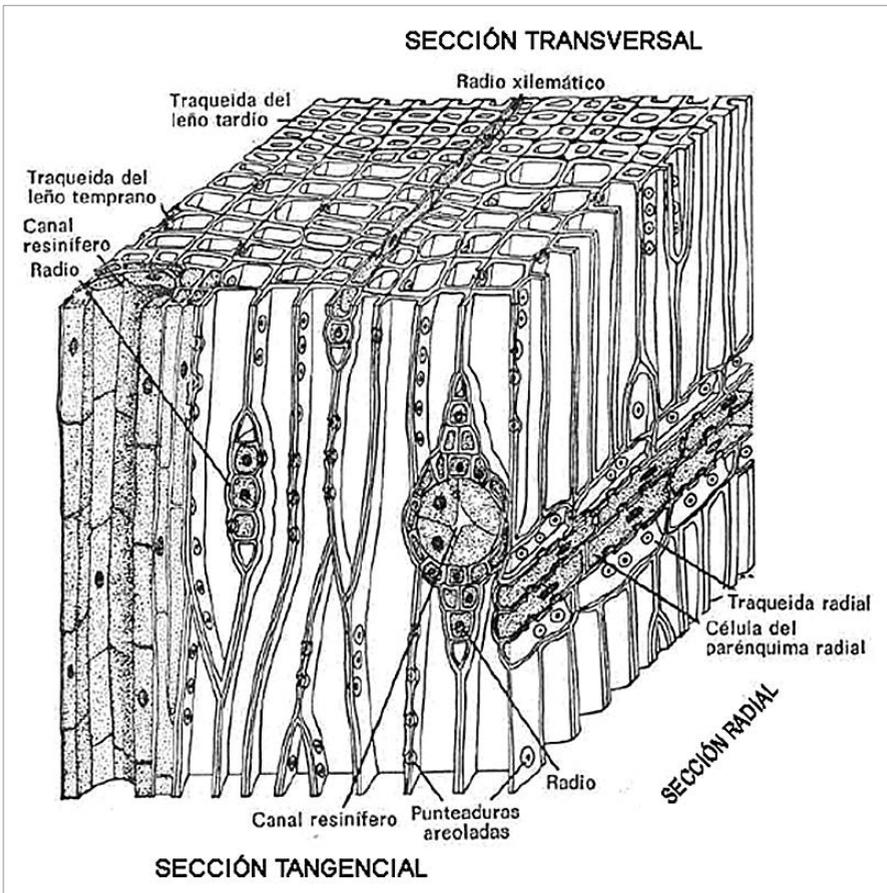


Figura 5. Diagrama tridimensional de un cubo de xilema de *Pinus halapensis*. En: Anatomía vegetal (p353), por A. Fahn, 1978, Madrid: Ediciones Pirámide.

- **Traqueidas axiales:** ocupan el 95% del volumen de la madera. Para que se produzca la circulación de sustancias en el leño, desde las raíces a las hojas, las paredes radiales de estas células presentan punteaduras areoladas, a través de las cuales, los líquidos pasan de una célula a otra. Las punteaduras pueden ser uniseriadas o biseriadas en posiciones opuestas (Fig. 6).

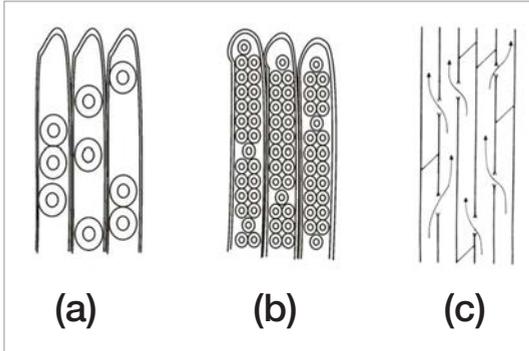


Figura 6. Traqueidas axiales de *Pinus sp.* Disposición uniseriada (a) o biseriada (b) de las punteaduras areoladas en las paredes radiales. (c) Representación esquemática de la circulación de líquidos a través de las punteaduras. En: 2010, www.fing.edu.uy/iq/maestrias/icp/materiales/2010/01_Quimica_y_Estructura_de_la_madera/Anatomia_de_la_madera.pdf

- **Parénquima vertical o axial:** en el género *Pinus* ha quedado reducido a los conductos resiníferos.
- **Traqueidas radiales:** se presentan asociadas a los radios medulares heterogéneos.
- **Parénquima radial:** constituyen los radios medulares. Las células parenquimáticas se caracterizan por presentar paredes delgadas, no lignificadas y punteaduras simples. Podemos encontrar radios heterogéneos que, además de parénquima y traqueidas, incluyen un conducto resinífero.
- **Células epiteliales:** son células del parénquima axial, de paredes finas y no lignificadas que circundan los canales resiníferos formando un epitelio. Están especializadas en la producción de resina que vierten al lumen del canal.
- **Canales resiníferos:** son espacios intercelulares que se forman de modo esquizógeno, es decir, por separación de células. En el gé-

nero *Pinus*, la cavidad se encuentra rodeada en primer lugar por una capa de células epiteliales y, después, por una o más capas de células de la vaina (que son células de paredes gruesas no lignificadas, pero muy ricas en sustancias pectínicas y cuya lámina interna tiene suberina). Los conductos resiníferos siempre están presentes en este género y pueden ocupar una posición axial o radial. Estas estructuras secretoras especializadas se conectan entre sí, por medio de anastomosis, formando una compleja y ramificada red.

Disposición de los tejidos en el tallo.

En el tallo de *Pinus*, el sistema vascular aparece como un cilindro que delimita una región externa (el córtex) y una interna (la médula) de tejido fundamental constituido por parénquima. Esas dos zonas de tejido fundamental se encuentran conectadas entre sí a través de los radios medulares que son unos paneles más o menos amplios también de parénquima fundamental (Fig. 7).

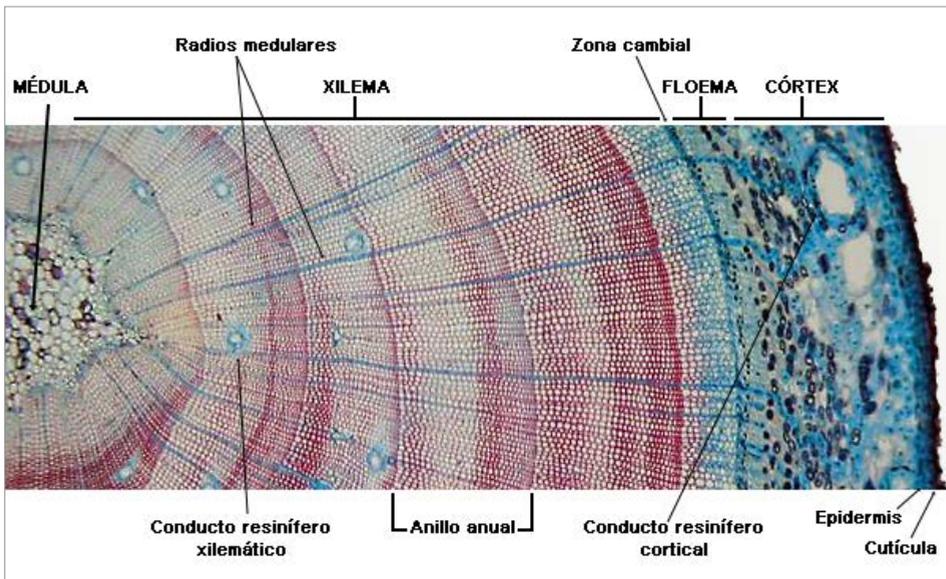


Figura 7. Disposición de los tejidos en el tallo de *Pinus*. Imagen adaptada de: Biology of Plants Tentative Schedule. Plant Physiology Information Website, por: R. E. Koning, 1994, http://plantphys.info/plant_biology/labaid/pinelab/

1.1.2. ANATOMÍA DE LA RAÍZ

El sistema radicular en *Pinus* es un sistema radicular de raíz axonomorfa o pivotante, es decir, presenta una raíz principal de la que, a partir del periciclo, surgen raíces laterales.

La ramificación es de tipo endógeno, es decir, las nuevas raíces se forman dentro de los tejidos internos a partir del periciclo que es una zona meristemática que rodea al cilindro vascular y que está en contacto directo con el xilema primario.

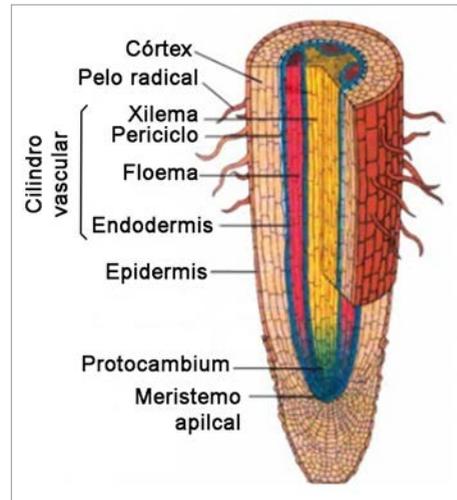


Figura 8. Disposición de los tejidos en la raíz de *Pinus*. En: 2013, www.slideshare.net/yantomusadi/bab-jaringan-tumbuhan

Las porciones maduras de la raíz tienen crecimiento secundario en grosor y cumplen principalmente una función de anclaje y de almacenamiento de materiales de reserva. Las porciones jóvenes, en los extremos del sistema radicular, se encuentran en proceso de crecimiento primario y cumplen la función de absorción.

Disposición de los tejidos en la raíz.

Los tres sistemas de tejidos (epidérmico, fundamental y vascular) se encuentran formando tres capas concéntricas (Fig. 8).

- **la epidermis:** uniseriada, con pelos radiculares.
- **el parénquima cortical:** normalmente más ancho que en el tallo, con un papel más destacado en almacenamiento. Presenta conductos resiníferos.
- **el cilindro vascular:** es compacto, es decir, el xilema se extienden hasta el centro y en un corte transversal se aprecia como estrellado (actinostela o protoestela). El xilema primario de las raíces forma dos o más polos (polos del xilema primario) y según su número la raíz será diarca, triarca, tetarca o poliarca. Asociados a los polos del xilema primario aparecen conductos resiníferos.

1.2. MECANISMOS DE RESPUESTAS DE LOS PINOS AL ATAQUE PATÓGENO

Pinus radiata es considerada como la especie más susceptible al ataque de *F. circinatum* (Hodge y Dvorak, 2000). Pero incluso dentro de una misma especie, por muy susceptible que ésta sea, el grado en el que cada individuo desarrolla la enfermedad es muy variable (Storer y cols., 1999). Además, el nivel de tolerancia de un individuo puede cambiar en el tiempo como resultado de una resistencia inducida asociada con la activación de los mecanismos de defensa naturales de la planta huésped, lo que produce cambios que disminuyen los efectos de posteriores ataques bióticos (Eyles y cols., 2010). Este fenómeno, descrito por primera vez en gimnospermas por Christiansen y cols., (1999), se ha descrito también en *P. radiata* como respuesta a la infección por *F. circinatum* (Bonello y cols., 2001; Gordon y cols., 2011).

Las coníferas son organismos que viven muchos años y parte de su éxito se debe a su capacidad de integrar múltiples mecanismos de defensa, constitutivos e inducidos, en una respuesta coordinada y efectiva. En ocasiones, ciertas respuestas de defensa pueden expresarse tanto de forma constitutiva como inducida (Franceschi y cols., 2005). Este es el caso de la oleorresina, la más común de las defensas de las coníferas.

Las oleorresinas son una mezcla compleja de terpenoides que normalmente permanece sometida a altas presiones en el interior de los canales resiníferos. La ruptura de estos provoca que fluya al exterior constituyendo el principal mecanismo de resistencia contra la invasión de insectos y de los patógenos que van asociados a ellos (Phillips y Croteau, 1999).

Los conductos resiníferos se forman de forma natural, ligados al crecimiento secundario, durante el normal desarrollo del pino, y se denominan conductos resiníferos constitutivos. Pero además, también pueden formarse de forma inducida por factores externos como por ejemplo heridas producidas al árbol y, en este caso, se denominan conductos resiníferos traumáticos. Estos presentan una distribución característica que los diferencia de los canales resiníferos constitutivos (Ban-

nan, 1936); los constitutivos generalmente aparecen solos y distribuidos irregularmente por el leño, mientras que los traumáticos se forman en series tangenciales de una o dos filas dentro de un anillo anual de xilema. Se sabe además que la resina producida por los conductos resiníferos traumáticos puede ser más fungistática que la resina producida por los conductos resiníferos constitutivos y esto es debido a que se modifica su contenido en terpenos y en compuestos fenólicos adicionales (Nagy y cols., 2000; Krokene y cols., 2003).

Son varios los estudios que han analizado este mecanismo de defensa en la respuesta de los pinos a la invasión por patógenos (Reid y cols., 1967; Hudgins y cols., 2005; Luchi y cols., 2005; Nagy y cols., 2005). Sin embargo, se conoce muy poco sobre el papel que juegan los conductos resiníferos, tanto los constitutivos como los traumáticos, durante el desarrollo de la enfermedad del chancro resinoso de los pinos, a pesar del hecho de que, como su nombre indica, una de las principales características de esta enfermedad es el exudado de copiosas cantidades de resina. Es por ello que resulta esencial llevar a cabo un análisis más integrado de los eventos que tienen lugar durante el proceso de infección por *F. circinatum* y que ayude a aclarar el papel de los mencionados conductos resiníferos.

2. EL CHANCRO RESINOSO DE LOS PINOS Y SU AGENTE CAUSAL: UNA PERSPECTIVA HISTÓRICA

La enfermedad conocida como “el chancro resinoso de los pinos” es una de las enfermedades que más problemas genera en los pinos de cualquier parte del mundo, cuyo negativo impacto en el terreno económico, ecológico y social ha sido bien documentado (Wingfield y cols., 2008).

Se detectó por primera vez en 1945 en un bosque del sureste de los Estados Unidos compuesto por una mezcla de árboles maduros de

Figura 9. Chancro resinoso en el tronco de *Pinus radiata*.



Pinus virginiana Mill, *Pinus echinata* Mill y *Pinus rigida* Mill. (Hepting y Roth, 1946). Los autores de dicho informe encontraron que las ramas, o la guía principal, de los pinos enfermos estaban muertas. En la base de las ramas muertas localizaron un chancro, caracterizado por formar una depresión en la que la corteza del pino adquiere un tono negruzco. Como característica más destacable, el chancro estaba cubierto de abundante resina que se derramaba por el tronco (Fig. 9). Precisamente de este síntoma (la copiosa exudación de resina), que permitía diferenciar ésta de otras enfermedades productoras de chancros, tomó su nombre la enfermedad.

Los autores designaron la causalidad de esta patología a una especie fúngica, aún no descrita, del género *Fusarium* debido a las características de su crecimiento en medio de cultivo sólido, caracterizado por desarrollar un micelio aéreo algodonoso de color blanco ligeramente violeta (Fig. 10a), y a la producción de los típicos macroconidios en forma de huso (Fig. 10b) que dan nombre al género *Fusarium*. Se asignó a la sección *Liseola* dado que no producía clamidosporas. Las clamidosporas son esporas de origen asexual con una gruesa pared, lo que les permite esperar en fase de latencia a que se den las condiciones adecuadas para desarrollarse (Herrera y Ulloa 1990).

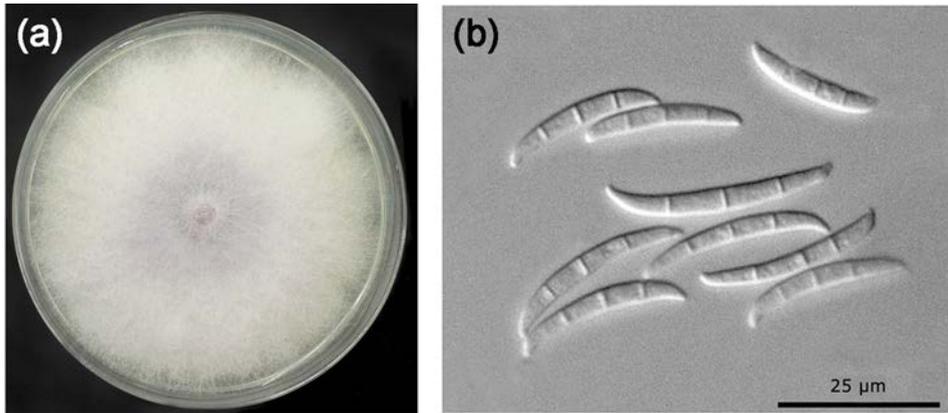


Figura 10. Primeros rasgos identificativos del agente causal del chancro resinoso de los pinos. (a) Cultivo en medio PDA **(b)** Macroconidios en forma de huso característicos del género *Fusarium* spp. Por: Leslie y Summerell, 2006, www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136630/5128

Tres años después fue encuadrado dentro de *Fusarium lateritium* Nees como una forma especial: *F. lateritium* f. sp. *pini* Hepting (Snyder y cols., 1949). La categoría de *forma specialis* es un rango informal de clasificación utilizado principalmente para designar grupos de hongos parásitos en función de su hospedador.

A finales de la década de los 70, Kuhlman y cols. (1978) asignaron este hongo a la especie *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wollenw. y Reinking, de nuevo en la sección *Liseola* basándose en la morfología de las células conidiógenas. Las células conidiógenas o fiálides son las células

en la hifa de las que nacen los conidios. Estas pueden ser de dos tipos: mono o polifiálidas, dependiendo de si

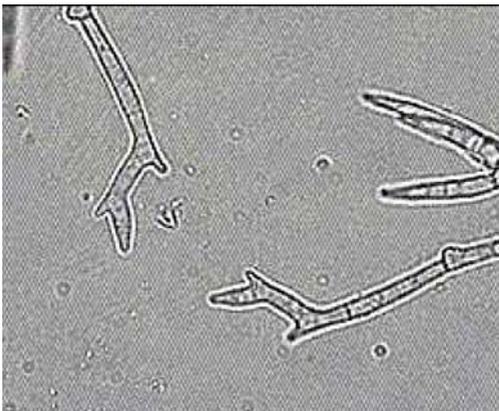


Figura 11. Conidióforo con poli-fiálidas. En: “*Fusarium circinatum* conocimiento del patógeno y establecimiento de bases para su control en *Pinus radiata*”, por: Ministerio de agricultura, servicio agrícola y ganadero, Ministerio de Chile, 2007, Informe final (p4).

los conidios nacen por una o por más aberturas. En el caso del agente causal del chancro resinoso de los pinos, se constató que producía abundantes microconidios a partir de mono y polifálides (Fig. 11) situadas en conidióforos (hifa que sostiene las fiálidas) ramificados.

De forma paralela, otro tipo de estudios desarrollados por Barrows-Broadus y Dwinell (1980) asociaron al patógeno a daños producidos no sólo en los troncos y ramas de los pinos afectados, sino también en estróbilos, piñas y semillas en las plantaciones y huertos semilleros; además, en la misma época, Barnard y Blakeslee (1980) descubrieron que causaba la muerte de plántulas de pino en los viveros forestales. Estos últimos, al describir la infección de plántulas de un año de edad de *Pinus elliottii* Enhelm por este patógeno, destacaron como síntomas principales: la clorosis y marchitez de las acículas (que pasan de un estado turgente y de color verde a un estado laxo y de color amarillento), la caída del ápice caulinar y la presencia de lesiones empapadas de resina en la base del tallo; siendo este último síntoma, según su criterio, el más apropiado para el diagnóstico eficaz de esta patología.

Poco más tarde, Barrows-Broadus y Dwinell (1983, 1984, 1985) sentaron las bases de la histopatología de esta enfermedad, a través del estudio histológico mediante microscopía óptica convencional de tejidos del tallo procedentes de pinos enfermos. Los autores identificaron hifas del patógeno en el interior de los conductos resiníferos y caracterizaron el tamaño de los conductos resiníferos corticales.

La taxonomía del género *Fusarium* se estabilizó significativamente a principios de los 80, a partir de la aceptación y el uso, por parte de la comunidad científica, de los trabajos de Gerlach y Nirenberg (1982) y de Nelson y cols., (1983) en los que, basándose en el concepto de especie morfológica, definieron escrupulosamente múltiples especies de *Fusarium*. A partir de esta revisión, *F. moniliforme* var. *subglutinans* ascendió a nivel de especie como *Fusarium subglutinans* (Wollenw. y Reinking) P.E. Nelson, Toussoun y Marasas (Nelson y cols., 1983), siendo su estado

teleomorfo o forma sexual *Gibberella fujikuroi*. La designación como especie de esta variedad, a la que pertenecía el hongo causante del chancro resinoso, se basó principalmente en la presencia de polifálidas y en la producción de microconidios en falsas cabezas, en lugar de en cadena. Según esta clasificación taxonómica, la especie morfológica *F. subglutinans* comprendía un gran grupo de hongos, de distribución ubicua y amplio rango de hospedadores, encontrando entre ellos a patógenos de pino, sorgo, maíz, arroz, caña de azúcar, piña y dracaena.

A principios de los 90, Correll y cols., (1991) propusieron asignar la categoría de *forma specialis pini* al agente causal del chancro resinoso para diferenciarlo del resto de patógenos englobados dentro del taxón *F. subglutinans*. Los autores realizaron múltiples ensayos de patogenicidad con el fin de determinar la virulencia de más de 200 cepas de *F. subglutinans* en plantas de *Pinus radiata*. Las cepas procedían no solo de tejidos de pino enfermo, sino también de insectos contaminados y de muestras de aire, pues se consideraba que estas eran dos de las principales vías de dispersión del patógeno. Además, también se testaron otras 44 cepas que incluían aislados de *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. moniliforme* provenientes de diversas plantas huésped. Comprobaron que sólo las cepas de *F. subglutinans* aisladas de los pinos (o de los insectos y muestras de aire recolectados en zonas con pinos infectados) resultaban virulentas en el pino radiata. Además, un año después presentaron los resultados de un ensayo de RFLP_s (*Restriction fragment length polymorphisms*) sobre ADN mitocondrial en el que diferenciaron un patrón de polimorfismos característico de los aislados de *F. subglutinans* provenientes de pinos enfermos (Correll y cols., 1992). Basándose en estos resultados el agente causal del chancro resinoso pasó a denominarse *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*.

Tradicionalmente, se consideraba que este era un patógeno de transmisión aérea (*air-borne*), cuyos propágulos penetran en la planta a través de heridas mecánicas producidas por la climatología, las prácticas forestales (Dwinell y cols., 1985) o los insectos perforadores pertenecien-

tes fundamentalmente a las familias *Scolytidae*, *Anobidae* y *Cercopidae* (Fox y cols., 1991). La dispersión geográfica de la enfermedad, se considera que ocurre a través del transporte de material infectado de pino (semillas o plántulas) y de madera infectada.

La declaración de la presencia de este patógeno en invernaderos de Sudáfrica (Viljoen y cols., 1994) puso de relieve la importancia de conocer todas las posibles fuentes de inóculo y la necesidad de desarrollar métodos de detección sencillos que limitaran el riesgo de introducir la enfermedad en nuevas áreas. Actualmente se piensa que el patógeno pudo propagarse por el mundo a través de lotes de semillas contaminados procedentes de Méjico (Britz y cols., 2001). Si la infección proviene de semilla contaminada esta puede desarrollarse produciendo el daño antes o después de la germinación de la semilla, lo que se conoce como *damping-off* de pre-emergencia o post-emergencia (Blakeslee y cols., 1981; Viljoen y cols., 1994); Al mismo tiempo, en Sudáfrica se comprobó por primera vez la capacidad de este patógeno para infectar las raíces de los pinos. Viljoen y cols. (1994) inocularon, por medio de una suspensión de esporas, el sustrato de crecimiento de plántulas de dos meses de edad de *Pinus patula* Schiede ex Schlechtendal et Chamisso y re-aislaron a este hongo de sus raíces. Las jóvenes plántulas, al enfermar, evidenciaron clorosis en sus acículas, así como marchitez y decaimiento de los brotes. Además presentaron el sistema radicular subdesarrollado con lesiones necróticas en la corteza de algunas raíces.

Los nombres utilizados para designar a esta especie han variando bastante a lo largo del tiempo, por lo que podemos afirmar que la taxonomía de este hongo ha sido compleja, del mismo modo que lo ha sido la de las especies de *Fusarium* en general. En la clasificación taxonómica de especies del género *Fusarium* se han utilizado tres conceptos básicos de especie diferentes: el concepto morfológico, el concepto biológico y el concepto filogenético. Se ha comprobado que algunos criterios basados en el concepto morfológico de especie pueden generar confusiones debido a que las características morfológicas pueden variar en función

de las cepas o de las condiciones de cultivo. Esto explica que distintos autores describieran diferente número de especies dentro de la sección *Liseola* (Nelson y cols., 1983; Nirenberg, 1989). Para superar estas dificultades, empezó a usarse el estado sexual o teleomorfo, es decir, el concepto de especie biológica que requiere que miembros de la misma especie sean fértiles entre sí y que su progenie sea igualmente viable y fértil.

En la mayoría de los hongos ascomicetos heterotálicos filamentosos, los genes responsables del apareamiento sexual están localizados en un único locus, denominado MAT (del inglés *mating type*), del que existen dos idiomorfos: MAT-1 y MAT-2. El apareamiento solamente ocurre entre individuos con diferentes genes MAT. Así, basándose en pruebas para determinar la fertilidad del cruce entre dos aislados, Hsieh y cols. (1977) distinguieron tres poblaciones de apareamiento (*matying populations*) diferentes (A, B y C) dentro de la sección *Liseola*. Después, Kuhlman, (1982) identificó una cuarta población (D) y además asignó a cada población de apareamiento el nombre de una variedad de *Gibberella fujikuroi*. Así, la población A fue la var. *moniliformis*; la B fue la var. *subglutinans*; la C fue la var. *fujikuroi*; y la D la var. *intermedia*. La situación resultante fue que, el estado anamorfo (fase asexual en la que se producen conidios) de tres especies diferentes: *F. moniliforme*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum* compartían una misma forma sexual. Se hizo evidente la necesidad de correlacionar las especies taxonómicas con las poblaciones de apareamiento dentro de este grupo de hongos. Dicha necesidad pudo satisfacerse a partir de los años 90, con el avance experimentado en el campo de la biología molecular y la inclusión del concepto filogenético de especie.

El desarrollo de nuevas herramientas filogenéticas basadas en la manipulación del ADN revolucionó la taxonomía del género *Fusarium*. Estas herramientas incluyen cariotipos electroforéticos, RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), RFLP, AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) y la secuenciación directa de genes específicos tales como el gen de la β -tubulina, el factor de elongación 1α o el gen H3 de

la histona (Xu y cols., 1995; Voigt y cols., 1995; Steenkamp y cols., 1999; Marasas y cols., 2001; Geiser y cols., 2004). Así, determinados taxones que antes eran considerados como una única especie ahora, según el concepto de especie filogenética, que proporciona identificaciones más consistentes, se acepta que forman un conglomerado de especies en el cual están incluidos diferentes taxones. Tal es el caso del complejo de especies de *G. fujikuroi*.

En el caso concreto del agente causal del chancro resinoso de los pinos, este pasó a denominarse *Fusarium circinatum* Nirenberg et O'Donnell, sobre la base del reconocimiento de los tres conceptos de especie. En primer lugar, para distinguirlo de otros *Fusaria*, Nirenberg y O'Donnell (1998) describieron detalladamente caracteres morfológicos como el tamaño y forma de los macro y microconidios, y la presencia de circinos (es decir, hifas enrolladas y estériles) que dieron nombre a la especie. En esta misma publicación, también se describió el estado teleomorfo del patógeno al que denominaron *Gibberella circinata*. La forma sexual *G. circinata*, hasta la fecha, no ha sido observada en campo, obteniéndose únicamente en laboratorio mediante el cruzamiento de estirpes MAT-1 y MAT-2 compatibles en cultivo. Poco después, la consideración de este patógeno como un taxón independiente de *F. subglutinans* se afianzó a partir de los trabajos de Britz y cols. (1999) con sus resultados basados en el concepto de especie biológica y de O'Donnell y cols. (1998, 2000) y Steenkamp y cols. (1999) con sus resultados basados en el concepto de especie filogenética. De este modo, *F. circinatum* pasó a considerarse la población de apareamiento H dentro del complejo de especies de *G. fujikuroi*. Actualmente, se dispone de dos métodos moleculares para la identificación inequívoca de *F. circinatum*. El primero de ellos, es un procedimiento de RFLP apoyado en la secuenciación del gen *H3* de la Histona de *F. circinatum* (Steenkamp y cols., 1999). El segundo método, más rápido, fue desarrollado por Schweigkofler y cols. (2004) quienes secuenciaron la región IGS (secuencia espaciadora repetida y no transcrita situada en el ADN ribosómico) en un set representativo de aislados de *Fusarium spp.* Las secuencias obtenidas de la región IGS presentaron tal grado de variabilidad que permitieron el diseño de dos cebadores

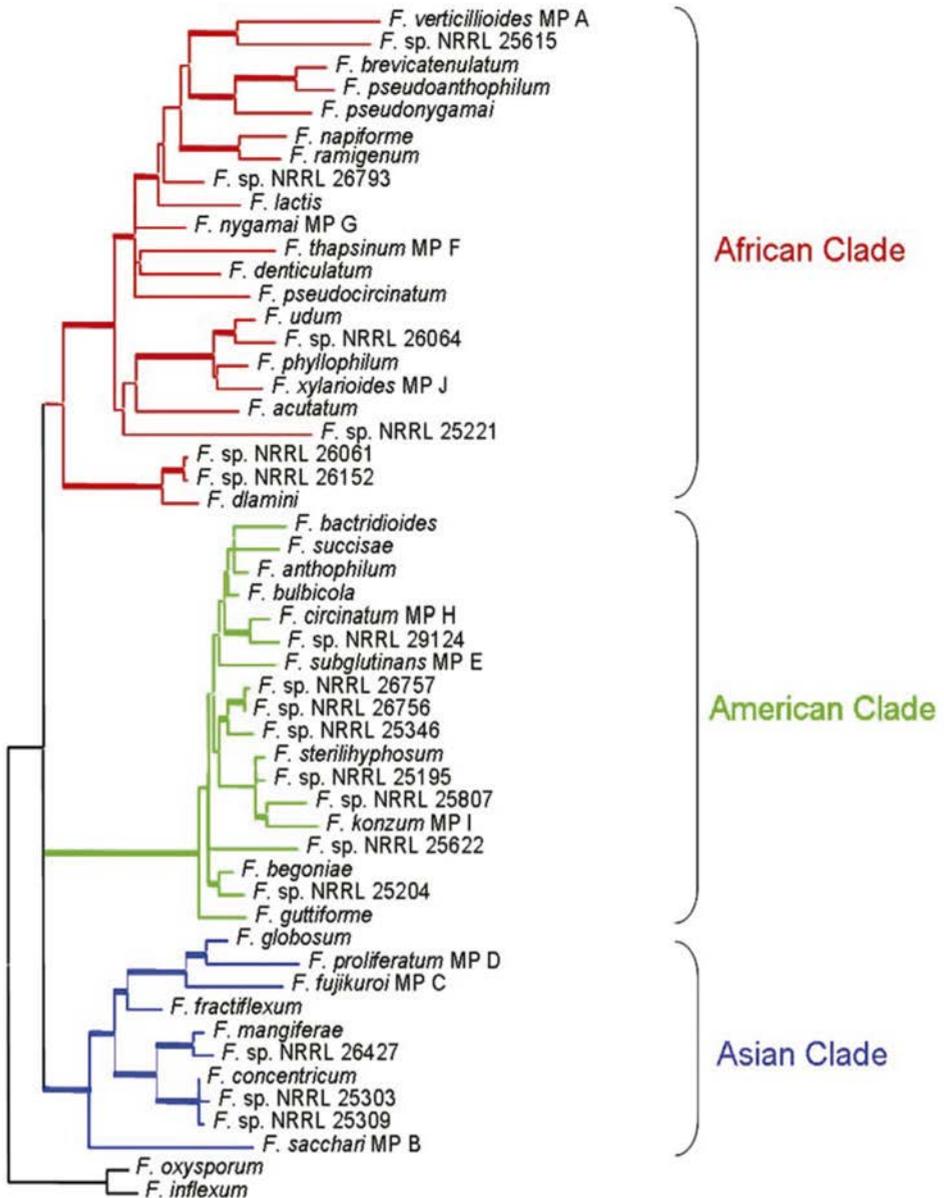


Figura 12. Árbol filogenético del complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*. En: Diversity and evolution of *Fusarium* sp. in the *Gibberella fujikuroi* complex, por: M. Kavas, 2009, Fungal Diversity, 34: 3.

específicos de *F. circinatum*. Merece la pena mencionar que, en el presente trabajo se han usado un par de cebadores que también son complementarios a la región IGS de *F. circinatum*.

Englobando la información proveniente de las tres aproximaciones para la identificación de especies dentro del complejo de *G. fujikuroi*, actualmente se conocen 34 morfoespecies, 10 especies biológicas designadas como poblaciones de apareamiento de la A a la J y 50 especies filogenéticas o linajes. Además, se considera al complejo de especies de *G. fujikuroi* como un grupo monofilético en el que se ha establecido la jerarquía evolutiva entre sus miembros y ciertos aspectos relacionados con la dinámica de sus poblaciones (Kavas y cols., 2007). Así, el análisis filogenético de varios genes separó a los miembros de este complejo de especies en tres grandes grupos o clados (O'Donell y cols., 1998). Para explicar la existencia de estos tres grandes grupos de especies filogenéticas, los autores han elaborado una hipótesis denominada "filogeográfica" en la que especulan que los tres clados se diferencian por el origen geográfico de la planta huésped de la que se aisló cada linaje fúngico. Así, definieron el clado americano, el africano y el asiático (Fig. 12).

En el caso de *F. circinatum*, que pertenece al clado americano, parece cumplirse la hipótesis filogeográfica de O'Donell puesto que, por un lado, el origen biogeográfico de *Pinus* parece situarse en Laurasia (masa de tierra del hemisferio norte en la era Mesozoica) que posteriormente se dividió dando lugar a Eurasia y América del Norte (Millar, 2000). Por otro lado, se piensa que la enfermedad del chancro resinoso de los pinos es endémica del sureste de los Estados Unidos y de Méjico debido a que las poblaciones de *F. circinatum* de estas regiones sostienen la mayor diversidad genética en comparación con cualquier otra población analizada (Correll y cols., 1992; Viljoen y cols., 1997; Wikler y Gordon, 2000).

Se consideraba que esta enfermedad estaba principalmente confinada a regiones con clima mediterráneo o tropical, sin embargo, el cambio climático está favoreciendo la expansión del área de riesgo,

especialmente en Europa (Watt y cols., 2011), llegando a extenderse también en regiones con clima suboceánico (Garbelotto y Pautasso, 2012). En la actualidad existen referencias de su presencia en Haití (Hepting y Roth, 1953), Japón (Muramoto y Dwinell, 1990), Sudáfrica (Viljoen y cols., 1994), Corea (Lee y cols., 2000), Méjico (Britz y cols., 2001), Chile (Wingfield y cols., 2002b), España (Landeras y cols., 2005), Francia (EPPPO, 2006), Italia (Carlucci y cols., 2007), Portugal (Bragança y cols., 2009), Uruguay (Alonso y Bettucci, 2009), Colombia (Steenkamp y cols., 2012) y Brasil (Pfenning y cols., 2014).

En España, aunque su presencia se conoce desde mediados de los 90, no fue citado oficialmente hasta 2005 por Landeras y cols., (2005), autores que advirtieron la seria amenaza que supone este patógeno tanto para las plantaciones comerciales de *Pinus radiata* y *Pinus pinaster* Ait., como para las poblaciones nativas de *P. pinaster* y *P. sylvestris* L. Como resultado de las prospecciones realizadas desde entonces se sabe que, en la actualidad, se encuentra distribuido por las masas forestales de toda la cornisa cantábrica y se ha podido constatar el grave problema que supone para los viveros de la zona (Pérez-Sierra y cols., 2007). En el País Vasco se ha informado de la presencia del patógeno en ejemplares de pino radiata tanto de vivero (Ridley y Dick, 2000) como de plantaciones (Iturritxa y cols., 2011).

Fusarium circinatum entró a formar parte de la lista A1 de organismos de cuarentena de la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPPO) en 2002, y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación estableció por ley el programa nacional de erradicación y control de esta enfermedad (Real Decreto 637/2006). De este modo, si se confirma la presencia de un foco inicial de *F. circinatum*, se debe proceder a la eliminación in situ del material vegetal afectado y a la tala y eliminación de la parte aérea cortada de todas las plantas de especies sensibles que presenten síntomas de la enfermedad en un kilómetro a la redonda.

La mayoría de especies de pino con interés comercial son susceptibles a *F. circinatum* por lo que la irrupción de este patógeno en las repoblaciones forestales, además de la indiscutible repercusión en el equilibrio ecológico de las especies de esa zona, puede generar grandes pérdidas a nivel económico. Dichas pérdidas, no solo están relacionadas con las derivadas de la bajada en el rendimiento de las plantaciones forestales (puesto que se reducen la tasa de crecimiento del pino y la calidad de la madera por quedar impregnada en resina) o de la muerte masiva de las plántulas en los viveros forestales (Viljoen y cols., 1994; Wingfield y cols., 2002, 2008), sino que también hay que tener en cuenta las pérdidas derivadas de las acciones que exigen las medidas de control establecidas por Ley.

El control y manejo de esta enfermedad es bastante complicado dado que el patógeno puede causar daños en cualquier momento del ciclo biológico del pino: floración, semilla, plántula o árbol maduro. Una de las primeras acciones a tener en cuenta, debería ser la restricción de entrada del patógeno en nuevas áreas geográficas aún vírgenes (como es el caso de Nueva Zelanda y Australia). Para evitar, en lo posible, lo sucedido en Sudáfrica es imprescindible conocer todas las fuentes potenciales de diseminación y aplicar medidas eficaces que contrarresten el peligro. Por ejemplo, en aquel momento, no existía un método eficaz para identificar semilla contaminada, lo cual se resolvió con la aplicación para tal fin de los protocolos basados en la amplificación específica de ADN del patógeno (Schweigkofler y cols., 2004).

En la actualidad, la consolidación de *F. circinatum* como un patógeno de viveros es un problema muy serio no sólo en Sudáfrica sino también en Chile (Wingfield y cols., 2002), Portugal (Bragança y cols., 2009) y España (Landeras y cols., 2005). En Sudáfrica, inicialmente la enfermedad solo afectaba a la planta de vivero, pero con el tiempo el impacto de este patógeno se fue extendiendo a las nuevas plantaciones de pino (Coutinho y cols., 2007), lo cual contribuyó significativamente a la mortalidad observada en campo (Mitchell y cols., 2004;

Crous, 2005; Jones y cols., 2014). Allí no tienen claro si el patógeno accede al hospedador a través de las heridas hechas durante el trasplante, o si el hospedador ya estaba infectado previamente (Mitchell y cols., 2011). Las nuevas necesidades del sector forestal han de conducir ineludiblemente a la investigación de los mecanismos y estrategias usados por el patógeno para infectar los plántones de pino que serán trasladados posteriormente al campo. Además, la presencia de *F. circinatum* en las raíces parece que también puede ocasionar daños en planta adulta. Así, en la publicación de Garbelotto y cols. (2007) se informó de la presencia de ejemplares enfermos de *Pinus halepensis* Mill. con 20 años de edad que mostraban síntomas de clorosis en su corona. Si bien no se encontraron signos de una putativa infección aérea, los autores describieron la existencia de lesiones empapadas de resina en la raíz primaria de esos ejemplares. De dichas lesiones en las raíces leñosas aislaron a *F. circinatum*.

A pesar de la evidencia de que la infección de las raíces de pino a través de la inoculación del sustrato con el patógeno puede ser un componente importante en el ciclo de la enfermedad, bien poco se sabe acerca de la interacción así establecida entre *F. circinatum* y las raíces de los pinos. Algunos patógenos son capaces de adoptar estilos de vida diferentes, dependiendo del hospedador o de los tejidos del mismo que están colonizando. Por ejemplo, se ha publicado recientemente que *Magnaporthe oryzae* y *Colletotrichum graminicola*, tradicionalmente considerados como patógenos foliares, son capaces de infectar las raíces de sus hospedadores (Sesma y Osbourn, 2004; Sukno y cols., 2008; Marcel y cols., 2010). Ambos han sido descritos como patógenos hemibiotróficos, es decir, parásitos que inicialmente mantienen una relación biotrófica con su anfitrión (le infectan sin causarle la muerte) y posteriormente desarrollan un estilo de vida necrotrófico. La fase biotrófica de la infección de las hojas se inicia con el desarrollo de un apresorio a partir de la hinchazón del extremo final del tubo germinativo de los conidios. El apresorio produce una clavija de penetración que perfora la superficie de la planta y, una vez dentro del lumen de las células epidérmicas, se expande para formar la hifa filamentosa primaria. Después, las

hifas primarias se diferencian en hifas bulbosas invasivas que son hifas más gruesas que crecen de un modo biotrófico, y que pueden desarrollar una o más de las estrechas hifas filamentosas invasivas que invaden las células adyacentes sin llegar a matarlas. En los tres artículos mencionados anteriormente, los autores observaron que los pasos iniciales durante la infección de la raíz no dependen del apresorio asociado con la infección de las hojas, sino que están mediados por unas estructuras de penetración más simples conocidas como hifopodios.

En lo relativo a *F. circinatum*, no se conocen ni los mecanismos de entrada ni la estrategia utilizada para infectar las plántulas de pino a través de la invasión de sus raíces. Una mayor comprensión del tipo de relación que establece este patógeno con las raíces de su hospedador permitirá incrementar la eficacia de las medidas de gestión que se tomen para el control de la enfermedad.

3. LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

La interacción entre la planta y el patógeno puede ser compatible (virulenta) cuando las condiciones son favorables para el patógeno, de forma que éste puede quebrar los mecanismos de defensa de la planta y la infección tiene éxito; o incompatible (avirulenta) cuando la infección no progresa y los mecanismos de defensa de la planta impiden la entrada o el establecimiento del patógeno.

Fusarium circinatum es un patógeno muy virulento para más de 50 especies del género *Pinus* (Hepting y Roth 1953; Muramoto y cols., 1993; Storer y cols., 1994, 1997; Clark y Gordon 1999; Guerra-Santos 1999; Hodge y Dvorak 2000; Enebak y Carey 2003; Enebak y Stanosz 2003), además de afectar también a la especie *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Gordon y cols., 2006).

Se dice que una planta es resistente cuando tiene la habilidad de reducir el crecimiento o desarrollo de un patógeno o parásito

determinado después de que se haya iniciado o establecido el contacto. La resistencia de una planta se mide comparando la cantidad de patógeno presente en la planta (o en una parte de esa planta) con la cantidad de patógeno que hay en una planta susceptible (menos resistente).

El modelo “gen a gen”, propuesto por Flor en 1956, en el que se postulaba la heredabilidad en la resistencia a un patógeno específico, puede ser válido para muchas de las interacciones planta-hongo fitopatógeno (Cook, 1998) sobre todo en aquellas caracterizadas por su elevada especificidad por el huésped, es decir, que se trata de casos extremos de coevolución específica (Soler, 2002), como los ejemplos de *Melampsora lini* y lino (Burdon y Jarosz, 1991; Jarosz y Burdon, 1991), *Cladosporium fulvum* y tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Jones y cols., 1994; Dixon y cols., 1998) o *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 y tomate (Simons y cols., 1998).

En otros casos, como el caso de nuestro patosistema de estudio (*F. circinatum*-*P. radiata*) existen evidencias suficientes para considerar que la resistencia genética que media en esta interacción patogénica es de tipo cuantitativo, es decir que es el resultado de la acción de múltiples genes, siendo la contribución de cada uno relativamente pequeña (Kaiyhan y cols., 2005; Poland y cols., 2009). Los resultados obtenidos por Roux y cols. (2007) confirman la existencia de diferencias en la susceptibilidad de *Pinus spp.* tanto a nivel de especie como de híbrido y, en el caso concreto de *P. radiata*, muestran que también existe diferente susceptibilidad a *F. circinatum* a nivel de clon dentro de una misma familia.

Se considera que la resistencia cuantitativa tiene efectos más duraderos y sobre un espectro más amplio de patotipos genéticos. Esto es un aspecto muy deseable para los programas de mejora genética, encaminados a la obtención de materiales de reproducción genéticamente más resistentes, como suministro para los viveros y las reforestaciones, en los cuales se combinarán las propiedades deseables de la madera con la resistencia al patógeno.

4. LA BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

El chancro resinosos de los pinos ocasiona abundantes pérdidas económicas en el sector forestal de muchas zonas del mundo (Wingfield y cols., 2008) y dado que todavía no se ha planteado una solución eficaz frente a este problema, se hace necesario profundizar en el conocimiento de la interacción planta-patógeno para tratar de abrir nuevos caminos que nos conduzcan a terapias más exitosas en el control de la enfermedad.

4.1. LA MICROSCOPIA APLICADA A LA FITOPATOLOGÍA

Desde los inicios de la Fitopatología, la visualización directa de la interacción que se da entre el patógeno y su planta huésped ha supuesto un relevante avance en el conocimiento y la comprensión del proceso de infección. Al principio, se utilizó la microscopía óptica simple en conjunción con diferentes métodos de tinción, con el fin de localizar al patógeno en los tejidos de la planta o para identificar al agente causal de una enfermedad. Más adelante, la microscopía óptica convencional se ha utilizado sobre todo para conocer los procesos que conducen al desarrollo de las enfermedades (Jiménez-Díaz y cols., 1989a; Holub y cols., 1994; Stevenson y cols., 1997; Soyly y Soyly, 2003; Gupta y cols., 2009, 2010;) con todos los fenómenos o alteraciones inherentes a dicho proceso, como la formación de nuevas estructuras celulares, la degradación de estructuras del huésped, etc.

La interacción entre la planta y el patógeno se inicia a nivel celular y puede ser crucial para el resultado final de susceptibilidad o resistencia al establecimiento de la enfermedad. El desarrollo, por parte del patógeno, de diferentes estructuras y estrategias de invasión que le ayuden a vencer las barreras presentes en los órganos del huésped se

considera un paso crucial para el éxito del parasitismo, por lo que para poder abordar y comprender estos mecanismos, resulta particularmente importante poder detectar visualmente el proceso de penetración del patógeno en la planta huésped (Mendgen y cols., 1996). Para tal fin, se pueden aplicar diversas modalidades de microscopía.

El mayor poder de aumento proporcionado por la microscopía electrónica, en sus dos variantes de transmisión (TEM) y de barrido (SEM), ha permitido la realización de interesantes estudios en fitopatología. Así, la microscopía electrónica de barrido se ha utilizado principalmente para el estudio de microorganismos epifitos o para la caracterización del modo y las estructuras empleadas por los patógenos durante la penetración del organismo huésped. Por su parte, la microscopía electrónica de transmisión ha permitido conocer con mucho más detalle las interacciones planta-patógeno a nivel subcelular (Gupta y cols., 2010), pudiendo caracterizarse los procesos de penetración activos o pasivos de los patógenos o los cambios morfológicos en las células y tejidos de la planta provocados por sus propios mecanismos de defensa cuando el patógeno ataca.

Sin embargo, aunque todos estos aspectos queden fuera de las posibilidades que ofrece la microscopía óptica convencional (por su menor poder de resolución y aumento), recientemente, el microscopio óptico ha experimentado un resurgimiento en el ámbito de la Fitopatología debido a la evolución y desarrollo de la microscopía de fluorescencia y la microscopía confocal (Heath, 2000). Estas novedosas variantes permiten, a través de sencillos protocolos de observación no destructivos, la realización de estudios *in vivo* sin la necesidad de fijar el material vegetal. Para ello ha sido de gran importancia el desarrollo de nuevos marcadores celulares como, por ejemplo, fragmentos de ADN codificantes de proteínas auto-fluorescentes como la GFP (*Green Fluorescent Protein*) y sus derivados. Esto, unido a la creciente facilidad con la que se pueden generar organismos transgénicos ha permitido la visualización de estructuras celulares fluorescentes con una mínima manipulación de la muestra (Fernández-Abalos y cols., 1998; Czymmek y cols., 2007).

La proteína GFP ha facilitado mucho el estudio de las interacciones planta-patógeno y se ha empleado en distintas especies patógenas como un marcador tanto para caracterizar el proceso de colonización (Lagopodi y cols., 2002; Jansen y cols., 2005; Zvirin y cols., 2010), como para estudiar el patrón espacial de expresión génica y de localización proteica (Michaelse y cols., 2009b; van der Does y cols., 2008).

La microscopia de luz convencional (Barrows-Broaddus y Dwinell, 1983, 1984) y, más recientemente, la microscopía electrónica de transmisión (Kim y cols., 2009) y de barrido (Thoungchaleun y cols., 2008), han proporcionado una valiosa información acerca de la interacción entre *F. circinatum* y *Pinus sp.* Sin embargo, hasta la fecha no se había empleado la microscopia láser confocal (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*), junto con el uso de un transformado de *F. circinatum* portador de la GFP para el estudio *in vivo* y con gran precisión de la interacción con el pino. Esta técnica además de emplearse para localizar al patógeno, sirve también para realizar un seguimiento de su actividad metabólica. La GFP, en combinación con técnicas de microscopía de fluorescencia o microscopía confocal, es hoy en día una herramienta esencial en los estudios de localización y supervivencia del patógeno en las plantas.

4.2 LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL COMO HERRAMIENTA DE ESTIMACIÓN DE LA BIOMASA FÚNGICA *IN PLANTA*.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés *Polimerasa Chain Reaction*), fue desarrollada por Kary Mullis y sus colaboradores a mediados de los años 80 (Saiki, 1985), y permite la producción de múltiples copias de un fragmento de ADN específico.

La PCR cuantitativa o a tiempo real es una variante de la PCR que permite conocer la cantidad de ADN presente en la muestra original. La técnica amplifica el fragmento de ADN deseado y, simultáneamente, cuantifica de forma absoluta el producto de dicha amplificación.

El procedimiento surgió a partir de los estudios basados en la relación cuantitativa existente entre la cantidad de secuencia molde al comienzo de la reacción y la cantidad de producto obtenido al final de un ciclo dado (Higuchi y *cols.*, 1989; 1992). Se diseñaron sistemas que, basándose en el uso de fluoróforos o fluorocromos que guardaran una proporción directa con la cantidad de producto generado en la reacción (Livak y *cols.*, 1995), permitieron la detección y cuantificación del producto amplificado a medida que se iba acumulando en los sucesivos ciclos de amplificación. Desde entonces, la metodología en torno al marcaje del producto y a la visualización e interpretación de los resultados se ha desarrollado de tal modo que es posible normalizar y cuantificar las muestras con gran fiabilidad.

Actualmente, la PCR cuantitativa (qPCR, *quantitative PCR*) se realiza en un termociclador específico que hace incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y que detecta la fluorescencia emitida por la excitación de un fluoróforo que se encuentra asociado a la generación de las nuevas moléculas de ADN durante la reacción de amplificación.

En el mercado existen distintos tipos de marcaje y las técnicas de qPCR pueden clasificarse por el uso de:

I. Fluoróforos o fluorocromos no específicos: son moléculas que al unirse al surco menor del ADN de doble cadena producen fluorescencia y esta es medida por el termociclador. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción. Un ejemplo de colorante que permite esta detección es el SYBR Green® (PE Applied Biosystems) que, excitado mediante luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$), emite luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$).

II. Sondas específicas: sondas moleculares dependientes de la secuencia que se va a amplificar (normalmente oligonucleótidos marcados con dos tipos de fluorocromo, un donador y un aceptor). El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las sondas específicas más utilizadas

son las sondas TaqMan® (PE Applied Biosystems) y las sondas tipo Molecular Beacons o el marcaje Scorpions® (Roche). Este tipo de marcaje, dado que necesita sondas específicas para cada fragmento a analizar, garantiza la especificidad de la detección y además permite detectar varias secuencias diferentes en una misma reacción.

4.2.1. PRINCIPIOS TEÓRICOS DE LA CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.

Los sistemas de qPCR detectan el incremento de fluorescencia (ΔR_n) en cada ciclo de PCR y los *softwares* de análisis generan la curva de cinética de la reacción, a partir de la representación de dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos.

A diferencia de la PCR convencional, en la que el producto se detecta únicamente al final de la reacción mediante una electroforesis en gel de agarosa, la detección en la PCR a tiempo real comienza cuando la cantidad de producto amplificado sobrepasa un determinado umbral y utiliza ese parámetro como un indicador de la cantidad de producto amplificado (Saiki y *cols.*, 1985). Así, cuanto mayor es el número de copias presentes en el extracto de ADN, antes se sobrepasa este umbral y se inicia la detección. (Fig. 13).

En la curva cinética de la reacción, se distinguen tres fases:

I. La fase inicial: durante los primeros ciclos de la PCR donde se produce muy poco cambio en la señal de fluorescencia, quedando definida así la denominada línea basal (*baseline, en inglés*). Hasta que no se produce un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia, con respecto a esta señal de base, no puede iniciarse el proceso de detección. Se denomina ciclo umbral o C_t (*threshold cycle*) al ciclo de amplificación, para cada una de las muestras, a partir del cual el sistema empieza a detectar la señal de fluorescencia asociada a un incremento exponencial del producto de la PCR. El parámetro C_t es el más importante para la cuantificación, de tal manera que cuanto mayor sea la can-

tividad inicial de ADN, antes se detectará el producto acumulado en la PCR, y más bajo será el valor C_t . Una vez alcanzado este valor comienza la siguiente fase.

II. La fase exponencial o logarítmica: en esta fase, si la reacción ocurre con la máxima eficiencia de amplificación, se dobla el producto de partida en cada ciclo según la siguiente ecuación:

$$T_n = T_0(E)^n$$

Donde:

- T_n = la cantidad de muestra amplificada en el ciclo n ;
- T_0 = la cantidad de muestra al comienzo de la reacción;
- E = la eficiencia de la amplificación.

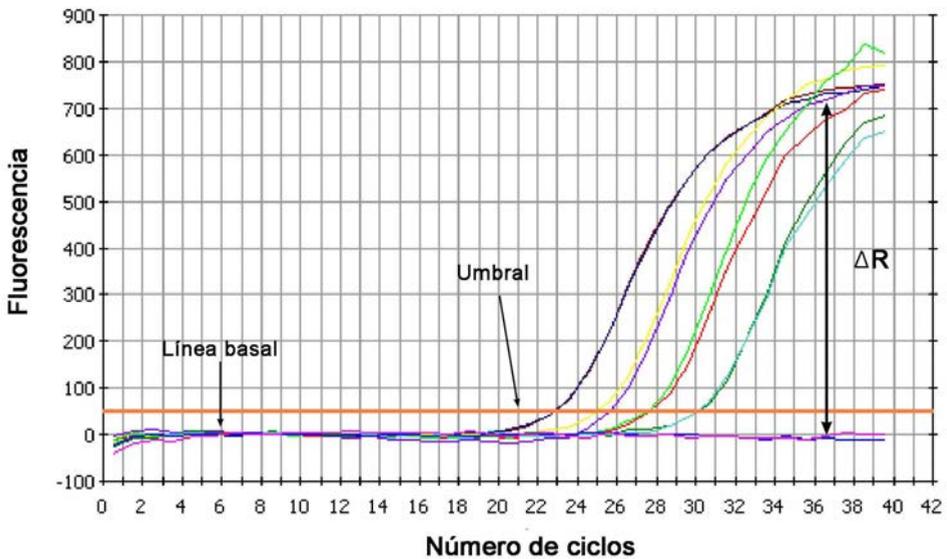


Figura 13. Curvas de cinética de la reacción propias de la PCR cuantitativa para distintas muestras con diferente cantidad de ADN. En el eje de abscisas se representan el número de ciclos de la PCR y en el de ordenadas la fluorescencia detectada. Desde el comienzo de la reacción (ciclo 1) hasta el final (ciclo 40) se produce un incremento de fluorescencia (ΔR_n) que en el caso de la qPCR es cuantificado y representado a tiempo real, es decir, mientras ocurre la reacción de amplificación. La línea umbral (en naranja) indica el nivel de detección o el punto en el que la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia por encima de la señal de fondo que queda definida por la línea basal.

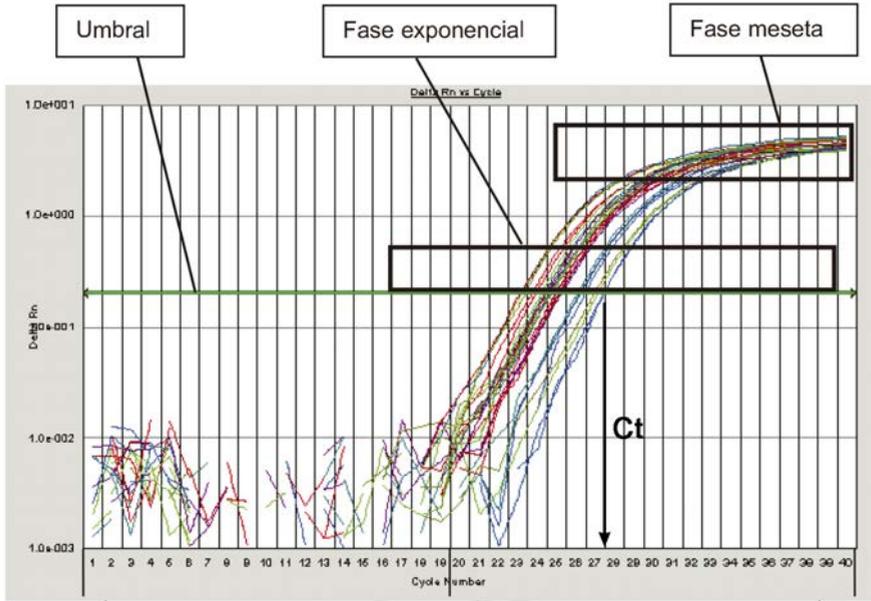


Figura 14. Cinética de la reacción de amplificación en escala semilogarítmica. La figura muestra la amplificación de diferentes muestras. El parámetro Ct (threshold cycle) o ciclo umbral se define como el ciclo de amplificación en el que tiene lugar un incremento significativo en el nivel de fluorescencia (ΔRn) asociado con un crecimiento exponencial del producto de PCR. En: Aislamiento y caracterización de los genes *fost12* y *fost20* en el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (p79), por: M. A. García-Sánchez, 2007.

III. La fase lineal: la curva de la cinética de la reacción se torna más lenta puesto que la eficiencia de la amplificación decae debido a diversos factores tales como la pérdida de actividad de la polimerasa, o el déficit de alguno de los componentes de la reacción.

IV. La fase meseta o *plateau*: esta fase se alcanza en los últimos ciclos y marca el punto final de la reacción. Es en esta fase final en la que, durante una PCR convencional, se lleva a cabo la detección de los productos de la amplificación, mediante la electroforesis en geles de agarosa.

Si se muestra la cinética de la reacción de PCR a tiempo real en escala semilogarítmica (Fig. 14), la fase exponencial de la reacción (que sucede justo después de alcanzar el C_T), quedaría representada como una

recta. Es decir, al trazar la función potencial $T_n = T_0(E)^n$ en una escala semilogarítmica (eje X lineal, eje Y con escala logarítmica) se obtiene la ecuación de una recta. La pendiente de la recta en esa función, es un reflejo de la eficiencia de la amplificación, de tal modo que la eficiencia de la reacción puede calcularse con la siguiente fórmula:

$$Eff = 10^{(-1/pendiente)-1}$$

La eficiencia de la PCR suele ser del 90-100 % ($-3,6 > \text{pendiente} > -3,1$), aunque esta puede verse afectada por numerosas variables (Bustin y Nolan, 2004; Wong y Medrano, 2005; Yuan y cols., 2006).

4.2.2. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Existen dos maneras de cuantificar una muestra problema de ADN mediante qPCR:

I. Cuantificación absoluta: la concentración de ADN de las muestras que se desea amplificar se estima interpolando sus valores de C_t en una recta patrón construida con estándares de concentración conocida. Este método requiere de la cuantificación *previa* del *stock* de ADN, utilizado para la construcción de la recta patrón, mediante otros métodos como la espectrometría (medida de la absorbancia a 260 nm) (Bustin, 2000).

II. Cuantificación relativa: consiste en comparar la amplificación de una secuencia de ADN problema respecto a otra, denominada “control endógeno”. La cuantificación relativa puede llevarse a cabo utilizando el método de la recta patrón o el método comparativo de los C_t .

- Método de la recta patrón: utiliza un conjunto de muestras patrón, a partir de las cuales las muestras problema son cuantificadas. Como la cuantificación debe ser normalizada respecto a un control endógeno, se debe realizar una recta patrón tanto para

el gen problema como para el gen endógeno o de referencia, de tal manera que, para cada muestra, se determine la cantidad de gen problema y de gen endógeno a partir de las rectas patrones apropiadas.

- Método comparativo del C_t ($\Delta\Delta C_t$): Este método utiliza una serie de fórmulas aritméticas para conseguir el mismo resultado de cuantificación relativa que con el método anterior. Para utilizar este método es necesario que la eficiencia de la amplificación del gen problema y la del gen endógeno sean semejantes estadísticamente, (Pfaffl, 2001).

Actualmente se considera a la qPCR el método más preciso para cuantificar el grado de colonización fúngica en los tejidos del hospedador (Stephens y cols., 2008; Macia-Vicente y cols., 2009). Se han desarrollado protocolos rápidos y muy sensibles para la detección específica del DNA de *F. circinatum* (Schweigkofler y cols., 2004; Ioos y cols., 2009), sin embargo, hasta la fecha no se han optimizado para poder ser utilizados y aplicados en la monitorización de la colonización del sustrato natural de este patógeno.

OBJETIVOS

2



En el presente trabajo, hemos adaptado las dos metodologías anteriormente descritas para investigar de forma sistemática la dinámica espacial y temporal del proceso de infección *in planta* durante las interacciones compatibles entre *P. radiata* y *F. circinatum* que conducen al desarrollo de la enfermedad del chancro resinoso. Se usó la qPCR para estimar la cantidad de ADN fúngico como una medida indirecta de la biomasa del patógeno durante la infección y, después se realizó un detallado análisis histológico de la colonización de *P. radiata* por una estirpe de *F. circinatum* marcada con el gen de la GFP. Se persiguieron principalmente los siguientes objetivos.

1. Caracterizar el proceso de infección de *P. radiata* a partir de la inoculación de *F. circinatum* en el tallo;
2. Caracterizar el papel de los conductos resiníferos, tanto los constitutivos como los inducidos, en la invasión del patógeno, así como la eficacia de la reacción inducida para contrarrestar el desafío patógeno;
3. Determinar si *F. circinatum* puede alcanzar e infectar las raíces de los pinos desde un inóculo situado a una distancia de la raíz (es decir, sin dañar el sistema radicular). Si es así:
 - a. supervisar la estrategia utilizada por *F. circinatum* para penetrar y colonizar las raíces del pino;
 - b. abordar la gravedad del daño causado a las raíces;
4. Determinar si *F. circinatum*, a partir de la infección de las raíces, tiene la capacidad de propagarse a las partes aéreas de la planta. Si es así:
 - a. describir la histopatología observada;
 - b. evaluar el impacto de tal dispersión sobre el declive de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

3



1. ORGANISMOS

1.1 PLANTAS.

1.1.1. *PINUS RADIATA* D. DON.

El material vegetal utilizado en los ensayos procede de semillas obtenidas en rodales de *Pinus radiata* de Bizkaia y comercializadas por la Asociación de Viveristas del País Vasco.

1.2. HONGOS.

1.2.1. *FUSARIUM CIRCINATUM* NIRENBERG ET O' DONNELL.

La población de *F. circinatum* del País Vasco es bastante homogénea. En esta únicamente se han encontrado 2 grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) y un único alelo de los genes de apareamiento o *mat-ying type*, el idiomorfo, MAT-2 (Iturritya y cols, 2011).

La cepa de *Fusarium circinatum* utilizada en todos los ensayos, identificada como CECT 20759, proporcionada por la Dra. Eugenia Iturritya (Neiker-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario), fue aislada de rodales de *P. radiata* de Bizkaia. Dicha estirpe, en base a los análisis moleculares realizados por Iturritya y cols (2011), representa el genotipo más común en la población de *F. circinatum* del País Vasco: el genotipo M1, de un total de 9 genotipos obtenidos con 6 marcadores polimórficos de ADN y el genotipo A1, de los 3 genotipos obtenidos en base a 103 loci usando AFLPs.

1.3. BACTERIAS.

1.3.1. *ESCHERICHIA COLI*.

- I. **Cepa DH5 α** (*F*⁻, *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*). Se utilizó en las transformaciones bacterianas por choque térmico.
- II. **Cepa DH10 β Gold**. (*F*- *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara*, *leu*) 7697 *galU* *gal*KU- *rpsL* (Str^R) *nupG*). Se utilizó en las transformaciones bacterianas por electroporación.

1.3.2. *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

- I. **Cepa AGL1** (AGL0 *recA::bla* pTiBo542(Δ)T Mop⁺ Cb^R Rf^R). (Lazo y cols, 1991). Esta cepa porta, como plásmido Ti desarmado (también denominado plásmido *helper*) el vector hipervirulento pTiBo542(Δ)T, especialmente diseñado para la transformación de células eucariotas mediante el sistema de plásmidos binarios. Esta cepa se utilizó para la transformación de *F. circinatum*.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1. *PINUS RADIATA*

2.1.1. GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO EN INVERNADERO.

Se esterilizó la superficie de las semillas comerciales de pino sumergiendo las mismas en agua oxigenada al 30% y manteniéndolas en agitación durante 1 hora (h). Seguidamente, se realizaron tres lavados

sucesivos con agua destilada y estéril y se sembraron en bandejas de plástico flexible con 35 alveolos de 200 cm³, paredes cerradas y forma de prisma (Arnabat, Barcelona). Como sustrato, utilizamos una mezcla de turba de *Sphagnum* (70% turba rubia y 30% de turba negra). A los ocho meses y utilizando como sustrato la misma mezcla de turba de *Sphagnum*, se trasplantaron las plántulas a contenedores de plástico rígido con mayor capacidad volumétrica (a bandejas con 6 alveolos de boca cuadrada y 1600 cm³, QuickPotTM; o a contenedores individuales de boca redonda y 2000 cm³ de capacidad (Soparco, Condé-sur-Huisne, France). Durante toda su fase de crecimiento, las plantas crecieron en un invernadero con las condiciones controladas de temperatura (20-25 °C), humedad relativa (60-70%) y fotoperiodo (12 h de luz-12 h de oscuridad). Las plantas se regaron a demanda y se aplicó al sustrato de crecimiento de las mismas un fertilizante de liberación lenta (Plantacote Plus; Aglukon) con bajo contenido en nitrógeno y fósforo (NPK, 14-8-15).

2.1.2. ENSAYOS DE INFECCIÓN EN INVERNADERO DE PROTECCIÓN BIOLÓGICA P2.

Los ensayos de infección se realizaron en un invernadero de cristal de alta seguridad especialmente adaptado para trabajar con organismos de cuarentena P2. La temperatura se mantuvo a 25 ± 3°C, la humedad relativa entre el 70 y el 80% y el fotoperiodo, de 16 h de luz a una intensidad de 120 μmol m⁻² s⁻¹, fue provisto por tubos fluorescentes de luz blanca y fría (TLD 58 W/33; Philips, France).

Antes de la inoculación con el patógeno, las plantas se dejaron aclimatar durante un mes en estas condiciones y con riego a demanda, evitando siempre el exceso de agua en el sustrato.

2.2. *FUSARIUM CIRCINATUM*.

Las estirpes de *Fusarium circinatum* se conservaron a -80 °C en viales con glicerol al 25% (v/v). Las condiciones y medios de cultivo variaron según el tipo de experimento, y se detallan a continuación:

2.2.1. EN MEDIO LÍQUIDO.

- I. **Para la esporulación abundante:** 22-28 °C/180 r.p.m./PDB (*Potato dextrose broth*, caldo de patata, casa comercial Difco; 24 g PDB/1l agua destilada y desionizada).
- II. **Para el crecimiento de micelio:** 22-28 °C/120 r.p.m./PDB.
Cuando fue necesario prevenir el crecimiento bacteriano se añadía al medio el antibiótico Cloranfenicol (20 µg/ml).

2.2.2. EN MEDIO SÓLIDO.

- I. **Para la germinación de esporas** y la obtención de cultivos monospóricos: 22-28 °C/Agar-Agua (20 g Agar/1l agua destilada y desionizada).
- II. **Para la obtención de micelio:** 22-28 °C/PDA (*Potato dextrose agar*, caldo de patata con agar, Difco; 39 g PDA/1l agua destilada y desionizada).

2.3. *ESCHERICHIA COLI*.

Las estirpes de *E. coli* se conservaron a -80 °C en viales con glicerol al 50% (v/v). Las condiciones y medios de cultivo fueron los descritos por Sambrook y *cols* (1989), con una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C, tanto para los medios sólidos como para los líquidos.

- I. **LB** (Luria-Bertani): 0,5% de extracto de levadura; 1% de bacto-triptona y 1% de NaCl. Fue el medio utilizado para el cultivo rutinario de esta bacteria. Para la preparación de medio sólido, se añadieron 15 g/l de agar.
- II. **2xTY:** como el LB pero con doble cantidad de extracto de levadura y de bacto-triptona. Con este medio se consigue un crecimiento más rápido.

Cuando fue necesario y según los plásmidos utilizados, estos medios se suplementaron con los antibióticos Ampicilina (100 µg/ml) o Kanamicina (50 µg/ml).

2.4. *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

La estirpe AGL-1 de *A. tumefaciens* se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales con glicerol al 50% (v/v). Para su crecimiento rutinario se utilizó el medio LB, agregando los antibióticos correspondientes en cada caso, siendo $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ su temperatura óptima de crecimiento. Para llevar a cabo la transformación de *F. circinatum* mediante el método de co-cultivo con *A. tumefaciens* (apartado 10) se utilizaron otros medios:

I. Medio mínimo, para 1 litro:

10 ml de tampón K; 20 ml de tampón M-N; 1 ml de CaCl_2 al 1%; 10 ml de glucosa al 20% (p/v); 10 ml de FeSO_4 al 0,01%; 5 ml de elementos traza y 2,5 ml de NH_4NO_3 al 20% (p/v).

- *tampón K*: 200 g/l de K_2HPO_4 ; 145 g/l de KH_2PO_4 ; pH 7.

- *tampón M-N*: 30 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15 g/l de NaCl.

- *elementos traza*: 100 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 100 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 100 mg/l de H_3BO_3 ; 100 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 100 mg/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

II. Medio de inducción, para 1 litro:

10 ml de *tampón K*; 20 ml de *tampón M-N*; 1 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1%; 2,5 ml de NH_4NO_3 al 20% (p/v); 10 ml de glicerol al 50%; 40 ml de MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) 1 M, pH 5,3; 5 ml de glucosa 2 M. Además, se añade en el momento antes de usar: 10 ml de FeSO_4 al 0,01% (p/v); 5 ml de la solución de *elementos traza* y 2 ml de acetosiringona (3',5'-Dimethoxy-3'-hydroxyacetophenone) 100 mM, cuya solución stock se prepara a razón de 40 mg/ml en etanol absoluto y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

III. Medio de co-cultivo: tiene la misma composición que el medio de inducción, pero se añaden 15 g/l de agar y se dispensa en placas de Petri.

3. MANIPULACIÓN DE *FUSARIUM CIRCINATUM*

3.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS MONOSPÓRICOS.

Un cultivo monospórico es aquel procedente de una única spora uninucleada o microconidio, lo cual garantiza la homogeneidad genética del cultivo y la maximiza en las posteriores réplicas que se hagan de las colonias.

Para su obtención, en primer lugar y en condiciones asépticas, se recolectaron esporas del hongo mediante cualquiera de las dos técnicas descritas más adelante, (sección 3.4 de Materiales y Métodos). Se prepararon varias suspensiones de las esporas a concentraciones menores para, una vez sembradas en placas de Agar-Agua, conseguir una buena separación entre una y otra spora. Las placas se incubaron a 22 °C durante 10-12 h permitiendo de tal modo el ligero desarrollo de un tubo germinativo o incluso una ramificación micelial mayor. A continuación, utilizando una lupa binocular, se procedió a ubicar una spora recién germinada en la placa, asegurándonos de que no hubiera otra en su cercanía. Con un punzón estéril, se tomó una única spora en un pequeño fragmento de agar, colocándose esta seguidamente en una placa de PDA. Estas placas se incubaron a 22 °C hasta que el micelio ocupase toda la placa. Las placas así obtenidas, con el micelio de *F. circinatum* proveniente de una única spora, pasaron a denominarse “placas madre”. Finalmente, se realizaron dos copias (copia A y B, a su vez duplicadas) de cada aislado original o cultivo madre monospórico.

3.2. CONSERVACIÓN DE AISLADOS.

El mantenimiento de las cepas de hongos, para su conservación a largo plazo y su posterior estudio, lleva frecuentemente asociada la pérdida de la virulencia, de la viabilidad o de la habilidad de esporulación de dichas cepas, especialmente si pertenecen a especies que crecen vigorosamente en un medio artificial. Para reducir la probabilidad de que ocurran estos cambios, se aplicó un método de conservación por congelación a los cultivos monospóricos de las estirpes de *Fusarium* de interés. Los factores clave para el éxito de dicho método son la rápida velocidad de enfriamiento de las estirpes en el momento del almacenamiento; la constancia de la temperatura mínima a la que se mantiene el aislado y la rápida descongelación del mismo en el momento de su recuperación.

Para ello, en condiciones de asepsia, se transfirió 1 ml de glicerol al 25% (v/v) a la placa madre y a las dos placas con las copias A y B de los cultivos monospóricos de cada aislado original de *F. circinatum*. Con la propia punta recortada de la pipeta, se obtuvieron las suspensiones de micelio y conidios de dichos aislados en el glicerol que se dispusieron en crioviales de 2 ml de capacidad, para congelarlos rápidamente en nitrógeno líquido y guardarlos congelados a -80 °C en un ultra congelador.

Rutinariamente, se utilizó la copia A obtenida del cultivo madre monospórico de *F. circinatum*. Si en algún momento se observaba la presencia de contaminación en dicho stock o algún cambio en el comportamiento habitual del hongo (bien en cuanto a su crecimiento vegetativo, a la producción de esporas o a su capacidad patogénica), se procedía a la destrucción de dicho stock para comenzar a usar la copia B que había sido obtenida a su vez del cultivo madre monospórico. Si sucedía lo mismo con la copia B, se realizaban otras dos copias del stock original que, desde su obtención a partir de la suspensión de micelio y conidios de la “placa madre”, había permanecido sin usarse almacenado a -80 °C en glicerol al 25% (v/v).

3.3. RECOLECCIÓN DE MICELIO.

Cuando se requerían altas cantidades de micelio de *F. circinatum*, por ejemplo para la extracción de ácidos nucleicos, se obtenían a partir de los cultivos monosporicos del aislado correspondiente que se encontraban almacenados en glicerol al 25% (v/v) a -80 °C.

Para ello, en condiciones de esterilidad, se introducía un punzón limpio e incandescente (mediante su calentamiento en la llama de un mechero) en el criovial, que contenía dicho stock congelado en glicerol, para recolectar un pequeño fragmento de micelio con el que inocular 100 ml de medio PDB (contenidos en matraces de 250 ml de capacidad), suplementado con el antibiótico Cloranfenicol a una concentración final de 20 µg/ml. Este cultivo se incubaba a 25 °C y 120 r.p.m., durante 5-7 días, pasados los cuales, se filtraba a través de una gasa doble previamente esterilizada en el autoclave. Se recogía el micelio de *F. circinatum* que quedaba retenido en la gasa con una espátula limpia y se colocaba en papeles de filtro, previamente esterilizados en el autoclave. Mediante un suave prensado, los papeles de filtro absorbían el exceso de agua contenido en dicho micelio. Finalmente, el micelio así recuperado se pesaba y se envolvía en paquetitos de papel de aluminio que podían almacenarse hasta su uso en un ultra-congelador a -80 °C.

3.4. RECOLECCIÓN DE CONIDIOS.

3.4.1. MÉTODO PARA OBTENER GRANDES CANTIDADES EN MEDIO LÍQUIDO.

Se obtuvieron suspensiones altamente concentradas y limpias de conidios de *F. circinatum* a partir del cultivo en un medio líquido de las estirpes almacenadas en glicerol al 25% (v/v) a -80 °C. Debido a que el crecimiento del hongo en medio líquido a partir de dicho stock, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, se desarrolla con la forma de una masa globosa y compacta de micelio, es conveniente comenzar

con la preparación de pre-inóculos del hongo para obtener finalmente una buena producción de esporas en el medio. Los pre-inóculos son cultivos del hongo en pequeñas cantidades de medio líquido. Se utiliza una pequeña cantidad de medio del pre-inóculo (de apariencia ligeramente turbia debido al contenido de esporas) para inocular cantidades mayores de medio líquido en las condiciones apropiadas que favorezcan la esporulación del hongo.

Los pre-inóculos se prepararon en matraces de 50 ml de capacidad que contenían 20 ml de medio PDB y se mantuvieron en agitación (a 25 °C y 180 r.p.m.) durante 3 días. Pasado este tiempo se utilizó 1 ml del medio proveniente de este pre-inóculo para inocular 100 ml de PDB (contenidos en matraces de 250 ml de capacidad) suplementado con Cloranfenicol (20 µg/ml). Los matraces se mantuvieron durante 5-7 días a 25 °C y en agitación continua a 180 r.p.m para favorecer la esporulación del hongo. De este modo, se observó un menor desarrollo de masas globosas de micelio a favor del aumento progresivo en la turbidez del medio (lo cual estaba relacionado con la producción de esporas).

Para recoger las esporas de *F. circinatum* se procedió a filtrar los medios así inoculados a través de una gasa doble (previamente esterilizada en el autoclave) que retenía el micelio. El filtrado, que contiene las esporas del hongo, se lavó tres veces con agua destilada y estéril, mediante la precipitación de las esporas por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 minutos (min) y su posterior re-suspensión en agua por agitación. Las esporas se cuantificaron con una cámara Thoma (o una cámara Neubauer) al microscopio y se ajustaron a la concentración final deseada. Las esporas así preparadas podían mantenerse a 4 °C hasta su uso, durante no más de 24h.

3.4.2. MÉTODO RÁPIDO A PARTIR DE CULTIVO EN PLACA.

En ocasiones no era necesario obtener suspensiones altamente concentradas de esporas de *F. circinatum* ya que sólo se requerían pequeñas cantidades de conidios. En estos casos se partió del cultivo sólido del

hongo (durante no más de 14 días) en placas PDA en las que se observara el crecimiento fúngico a modo de micelio aéreo algodonoso. Con la punta de una pipeta se colocó en esos cultivos una gota de 10 µl de agua destilada y estéril que, a través del pipeteo repetido 3 ó 4 veces, se colmaba de esporas provenientes de los conidióforos desarrollados en el micelio aéreo de *F. circinatum*.

4. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

En la presente tesis se han usado diferentes herramientas y procedimientos moleculares que implican la extracción y procesamiento del material genético (ADN) tanto de las plantas de pino y las estirpes fúngicas empleadas en los ensayos de infección, como de diferentes plásmidos bacterianos usados como vectores de clonación.

4.1. ADN GENÓMICO DE LA PLANTA.

Una vez recolectado el material vegetal del que se partía (porciones del tallo de los pinos) se pasó a congelar inmediatamente en N₂ líquido y almacenarlo a -20 °C hasta su procesamiento.

Se utilizaron dos métodos: el derivado del producto comercial “DNeasy[®] Plant mini kit” (Qiagen, Hilden, Alemania) y un método que incluye el uso de una solución tampón de lisis (que denominamos método TENSP). Ambos métodos se emplearon también para la extracción de ADN genómico de las extirpes fúngicas de interés y se describen detalladamente en el siguiente apartado.

4.2. ADN GENÓMICO DEL HONGO.

En función de las necesidades de rapidez, comodidad o calidad de la extracción, se usaron distintos métodos.

4.2.1. DNEASY[®] PLANT MINI KIT.

Este kit comercial se usó para la extracción del ADN genómico tanto de la planta como del hongo cuando se requería rápidamente un ADN muy limpio y de alta calidad. El kit incluye todos los componentes necesarios para la extracción de ADN, incluidas mini columnas, buffers y enzimas. Se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante.

4.2.2. MÉTODO “TENSP”.

Como alternativa costo-efectiva del método comercial, se usó rutinariamente este método para la obtención de ADN genómico limpio y poco degradado tanto de la planta como del hongo.

El método consiste en machacar en un mortero 100 mg de material vegetal con nitrógeno líquido, recoger el fino polvo generado en tubos *ependorff* de 1,5 ml y añadir 600 µl de la solución de lisis “TENSP” [100 mM de TrisHCl pH 8; 50 mM de EDTA; 0,5 M de NaCl; 2% de SDS; 1% de PVP (Polivinilpirrolidona); 10 mM de b-Mercaptoetanol]. Se mezcló todo usando un agitador tipo vórtex (o mezclador de vórtice) para homogeneizar y se incubó a 65 °C durante 30 min. Se agitó nuevamente en mitad de la incubación. Una vez rotas las células y liberado el interior celular al medio, se procedió a extraer del mismo las proteínas y lípidos mediante el método conocido como fenolización. Para ello, se añadieron 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 4 °C y 10 000 r.p.m durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo *ependorff*, se mezcló en vórtex con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó durante 5 min a 10 000 r.p.m. y a 4 °C. Se repitió este paso en el que proteínas y lípidos quedan retenidos en la fase fenólica y el ADN queda suspendido en la fase acuosa. Se procedió a otra extracción con cloroformo: isoamílico (24:1) mezclando en vórtex y centrifugando durante 5 min a 10 000 r.p.m. y a 4 °C. Tras repetir este paso, se procedió a una precipitación estándar de ADN que, además de limpiar un poco más la muestra, permite su posterior re-suspensión en el medio y

volumen deseados. Para ello, se recogió el sobrenadante (la fase acuosa con el ADN en suspensión) y se añadieron 0,7 volúmenes de Isopropanol (o bien 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío). Se guardaron varias h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este paso suele verse el ADN formando un “ovillo” o “nube”. Después, se centrifugaron las muestras durante 15 min a 14 000 r.p.m. y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para precipitar el ADN. Se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 70% para limpiar el pellet de sales. Se volvieron a centrifugar los tubos 2 min a 14 000 r.p.m., tras lo cual se desechó el sobrenadante y el pellet se dejó secar al aire o bien se concentró utilizando un evaporador centrífugo al vacío (Speed Vac). Una vez seco el pellet, se re-suspendió en 100 μl de agua destilada estéril y se añadió ARNasa A (Roche) del stock preparado a 10 mg/ml hasta una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3. MÉTODO “CTAB”.

Este otro método, descrito por Möller y cols (1992) y también basado en el uso de una solución tampón de lisis, resultó un método muy eficiente (aunque, al igual que el anterior, bastante laborioso) para la obtención de gran cantidad de ADN de calidad (aproximadamente de 5 a 10 μg de ADN por cada gramo de micelio).

Para ello, se obtuvo el micelio de la estirpe fúngica deseada según lo descrito en la sección 3.3 de “Materiales y Métodos”. Dicho micelio fue pulverizado en un mortero con nitrógeno líquido y el pulverizado se repartió en tubos de 1,5 ml en fracciones de 300 mg como máximo. A continuación se añadieron en cada tubo 500 μl de una solución de lisis (100 mM de TrisClH pH 8; 10 mM de EDTA; 2% de SDS) y 50-100 μg de proteinasa K. Se incubaron a 55-60 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h mezclando ocasionalmente y con suavidad. Pasado este tiempo se ajustó la concentración salina mediante la adición de 140 μl de NaCl 5 M; se añadieron 1/10 volúmenes (65 μl) de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamónio) al 10% y los tubos se incubaron a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Después, se añadió un volumen (700 μl) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente invirtiendo los tubos varias veces y estos se man-

tuvieron en hielo durante 30 min. Tras este periodo, se centrifugaron a 4 °C y 10 000 r.p.m. durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a tubos nuevos y se les añadió 225 µl de acetato amónico 5 M. Se mezcló con cuidado y se mantuvo en hielo un mínimo de 30 min. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos a los que se añadieron 5 µl del stock de ARNasa A preparado a una concentración de 10 mg/ml. Los tubos se mantuvieron en incubación durante 1 h a 37 °C y se repitió el paso de la centrifugación y la transferencia del sobrenadante a nuevos tubos. Para precipitar el ADN se añadieron a los tubos 0,7 volúmenes de isopropanol y se mantuvieron en hielo durante 15-30 min. Tras la incubación se realizó una centrifugación a 14 000 r.p.m. durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%. Tras secar con vacío en Speed Vac el ADN fue resuspendido en 50 µl de agua estéril.

4.2.4. MÉTODO RÁPIDO A PARTIR DE CULTIVO EN PLACA.

Este método se usó para obtener de un modo rápido ADN a pequeña escala que se utilizó *a posteriori* preferentemente como molde en la PCR. La principal diferencia con respecto a los dos métodos anteriores es que el material de partida para la extracción de ADN se obtiene en menos tiempo y conlleva un menor procesamiento. El procedimiento, modificado por el Doctor Díaz-Mínguez (CIALE, Universidad de Salamanca) del original descrito por DuTeau (DuTeau y Leslie, 1991), es el siguiente:

Se preparó un cultivo en placa con medio PDA de la estirpe elegida. Se incubó hasta obtener una colonia de 2-3 cm de diámetro. El micelio de la colonia se raspó con un bisturí procurando no tomar fragmentos de agar y se transfirió a un tubo *ependorff* de 1,5 ml. A continuación se llenó el tubo que contenía el micelio con nitrógeno líquido y se permitió la evaporación. Se repitió el proceso hasta que el micelio quedara completamente congelado y se añadió inmediatamente el tampón de lisis (50 mM de Tris pH 8; 50 mM de EDTA; 3% de SDS; 1% de β-Mercaptoetanol; 100 µg/ml de proteinasa K). Se agitó en vórtex

y se incubó a 65 °C durante 40 min. Se volvió a agitar en mitad de la incubación. Se añadieron 500 µl de fenol equilibrado y, para separar las fases, se centrifugó a 10 000 r.p.m. durante 5 min. Se tomaron 400 µl de la fase acuosa y se realizó una nueva extracción con 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se separaron las fases mediante una nueva centrifugación y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se añadieron 75 µl de acetato amónico 5 M, se mezcló suavemente y a continuación se añadieron 900 µl de etanol absoluto frío. Al mezclar, a veces se observaron hebras de ADN que podían cogerse con la punta de una pipeta. Si no sucedía así se incubaba durante 30 min a -80 °C y posteriormente se centrifugaban las muestras a 14 000 r.p.m. durante 15 min para sedimentar el ADN. El precipitado se lavó con etanol al 70% para eliminar las sales y se secó al vacío. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril y se utilizó 1 µl como molde por cada reacción de PCR. Cuando hubo problemas de amplificación se procedió a hacer diluciones del ADN.

4.3. ADN DE PLÁSMIDOS.

En primer lugar, se procedió al cultivo de las estirpes bacterianas portadoras de los plásmidos de interés correspondientes. Para ello, las bacterias fueron inoculadas en medio LB o 2xTY más el antibiótico adecuado e incubadas a 37 °C durante una noche. Tras la amplificación del cultivo bacteriano, se procedió a extraer el ADN de sus plásmidos mediante cualquiera de los protocolos descritos a continuación:

4.3.1. HIGH PURE ISOLATION KIT.

Este kit de mini columnas comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) se usó cuando se requería un alto grado de pureza del ADN plasmídico (por ejemplo para la construcción de vectores o para la transformación mediante electroporación). Para ello, se partió de 4-5 ml de cultivo bacteriano y se siguieron las instrucciones del fabricante.

4.3.2. LISIS ALCALINA.

Este método (Sambrook y *cols*, 1989) permitía recuperar el plásmido, con un menor grado de pureza que el obtenido con el método anterior pero, en cantidades suficientes (más de 10 µg) para posteriores experimentos. El procedimiento fue el siguiente:

Se tomó una colonia con un palillo estéril, se hizo una réplica en una placa de LB (en la que se fueron situando ordenadamente todas las colonias) y, con lo que quedó de la colonia en el palillo, se inocularon 3 ml de medio LB más el antibiótico correspondiente. El cultivo bacteriano se incubó durante toda la noche (o al menos durante 8h) a 37 °C con agitación vigorosa. Después, el cultivo se traspasó a tubos *ependorff* de 1,5 ml y se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 5 min para que las células se sedimentaran. Se eliminó el medio de cultivo y las células recuperadas se resuspendieron, mediante su agitación en vórtex, en 100 µl de la solución 1 (50 mM de Glucosa; 10 mM de EDTA y 25 mM de Tris-HCl, pH 8) mantenida a 4 °C. Tras 5 min a temperatura ambiente se añadieron 200 µl de la solución 2 (0,2 N de NaOH y 1% de SDS), se mezcló el contenido de los tubos mediante inversión y se mantuvieron en hielo 5 min. Finalmente, se añadieron 150 µl de acetato sódico 3 M, pH 4,8 mantenido a 4 °C. La suspensión se mezcló de nuevo por inversión y se mantuvo 10 min en hielo. La eliminación de ADN genómico y de restos celulares se realizó por centrifugación a velocidad máxima durante 15 min. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y el ADN plasmídico se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y se lavó 2 veces con etanol al 70%. Una vez secado al vacío el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril (o de TE pH 8) y se añadió 1 µl de ARNasa 10 mg/ml.

4.3.3. CRACKING DE COLONIAS

Este método, descrito por Le Gouill y Dery (1991), se usó cuando era necesario identificar, de entre un número elevado de colonias bacterianas, aquellas que habían incorporado el producto de nuestra ligación

(vector + inserto) deseado. Este método requería que el tamaño del inserto fuera significativamente superior al del vector.

Se añadieron 40 µl de una solución de lisis (1% de SDS; 0,1 N de NaOH; 10 mM de TrisHCl; 10 mM de EDTA) en tantos tubos *ependorff* de 1,5 ml como colonias a analizar. Se tomó cada colonia con un palillo estéril y se resuspendió en la solución de lisis (no sin antes realizar una réplica de la colonia en una placa de LB). Se dejaron los tubos *ependorff* a temperatura ambiente durante 15 min. En este tiempo se preparó una mezcla, en proporción 3:5, de HCl 1 N y tampón de carga (0,5% de azul bromo-fenol; 0,25% de Xileno cianol y 30% de glicerol ó 15% de Ficoll) (Sambrook y *cols*, 1989) y se añadieron 8 µl de esta mezcla a cada tubo. Se mantuvieron a - 80 °C durante 20 min. Tras este tiempo se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 15 min para que los restos celulares sedimentaran completamente. Se recogió el sobrenadante y se puso inmediatamente en hielo. Se utilizaron 30 µl para visualizar el ADN en un gel de agarosa-TAE al 0,8%. En el gel se pueden apreciar las diferencias de tamaño entre las colonias que han sido transformadas por el vector con el inserto deseado y aquellas transformadas por el vector sin el inserto. Una vez localizadas las colonias de interés, se recuperó y amplificó el plásmido, a partir de las copias realizadas en la placa, utilizando uno de los métodos descritos anteriormente.

5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

5.1. TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Los tratamientos de ADN con endonucleasas de restricción se realizaron rutinariamente para la caracterización física de los plásmidos y para la construcción de los vectores recombinantes.

El tipo de tampón utilizado, la concentración de sales y las condiciones específicas de incubación se ajustaron a las instrucciones de la casa comercial (Roche, Promega, Madison, WI, USA). En general, todas las reacciones enzimáticas fueron realizadas en presencia del tampón correspondiente a una concentración final denominada 1X (dicho tampón era normalmente suministrado por la casa comercial a una concentración 10X). Las digestiones se llevaron a cabo durante tiempos y con cantidades de enzima variables dependiendo de la pureza y la cantidad del ADN a tratar. Como norma general, el volumen de la enzima no superó 1/10 del volumen total de la reacción. Esto es así debido a que la alta concentración de glicerol de las soluciones en que se almacenan las enzimas podría inhibir la propia actividad enzimática.

Cuando el ADN debía ser tratado con varias endonucleasas de restricción de forma sucesiva (no al mismo tiempo, por carecer de buena actividad en un mismo tampón), el ADN digerido con la primera de las enzimas fue purificado con mini columnas comerciales (GeneClean® Turbo; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) o por fenolización, y sometido a una nueva digestión con la siguiente enzima.

Las digestiones totales se llevaron a cabo durante al menos 1 h y los tamaños de los fragmentos digeridos se visualizaron en geles de agarosa utilizando marcadores de tamaño conocidos (ver sección 5.3.1 de “Materiales y Métodos”).

5.2. LIGACIONES.

Se utilizaron las ligasas de las casas comerciales Roche y Promega siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, según se tratase de ligaciones de extremos cohesivos o romos. La ligasa de Roche necesita incubaciones durante varias horas a 16 °C para actuar. La ligasa de Promega se usó en ligaciones rápidas pues ejercía su actividad en 1 h a 22 °C. El volumen de reacción utilizado fue en la mayoría de los casos de 5 a 10 µl.

5.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

5.3.1. ELECTROFORESIS LINEAL DE ADN.

La electroforesis en gel de agarosa se usó rutinariamente para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La electroforesis se realizó en cubetas horizontales en las que los geles de agarosa, de tamaño variable, fueron sumergidos en un tampón de electroforesis. La concentración de agarosa en los geles varió entre 0,6% y 2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos de ADN que se querían analizar. Tanto la preparación de los geles como el desarrollo de las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TAE 1X (40 mM de Tris-acetato y 1 mM de EDTA).

Las muestras de ADN se mezclaron, en proporción 5:1 (v/v), con un tampón de carga de electroforesis [azul de bromofenol al 0,25% (p/v), xilén cianol FF al 0,25% (p/v), Ficoll tipo 400 al 15% (p/v)]. De esta forma se pudo seguir el avance de la electroforesis por la posición relativa de los colorantes del frente, dado que migran a la par que un tamaño de ADN conocido. A continuación se aplicó un voltaje variable (entre 1 y 7,5 voltios/cm) dependiendo de la cantidad de ADN y del rango de tamaños que se pretendiera resolver.

Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución tampón de TAE 1X que contenía un fluoróforo, lo cual permitía la visualización de los fragmentos de ADN. Como sustancias fluoróforas, usamos bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, o bien SYBR Green a razón de 1 μg por cada 10 ml de volumen total. El bromuro de etidio es un agente intercalante que se inserta en el espacio entre dos pares de bases nitrogenadas, por lo que tiene un poderoso efecto mutágeno. El bromuro de etidio absorbe luz ultravioleta de longitud de onda $\lambda \approx 300 \text{ nm}$, y emite una luz anaranjada de 590 nm, mediante la cual podemos observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel tras la electroforesis. El SYBR Green se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los

ácidos nucleicos de éste, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. Este fenómeno se conoce como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés *Förster Resonance Energy Transfer*). El complejo resultante ADN-SYBR Green presenta el pico de absorción en $\lambda = 498$ nm y el de emisión en $\lambda = 522$ nm. Debido a que no es un agente intercalante, actualmente, el SYBR Green representa una alternativa como tinte al bromuro de etidio, ya que es hasta 100 veces más sensible que éste y mucho menos perjudicial para la salud.

Las concentraciones y tamaños de los fragmentos separados se estimaron por comparación directa con muestras patrón de tamaños conocidos que se incluían rutinariamente en los geles. Como marcadores de tamaño habituales se usaron: 1/*Hind*III (el ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa *Hind*III); 1*Hind*III/*Eco*RI-*Hind*III (la mezcla del producto de dos digestiones independientes: la digestión del ADN del fago lambda con *Hind*III más la digestión doble del ADN del fago lambda con *Eco*RI y *Hind*III); y el marcador comercial 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

5.3.2. RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Para la recuperación de fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa, se utilizó el producto comercial *Gene Clean*[®] *kit* (MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA), que emplea una resina que se une al ADN, y se siguieron las instrucciones del fabricante.

5.4. RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE SUSPENSIONES LÍQUIDAS.

Se realizaron dos procedimientos: uno rutinario, mediante la precipitación del ADN con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0,1 volúmenes de acetato amónico 3 M, pH 5,2. La muestra se mezcló y mantuvo a -20 °C durante al menos 1 h; se precipitó centrifugando a 14 000 r.p.m. durante 15 min, se lavó el pellet con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en agua destilada desionizada estéril.

El otro procedimiento implicó el uso del kit comercial *Gene Clean Turbo*® (MP Biomedicals). Se escogió este método, que emplea mini columnas que retienen el ADN, cuando se requería un ADN muy limpio y libre de sales.

5.5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

Para estimar la concentración y pureza del ADN, se midió la absorbancia, por espectrofotometría a las longitudes de onda 260 nm y 280 nm, de varias diluciones de la solución final. Para estimar la cantidad de ADN, se debe tener en cuenta que una unidad de absorbancia equivale a 50 µg/ml de ADN. Además, midiendo la razón A_{260}/A_{280} (absorbancias máximas del ADN y de las proteínas, respectivamente) puede estimarse aproximadamente la pureza del ADN. El ADN puro de *E. coli* tiene una razón de 1,8 A, aunque este valor depende de la composición de bases y puede variar según los organismos.

La cantidad e integridad de las muestras también se puede estimar mediante electroforesis en geles de agarosa (al 0,6% para ADN genómico), calculando el tamaño y cantidad en referencia a concentraciones conocidas de marcadores de peso molecular.

6. VECTORES DE CLONACIÓN: PLÁSMIDOS

Los plásmidos aquí utilizados contienen el origen de replicación bacteriano ColE1 y una multidiana de restricción (MCS, *multiple cloning site*) con secuencias de reconocimiento únicas para diferentes endonucleasas.

6.1. PBLUESCRIPT II KS (-).

Este plásmido, usualmente denominado pKS (-), cuyo mapa aparece esquematizado en la figura 15, fue inicialmente diseñado por la casa comercial Stratagene (La Joya, Ca, USA) como vector de clonación en bacteriófagos. Dicho plásmido posee el origen de replicación (-) del bacteriófago filamentoso f1, además del origen de replicación bacteriano ColE1. pKS (-) tiene un tamaño de 2,96 kb y deriva de la serie de plásmidos pUC que, al ser pequeños, pueden transportar fragmentos de ADN relativamente grandes. El plásmido cuenta con 21 sitios de restricción únicos en su multidiana de restricción y, como marcador seleccionable, porta el gen de resistencia a la ampicilina. Estas características hacen del plásmido pKS un vector muy versátil para la clonación de fragmentos de ADN.

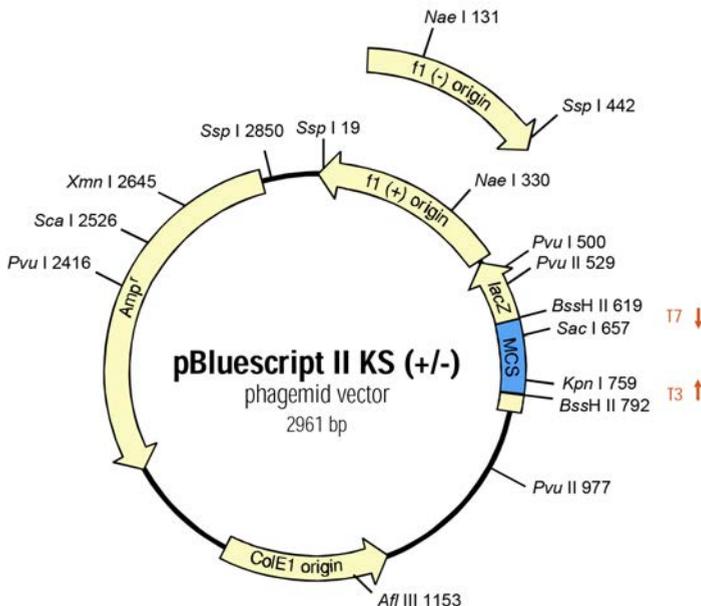


Figura 15. Mapa del plásmido pBluescript II KS (+/-). Este plásmido se usó como vector de clonación. En azul, se muestra la localización de la multidiana de restricción (MCS). En letra cursiva se muestra la localización de varios sitios de restricción de diferentes enzimas endonucleasas.

6.2. PBHT1.

Este vector, desarrollado por Mullins y cols (2001), deriva del plásmido pCAMBIA1300 (CAMBIA, Canberra, Australia) que es un vector ampliamente utilizado para la transformación de células vegetales mediante el sistema de transformación de *A. tumefaciens*. pBHT1 está adaptado para usarse como vector binario en las transformaciones de hongos filamentosos mediante el mismo sistema. Su tamaño es de unas 8,4 Kb y posee una multidiana de restricción flanqueada por dos series de secuencias repetidas, denominadas bordes de integración LB y RB (*T-border left* y *T-border right*) que, en la figura 16, aparecen enmarcadas por un cuadrado rojo. La secuencia flanqueada por estos dos bordes (denominado ADN de transferencia o T-DNA) es la región de ADN que se escindirá del plásmido binario para introducirse e integrarse en el genoma del hongo.

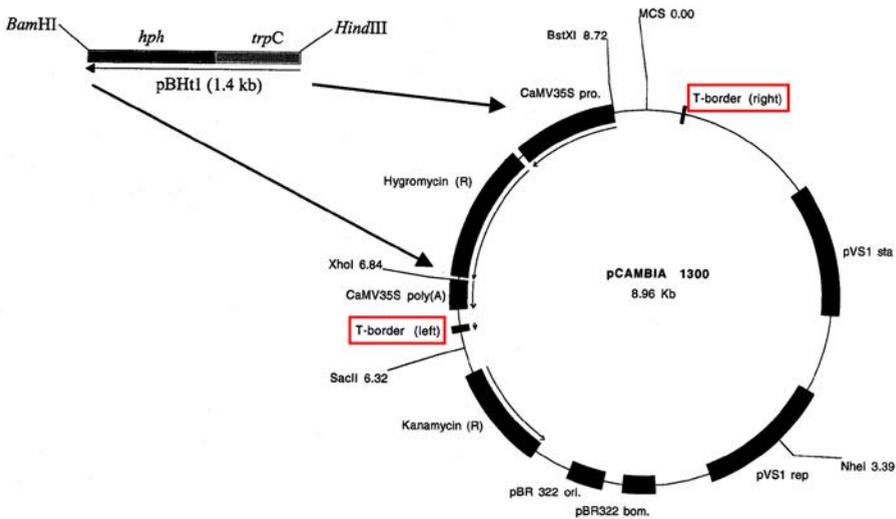
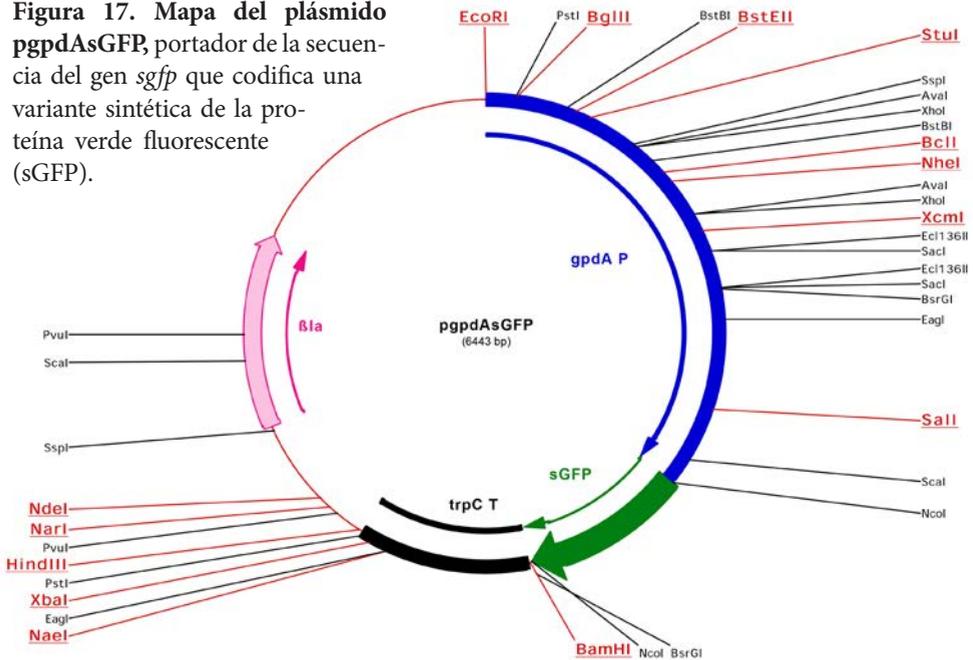


Figura 16. Esquema representativo de la obtención de pBHT1. Este plásmido es un derivado del plásmido pCAMBIA1300 (Mullis y cols., 2001). Los autores buscaron sustituir la secuencia promotora del gen que confiere resistencia a la higromicina incluida en la región de ADN transferible. En el plásmido pCAMBIA1300 este gen se encuentra bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S pro), muy usado como promotor en plantas. Sin embargo, pBHT1 posee el gen de resistencia a la higromicina bajo el control de un promotor fuerte en hongos, el promotor del *trpC* de *Aspergillus nidulans*.

Figura 17. Mapa del plásmido **pgpdAsGFP**, portador de la secuencia del gen *sgfp* que codifica una variante sintética de la proteína verde fluorescente (sGFP).



En este plásmido se combinan las funciones de replicación de ColE1 (pBR322 *ori*) y de pVS1 (pVS1 *rep* y pVS1 *sta*) para replicar y mantener estables las copias del plásmido tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. Como marcadores de selección, pBHt1 porta el gen de resistencia a kanamicina (para la selección en bacterias) y el gen de resistencia a la higromicina B (*hph*), incluido en la región de ADN transferible (para la selección en hongos).

6.3. PGPDASGFP.

El plásmido **pgpdAsGFP**, proporcionado por el Dr. Fernández-Ábalos (Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca), es un derivado del plásmido pMCB32 (Fernández-Ábalos y *cols*, 1998) que fue inicialmente diseñado para expresar la GFP en hongos filamentosos mediante métodos de transformación anteriores al uso de *A. tumefaciens*, como por ejemplo la transformación de protoplastos por el método del polietilenglicol.

El plásmido *pgpdAsGFP* lleva la secuencia de una variante sintética del gen de la GFP originalmente aislado de la medusa *Aequorea victoria*. La secuencia génica de dicha variante, denominada *sgfp* (*synthetic green fluorescent protein*) (Chiu y cols, 1996), ha sido modificada de tal modo que sus codones se adapten a la expresión génica en animales y células vegetales. Además, la secuencia de la *sgfp* porta la mutación S65→T. La sustitución de una serina por una treonina en la posición 65 de la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante conlleva el desplazamiento de los picos máximos de excitación de la proteína desde 395 y 470 hasta un único pico en 488 nm, lo cual la hace especialmente indicada para la microscopía confocal y de fluorescencia.

En el plásmido *pgpdAsGFP* (Fig. 17) el gen *sgfp* (mostrado en color verde) se encuentra bajo el control del promotor del gen que codifica la enzima GPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) de *Aspergillus nidulans* (Punt y cols, 1988), *PgpdA* (mostrado en color azul). Éste es un promotor fuerte y constitutivo, por lo que la *sgfp* se acumula en el citoplasma de todos los morfotipos fúngicos (hifas, esporas...) y genera una fuerte emisión de fluorescencia fácilmente observable incluso con un microscopio de epifluorescencia.

7. TRANSFORMACIONES BACTERIANAS

La transformación bacteriana implica la introducción de ADN exógeno, que se encuentra en el ambiente, a través de la membrana de la célula bacteriana. Para que ocurra la transformación, la bacteria debe estar en un estado de competencia, que puede inducirse artificialmente, en respuesta a condiciones ambientales tales como la falta de nutrientes o una densidad celular elevada.

7.1. TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*.

7.1.1. MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO.

Las membranas celulares de las bacterias se hacen más permeables mediante su enfriamiento en presencia de cationes divalentes (del tipo Ca^{2+}). La posterior exposición a un breve golpe de calor genera poros en las membranas celulares que permiten la entrada del ADN exógeno. Este procedimiento fue el más utilizado habitualmente para la amplificación rutinaria de plásmidos.

I. Preparación de células electrocompetentes

Las transformaciones se realizaron con alícuotas congeladas de células competentes preparadas según el método de Hanahan y *cols* (1995). Se realizó un pre-inoculo con células de *E. coli* DH5 α en 5 ml de LB que se incubó con agitación toda la noche a 37 °C. Dicho pre-inóculo se utilizó para inocular, en un matraz de 2 l, un cultivo de 500 a 600 ml de medio ϕ (Psi: 20 g/l de triptona; 5 g/l de extracto de levadura; 0,745 g/l de KCl y 4 g/l de MgSO_4) ajustado a pH 7,6 (con KOH 10 N) que se incubó, a 37 °C con agitación vigorosa (250-300 r.p.m.), hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 550 nm de 0,48 A. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 2 500 r.p.m. durante 5 min a 4 °C y se resuspendieron en 150 ml de tampón TFB1 frío [12 g/l de RbCl_2 ; 6,28 g/l de MnCl_2 ; 2,94 g/l de acetato potásico; 1,09 g/l de CaCl_2 y 15% de glicerol (v/v)], ajustado a pH 5,8 (con ácido acético 0,2 M) y esterilizado por filtración. Las células se mantuvieron en hielo, con una agitación manual suave, hasta su completa resuspensión. Se incubaron durante 5 min más en hielo y se centrifugaron durante otros 5 min a 2 500 r.p.m. y a 4 °C. Se resuspendieron en un volumen de 20 ml de TBF2 frío (2,1 g/l de MOPS; 1,2 g/l de RbCl_2 ; 8,32 g/l de CaCl_2 y 15% de glicerol), ajustado a pH 7 (con NaOH) y esterilizado por filtración. Las células volvieron a incubarse en hielo durante 15 min, tras lo cual se distribuyeron en alícuotas de 10, 100 y 200 μl que se guardaron a -80 °C.

II. Procedimiento

En aquellas transformaciones en las que se requería una elevada eficiencia de transformación, se utilizaron alícuotas de 50 a 100 μl de células competentes que fueron descongeladas en hielo. En ese mismo tubo se añadieron de 10 a 200 ng de ADN del plásmido que deseábamos fuera incorporado por las células bacterianas (en un volumen no mayor que la cuarta parte del volumen de células). La suspensión celular se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo durante 20 min. Después, la mezcla fue sometida a un choque térmico mediante su inmersión en un baño previamente calentado a 37 °C durante 2 min y su rápido trasvase y mantenimiento en hielo durante otros 2 min. A continuación, tras añadir más ADN y 500 μl de medio LB, la mezcla de *E. coli* se incubó a 37 °C, con agitación moderada, durante 50 min. Transcurrido este tiempo las células se inocularon sobre los medios sólidos selectivos y las placas se incubaron a 37 °C toda la noche. La frecuencia de transformación que se obtuvo con este método fue de 2 a $5 \cdot 10^8$ transformantes por μg de ADN plasmídico.

Cuando no se necesitaban eficiencias de transformación demasiado elevadas, se empleó un procedimiento de transformación más rápido que consistía en añadir de 1-2 μl de ADN plasmídico (1-100 ng) a 3-5 μl de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla se mantuvo 1 minuto en hielo y seguidamente se sometió a un choque térmico idéntico al descrito previamente. Tras añadir 100 μl de medio LB, la mezcla se extendió directamente sobre medio sólido selectivo. La frecuencia de transformación obtenida fue mucho menor que con otros métodos, pero el número de colonias transformantes era suficiente como para asegurar la introducción del plásmido en la estirpe deseada.

Para seleccionar los clones portadores de plásmidos recombinantes derivados de vectores de clonación que portan el inicio del gen *lacZ* de *E. coli*, capaz de α -complementación en cepas bacterianas como DH5a [como son los vectores de la serie pBluescript II KS/SK (+/-)], se extendió por cada placa de Petri, antes de añadir la mezcla de la transfor-

mación, 80 μ l de IPTG (de una solución 0,1 M) como inductor de la transcripción y 40 μ l de X-Gal [de una solución al 2% en N,N-dimetilformamida (p/v)] como substrato cromogénico de la enzima. La ausencia de inserto en el sitio de clonación del vector, queda indicada por la coloración azul de las colonias la cual se produce por el procesamiento del sustrato X-gal; mientras que en los clones recombinantes (aquellos que han incorporado el ADN) no habría producción de enzima y el color de las colonias sería blanco.

7.1.2. MEDIANTE ELECTROPORACIÓN.

Este procedimiento consiste en provocar un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante la aplicación de un campo electromagnético a través de la suspensión celular. Se utilizó cuando se pretendían realizar transformaciones bacterianas con plásmidos de gran tamaño molecular, como por ejemplo, el plásmido pNMk2 de más de 12 kb generado en el presente trabajo.

I. Preparación de células electrocompetentes

Se inoculó un pre-cultivo de 3 ml de LB con una colonia de la cepa DH10 β y se incubó toda la noche a 37 °C en agitación. Al día siguiente, se inocularon 100 μ l del pre-inóculo en 100 ml de medio LB, incubándose la mezcla durante 4-5 h a 150 r.p.m. Después, el cultivo se mantuvo en hielo durante 15 min, pasados los cuales se centrifugó a 2 500 r.p.m. durante 5 min a 4 °C para obtener un precipitado con las bacterias, que se resuspendieron suavemente en agua destilada fría. Se centrifugó y desechó el sobrenadante. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 0,5 ml de glicerol al 10% (v/v) frío y se dispensaron en alícuotas de 40 μ l para su conservación a -80 °C hasta el momento de su uso.

II. Procedimiento

A una alícuota de 40 μ l de células electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo, se añadieron 5-50 μ g de plásmido (en un volu-

men de 2 μ l). La suspensión celular se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 1 minuto para transferirse fría a una cubeta de electroporación previamente esterilizada y enfriada. A continuación, se insertó la cubeta en el electroporador (Gene Pulser I, Bio-Rad, USA) y se aplicó un pulso electromagnético con las condiciones adecuadas a la capacidad de la cubeta empleada. En nuestro caso, las condiciones del pulso para una cubeta de 0,2 ml, fueron: 25 μ F de capacitancia, 2 500 V de potencial y 200 Ω de resistencia. Inmediatamente después se añadió 1 ml de medio SOC [2% (p/v) de triptona; 0,5% (p/v) extracto de levadura; 10 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 20 mM de glucosa; 20 mM de MgCl₂; 20 mM de MgSO₄] para recoger las bacterias. Se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación suave. Se centrifugó y resuspendió en el volumen deseado para extenderlo en el medio selectivo (según el marcador de selección del plásmido utilizado).

7.2. TRANSFORMACIÓN DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

7.2.1. MEDIANTE ELECTROPORACIÓN.

I. Preparación de células electrocompetentes

Se inoculó una colonia de la cepa AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens* en 100 ml de LB más los antibióticos Rifampicina (25 μ g/ml) y Carbenicilina (100 μ g/ml). Se incubó toda la noche a 30 °C, con agitación vigorosa (180-200 r.p.m.). Al día siguiente, las células se centrifugaron a 5 000 r.p.m. durante 5 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 50 ml de glicerol al 10% (v/v) frío. Este paso se repitió 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10% frío y se repartieron en alícuotas de 40 μ l que se conservaron a -80 °C.

II. Procedimiento

Para la electroporación, se añadieron 200 ng de ADN (en un volumen no mayor de 4 μ l) a 40 μ l de células electrocompetentes. Se colocó la mezcla en una cubeta de electroforesis fría a la cual, tras insertarse en el electroporador (Gene Pulser I, Bio-Rad, USA), se le aplicó un pulso

de 8-12 ms, 2 500 V, 25 μ FD y 400 Ω . La suspensión celular se recuperó añadiendo 1 ml de LB y, a continuación, se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2-4 h. Después las células se extendieron en placas de LB más el antibiótico adecuado [Ampicilina (100 μ g/ml) o Kanamicina (50 μ g/ml)]. Tras 2-3 días a 28 °C, comenzaron a verse las colonias transformantes.

8. TRANSFECCIÓN: TRASFORMACIÓN FÚNGICA

La transfección consiste en la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas para la transferencia. No obstante, se prefiere y está mucho más extendido el término *transformación* para describir las transferencias no virales de material genético en bacterias y células eucariotas no animales como hongos, algas o plantas.

8.1. TRANSFORMACIÓN DE *FUSARIUM CIRCINATUM* MEDIANTE EL MÉTODO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

La transformación de *F. circinatum* se llevo a cabo siguiendo el protocolo descrito por Mullins y cols (2001).

8.1.1. PREPARACIÓN DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

Una vez seleccionada la colonia de *A. tumefaciens* portadora de la construcción genética generada en el presente trabajo, denominada pNMk2 y derivada del vector pBHt1, se cultivó en 5 ml de Medio Mínimo (ver sección 2.4 de “Materiales y Métodos”) suplementado con Kanamicina (que se añadió en el momento de uso a una concentración final de 50 μ g/ml), durante 1-2 días a temperatura no superior a 28 °C

y 120 r.p.m. Se midió la densidad óptica del cultivo, a 600 nm, con un espectrofotómetro y se inoculó la cantidad apropiada para alcanzar una D.O.⁶⁰⁰ = 0,15 en 3 ml de Medio de Inducción (ver sección 2.4 de “Materiales y Métodos”), suplementado con Kanamicina (que se añadió en el momento de uso a una concentración final de 50 µg/ml). Este medio contiene además acetosiringona, molécula que funciona como un inductor de los genes de virulencia de la bacteria. El cultivo bacteriano se incubó durante 6 h a 28 °C y 180-200 r.p.m.

8.1.2. PREPARACIÓN DE *FUSARIUM CIRCINATUM*.

Mientras se alcanzaba la densidad del cultivo bacteriano deseada, se preparó una suspensión de esporas frescas de *F. circinatum* en agua (ver sección 3.4 de “Materiales y Métodos”) a una concentración final de 10⁶ esporas/ml.

8.1.3. CO-CULTIVO DE *A. TUMEFACIENS* CON ESPORAS DE *F. CIRCINATUM*.

Se mezclaron 100 µl de la suspensión de 10⁶ esporas/ml de *F. circinatum* con 100 µl del cultivo de la estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* (después de 6 h de incubación a 28 °C y 180 r.p.m. en el medio de inducción). Se mezcló por inversión y se extendió la mezcla sobre una membrana de nitrocelulosa (0,45 µm de poro) colocada sobre un medio de co-cultivo (ver sección 2.4 de “Materiales y Métodos”) en placas de Petri. Estas placas se incubaron durante 2-4 días a temperatura ambiente (entre 22 °C y 28 °C) buscando las condiciones adecuadas para que el hongo no creciera muy deprisa y suprimiera el crecimiento de la bacteria, pues se obtendrían menos transformantes.

Pasado este tiempo, y cuando ya comenzó a observarse crecimiento de micelio, se transfirió la membrana a otra placa con medio de selección. Como medio de selección se usó PDA suplementado con higromicina B a una concentración final de 75 µg/ml (para la selección de los transformantes fúngicos) y con cefotaxima a una concentración final de 200 µM (para inhibir el crecimiento bacteriano). Se incubaron las

placas durante otros 5-7 días a temperatura ambiente (entre 22 °C y 28 °C) hasta que empezaban a verse colonias resistentes sobre el fondo. Estas colonias se transfirieron a nuevas placas con PDA suplementado con 100 µg/ml de higromicina B, recogiendo el micelio con pinzas o recortando la membrana con un bisturí. Se realizaron 2 réplicas más en PDA suplementado con 100 µg/ml de higromicina B.

8.2. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD MITÓTICA DE LOS TRANSFORMANTES.

Se siguió el procedimiento descrito por Covert y *cols* (2001) mediante el cual se comprobó si los transformantes, después de ser cultivados durante varias generaciones sucesivas en un medio sin higromicina, mantenían la resistencia al antibiótico cuando se les volvía a someter a la presión selectiva ejercida por el mismo. El procedimiento fue el siguiente:

Se inocularon esporas de los transformantes seleccionados en 3 ml de medio PDB y se cultivaron en agitación a 120 r.p.m. a temperatura ambiente. Después de 4 días de crecimiento, se sembraron 50 µl de cada cultivo en otros 3 ml de PDB y se mantuvieron en las mismas condiciones 3 días más. Se repitió el proceso una vez más, tras lo cual se transfirió una porción de micelio a placas con medio PDA suplementado con 150 µg/ml de higromicina B, y otra porción a placas con medio PDA sin antibiótico.

La estabilidad mitótica también fue testada en cultivos sólidos mediante la transferencia de micelio de cada uno de los transformantes a un borde de placas con medio PDA. Una vez que el crecimiento alcanzó el lado opuesto de la placa, el micelio del borde de crecimiento se transfirió a otra placa con medio PDA. Se repitió el proceso una vez más, tras lo cual se transfirió una porción de micelio a placas con medio PDA suplementado con 150 µg/ml de higromicina B, y otra porción a placas con medio PDA sin antibiótico.

9. ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTA

Se realizaron dos tipos de ensayos de infección diferentes, con dos tipos de propágulo diferentes (esporas o micelio del patógeno) en función del órgano vegetal expuesto al patógeno (tallo o raíz). Así, en lo sucesivo, distinguiremos entre:

- inoculación aérea (*air-borne inoculation*): realizada en el tallo de la planta, con inóculo esporal.
- inoculación en sustrato (*soil-borne inoculation*): realizada en el sustrato de crecimiento de las raíces de la planta, con inóculo vegetativo.

9.1. INOCULACIÓN AÉREA.

Los ensayos fueron realizados mediante la inoculación de las esporas fúngicas en el tallo de los pinos según el método descrito por Davis y cols (2002).

9.1.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

La obtención del inóculo esporal se produjo a partir de los cultivos monospóricos del aislado de *F. circinatum* correspondiente, almacenados en glicerol al 25% (v/v) a -80 °C (ver sección 3.4 de “Materiales y Métodos”). La suspensión de esporas obtenida se ajustó, mediante la cuantificación con una cámara Thoma al microscopio, a una concentración final de $2,5 \cdot 10^5$ esporas/ml. Los conidios se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de la infección.

9.1.2. PROCEDIMIENTO.

El proceso de inoculación de las plantas con *F. circinatum* consistió en, después de medir la longitud del tallo de los pinos, eliminar cuidadosamente un fascículo de acículas situado hacia la mitad del tallo. En la herida así producida, se colocó una gotita de 1 μ l de la suspensión de

Escala de severidad	Descripción	Síntomas visibles
1	Planta saludable sin síntomas de necrosis	
2	Parte aérea sana, con necrosis únicamente en el punto de inoculación	
3	Parte aérea sana, pero con necrosis > 2cm alrededor del punto de inoculación	
4	Síntomas de marchitez en las acículas y decaimiento del ápice de la planta	
5	Acículas necróticas y planta muerta por encima del punto de inoculación	

TABLA 1. Escala de severidad, con valores del 1 al 5, creada por Correll y cols. (1991) que se aplicó para valorar los síntomas de enfermedad visibles en las plántulas de *Pinus radiata* inoculadas en el tallo con esporas de *Fusarium circinatum*.

Escala de severidad	Descripción	Síntomas visibles
0	Ausencia de exudación	
1	Exudación baja de resina: la gota cae por el tallo a una distancia de la herida ≤ 5 mm	
2	Exudación moderada de resina: la gota cae por el tallo hasta una distancia de la herida ≤ 4 cm	
3	Exudación elevada de resina: la gota cae por el tallo hasta una distancia de la herida > 4 cm.	

TABLA 2. Escala, con valores del 0 al 3, creada por Bonello & Blodgett (2003) que se aplicó para valorar la cantidad de resina exudada por las plántulas de *Pinus radiata* inoculadas en el tallo con esporas de *Fusarium circinatum*.

esporas previamente ajustada a una concentración $2,5 \cdot 10^5$ esporas/ml. De este modo, la inoculación de cada una de las plantas se realizó en una localización similar del tallo y con 250 esporas del aislado fúngico deseado (silvestre o transformante). En las plantas que sirvieron como control negativo de la inoculación, se procedió de la misma manera pero colocando en la herida 1 μ l de agua destilada y estéril. También se designaron plantas como controles negativos ambientales sobre las que no se llevó a cabo ninguna manipulación.

9.1.3. EVALUACIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA.

Tras la inoculación de las plantas, y a lo largo de las ocho semanas de duración del ensayo de infección, se evaluaron semanalmente dos aspectos referentes a la sintomatología observada a nivel de parte aérea:

- I. **La severidad de la infección**, para cuya evaluación se siguió la metodología descrita por Correll y cols (1991) que asigna un valor establecido en una escala de severidad de 1 a 5 a cada uno de los síntomas siguientes: necrosis de los tejidos alrededor del punto de inoculación, clorosis/marchitez de las acículas y decaimiento del brote apical de la planta. Los valores de dicha escala se ilustran en la Tabla 1 con las fotografías correspondientes a cada valor.
- II. **La cantidad de resina** que exuda la herida producida en el punto de inoculación. Para su evaluación se usó la metodología descrita por Bonello y Blodgett (2003), que asigna un valor de 0 a 3 a dicha exudación en función del tramo de tallo que alcanzan a recorrer las gotas de resina. Los valores de dicha escala se ilustran en la Tabla 2 con las fotografías correspondientes a cada valor.

9.1.4. ÍNDICE DE PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Con el fin de comparar la capacidad que tiene cada estirpe analizada (el aislado silvestre de *F. circinatum* y su transformante) de producir síntomas en las plantas con mayor o menor severidad o rapidez, se utilizó el Índice de Progresión de la Enfermedad (IPE). Este índice refleja el progreso de la enfermedad a lo largo del tiempo y fue definido según García-Sánchez y cols (2010) mediante la fórmula:

$$\text{IPE} = \sum X_i/n, \text{ para } i=1, 2, \dots, n;$$

donde X_i representa el valor medio de los valores asignados a cada planta según la escala de Correll (desde 1=planta sana, hasta 5=planta

muerta), registrado semanalmente para cada uno de los grupos de plantas sometidos a los diferentes tratamientos (inoculadas con la estirpe silvestre, con la estirpe transformada y sus correspondientes controles) y *n* representa el número de semanas transcurridas tras la inoculación.

9.2. INOCULACIÓN EN SUSTRATO.

Los ensayos fueron realizados mediante la inoculación del sustrato de crecimiento de las raíces de los pinos con micelio vegetativo, siguiendo el procedimiento experimental puesto a punto por nuestro grupo de investigación (Sánchez-Zabala, 2013). Para evitar en lo posible la producción de heridas en las raíces de los pinos, se llevó a cabo un paso previo que garantizara el correcto estado de salud del sistema radical de las plantas. Así, un mes antes de los ensayos de infección, las plántulas de pino, que habían crecido en contenedores de 200 cm³ de capacidad, se trasplantaron a contenedores de 1600 cm³. El tamaño del nuevo contenedor permitía que el sustrato envolviera completamente el cepellón tras el trasplante y dejara una distancia de varios centímetros entre el paquete de raíces que formaba el cepellón y las paredes del nuevo contenedor. Esta distancia aseguró que las raíces estuvieran intactas (no dañadas) en el momento de la inoculación.

9.2.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

Para la obtención del inóculo vegetativo de *F. circinatum* se preparó previamente un pre-inóculo del hongo a partir del cultivo del aislado monospórico (almacenado a -80 °C) en placas de medio PDA. Las placas se mantuvieron a 25 °C durante 7-10 días y, mientras tanto, se preparó un soporte para el crecimiento vegetativo del hongo adecuado para su posterior inoculación en el sustrato de crecimiento de los pinos. Dicho soporte consistió en semillas de mijo (familia Poaceae) que se hidrataron en agua desionizada durante 24 h y, tras escurrirlas, se distribuyeron en dosis de 100 ml dentro de frascos de vidrio de 500 ml.

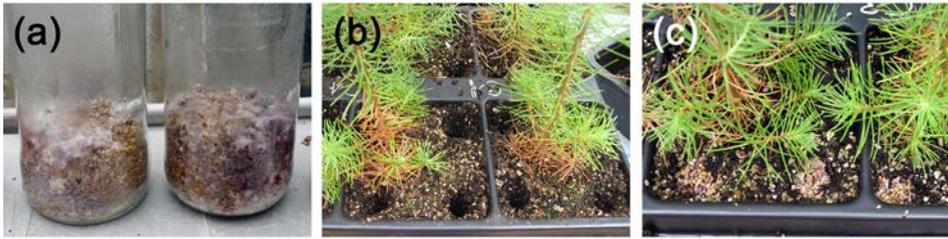


Figura 18. Ensayo de inoculación del sustrato de crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* con micelio de *Fusarium circinatum*. (a) Detalle del micelio de *F. circinatum* crecido durante 14 días en mijo y usado como inóculo en los ensayos de infección; (b-c) Se muestran los cuatro agujeros equidistantes en el sustrato antes (b) y después (c) de la introducción del inóculo vegetativo de *F. circinatum*.

La mayor capacidad del contenedor en que se dispuso el mijo garantizó la disponibilidad de O_2 para el hongo durante su posterior tiempo de incubación. Los tarros con el mijo se esterilizaron en el autoclave, mediante 3 ciclos de 20 min a 121 °C.

Cada uno de los frascos así preparados se inocularon con 15 discos de 5 mm de diámetro obtenidos del margen de las colonias de *F. circinatum* crecidas en las placas de medio PDA. A los frascos que sirvieron para la producción del inóculo vegetativo control (sin *F. circinatum*) se les añadieron 15 discos de medio PDA de placas sin crecimiento fúngico. Tras la inoculación, los frascos se incubaron en oscuridad a 28°C hasta que el micelio cubriera de forma densa todo el mijo del frasco, lo cual aproximadamente tardó unos 14 días (Fig. 18a).

9.2.2. PROCEDIMIENTO.

Para inocular el sustrato de crecimiento de las plantas de pino con *F. circinatum*, se practicaron 4 agujeros en el sustrato (con un sacabocados de 20 mm de diámetro) en cada una de las esquinas superiores del contenedor y a una distancia del tallo de unos 5 cm (Fig. 18b). Después, en cada hueco se introdujo una dosis de 6 ml del inóculo vegetativo (*F. circinatum* crecido en el mijo), tras lo cual terminó de cubrirse con sustrato (Fig. 18c). Para el tratamiento control (sin *F. circinatum*), el agujero se rellenó con mijo que no había sido inoculado con *F. circinatum*.

Escala de severidad	Descripción	Síntomas visibles
1	Ausencia de síntomas	
2	Marchitez o clorosis en las acículas	
3	Decaimiento del ápice de la planta	
4	Acículas necróticas y planta muerta	

TABLA 3. Escala, con valores del 1 al 4, creada para la valoración de los síntomas visibles de enfermedad en la parte aérea de las plántulas de *Pinus radiata* tras la inoculación de su sustrato de crecimiento con *Fusarium circinatum*.

9.2.3. EVALUACIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA.

I. Parte aérea de la planta

Se evaluaron los síntomas observados en la parte aérea de la planta, a lo largo de los 3 meses que duro el ensayo. Para ello, a los síntomas se les asignó un valor de 1 a 4 en una escala de severidad desarrollada para el presente trabajo, en la que el valor 1 correspondía a una planta sana, sin síntomas; 2, a plantas que presentaban clorosis o marchitez

en las acículas; 3, cuando se producía el decaimiento del ápice de la planta; y 4, cuando se producía la necrosis foliar y muerte de la planta. Los valores de dicha escala se ilustran en la Tabla 3 con las fotografías correspondientes a cada valor.

II. Sistema radicular

Se valoró el estado del sistema radicular de los pinos mediante el uso de un sistema basado en instrumentación óptica y el posterior análisis de la imagen con un programa especializado.

Para ello, teniendo cuidado en mantener la integridad del sistema radical, se arrancó cada pie de planta del contenedor que las albergaba, dejando libre el cepellón con las raíces. Se cortó el tallo de las plantas y se procedió a lavar sus raíces, primero sumergiéndolas en un contenedor lleno de agua y después manteniéndolas bajo el grifo de agua hasta que quedaran libres de partículas de suelo. Se procedió al escaneado y análisis de las mismas con el paquete informático WINRHIZO® PRO (Regent Instruments Inc.). Se establecieron 5 clases de raíz en función de su diámetro: <0,5; 0,5–1,0; 1,0–1,5; 1,5–2,0 y >2,0 mm. Para cada una de esas clases, se determinaron los siguientes parámetros: la longitud de las raíces (cm), el área de la superficie radicular (cm²) y el número de puntas de las raíces. Se calculó la intensidad de ramificación de las raíces como la razón entre el número total de puntas de las raíces y la longitud de las mismas (cm⁻¹).

10. ANÁLISIS MICROSCÓPICOS

10.1. EQUIPAMIENTO ÓPTICO.

Para la observación microscópica de preparaciones de *F. circinatum* o de cortes histológicos vegetales, se utilizó diverso equipamiento óptico dependiendo del objetivo de estudio.

10.1.1. MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL.

Para el estudio y la manipulación de conidios y de micelio se trabajó, usando el rango de luz visible, con el microscopio de fluorescencia Leica DMLB y con una lupa binocular Leica MZ95 (Leica Microsystems, Germany).

10.1.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Para los estudios que comprendían el uso de proteínas quimioluminiscentes, como la GFP, se usó el microscopio de epifluorescencia Leica DMLB (Leica Microsystems, Germany) equipado con una lámpara de mercurio de alta presión 100W y con el cubo de filtros I3 compuesto por un filtro de excitación BP 450-490, un espejo dicróico RSP 510 y un filtro barrera LP 515.

10.1.3. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER DE BARRIDO.

El proceso de infección del pino por *F. circinatum* se evaluó, a nivel histológico, mediante la visualización de cortes histológicos en el microscopio confocal láser de barrido (CLSM, de sus siglas en inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*) Leica LCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Germany). Dicho microscopio está equipado con 4 láseres (1 de diodo, 1 de argón y 2 de helio-neón) que generan 9 líneas de excitación posibles: 405, 458, 476, 488, 496, 514, 543, 594 y 633 nm. El sistema cuenta con 3 fotomultiplicadores para detectar la fluorescencia emitida por la muestra y otro detector más para la luz transmitida. Además, este microscopio permite realizar una exploración espectral de regiones concretas de las muestras (λ scan) gracias a lo cual se pudieron obtener las curvas de fluorescencia de las regiones del corte deseadas y se pudo realizar la separación espectral de emisiones fluorescentes muy similares.

En nuestro estudio, las muestras se excitaron con luz azul (488 nm) y la fluorescencia emitida se derivó a tres canales: en el canal verde se

recogió la emisión de la GFP (504-524 nm); en el canal rojo se recogió la emisión auto fluorescente de los tejidos de la planta (540-700 nm); y en el canal azul se mostró la fluorescencia emitida por la clorofila (a partir de su espectro de emisión tomado con la función lambda scan del software); además, en un cuarto canal se recogió la luz transmitida por la muestra.

10.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de tejido vegetal analizadas fueron básicamente de dos tipos:

- I. raicillas finas** de diferentes zonas del sistema radical de los pinos que, tras retirarles el exceso de sustrato adherido a dichas raíces, se cortaron en porciones de aproximadamente 1 cm de longitud.
- II. secciones transversales** de aproximadamente 0,5-1 mm de grosor del cuerpo primario de la planta (raíz principal, cuello de raíz y tallo) que se obtuvieron mediante el corte manual con una cuchilla.

El material vegetal así obtenido (tanto las raicillas como las secciones transversales) se fijó durante toda la noche a 4 °C y en oscuridad, en una solución al 2,5% de paraformaldehído (PFA) con pH 7. A continuación, las muestras se lavaron tres veces con un tampón salino (PBS, *phosphate-buffered saline*) y se mantuvieron en oscuridad a 4 °C hasta su utilización. En el momento del análisis histológico, la muestra se colocó directamente en un portaobjetos de vidrio sobre una gota de agua y por encima se dispuso la cubierta protectora.

10.3. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES DIGITALES.

Con el microscopio confocal se tomaron por un lado, imágenes individuales correspondientes a un único plano focal (xy) y, por otro lado, series de secciones ópticas de varios planos focales durante el esca-

neado tridimensional de las muestras. El software LCS (Leica Microsystems) apila ordenadamente las secciones ópticas seriadas en función de su posición en el eje z. Estos grupos de imágenes seriadas, conocidos comúnmente como *stacks*, se combinaron y procesaron, usando tanto el software LCS como el programa *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA). Se obtuvieron así imágenes fruto de la información proveniente de las tres dimensiones (xyz) con las que se pudo incluso reconstruir tridimensionalmente la estructura observada.

Para obtener microfotografías completas de los cortes transversales de pino, se ensamblaron varias imágenes individuales, cada una de las cuales correspondía a una sección del corte transversal completo, usando el programa *Photoshop CS* (Adobe).

11. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR, así como la qPCR, son dos técnicas que parten de un principio similar, aunque metodológicamente son diferentes; la primera genera resultados cualitativos mientras que la segunda, cuantitativos.

Ambas técnicas aprovechan la actividad catalítica de la enzima ADN polimerasa que, en el medio apropiado y en presencia de dos cebadores (fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar) es capaz de sintetizar las nuevas cadenas de ADN (siempre en dirección 5' → 3') incorporando nucleótidos complementarios a la cadena molde.

En este trabajo, dependiendo del objetivo de la amplificación, se utilizaron las siguientes enzimas:

- *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen) producida por la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y Biotools DNA Polimerasa (Biotools ByM Labs, SA, Madrid, Spain) producida por el organismo *Thermus thermophilus*.

Para comprobaciones rutinarias en una PCR convencional, como por ejemplo la comprobación de la presencia de fragmentos clonados en plásmidos recombinantes o para identificar transformaciones positivas.

- *AmpliTag* Gold® (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) proveniente del organismo termófilo *Thermus aquaticus*. Para amplificaciones en las que se precisaba de una gran fidelidad, como en las realizadas para cuantificar el ADN mediante qPCR.

Las concentraciones de la enzima utilizada en cada caso (generalmente 1 U por cada 50 µl de reacción), así como el volumen final de la reacción (que osciló entre 10 y 100 µl) se determinaron siguiendo las indicaciones de las diferentes casas que comercializan las polimerasas utilizadas.

Las amplificaciones se realizaron con dos cebadores, también denominados oligonucleótidos o *primers*, correspondientes a los extremos 5' de las dos cadenas del fragmento del ADN molde y que aparecen detallados en la Tabla 4.

11.1. PCR CLÁSICA O CONVENCIONAL.

La PCR clásica es una herramienta cualitativa utilizada para detectar la presencia o ausencia de una secuencia de ADN. La sensibilidad de esta técnica es muy alta aunque presenta algunos inconvenientes, como una alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta, y realizar una adecuada manipulación de los reactivos.

11.1.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Cuando la secuencia de los fragmentos que nos interesaba amplificar era conocida, se diseñaron oligonucleótidos (cebadores) específicos para esa secuencia con el programa OLIGO v3.3 (Molecular Biology Insights, Inc). El criterio para diseñar los oligonucleótidos se basó principalmente en la temperatura de hibridación deseada para los mismos,

y esto se consiguió jugando con el tamaño de su secuencia. En primer lugar, se estableció un tamaño suficientemente grande y se seleccionaron las zonas donde, por su secuencia nucleotídica, la temperatura de hibridación fuera más alta. Una vez establecidas estas zonas se ajustó el tamaño del oligonucleótido y la posición exacta donde la temperatura fuera la deseada. Los oligonucleótidos diseñados, además de cumplir las condiciones mencionadas, fueron analizados para evitar la formación de bucles en los mismos y la formación de dímeros intracatenarios o con otros oligonucleótidos.

Organismo	Número de acceso (GenBank)	Nombre del gen	Nombre del cebador	Secuencia 5'→3'	T _m (°C)	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	JC209356.1	Hygromycin resistance, <i>hph</i>	hphA	CACAGCCATCGGTCCAGACG	62,1	655	Ramos y cols. 2007
			hphB	GCCTGAAACCGAACTGCCCG	63,1		
<i>Aequorea victoria</i>	(*)	Green fluorescent protein, <i>gfp</i>	GFPA	GCTTTCCCACTTCATCGCAG	59,4	615	OLIGO v3.3 software
			GFPB	GTTCTGCTGGTAGTGGTCCG	61,4		
<i>Gibberella circinata</i>	AY249403	Intergenic Spacer (IGS)	FCIR-F	TCGATGTGTCGTCTCTGGAC	59,4	146	loos y cols., 2009
			FCIR-R	CGATCCTCAAATCGACCAAGA	57,9		
<i>Pinus radiata</i>	FE520931.1	Ubiquitin, <i>ubi1</i>	UBIQ-F	GGCTAAGATTCAAGACAAGGAAGGT	61,3	99	OLIGO v3.3 software
			UBIQ-R	TTATAATCCGCCAGGGTTCG	57,3		
<i>Pinus radiata</i>	EU044786	<i>Pinus radiata</i> SHORT-ROOT	PrSHRtrFor1	GAACCAAGTGAAGGAGCATTG	59,8	122	Solé y cols., 2008
			PrSHRtrRev1	AAATCCTGCCTCCTTGAGCCT	59,8		
<i>Pinus radiata</i>	AF060491	Cinnamyl alcohol dehydrogenase, <i>cad</i>	CAD(Pe)-F	GGAACCATATCTTGCCCTTCTG	60,3	61	Primer expres software
			CAD(Pe)-R	TGGAACAACGCCAGCAT	56,0		
<i>Pinus radiata</i>	AF060491	Cinnamyl alcohol dehydrogenase, <i>cad</i>	CAD(O)-F	GTTGGTCGAATTTCCGTTGCT	57,9	113	OLIGO v3.3 software
			CAD(O)-R	ATTGACCCTGTGACCTCCCA	59,8		
<i>Pinus radiata</i>	U76757	Needly, <i>nly</i>	NLY(Pe)-F	CACAGCAGTGAGAGCGATGAA	59,8	64	Primer expres software
			NLY(Pe)-R	CCTTGGACCGCCTCCTTT	58,2		
<i>Pinus radiata</i>	U76757	Needly, <i>nly</i>	NLY(O)-F	GCAGTGAGAGCGATGAAAGGAA	60,3	123	OLIGO v3.3 software
			NLY(O)-R	TCTCCTGGTTCGGTGACAATGA	60,3		

TABLA 4. Selección de las parejas de cebadores escogidos o diseñados específicamente para la detección e identificación de secuencias de ADN en el presente trabajo. T_m, temperatura de hibridación. (*) Secuencia proporcionada por el Dr. Fernández-Ábalos (Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca).

11.1.2. CONDICIONES.

Las reacciones se prepararon normalmente en un volumen de 20 μl que, además de la enzima polimerasa, incluía:

- un tampón de reacción específico de cada enzima, proporcionado por la citada casa comercial a una concentración 10 veces superior a la concentración de reacción.
- MgCl_2 , en una cantidad que, según la enzima utilizada o el fragmento de ADN a amplificar, varió entre 1,5 y 2,5 mM, siendo 1,5 mM la más habitual.
- desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs): 0,2 mM.
- los cebadores: la cantidad de cada oligonucleótido usado en la reacción, aún siendo generalmente de 0,2 μM , varió desde 0,1 hasta 0,6 μM según la temperatura de hibridación de los cebadores.
- el ADN molde, cuya cantidad varió según el tipo de ADN (genómico o plasmídico) y su pureza. Así, en el caso de ADN genómico, se usaron entre 50 y 100 ng y en el caso de ADN de plásmido se usaron entre 0,01 y 10 ng. Si se sospechaba que la muestra de ADN molde pudiera contener impurezas que entorpecieran la reacción, se diluía con agua Milli-Q estéril.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en los termocicladores de Applied Biosystems: *GeneAmp® PCR System 2400, 2720 y 9700* y en el termociclador "*Mastercycler Gradient*" (Eppendorf, Hamburg, Germany). La reacción estándar de amplificación consistió en un paso inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de tres pasos:

- I. desnaturalización de las hebras de ADN (30-45 segundos a 94 °C).
- II. hibridación del cebador (45-60 segundos a una temperatura que osciló entre 56-63 °C, dependiendo del cebador).
- III. elongación de la nueva cadena de ADN (72 °C durante 50 segundos).

Una vez finalizados los ciclos, se aplicó una última fase de extensión a 72 °C durante 7 min. Los amplicones o productos finales de la amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

11.2. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.

Esta técnica permite amplificar y simultáneamente cuantificar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. La medida de intensidad de la fluorescencia emitida permite determinar la cantidad de producto amplificado en la muestra.

Para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real se seleccionó el fluoróforo SYBR Green® (PE Applied Biosystems). Este marcaje tiene la ventaja de que usando los mismos reactivos, se puede analizar el fragmento de ADN que deseemos cambiando únicamente el par de cebadores específicos para efectuar la amplificación. El principal inconveniente del SYBR Green es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo ADN genómico contaminante en la muestra o dímeros de primer (los cuales son muy frecuentes en toda reacción de PCR). Este inconveniente conlleva necesariamente un diseño muy estricto y cuidadoso de los cebadores para aumentar su especificidad por la secuencia de ADN diana y evitar en lo posible las amplificaciones inespecíficas que distorsionarían los resultados de nuestro experimento.

Se escogió el método de cuantificación relativa mediante curva estándar para determinar la cantidad relativa de ADN problema (o incógnita) en una muestra experimental respecto a la cantidad de ADN de un gen endógeno (o control). Este método requirió la creación de una recta patrón para cada secuencia diana analizada (la secuencia problema y la secuencia del control endógeno). Cada recta patrón se obtuvo a partir de la amplificación de diluciones seriadas de una

muestra de ADN molde, de concentración conocida, usando la pareja de cebadores diseñados específicamente para esa secuencia. Las rectas patrón relacionan cada concentración con su Ct (ciclo umbral) y son propias de cada pareja de cebadores. Así, pudo relacionarse la cantidad de ADN presente en la reacción con un ciclo umbral (Ct) en la PCR a través de la ecuación de la recta:

$$y = mx + b; (r^2 \geq 0,99)$$

Donde:

$y = Ct$ (cycle threshold);

$m =$ pendiente de la recta;

$x =$ logaritmo de la cantidad de ADN;

$b =$ ordenada en el origen;

$r^2 =$ coeficiente de correlación.

Posteriormente, se extrapolo la cantidad de ADN en cada muestra experimental a partir del dato Ct obtenido durante la amplificación. Además, la pendiente de la recta depende de la eficiencia de los cebadores, que se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$E = [10^{(-1/m)}] - 1$$

Donde:

$E =$ eficiencia;

$m =$ pendiente de la recta.

En este sentido, una eficiencia de amplificación del 100% correspondería a una pendiente en la ecuación de la recta (m) igual a 3,32.

El diseño del experimento requirió que cada placa de PCR tuviera los siguientes componentes:

- Muestra incógnita: es la muestra en la que se quiere determinar la cantidad relativa de ADN.

- Control endógeno o control de carga: gen o secuencia de ADN, cuya cantidad se mantiene relativamente constante en las condiciones del ensayo. Se utiliza para normalizar la carga de ADN en cada muestra.
- Control negativo para cada gen o secuencia diana: muestra en la que se añadieron todos los reactivos necesarios menos el ADN molde. Este control permitió descartar una posible contaminación de las muestras con ADN exógeno o la formación de dímeros de *primer* en la reacción.
- Control positivo: muestra de ADN amplificada con éxito en PCRs anteriores y procedente siempre de la misma extracción (del mismo *stock* de ADN). Esta muestra conocida, además, sirvió para comparar los resultados obtenidos entre placas de diferentes reacciones de PCR.
- Control de hibridación cruzada entre muestras: se prepararon tantas reacciones como posibles combinaciones de los ADN molde usados en el estudio y los cebadores específicos de cada secuencia diana, con el fin de evitar los falsos positivos que supondría la transferencia de ADN diana de una muestra a otra.

Para cada muestra experimental, se normalizaron los datos entre el valor que se obtiene para la secuencia diana (incógnita) y para el gen endógeno (o normalizador) de tal manera que los valores resultantes fueran reflejo de los cambios de cantidad en la secuencia diana y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida a cada reacción.

11.2.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando dos programas: Primer Express (Applied Biosystems) y OLIGO v3.3. Dada la sensibilidad de la técnica, para su diseño se tuvieron en cuenta un conjunto de parámetros:

- Se seleccionaron amplicones pequeños: 50-150 pb.
- La longitud de los cebadores no rebasó el rango de 18-25 nucleótidos, siendo la más habitual en torno a los 21 nucleótidos. Los cebadores muy cortos hacen que la PCR no sea muy específica, y si se exceden en longitud se puede perder rendimiento en la reacción.
- La temperatura de fusión (T_m , de sus siglas en inglés *Melting Temperature*) de los cebadores idealmente debe oscilar entre 58-60 °C para garantizar la especificidad de su unión y el uso de las condiciones de amplificación estándar. Cuando la T_m de alguno de los oligonucleótidos difería del rango deseable, se ajustaba la concentración de ese oligonucleótido en el volumen de reacción. Por ejemplo, si la T_m estaba por debajo de 58 °C, se aumentó en 1,5 veces la cantidad de ese oligonucleótido en la reacción final y esta se llevó a cabo a 60 °C.
- Se buscaron parejas de oligonucleótidos cuya T_m no difiriera en más de 5 °C.
- El contenido de guanina y citosina (G-C) de los cebadores osciló entre el 44-61%. Un elevado contenido en G-C dificulta la desnaturalización de las cadenas durante la amplificación, lo que resulta en una disminución de la eficiencia de la reacción.
- Se evitaron secuencias que contuvieran 4 o más G-s continuas.
- Se intentó que los últimos 5 nucleótidos del extremo 3', de cualquiera de los dos cebadores, no tuvieran más de 2 G-s o C-s, para minimizar la formación de dímeros de *primer*.
- Se rechazaron cebadores con regiones de autocomplementariedad dentro de su secuencia para así evitar la formación de estructuras secundarias dentro de cada cebador. Con tal fin, se analizó la estructura secundaria de los cebadores utilizando el programa OLIGO v3.3.

11.2.2. CONDICIONES.

Las reacciones de amplificación, similares a las de una PCR convencional, se prepararon en un volumen de 20 μ l que incluyeron:

- La mezcla de reactivos *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) proporcionada por la casa comercial a una concentración 2X, es decir 2 veces superior a la concentración de reacción. Este mix comercial, además de incluir el agente químico SYBR Green[®], también incorpora el ión magnesio (Mg²⁺), una solución amortiguadora o *buffer*, los 4 dNTPs y la enzima AmpliTaq Gold DNA Polymerase[®] (Applied Biosystems). La casa comercial proporciona la polimerasa en su forma inactiva, para prevenir así su actividad inespecífica durante la preparación de la reacción. Para activar la enzima se aplicó un calentamiento de 10 min a 95 °C al inicio de los ciclos del programa de PCR.
- Los cebadores: la cantidad de cada oligonucleótido usado en la reacción, varió entre 0,2 y 0,3 μ M.
- El ADN molde: la cantidad varió entre 10 fg y 100 ng en función del objetivo (si se pretendía construir una recta patrón o cuantificar el ADN en una muestra experimental) y del organismo de procedencia del ADN (si era del hongo o de la planta).

Se realizó en un tubo *ependorf* una mezcla diferente para cada par de oligonucleótidos usados en la que se incluían todos los componentes de la reacción a excepción del ADN molde. Se dispensaron ordenadamente alícuotas de la mezcla en una placa de PCR y se añadió a cada pocillo la cantidad de ADN deseada (normalmente 100 ng) en un volumen de 5 μ l.

Cada reacción se amplificó por triplicado (para descartar errores de pipeteo) en el termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) programado con las siguientes condiciones: un paso inicial de 94 °C

durante 10 min (para activar la enzima *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*®), seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C (desnaturalización) más 1 min a 60 °C (hibridación y extensión). El *software* Step One v2.1 permitió la visualización de los datos sobre la cuantificación del producto amplificado a medida que este se iba acumulando en los sucesivos ciclos de amplificación.

Dado que se usó como fluoróforo el SYBR Green, una vez finalizados los 40 ciclos de amplificación, se programó la realización de una curva de disociación para comprobar la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Para ello, el equipo midió continuamente la fluorescencia emitida en el rango de 60-95 °C, aumentando la temperatura 0,2 °C por segundo. Este paso permitió monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Analizando las curvas de disociación de las muestras de ADN amplificadas y de los controles negativos (donde no debe darse amplificación de ADN y, por lo tanto, su curva de disociación debe ser diferente a la del resto de muestras) se pudo identificar la presencia de dímeros de *primer* y verificar la especificidad de la reacción.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS Inc (Chicago, Illinois).

En primer lugar se verificaba la normalidad en la distribución de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levéne. Si se aceptaba la normalidad y homocedasticidad de las observaciones se aplicaba después el contraste paramétrico adecuado: para determinar las diferencias significativas en-

tre dos grupos o muestras se realizaba el test t de *Student*; mientras que para más de dos grupos o muestras, se realizaba un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una comparación múltiple post hoc de medias observadas mediante el test de Tukey. Cuando fue necesario, se usó el modelo general lineal para llevar a cabo el análisis ANOVA con medidas repetidas. Si se rechazaba la normalidad u homocedasticidad de las observaciones, se evaluaban los datos mediante pruebas no paramétricas, como la U de Mann-Whitney. Para probar la dependencia o independencia de dos variables entre sí, mediante la presentación de los datos en una tabla de contingencia, se usó la prueba chi cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher.

Los detalles de los análisis estadísticos se presentan en las leyendas de las tablas y figuras.

RESULTADOS

4



1. TRANSFORMACIÓN DE *FUSARIUM CIRCINATUM* CON EL GEN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

La obtención de transformantes de *F. circinatum* que portaran y expresaran el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein) se llevó a cabo aplicando las metodologías descritas para las primeras transformaciones realizadas en *F. oxysporum* (Mullins y cols., 2001) y *F. circinatum* (Covert y cols., 2001), utilizando para ello el sistema biológico de transformación de *A. tumefaciens* y el sistema de plásmidos binarios (Bundock y cols., 1995; de Groot y cols., 1998).

1.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE TRANSFORMACIÓN PNMk2.

El plásmido pNMk2 (García-Sánchez y cols., 2009; Martín-Rodríguez y cols., 2013) se construyó sobre el esqueleto del plásmido pBHt1 (Mullins y cols., 2001), que es un vector binario adaptado para la transformación de hongos filamentosos mediante el sistema de transformación de *A. tumefaciens*. Las características de pBHt1 se detallan en la sección 6.2 de “Materiales y Métodos”.

Se diseñó el plásmido pNMk2 como vector binario para la transformación de *F. circinatum*, de tal modo que su región transferible (T-DNA) incluyera:

- I. el gen bacteriano *hph* (bajo el control del promotor del *trpC* de *Aspergillus nidulans*) que codifica la enzima higromicina fosfotransferasa, la cual confiere resistencia a la higromicina B, que servirá como marcador de selección en hongos. Se comprobó previamente la sensibilidad del aislado de *F. circinatum* con que trabajamos a dicho antibiótico mediante la inoculación del mismo en placas de PDA suplementadas con 100 µg/ml de higromicina B.
- II. y el gen *sgfp* (Chiu y cols., 1996), que da lugar a una variante sintética de la GFP cuya emisión de fluorescencia se ha visto intensificada, bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo.

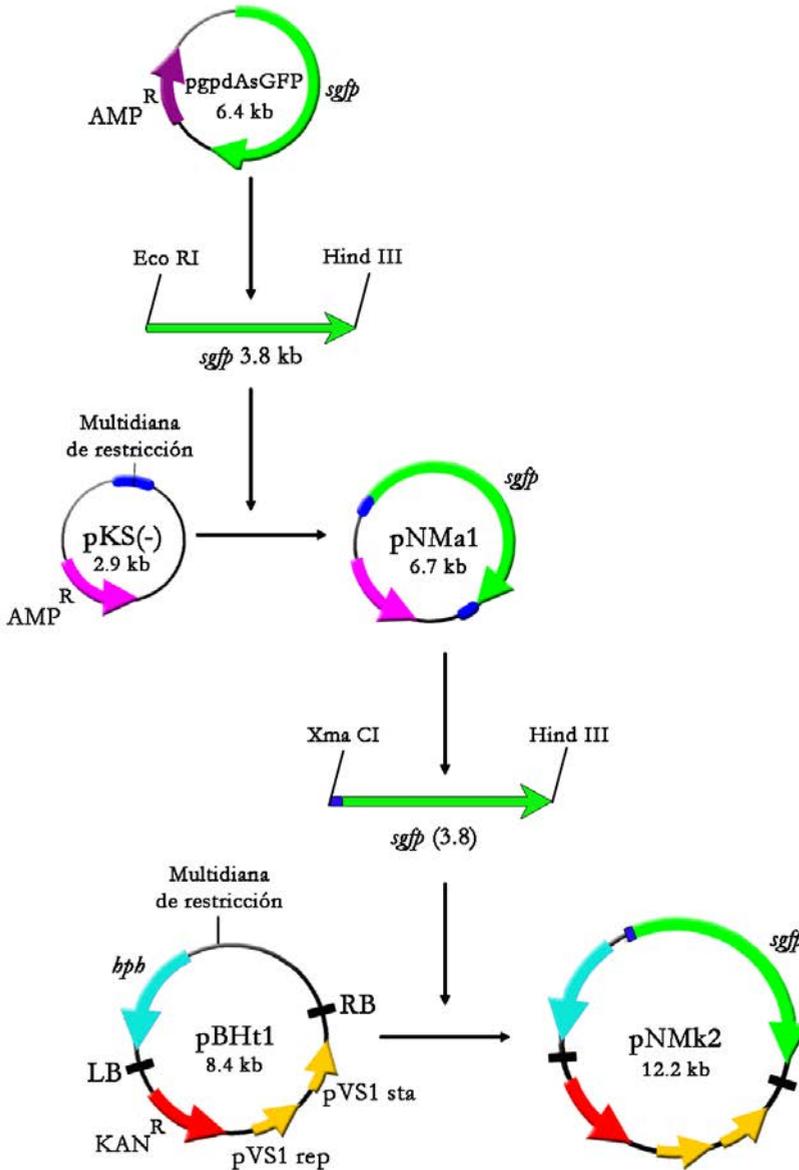


Figura 19. Esquema de la construcción del plásmido pNMk2. En la multidiana de restricción del vector pKS (-) se ligó el fragmento de 3,8 Kb que contiene el gen de la GFP (color verde) proveniente del plásmido pgpdAsGFP (en los sitios de restricción *EcoRI*-*HindIII*) para obtener pNMa1. Finalmente, en la multidiana de restricción del plásmido binario pBHt1, se ligó ese mismo fragmento en los sitios de restricción *XmaCI*-*HindIII*, obteniéndose así el plásmido pNMk2. AMP^R , gen de resistencia a la ampicilina; *hph*, gen de resistencia a la higromicina; LB, left T-border o borde de integración izquierdo; RB, right T-border o borde de integración derecho; KAN^R , gen de resistencia a la kanamicina; *pVS1 sta* y *pVS1 rep*, secuencias necesarias para la replicación y estabilización del plásmido en *Agrobacterium tumefaciens*.

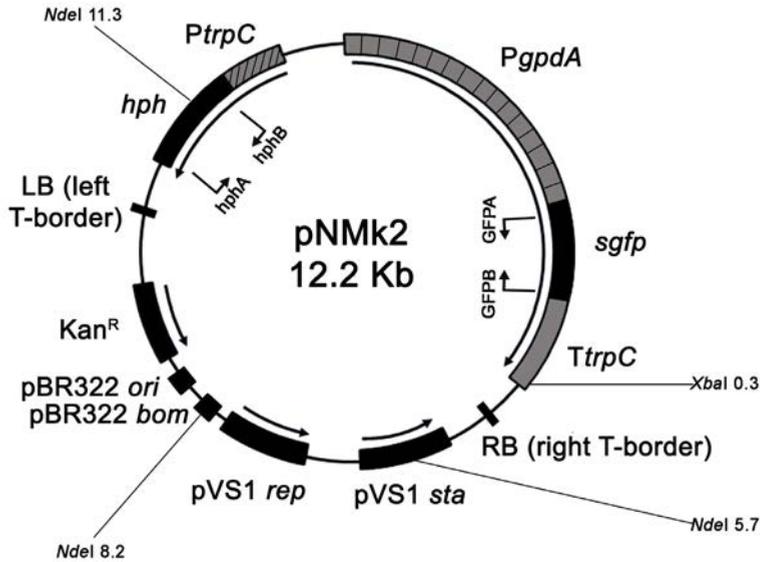


Figura 20. Mapa de pNMk2. Vector binario usado para introducir el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) en *Fusarium circinatum* mediante el sistema de *Agrobacterium tumefaciens*. La región de ADN que se transfiere se encuentra entre los bordes LB (left T-border) y RB (right T-border) del plásmido y contiene el gen de resistencia a la higromicina B (*hph*) como marcador de selección en hongos y el gen *sgfp*. Ambos genes se encuentran bajo el control de señales que permiten su expresión en hongos filamentosos. Se muestran los sitios de restricción para las endonucleasas *NdeI* y *XbaI* y las zonas de hibridación de los oligonucleótidos *hphA*, *hphB*, *GFPB* y *GFPB*. *PtrpC* y *TtrpC*, promotor y terminador respectivamente del gen que codifica una enzima bifuncional en la biosíntesis del triptófano; *Pgpda*, promotor del gen que codifica la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa; *Kan^R*, gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en bacterias; *pBR322 ori*, origen de replicación funcional en *E. coli*; *pBR322 bom*, bases de movilidad; *pVS1rep* y *pVS1sta*, regiones funcionales para la replicación y estabilidad del plásmido en *A. tumefaciens*.

La construcción del vector pNMk2 se realizó en *Escherichia coli* DH5 α , tal como se detalla a continuación (Fig. 19).

Se escindió del plásmido *pgpdAsGFP* el fragmento de DNA (de 3,8 Kb) que contiene la secuencia del promotor *Pgpda*, la región codificante de la proteína *sgfp* y la secuencia del terminador *TtrpC* mediante la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Después, se procedió a la ligación de dicho fragmento en la multiana de restricción del plásmido pBluescript II KS (-), de 2,9 Kb, tras haber sido so-

metido también este plásmido a la digestión con las mismas enzimas de restricción. Se obtuvo así el plásmido pNMa1 de 6,7 kb que fue posteriormente digerido con las enzimas de restricción *Xma*CI y *Hind*III para liberar de nuevo el fragmento de interés (de 3,8 Kb) correspondiente a la secuencia completa de la GFP. Dicho fragmento volvió a ligarse en la multidiana de restricción del vector binario pBHt1, de 8,4 Kb, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Se obtuvo así un plásmido de 12,2 Kb al que denominamos pNMk2 (Fig. 20) y que fue sometido a una serie de comprobaciones previas a su uso para la transformación de *A. tumefaciens*.

1.1.1. COMPROBACIÓN MEDIANTE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA.

La primera aproximación para averiguar si se había producido la ligación de los fragmentos deseados y, por lo tanto, la obtención de los plásmidos pNMa1 y pNMk2 fue la digestión enzimática de estos plásmidos con una serie de enzimas de restricción cuyo número de secuencias diana era conocido (al ser conocida su secuencia nucleotídica).

I. Restricción enzimática del plásmido pNMa1

El plásmido pNMa1 (6,7 Kb) se sometió a tres reacciones independientes de digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI (que genera dos fragmentos de 3,7 y 3 Kb aproximadamente), *Pvu*I (que genera dos fragmentos de 5,7 y 1 Kb aproximadamente) y *Pvu*II (que genera tres fragmentos de aproximadamente 2,5, 2,2 y 1,9 Kb) (Fig. 21).

II. Restricción enzimática del plásmido pNMk2

El plásmido pNMk2 (12,2 Kb) se sometió a dos reacciones independientes de digestión con las enzimas de restricción *Xba*I, que al tener como secuencia diana un sitio único de restricción en el plásmido se genera un único fragmento de ADN lineal de 12,2 Kb, y *Nde*I, que genera tres fragmentos de aproximadamente 2,5, 3,1 y 6,6 Kb (Fig. 22).

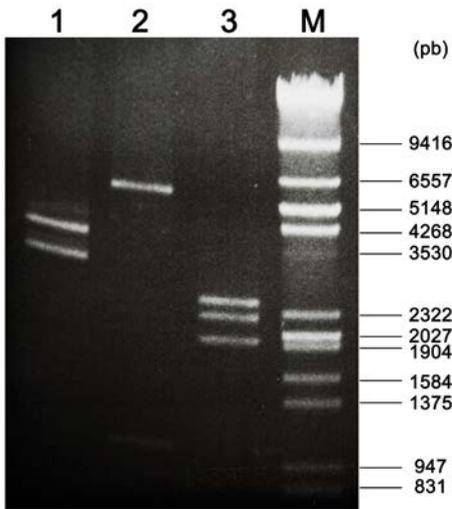


Figura 21. Digestiones enzimáticas del plásmido pNMa1. Gel de agarosa en el que se muestra el resultado de la digestión del ADN del plásmido pNMa1 con las enzimas de restricción *Bam*HI (carril 1), *Pvu*I (carril 2) y *Pvu*II (carril 3). A la derecha se muestra el marcador de tamaños (M) λ *Hind*III/*Eco*RI-*Hind*III y los pesos moleculares de sus bandas en pares de bases (pb).

Figura 22. Digestiones enzimáticas del plásmido pNMk2. Gel de agarosa en el que se muestra el resultado de la digestión del ADN del plásmido pNMk2 con las enzimas de restricción *Xba*I (carril 1) y *Nde*I (carril 2). Como marcador de tamaño (M) se usó 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A la izquierda del marcador se indican los correspondientes pesos moleculares en kilobases (Kb) de algunas bandas (cada banda del marcador de tamaños es una Kb mayor que la anterior).

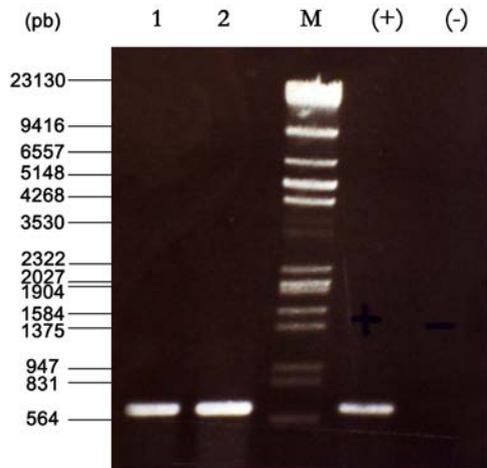
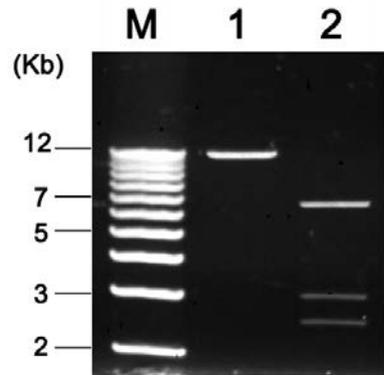


Figura 23. Comprobación de la presencia de los genes *sgfp* y *hph* en la secuencia del plásmido pNMk2 mediante PCR. El ADN del plásmido pNMk2 fue usado como molde para una serie de reacciones de PCR usando los pares de oligonucleótidos GFPa-GFPb (carril 1) y hphA-hphB (carril 2). Se incluye un control positivo (+) en el que se usó el ADN del plásmido *pgpdAsGFP* amplificado con el par de oligonucleótidos GFPa-GFPb y un control negativo (-) sin ADN molde y con todos los pares de oligonucleótidos usados. A la izquierda de la imagen aparecen indicados los tamaños de las bandas del marcador (M) λ *Hind*III/*Eco*RI-*Hind*III en pares de bases (pb). En las reacciones en que se dio la amplificación de ADN se observa como resultado un fragmento de aproximadamente 600 pb.

Figura 23. Comprobación de la presencia de los genes *sgfp* y *hph* en la secuencia del plásmido pNMk2 mediante PCR. El ADN del plásmido pNMk2 fue usado como molde para una serie de reacciones de PCR usando los pares de oligonucleótidos GFPa-GFPb (carril 1) y hphA-hphB (carril 2). Se incluye un control positivo (+) en el que se usó el ADN del plásmido *pgpdAsGFP* amplificado con el par de oligonucleótidos GFPa-GFPb y un control negativo (-) sin ADN molde y con todos los pares de oligonucleótidos usados. A la izquierda de la imagen aparecen indicados los tamaños de las bandas del marcador (M) λ *Hind*III/*Eco*RI-*Hind*III en pares de bases (pb). En las reacciones en que se dio la amplificación de ADN se observa como resultado un fragmento de aproximadamente 600 pb.

1.1.2. COMPROBACIÓN MEDIANTE PCR.

La presencia del gen *hph*, así como la del gen *sgfp* (que son los genes que se integrarán después en el genoma fúngico), en la secuencia del plásmido pNMk2 se confirmó mediante un análisis de PCR (Fig. 23) en el que se usaron los siguientes cebadores (que aparecen descritos en la tabla 4 de “Materiales y Métodos”):

- GFPA y GFPB, que amplifican aproximadamente 600 pb de la región codificante del gen *sgfp*.

- *hphA* y *hphB*, que amplifican unas 600 pb de la región codificante del gen que confiere resistencia a la higromicina B.

1.2. TRANSFORMACIÓN DE *FUSARIUM CIRCINATUM* MEDIANTE EL SISTEMA DE CO-CULTIVO CON *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

El plásmido pNMk2, una vez amplificado en *E. coli*, se utilizó para llevar a cabo la transformación, mediante electroporación, de la cepa AGL-1 de *A. tumefaciens* (Lazo y cols., 1991). Una vez obtenidas colonias de *A. tumefaciens* portadoras del vector binario pNMk2 se procedió al cocultivo en placa de una de estas colonias junto con las esporas de la estirpe patógena de *F. circinatum* CECT 20759 (que a partir de ahora denominaremos Fc-WT, *Fusarium circinatum wild type*). Se buscó así que ocurriera la transferencia del fragmento de ADN situado entre los bordes de integración RB y LB del vector a las células del hongo (Fig. 24).

Tras un periodo de 4 días en cocultivo, se seleccionaron las colonias del hongo resistentes al antibiótico higromicina B (75 µg/ml); las placas también contenían el antibiótico cefotaxima (200mM) con el fin de eliminar la bacteria. Posteriormente, se seleccionaron 16 colonias de putativos transformantes, por su resistencia a la higromicina B, que se traspararon a placas con medio PDA suplementado con una concentración un poco mayor de higromicina B (100 µg/ml). Todas las colonias fueron capaces de desarrollar micelio en el medio de selección, por lo que se determinó que la eficiencia de la transformación de *F. circinatum* mediada por *A. tumefaciens* fue de 16 transformantes por 10⁵ esporas.

1.3. ANÁLISIS DE LOS TRANSFORMANTES.

1.3.1. DETECCIÓN DEL GEN *SGFP* EN EL GENOMA FÚNGICO MEDIANTE PCR.

Se obtuvo ADN de los putativos transformantes mediante extracción rápida a partir del micelio cultivado en placa de las 16 colonias que crecieron en PDA suplementado con higromicina B (100 µg/ml). Este ADN sirvió como molde para realizar una serie de PCRs con las que comprobar si las colonias resistentes eran transformantes que, además de presentar resistencia a la higromicina B, también contenían el gen de la *sgfp*.

La integración del gen *sgfp* se determinó empleando los cebadores GFPA-GFPB. El resultado de la amplificación mostró un fragmento de 600 pb aproximadamente en todas las colonias de posibles transformantes que habían sido previamente seleccionadas por su resistencia a la higromicina B (Fig. 25).

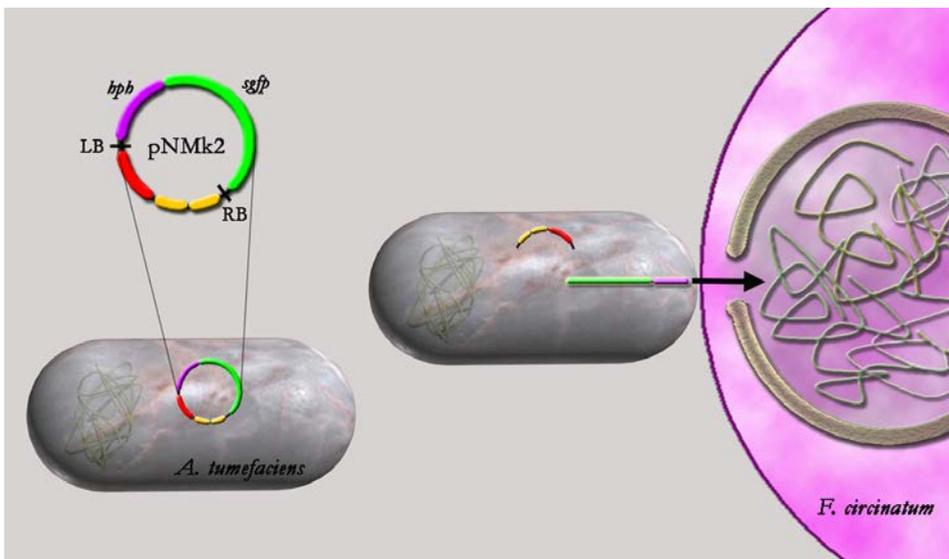


Figura 24. Esquema representativo de la transformación de una espora de *Fusarium circinatum* (en rosa a la derecha de la imagen) con el ADN transferible del plásmido pNMk2 que se encuentra en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens*.

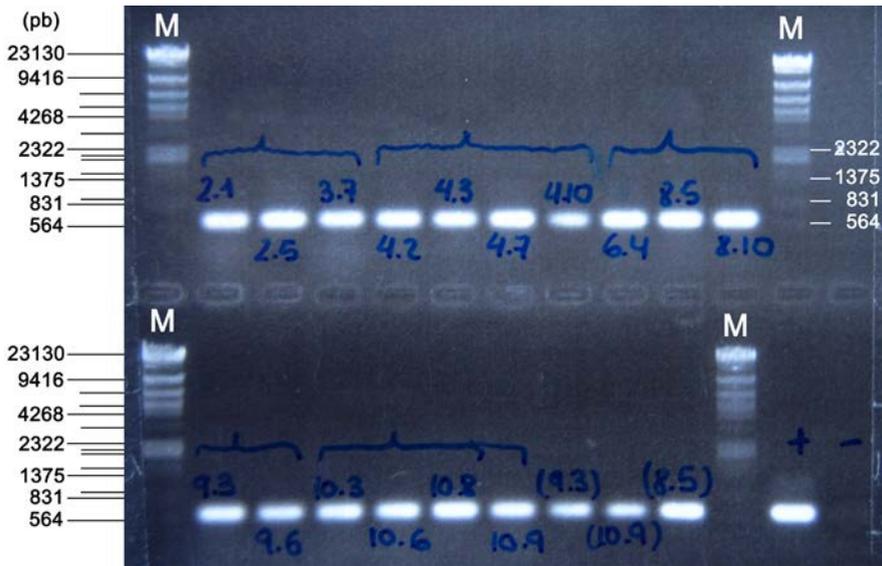


Figura 25. Comprobación de la integración del gen *sgfp* en el genoma de *Fusarium circinatum* mediante PCR. Señales de amplificación obtenidas utilizando la pareja de oligonucleótidos GFPA-GFPB. Como marcador de tamaño (M) se usó λ *HindIII/EcoRI-HindIII* y el tamaño de algunas de sus bandas se indica en pares de bases (pb) a la izquierda de la imagen. Se incluyó también un control positivo (+), en el que se usó el ADN del plásmido *pgpdAsGFP*, y un control negativo (-). Se observa la amplificación de un fragmento de ADN de unas 600 pb en todas las reacciones en las que se usó el ADN procedente de las colonias de *F. circinatum* seleccionadas como posibles transformantes.

1.3.2. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA *SGFP* POR MICROSCOPIA.

Una vez determinada la inserción del T-DNA en el genoma fúngico, se procedió a estudiar la presencia de la proteína *sgfp* sintetizada por los transformantes de *F. circinatum* (*hph::PgpdA-sgfp-TtrpC*). Para ello, se buscó detectar la señal de fluorescencia emitida por la proteína *sgfp* en el citoplasma celular de los transformantes mediante su observación con el microscopio de fluorescencia (Fig. 26).

De entre los transformantes de *F. circinatum* evaluados, que no solo portaban el gen *sgfp* sino que lo expresaban eficazmente, se seleccionó aquel que presentó la mayor intensidad y brillo de fluorescencia y se procedió a realizar un análisis más pormenorizado del mismo.

1.3.3. HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD GENÉTICA.

Para garantizar que el transformante seleccionado fuera una cepa genéticamente homogénea, y que la integración de los genes *hph* y *sgfp* se mantuviera estable a lo largo de sucesivas generaciones, se obtuvo y seleccionó un cultivo monospórico del cual se estudio su estabilidad mitótica.

I. Obtención de un cultivo monospórico.

Para ello, se recogieron esporas del transformante *hph::Pgpda-sgfp-TtrpC* de *F. circinatum* que, tras someterlas a diluciones sucesivas para disminuir su concentración, se traspasaron a placas de agar-agua. Las esporas recién germinadas en placas de agar-agua se traspasaron posteriormente a placas con medio PDA suplementado con el antibiótico higromicina B (100 µg/ml). Se determinó cuáles de esas colonias, desarrolladas a partir de una única spora de *F. circinatum* (es decir, genéticamente homogéneas), eran además resistentes al antibiótico. Se seleccionó una de ellas para todos los experimentos posteriores y pasó a denominarse en lo sucesivo Fc-GFP1.

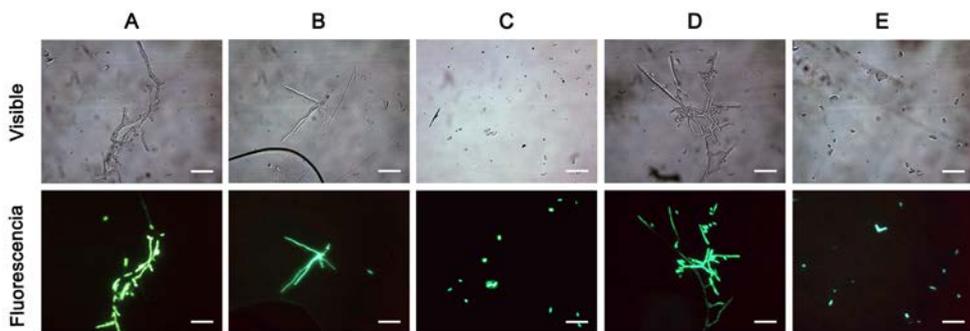


Figura 26. Expresión de la proteína sGFP en el citoplasma de las células de *Fusarium circinatum*. Se observaron hifas y esporas de varios de los transformantes con luz visible (arriba) y con el cubo de filtros I3 del microscopio de fluorescencia que permite la excitación de la muestra con luz azul (abajo). Se comprobó que la proteína sGFP se acumulaba en el citoplasma de las células fúngicas, tanto de las hifas (A, B y D) como de las esporas (C y E) dotándolas de una intensa fluorescencia verde cuando eran iluminadas con luz azul. Barra de escala, 40 µm.

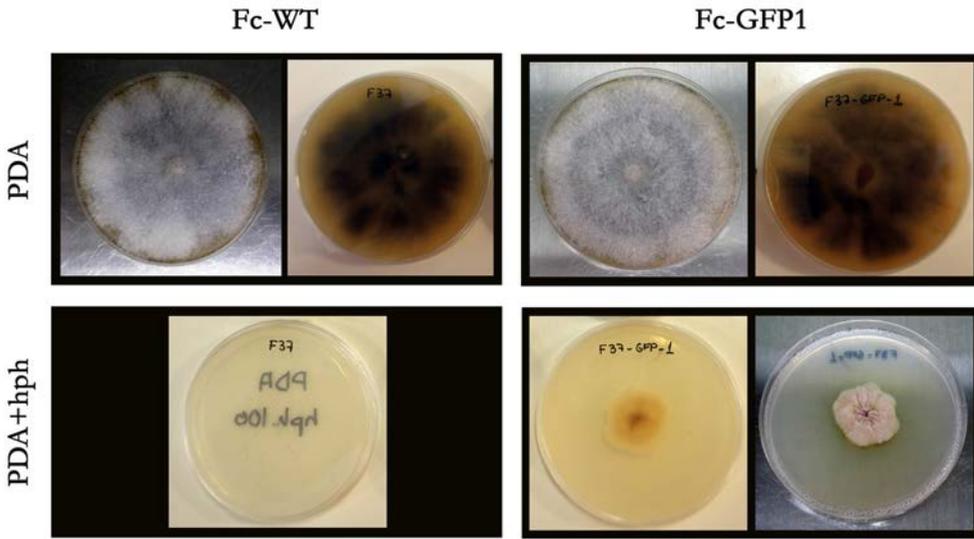


Figura 27. Crecimiento vegetativo de la estirpe silvestre de *Fusarium circinatum* Fc-WT y de su transformante Fc-GFP1. La estirpe silvestre crece normalmente en medio de cultivo PDA (arriba) pero no es capaz de desarrollar micelio en el mismo medio de cultivo suplementado con 100 µg/ml del antibiótico higromicina B (PDA+hph, abajo). Sin embargo, la estirpe Fc-GFP1 sí es capaz de desarrollar micelio en un medio suplementado con higromicina B. La capacidad de desarrollar micelio en un medio de cultivo suplementado con dicho antibiótico indica que la estirpe porta y expresa eficazmente el gen *hph* (que le confiere resistencia al antibiótico) y por lo tanto, asumimos que también porta el gen *sgfp*, puesto que ambos genes se encuentran en la región de ADN que se transfiere al genoma fúngico.

II. El estudio de la estabilidad mitótica.

Se procedió al cultivo del aislado monospórico de *F. circinatum* Fc-GFP1 durante 3 generaciones sucesivas en medio rico y en ausencia de presión selectiva (es decir, sin antibiótico). A continuación, la estirpe fue sub-cultivada en el mismo medio rico pero suplementado con higromicina B (100 µg/ml), de tal modo que se volvió a someter al transformante a la presión selectiva ejercida por el antibiótico. Se comprobó que dicho transformante mantenía la resistencia al antibiótico después de varias generaciones en ausencia de presión selectiva (Fig. 27).

1.3.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL TRANSFORMANTE FC-GFP1.

Se estudiaron dos aspectos diferentes en el comportamiento del transformante Fc-GFP1 respecto al fenotipo silvestre Fc-WT: su comportamiento durante el crecimiento saprófito y su comportamiento durante la interacción con la planta huésped.

I. Análisis del comportamiento durante el crecimiento saprófito.

La caracterización del crecimiento vegetativo de las cepas fúngicas en cultivo puro se llevó a cabo en medio PDA a 22 °C y en oscuridad. Tras la siembra, se comparó el aspecto de las colonias, su tasa de crecimiento a partir de inóculos de concentraciones de esporas similares y la capacidad de generar conidios de la cepa transformada de *F. circinatum* con respecto a la cepa silvestre. No se observó ninguna alteración del transformante respecto al tipo silvestre ni en la morfología, ni en la coloración de las colonias después de la valoración visual de las mismas (Fig. 27).

La evaluación del crecimiento se realizó midiendo la longitud (en mm) de 3 radios, equidistantes entre sí, proyectados a partir del origen de crecimiento de cada colonia hacia el extremo de la placa. Las medidas se tomaron 7 días diferentes después de la siembra hasta la total ocupación de la placa Petri (de 9 cm de diámetro), lo cual sucedió a los 12 días de crecimiento (Fig. 28).

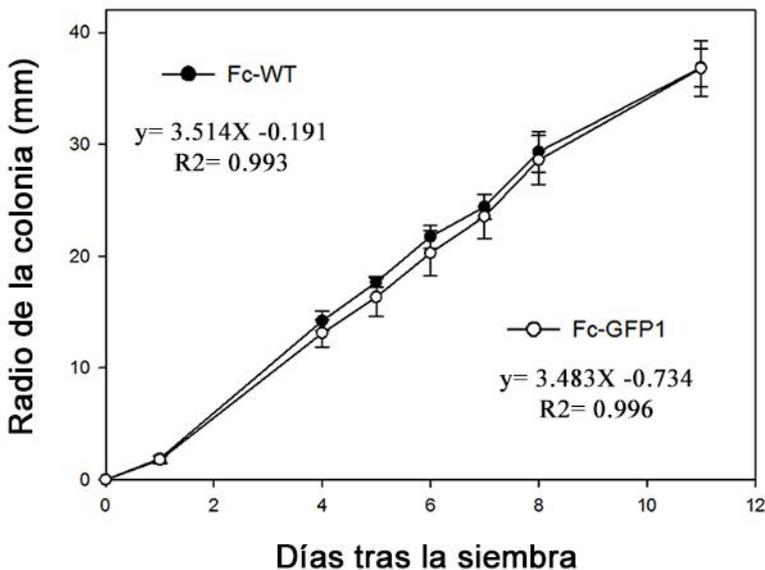


Figura 28. Tasa de crecimiento la estirpe silvestre de *Fusarium circinatum* (Fc-WT) y de su transformante (Fc-GFP1). Las barras de error muestran la desviación estándar en el radio (mm) de las colonias procedentes de 6 réplicas crecidas durante 11 días en medio PDA.

Las colonias de la estirpe silvestre alcanzaron, al final del ensayo, una tasa de crecimiento media (\pm desviación estándar) de 3,352 (\pm 0,082) mm/día y las colonias de la estirpe transformada 3,345 (\pm 0,184) mm/día, no encontrándose diferencias significativas entre ellas a nivel estadístico usando la prueba *t de Student*.

La evaluación de la capacidad de conidiación de las cepas fúngicas, se realizó a partir del cultivo puro en medio PDB a 22 °C y en oscuridad, tal y como se describe en la sección 3.4.1 de “Materiales y Métodos”. Se evaluó la cantidad de conidios de cada estirpe, recolectada después de seis días de incubación, en 5 ensayos diferentes. Los valores medios (\pm desviación estándar) obtenidos para la estirpe silvestre y para el transformante fueron de $1,456 \cdot 10^9$ ($\pm 1,022 \cdot 10^9$) y $1,876 \cdot 10^9$ ($\pm 1,465 \cdot 10^9$) esporas/ml respectivamente, no encontrándose tampoco diferencias significativas entre ambas estirpes usando la prueba *t de Student*.

II. Análisis del comportamiento *in planta*.

La caracterización del comportamiento *in planta* se realizó en plántulas de 1 año de *P. radiata*, comparando el fenotipo de la estirpe transformada de *F. circinatum* con el fenotipo silvestre y determinando el efecto de la integración del T-DNA sobre la patogenicidad o virulencia del transformante.

Para ello se inoculó el tallo de 10 pinos con esporas de la estirpe transformada de *F. circinatum* Fc-GFP1. Como control positivo se inocularon otras 10 plantas con esporas de la estirpe silvestre Fc-WT. Como control negativo de herida se inocularon 10 plantas sólo con agua y como control negativo ambiental se dejaron 10 plantas sin inocular. Durante los 2 meses de duración del ensayo, se observó detalladamente la sintomatología de las plantas, tomando como referencia las plantas no inoculadas con el patógeno. Los síntomas mostrados por cada una de las plantas del ensayo se registraron semanalmente y de manera individual, siguiendo la escala de severidad de síntomas propuesta por Correll y cols. (1991) que asigna un valor de 1 a 5 a cada síntoma (Ver Tabla 1 de “Materiales y Métodos”). Este ensayo se repitió tres veces de forma independiente, por lo que finalmente se evaluaron un total de 120 plántulas de pino radiata (10 pinos x 4 tratamientos x 3 réplicas).

Con el fin de evaluar la evolución de los síntomas de la infección a lo largo del tiempo en cada grupo de plantas establecido en función del inóculo y poder así comparar la capacidad de cada estirpe para producir síntomas en las plantas con mayor o menor severidad o rapidez, se procedió del siguiente modo: primero, para cada tratamiento se calculó la media (X_i) del valor asignado (según la escala de severidad de síntomas) a cada una de las 10 plantas que componían los 4 grupos o tratamientos. Estos valores medios fueron registrados con periodicidad semanal a partir del momento de la infección. Los resultados obtenidos en las tres réplicas, fruto de tres ensayos de infección independientes, fueron muy similares (Tabla 5).

X_i para $i=1,2,...n.$	Réplicas	Semanas después de la inoculación (n)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Fc-GFP	R1	1,0±0,0	1,6±0,5	2,3±0,8	3,3±1,3	4,2±1,5	4,3±1,3	4,5±1,1	4,5±1,1
	R2	1,0±0,0	1,6±0,5	1,8±0,9	2,8±0,9	3,4±1,2	3,7±1,1	4,1±1,1	4,4±1,1
	R3	1,0±0,0	1,6±0,5	2,5±0,7	2,8±0,8	3,2±0,9	3,9±1,0	4,4±1,0	4,6±1,0
Fc-WT	R1	1,1±0,3	1,6±0,5	2,6±1,0	3,6±0,7	4,5±0,8	4,6±0,7	4,7±0,5	5,0±0,0
	R2	1,0±0,0	1,6±0,5	2,2±1,1	2,8±1,0	3,4±0,8	4,1±1,0	4,5±1,1	4,6±1,0
	R3	1,0±0,0	1,7±0,5	2,2±0,9	3,0±1,1	3,7±1,1	4,2±1,0	4,7±0,7	4,8±0,6
C(-) herida	R1	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
	R2	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
	R3	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
C(-) ambiental	R1	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
	R2	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
	R3	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0

TABLA 5. Resultados de los ensayos de infección realizados con esporas de *Fusarium circinatum* sobre el tallo de *Pinus radiata* de 1 año y evaluados durante 8 semanas según una escala numérica (1-5) que valora el grado de severidad de los síntomas. Los valores de la tabla representan la media ($X_i \pm$ desviación estándar) de los valores asignados semanalmente a cada una de las 10 plantas que componen los 4 tratamientos, establecidos según el tipo de inóculo: estirpe de *F. circinatum* transformada con el gen sgfp (Fc-GFP1), estirpe de *F. circinatum* silvestre (Fc-WT), control negativo de herida y control negativo ambiental. Se muestran los resultados de tres ensayos de infección o réplicas (R1, R2 y R3) independientes.

Después, a partir de estos datos, se definió el Índice de Progresión de la Enfermedad (IPE) a lo largo del tiempo, como:

$$\text{IPE} = \sum X_i/n, \text{ para } i=1, 2, \dots, n;$$

Donde, X_i representa la media de la severidad de la infección para cada grupo de plantas (ver Tabla 5) y n representa el número de semanas transcurridas tras la inoculación.

De este modo, el valor IPE obtenido al finalizar el ensayo será el resultado de la suma de cada uno de los valores X_i/n calculados para cada semana. En la figura 29 se muestra una representación de la evolución temporal del índice IPE durante el ensayo de infección.

Al finalizar nuestro estudio a las 8 semanas después de la inoculación, el valor IPE del transformante Fc-GFP1 era de $6,16 \pm 0,36$ (Fig. 29), mientras que el valor IPE de la estirpe silvestre de *F. circinatum* era de $5,84 \pm 0,31$. En el caso de las plantas inoculadas con agua y de las no inoculadas, no se observaron síntomas evidentes de la enfermedad (lo cual se califica con un valor de 1), pero dado que el valor IPE es un sumatorio de una serie temporal, en ambos casos se llegó a un valor medio IPE de $2,72 \pm 0,00$.

A la vista de estos resultados, y según la prueba estadística *t-student* aplicada a los datos, podemos concluir:

- I. Que al finalizar el ensayo, se encontraron diferencias significativas, a un nivel de confianza del 95 %, entre el índice de progresión de la enfermedad causado por la inoculación con cualquiera de las dos estirpes de *F. circinatum* (Fc-WT o Fc-GFP1) y el causado en los controles negativos (control de herida y control ambiental).
- II. Que, 8 semanas después de la inoculación, no hay diferencias significativas en el índice de progresión de la enfermedad causado por la estirpe silvestre y la estirpe transformada a un nivel de confianza del 95 %.

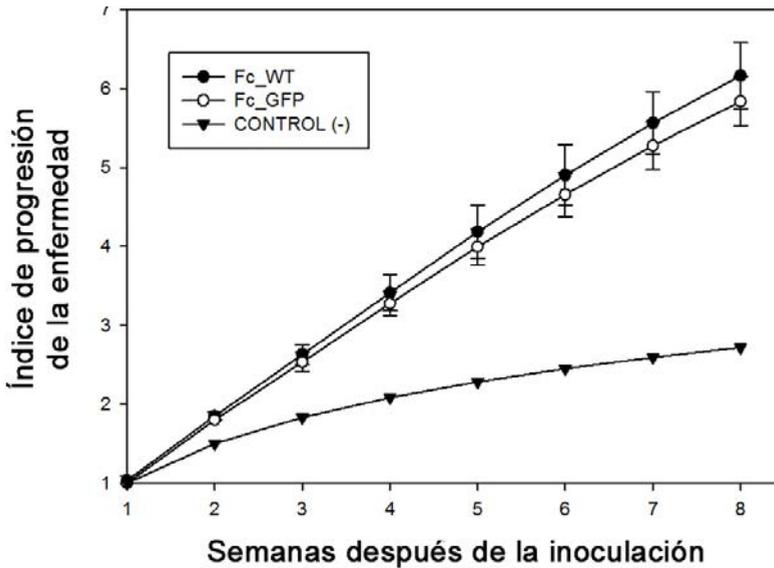


Figura 29. Índice de Progresión de la Enfermedad (IPE) a lo largo del tiempo. Cada punto en la gráfica representa, para cada uno de los tratamientos aplicados [cepa de *Fusarium circinatum* transformada con el gen *sgfp* (Fc-GFP1), cepa de *F. circinatum* silvestre (Fc-WT) y controles negativos] el valor IPE obtenido cada semana como resultado de la suma acumulada de la razón entre el valor medio de la severidad de la infección, según una escala numérica de síntomas (1-5), y el número de semanas transcurridas desde la inoculación. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media de 3 ensayos de infección independientes.

2. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE *FUSARIUM CIRCINATUM* TRAS LA INOCULACIÓN EN EL TALLO DE *PINUS RADIATA*

Para caracterizar el proceso de infección de *F. circinatum* tras la inoculación en el tallo de *P. radiata*, se llevaron a cabo tres aproximaciones experimentales que nos permitieron evaluar la interacción patógena a tres niveles diferentes:

- I. Evaluación a nivel macroscópico del proceso de infección, a través de la valoración visual de la progresión en que aparecen los síntomas de la enfermedad.

II. Evaluación a nivel molecular, en la que se cuantificó la carga de ADN patógeno a lo largo del proceso de infección de la planta hospedadora.

III. Evaluación a nivel histológico del proceso de infección, mediante la observación directa al microscopio confocal de la interacción ocurrida entre la planta hospedadora y la estirpe patógena que expresa el gen de la *sgfp*.

Los resultados de este apartado han sido publicados en Martín-Rodríguez y cols. (2013).

2.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA SINTOMATOLOGÍA.

Dado que no se observaron diferencias significativas en la progresión de la enfermedad causada por la estirpe silvestre Fc-WT y la estirpe transformada Fc-GFP1, para la evaluación de la sintomatología se usaron los datos obtenidos en los tres ensayos de infección independientes que se realizaron para caracterizar el comportamiento *in planta* de ambas estirpes de *F. circinatum*. Se evaluaron un total de 120 plántulas de *P. radiata* de 1 año de edad [60 pinos inoculados (20 pinos x 3 ensayos de infección) + 60 pinos control no inoculados (20 pinos x 3 ensayos de infección)].

2.1.1. INCIDENCIA DE LOS SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD A LO LARGO DEL PROCESO DE INFECCIÓN.

Durante la primera semana, casi todas las plantas presentaban un aspecto saludable sin síntomas visibles de enfermedad (Fig. 30a). A los 14 días después de la inoculación (ddi), el 60% de las plantas mostraban lesiones necróticas alrededor del punto de inoculación (PI) (Fig. 30b), caracterizadas por una área deprimida necrótica de color marrón-purpura que, con el tiempo, se extendía por el tallo, tanto por encima como por debajo del PI (Fig. 30c), apareciendo, además, clorosis en las acículas más cercanas a este punto. Los primeros síntomas de decaimiento de

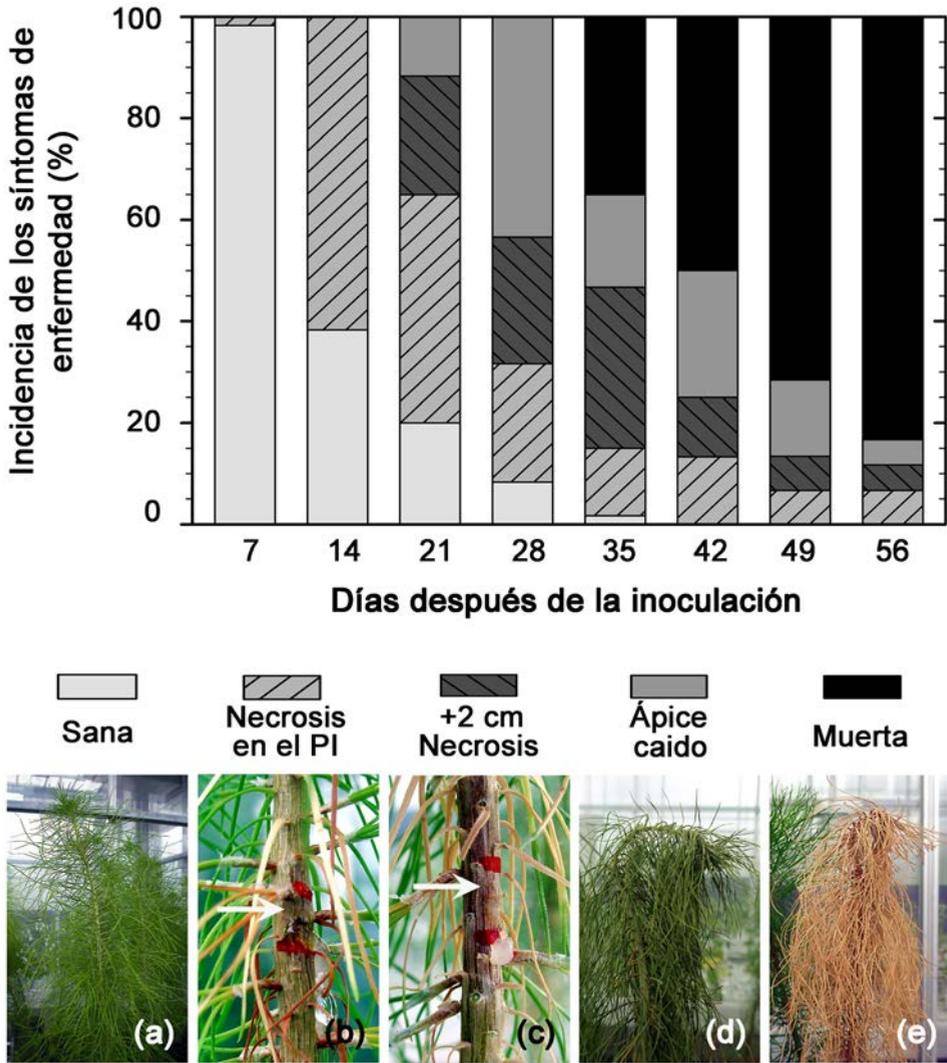


Figura 30. Evolución temporal de la incidencia de los síntomas de enfermedad apreciados visualmente tras la inoculación del tallo de *Pinus radiata* con esporas de *Fusarium circinatum*. El histograma de frecuencias del panel superior muestra el porcentaje de plántulas, de un total de 60, que exhibieron distintos síntomas de enfermedad. Dichos síntomas fueron clasificados según una escala de severidad del 1 al 5, en la que el valor 1 indicaba que la planta estaba sana (a); 2 indicaba la existencia de una herida necrótica (b) en el punto de inoculación (PI) a pesar del follaje saludable de la planta; 3 indicaba que la herida necrótica había alcanzado más de 2 cm alrededor del PI (c); 4 indicaba la marchitez del follaje y el decaimiento del ápice caulinar (d); y 5 indicaba que el follaje de la planta por encima del PI estaba muerto (e). Las flechas en (b) y (c) señalan el PI que a su vez se encuentra delimitado por dos marcas rojas.

la parte apical aparecieron a los 21 ddi (Fig. 30d). A la finalización del ensayo (56 ddi), todas las plantas que a los 21 ddi mostraron marchitez de su parte apical acabaron por morir (Fig. 30e), sin embargo, no todas las que mostraron inicialmente síntomas de necrosis en la zona de inoculación murieron. Al finalizar el ensayo de infección, algo más de un 10% de las plantas inoculadas con el patógeno sobrevivieron. En estas plantas, el tejido dañado por la inoculación mostraba una costra y la planta mantenía el aspecto saludable del inicio del ensayo.

2.1.2. CANTIDAD DE RESINA EXUDADA.

Se analizó también semanalmente la cantidad de resina que exudaban las plantas en el PI, asignando a cada planta un valor de 0 a 3 en función de la exudación observada (ausencia/ baja/ moderada/ alta). En las plantas inoculadas con *F. circinatum*, el flujo de resina aumentó con el tiempo. Sin embargo, en las plantas control, una vez que transcurrió la primera semana y que cicatrizó la herida producida durante la inoculación, la cantidad de resina exudada disminuyó rápidamente (Fig. 31).

En los pinos inoculados con *F. circinatum* observamos 2 incrementos significativos en la cantidad de resina:

- uno sucedió a los 7 ddi, coincidiendo con el incremento de resinación observado también en los pinos control y que muy probablemente se debiera a la herida causada al aplicar el protocolo de inoculación, y
- otro a los 21 ddi, momento en que las plantas alcanzaban su umbral de resinación, coincidiendo con la ausencia de flujo de resina en las plantas denominadas control de herida (aquellas inoculadas solamente con agua).

Se analizaron los datos de ese tiempo de estudio (21 ddi) más detenidamente mediante una tabla de contingencia. Para ello, se determinó qué porcentaje de plantas dentro de cada uno de los tres niveles de resinación (definidos como bajo, moderado y alto), terminaba por morir o sobrevivía al finalizar el ensayo. El test de la Chi cuadrado (χ^2

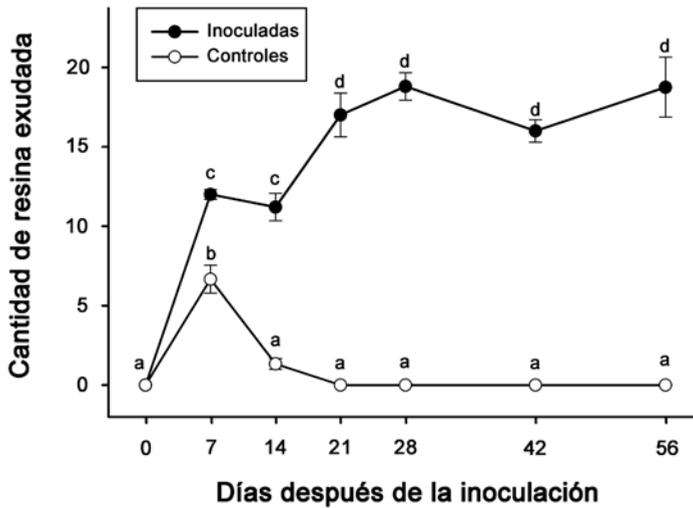


Figura 31. Cantidad de resina exudada por plántulas de *Pinus radiata* inoculadas con *Fusarium circinatum*. La resinación fue evaluada según una escala de 0 a 3 (ver Tabla 2 de “Materiales y Métodos”). Cada punto en la gráfica representa el valor medio calculado en 10 pinos por cada tiempo de estudio. Las barras de error son la desviación estándar obtenida en 6 grupos de 10 plantas (2 bloques x 3 réplicas independientes del ensayo). ANOVA: $df = 17$; $F = 72,55$, $P < 0,001$.

= 10,363) > ($\chi^2_{0,01(3-1)(2-1)} = 9,210$)) y el test exacto de Fisher ($P = 0,006 < 0,01$), indicaban la existencia de correlación entre la resina exudada a los 21 ddi y la supervivencia de la planta. Así, todas las plantas que mostraban un nivel de exudación alto o moderado a los 21 ddi murieron, mientras que todas las plantas que a los 21 ddi mostraban una baja exudación de resina estaban vivas y con aspecto saludable a la finalización del ensayo.

2.2. VARIACIÓN DE LA BIOMASA FÚNGICA A LO LARGO DEL PROCESO DE INFECCIÓN

Con el fin de cuantificar la carga patógena *in planta* a lo largo del proceso de infección, se utilizó la técnica de qPCR, que nos permitió determinar la cantidad de ADN de *F. circinatum* en relación a la cantidad de ADN de *P. radiata* presente en muestras recogidas durante un ensayo de infección.

Se inocularon 70 plántulas de un año de edad de *P. radiata* con esporas de *F. circinatum* tal y como se describe en la sección 9.1 de “Materiales y Métodos”. Se recogieron muestras del tejido vegetal inoculado en diferentes tiempos desde el momento de la inoculación (0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 42 días). Las muestras consistieron en una sección de tallo, de 5 mm de longitud, en torno al PI. Se escogieron aleatoriamente 5 pinos por cada tiempo de estudio. Como controles negativos, se recogieron los tallos de 5 plantas no infectadas. Se procesaron un total de 45 muestras [1 muestra de tallo x (5 plantas inoculadas) x (8 tiempos)+ 1 muestra de tallo x (5 plantas no inoculadas)].

Una vez recogidas las muestras de tallo, se lavaron con agua estéril para eliminar cualquier foco de infección superficial. Inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN total (ADN de la planta más ADN del patógeno). Tras la extracción, se comprobó la integridad de las muestras de ADN mediante electroforesis y su concentración se midió mediante espectrofotometría. Se ajustó la concentración de todas las muestras hasta $20\text{ ng}/\mu\text{l}$, y se usaron 5μ de este ADN como molde en las reacciones de qPCR.

2.2.1. ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE LOS CEBADORES USADOS EN LA PCR CUANTITATIVA.

Como cebadores específicos de *F. circinatum*, se escogió el par FCIR-F, FCIR-R (Ioos y cols., 2009) cuyo producto de la amplificación es un fragmento de 146 nucleótidos perteneciente a la región IGS (secuencia espaciadora repetida y no transcrita situada en el ADN ribosómico) del genoma de *F. circinatum*. Dado que se trata de una secuencia repetida en el genoma del hongo, se verá favorecida la amplificación de dicha secuencia, aún en condiciones en las que hubiera muy poca cantidad de ADN fúngico.

A la hora de escoger los cebadores específicos para *P. radiata*, se siguió el razonamiento inverso, de tal modo que se buscaron parejas de

cebadores que amplificaran específicamente genes que se encontraran en un número bajo de copias en el genoma de la planta hospedadora. Para tal fin, se diseñaron y testaron 6 parejas de oligonucleótidos: UBIQ-F/UBIQ-R; PrSHRtrFor1/PrSHRtrRev1; CAD-Pe-F/ CAD-Pe-R; CAD-O-F/ CAD-O-R; NLY-Pe-F/ NLY-Pe-R; NLY-O-F/ NLY-O-R (ver tabla 4 de “Materiales y Métodos”). En primer lugar, se intentó reproducir en una reacción de PCR clásica o convencional, las condiciones de amplificación que se darán en la qPCR. Se comprobaron 2 aspectos fundamentales:

- 1) que no se dieran hibridaciones cruzadas entre los primers diseñados para el pino con el ADN molde del hongo y a la inversa; y
- 2) que el resultado de la amplificación fuera de una única banda de ADN, incluso variando el tiempo y la temperatura en las condiciones de amplificación.

Así, se descartó en primer lugar la pareja UBIQ-F/UBIQ-R porque al cargar en un gel de agarosa al 1% (Tae 1X) el resultado final de la amplificación se observaron varias bandas de ADN.

El resto de cebadores diseñados para *P. radiata* pasaron a analizarse, con los mismos criterios anteriormente expuestos, directamente en una qPCR. Como ADN molde se añadieron 100 ng de ADN del pino. Se analizaron también los cebadores escogidos para amplificar el ADN de *F. circinatum*, añadiendo en este caso, a cada reacción de PCR, 10 ng de ADN molde del hongo. Se estableció esta diferencia, en cuanto a la cantidad de ADN molde de la planta o del patógeno usado en las reacciones, con el fin de emular una situación lo más cercana posible a la que se produce al analizar las muestras provenientes de los ensayos de infección.

Finalmente, se escogió la pareja formada por los primers NLY-O-F/ NLY-O-R para realizar el ensayo de cuantificación por ser los que funcionaron mejor en nuestro diseño experimental por tres razones fundamentales:

- únicamente se obtuvo una curva de amplificación en aquellas reacciones en las que se usó ADN del pino como ADN molde;
- no se observaron dímeros de primer en la curva de disociación (*Melt curve*) generada por el equipo (Fig. 32);
- el valor Ct (*cycle threshold*) obtenido en la amplificación ($23,8 \pm 0,23$) se consideró adecuado.

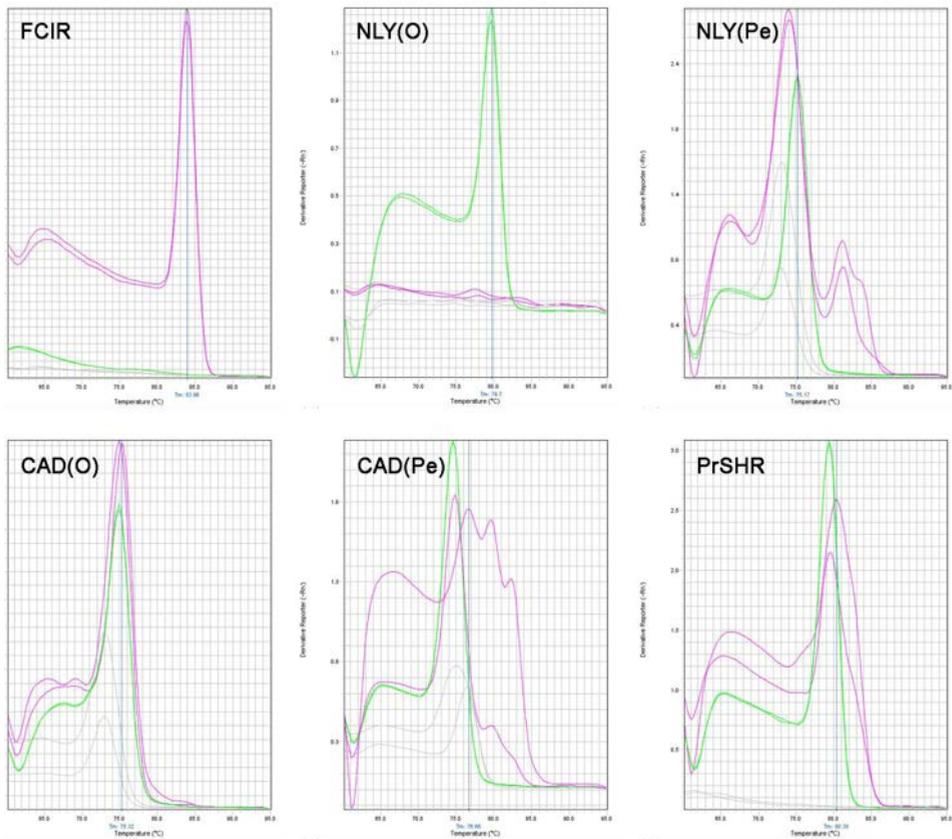


Figura 32. Curvas de disociación realizadas sobre el producto final de las PCR con las distintas parejas de cebadores. En cada una de las gráficas, se muestran: en rosa las curvas resultantes de la amplificación del ADN de *Fusarium circinatum*, en verde las resultantes de la amplificación del ADN de *Pinus radiata* y en gris claro las reacciones llevadas a cabo como control negativo, con agua en lugar de ADN.

2.2.2. RECTAS PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ADN DEL PATÓGENO Y DE SU PLANTA HOSPEDADORA.

Una vez seleccionadas las parejas de cebadores FCIRC y NLY(O) para la amplificación específica de una secuencia diana en el genoma de *F. circinatum* y de *P. radiata* respectivamente, el siguiente paso fue la creación de una recta patrón para cada una de estas secuencias diana.

Las rectas se obtuvieron a partir de una serie de muestras de ADN genómico, de las que se conocía su concentración, que se usaron en las reacciones de qPCR y que sirvieron para relacionar la cantidad de muestra (valor introducido) con la fluorescencia emitida (valor medido) durante la reacción. Las ecuaciones de la recta así obtenidas se representan en la figura 33.

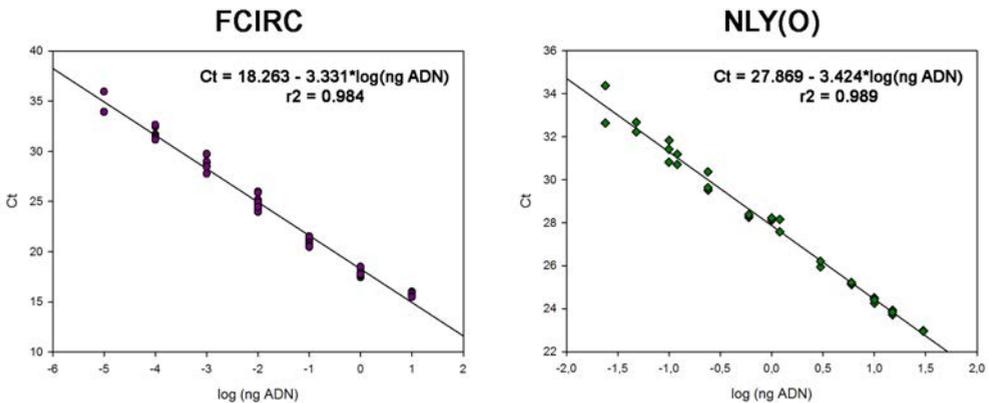


Figura 33. Rectas patrón asociadas a las secuencias diana en el genoma de *Fusarium circinatum* y de *Pinus radiata* seleccionadas para el estudio cuantitativo mediante qPCR. En el panel de la izquierda se muestra la recta de regresión generada a partir de la amplificación de una dilución en serie 10x de ADN de *F. circinatum* usando los cebadores FCIR-F / FCIR-R. En el panel de la derecha se muestra la recta generada a partir de la amplificación de tres diluciones seriadas diferentes (una 10X y dos 5X) de ADN de *P. radiata* usando los cebadores NLY(O)-F/NLY(O)-R. Cada punto en la gráfica representa, para cada muestra, el valor del logaritmo de la cantidad conocida de ADN (en ng) frente al valor de ciclo umbral (Ct) obtenido en la reacción de PCR. Además, para cada recta patrón, se indica arriba y a la derecha, la ecuación de la recta de regresión obtenida y el coeficiente de correlación (r^2).

	Ordenada en el origen (b)	Pendiente (m)	Coefficiente de correlación (r^2)	Eficiencia de amplificación (E)
<i>Fusarium circinatum</i>	18,263	-3,331	0,984	99,6%
<i>Pinus radiata</i>	27,869	-3,424	0,989	95,9%

TABLA 6. Parámetros de las ecuaciones de regresión de las rectas patrón de ADN de *Fusarium circinatum* y de *Pinus radiata*. La eficiencia de amplificación (E) se calculó a partir de las pendientes de las curvas estándar utilizando la ecuación $E = 10^{(1/m)} - 1$ (Higuchi y cols., 1993).

En condiciones ideales de amplificación, en las que la eficiencia de la reacción fuera de un 100%, teóricamente se duplicaría el producto en cada ciclo de PCR. En la práctica, una eficiencia del 100% es casi imposible, pero para que los resultados obtenidos en las reacciones de qPCR sean reproducibles, se requiere que la eficiencia de amplificación sea lo más cercana posible al 100%. En estas condiciones, la ecuación de regresión de la recta patrón tendría una pendiente de $-3,32$ y un coeficiente de correlación de 1. En nuestro caso, obtuvimos valores muy cercanos a los ideales (Tabla 6).

Se puede constatar que las dos rectas patrón tenían una pendiente (m) muy parecida, es decir, que tienden a ser paralelas (Fig. 33 y Tabla 6). Este hecho, que refleja una eficiencia de amplificación similar para ambas reacciones, es importante cuando se trata de ensayos de cuantificación relativa de un gen (en nuestro caso, una secuencia génica de *F. circinatum*) frente a un control endógeno (en nuestro caso, el gen NLY de *P. radiata*), puesto que permite establecer una relación entre los datos obtenidos con ambas rectas.

2.2.3. CURVA DE CRECIMIENTO DE *FUSARIUM CIRCINATUM* IN PLANTA.

Posteriormente, se realizaron las reacciones de qPCR con las muestras problema de ADN total procedentes de los ensayos de infección. Cada muestra se usó como ADN molde en reacciones de amplificación independientes realizadas con los cebadores FCIR y NLY(O).

Los valores Ct obtenidos en la reacción de amplificación se usaron para extrapolar, en la recta patrón adecuada a cada reacción, un valor de cantidad de ADN (en ng).

Para cada muestra problema, los datos que se obtuvieron con la secuencia diana de *F. circinatum* (FCIRC) se normalizaron frente a los datos obtenidos en la medición del control endógeno del pino (NLY), según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ADN de } \textit{Fusarium circinatum} (t_i)}{\text{ADN de } \textit{Pinus radiata} (t_i)}$$

siendo $t_i = 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28$ y 42 días después de la inoculación.

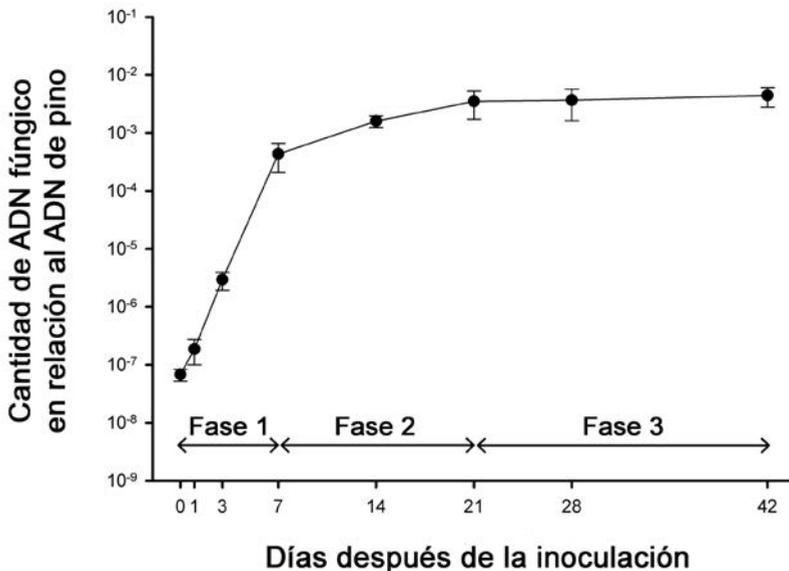


Figura 34. Curva de crecimiento de *Fusarium circinatum* durante la colonización del tallo de *Pinus radiata*. La cantidad de ADN del patógeno se midió en relación a la cantidad de ADN de la planta hospedadora mediante un protocolo de PCR cuantitativa en el que se usaron primers específicos del gen *nly* de *P. radiata* y de una secuencia en la región IGS de *F. circinatum*. Como ADN molde para la reacción se usó el ADN extraído de un segmento del tallo de los pinos alrededor del punto de inoculación. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media de 5 réplicas biológicas independientes. Se observaron tres fases diferenciadas: la fase 1 se corresponde con la fase exponencial de crecimiento del patógeno, la fase 2 es una fase de transición hacia la fase 3 o fase estacionaria.

Así, se obtuvo la cantidad relativa de ADN del patógeno (sin unidades) con respecto a la cantidad de ADN de la planta hospedadora para cada una de las 5 muestras tomadas en cada tiempo de estudio (ti). La determinación de estos datos permitió dibujar la curva de crecimiento de *F. circinatum* dentro de los tejidos del tallo del pino (Fig. 34).

La curva obtenida muestra tres fases claramente distinguibles. La fase 1 abarca los 7 días posteriores a la inoculación y muestra un incremento exponencial de la biomasa fúngica, incremento que llega a alcanzar valores 6000 veces superiores a la cantidad inicialmente inoculada. La fase 2, que va de 7 a 21 ddi, es un periodo de transición en el que la biomasa fúngica sigue incrementándose, pero más lentamente. En esta fase, la pendiente de la curva no es tan pronunciada como en la primera fase, de tal modo que al finalizar la fase de transición, a los 21 ddi, se detectó 8 veces más ADN fúngico que a su comienzo a los 7 ddi. La fase 3, que comienza a partir de los 21 ddi, es una fase estacionaria en la que la tasa de crecimiento se estabiliza. Así, el incremento en la biomasa fúngica a los 42 ddi era solo 1,2 veces superior al encontrado a los 21 ddi.

2.3. EVALUACIÓN A NIVEL HISTOLÓGICO.

Para el estudio histológico de la interacción planta-patógeno mediante microscopía confocal, se llevó a cabo un ensayo de infección en el que se inoculó el tallo de 60 plántulas de un año de edad de *P. radiata* con esporas de *F. circinatum* según lo descrito en la sección 9.1 de “Materiales y Métodos”. Como controles negativos de herida se inocularon 20 plantas con agua.

Se tomaron muestras a lo largo de diferentes tiempos desde el momento de la inoculación (0, 7, 14, 21, 28, 42 y 56 días). En cada muestreo, y por cada tiempo de estudio, se seleccionaron al azar 5 plantas inoculadas con Fc-GFP1 y 2 plantas inoculadas con agua.

Las muestras, que consistieron en una fina sección transversal del tallo de aproximadamente 0,5 mm de grosor efectuada en distintos puntos en torno al PI, se procesaron según lo descrito en la sección 10.2 de “Materiales y Métodos”. Concretamente dichas secciones se tomaron a 7 niveles diferentes a lo largo del tallo, cada nivel a 1 cm del anterior y tomando como centro el PI, es decir, se analizaron muestras hasta 3 cm por encima del PI y hasta 3 cm por debajo del PI.

2.3.1. PROGRESIÓN RADIAL DE LA COLONIZACIÓN DEL TALLO.

I. Aspectos generales.

La observación de las secciones realizadas al nivel del PI con el microscopio confocal proporcionó una imagen “a vista de pájaro” del progreso radial de la colonización en el tallo de las plantas inoculadas (Fig. 35).

A los 7 ddi (Fig. 35a), a pesar de que las plantas de las que se tomaron las muestras no presentaban síntomas visibles de infección, pudo observarse que el patógeno ya había alcanzado el tejido de la zona cambial y se podía intuir su tendencia a migrar hacia la médula.

Hacia los 14 ddi (Fig. 35b), en todas las plantas analizadas, *F. circinatum* ya había alcanzado la médula por medio de la colonización de los radios medulares. Además, en algunas de ellas, la invasión patógena había comenzando a extenderse por el xilema ocupando el interior de algunas traqueidas (punta de flecha en Fig. 35b) y de algunos conductos resiníferos (CR en Fig. 35b). El análisis de aquellas plantas que externamente mostraban una lesión necrótica en el PI mostró que, en la zona circundante a ese punto de infección, la invasión patógena progresaba tangencialmente a través del córtex y del floema.

A los 21 ddi, había plantas en las que externamente podía apreciarse cómo la herida necrótica se había extendido por el tallo desde el PI, tanto hacia arriba como hacia abajo. Además, en algunas de ellas el brote apical se había marchitado y estaba caído (Fig. 30).

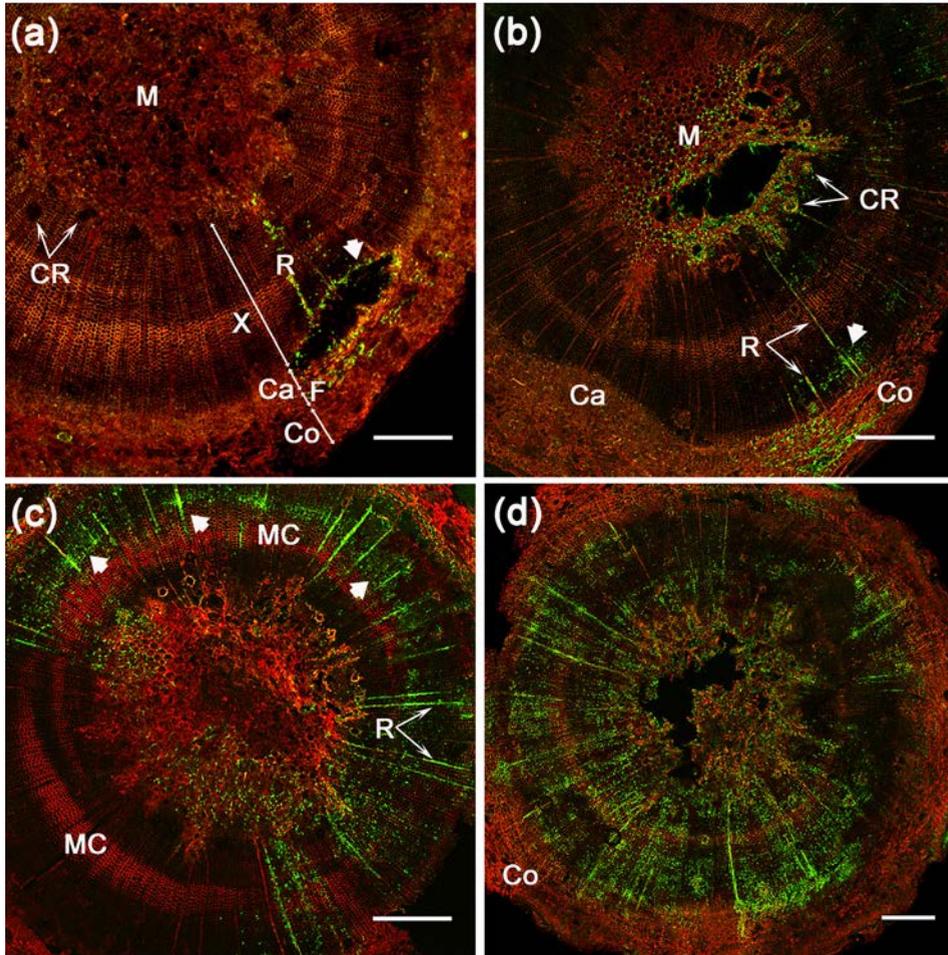


Figura 35. Aspectos generales de la colonización de *Pinus radiata* por *Fusarium circinatum* durante diferentes fases de la infección. Las imágenes de microscopía confocal muestran 4 secciones transversales del tallo de los pinos realizadas al nivel del punto de inoculación (PI). **(a)** Plántula asintomática, 7 días después de la inoculación (ddi). Puede observarse al patógeno en la zona del cambium (Ca), donde se ha producido la ruptura entre el tejido del xilema y del floema (punta de flecha), y también a lo largo de un radio medular (R). Nótese que los conductos resiníferos (CR) del xilema no están hipertrofiados. **(b)** Plántula con síntomas visibles de necrosis en el PI a los 14 ddi. Puede observarse al patógeno principalmente en el parénquima cortical (Co), en los radios medulares (R) y en la propia médula (M), pero también dentro de los conductos resiníferos (CR) y de algunos grupos de traqueidas axiales (punta de flecha) en el tejido xilemático más cercano al tejido parenquimático colonizado. Nótese que hay zonas del cambium (Ca) ensanchadas. **(c)** Plántula que a los 21 ddi presentaba una lesión necrótica de 3 cm alrededor del PI. Se observa que la infección se ha extendido por la mayoría

de los radios medulares (R) de las tres cuartas partes de la sección transversal. Nótese cómo hay muchos grupos de traqueidas invadidos por el patógeno (punta de flecha) en las zonas del xilema que quedan entre la corteza y las zonas de madera de compresión (MC). Las zonas de MC pueden identificarse en la imagen como zonas del xilema con mayor auto fluorescencia. (d) Plántula que presentaba el ápice caído a los 21 ddi. Las hifas del patógeno se han dispersado por el xilema de prácticamente toda la sección transversal. Nótese la ausencia de patógeno vivo en la corteza (Co). Barras de escala: 500 μm . Ca, zona cambial; Co, córtex; CR, conductos resiníferos; F, floema; M, médula; MC, madera de compresión; R, radios medulares; X, xilema.

Internamente, la observación microscópica de estas plantas permitió detectar que, en los estadios más avanzados de la infección, el patógeno había colonizado ya un gran número de radios medulares (R en Fig. 35c) y se extendía progresivamente por el tejido xilemático (puntas de flecha en Fig. 35c). El porcentaje de área invadida por el patógeno aumentaba progresivamente (si bien el grado de colonización podía variar) hasta que finalmente llegaba a ocupar toda la circunferencia del tallo (Fig. 35d). Se constató que la invasión del xilema se daba en espiral y de forma centrípeta, es decir, en trayectoria curvilínea y hacía dentro (Fig. 35c) y, a medida que la invasión del patógeno se extendía por las capas más internas del tallo, su presencia en el córtex y en el floema iba atenuándose (Fig. 35b *vs.* Fig. 35d).

II. Aspectos más concretos a nivel histológico y celular.

Durante la invasión de las capas más externas del tallo, cuya imagen más ampliada puede apreciarse en la figura 36, se confirmó la presencia del patógeno tanto en los espacios intercelulares del parénquima cortical (Co en la Fig. 36a) como en las proximidades de los conductos resiníferos corticales (CR en la Fig. 36). Además, desde estadios tempranos en la infección podía observarse generalmente al floema completamente colapsado por la abundancia de hifas fúngicas que lo colonizaban (F en la Fig. 36b).

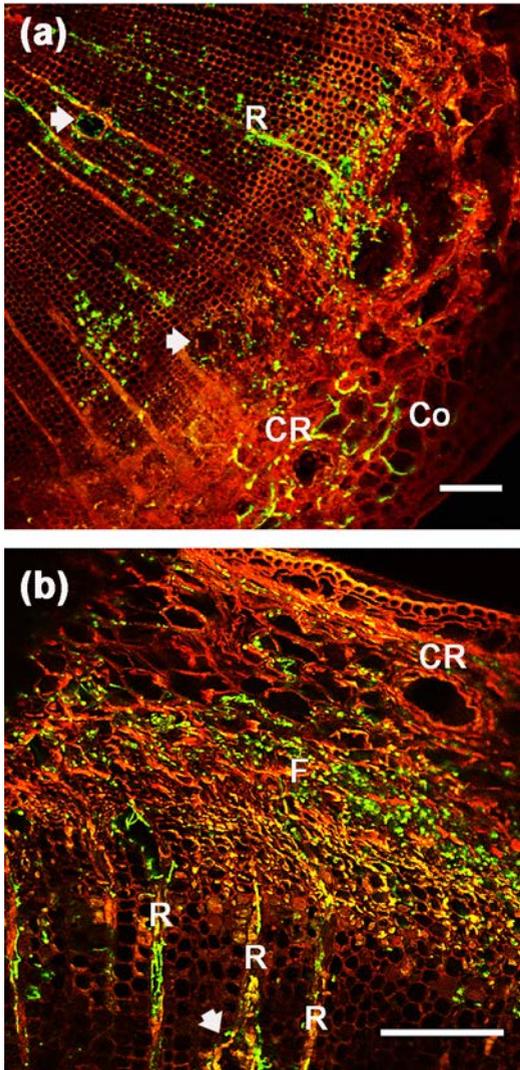


Figura 36. Colonización de las capas más externas de *Pinus radiata* 14 días después de la inoculación (ddi) con *Fusarium circinatum*. (a) En la zona del córtex (Co) puede observarse al patógeno en los espacios intercelulares así como alrededor de un conducto resinífero (CR). También puede verse al patógeno en los conductos resiníferos del xilema (indicados con puntas de flecha) y en algún radio medular (R). (b) El floema (F) se encuentra completamente colapsado por las hifas del patógeno, que también ha colonizado los radios medulares (R) así como los conductos resiníferos del xilema (punta de flecha) asociados a esos radios. Nótese, sin embargo, que en el lumen de los conductos resiníferos (CR) del parénquima cortical no hay presencia patógena. Barras de escala: 150 μ m; Co, córtex; CR, conductos resiníferos; F, floema; R, radios medulares.

La infección progresaba hacia capas más internas del tallo principalmente a través de los radios medulares (R en la Fig. 36). Dentro ya del cilindro vascular, se podía encontrar también al patógeno, además de en los radios medulares, en los conductos resiníferos (puntas de flecha en la Fig. 36) y en las traqueidas más cercanas a estos focos de infección. Se observó cómo las hifas de *F. circinatum* eran capaces de atravesar las punteaduras de las traqueidas (flechas en Fig. 37a) generándose así pequeños grupos de invasión en el tejido xilemático (Fig. 37b). En estadios tempranos de

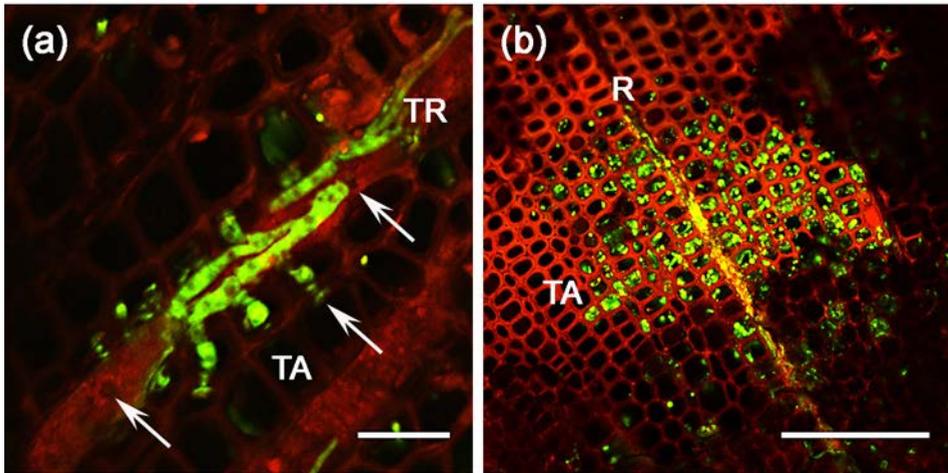


Figura 37. Colonización del xilema de *Pinus radiata* por *Fusarium circinatum*. (a) *Fusarium circinatum* pasa desde una traqueida radial (TR) a las traqueidas axiales (TA) adyacentes atravesando las punteaduras areoladas (flechas), 21 días después de la inoculación (ddi). (b) Grupos de traqueidas axiales (TA) invadidas por el patógeno alrededor de un radio medular (R), 42 ddi. Barras de escala: (a) 25 μm ; (b) 150 μm ; R, radios medulares; TA, traqueidas axiales; TR, traqueidas radiales.

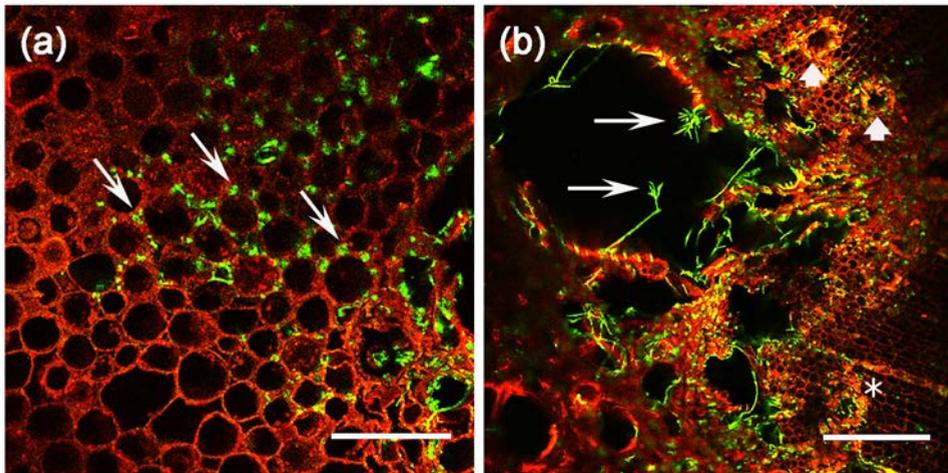


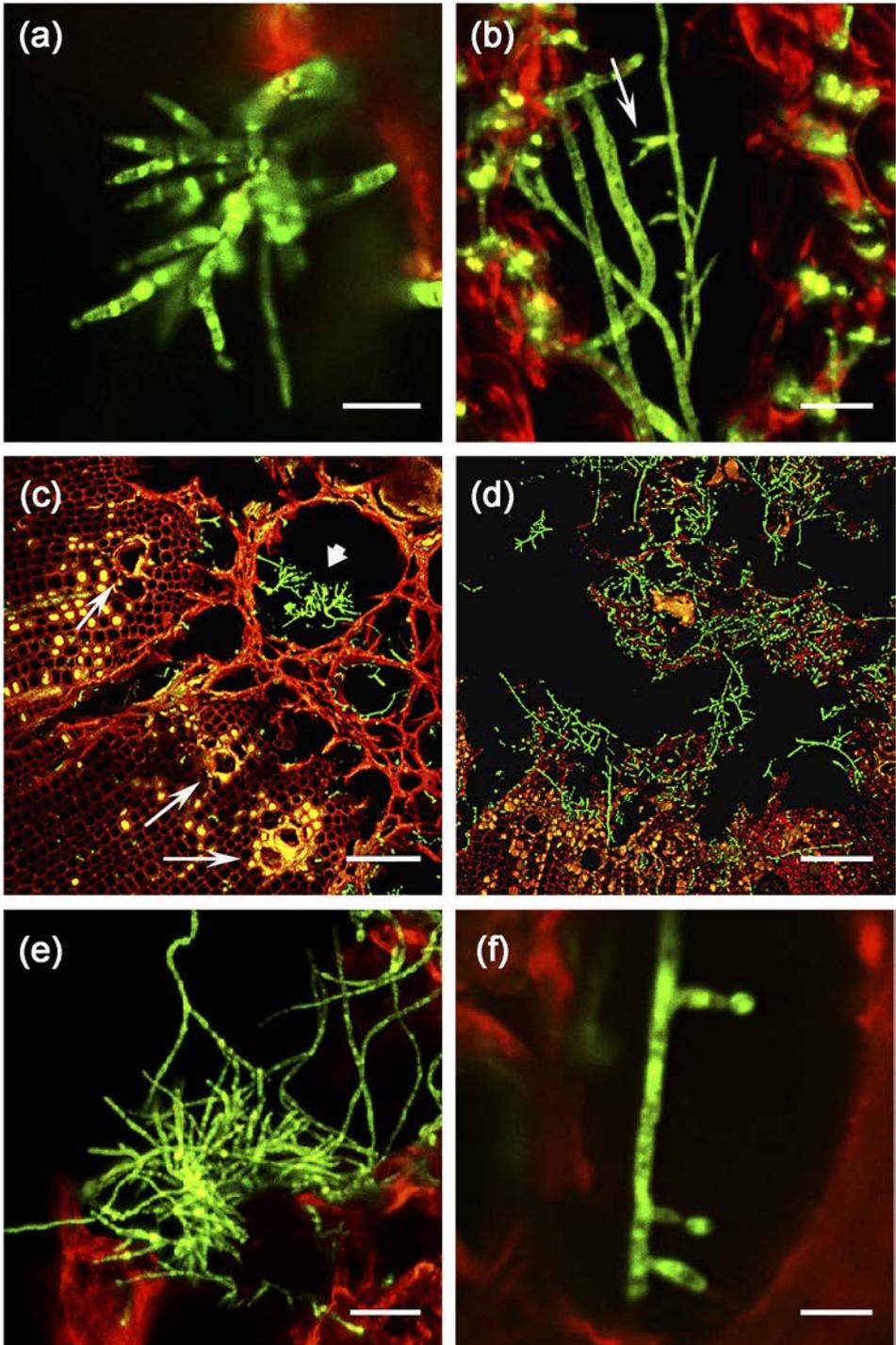
Figura 38. Colonización de la médula de *Pinus radiata* 14 días después de la inoculación (ddi) con *Fusarium circinatum*. Se muestran detalles de la Fig. 35b ampliados. (a) *Fusarium circinatum* se desarrolla inicialmente por la vía del apoplasto ocupando los espacios entre las células del parénquima (flechas). (b) Conidióforos ramificados (flechas) en las cavidades resultantes de la desintegración del tejido parenquimático de la médula. Pueden observarse conductos resiníferos hipertrofiados (punta de flecha) en el tejido xilemático próximo a las zonas colonizadas de la médula. Nótese cómo las hifas del hongo ocupan el lumen del conducto resinífero señalado con un asterisco. Barras de escala: 150 μm ;

la infección, fue más frecuente encontrar estos pequeños grupos de traqueidas invadidas por el patógeno en las zonas del xilema más cercanas al cambium (punta de flecha en la Fig. 35b). En algunos de los cortes visualizados se identificaron, por la mayor auto fluorescencia de sus paredes celulares, zonas de madera de compresión (MC en la Fig. 35c). Se encontró que los grupos de traqueidas invadidas por el patógeno se disponían normalmente en la cara externa (es decir, más cercana a la corteza) de esas zonas de madera de compresión (puntas de flecha en la Fig. 35c).

Una vez que el patógeno alcanzaba la médula, se observó que inicialmente las hifas de *F. circinatum* se disponían en los espacios intercelulares del parénquima, es decir, entre células parenquimáticas adyacentes (ver M en Fig. 35b y flechas en Fig. 38a). A medida que la colonización patógena progresaba, el tejido parenquimático se iba desintegrando y se formaban grandes huecos en los que podían apreciarse estructuras conidiógenas (flechas en Fig. 38b). Además, la observación de varios cortes realizados al nivel del PI mostró la presencia de abundantes conidióforos con las fiálides orientadas hacia estas cavidades huecas a los 14 ddi (Fig. 39a,b), a los 21 ddi (Fig. 39c) e incluso, aunque en menor proporción, a los 28 ddi (Fig. 39d).

Figura 39. Conidióforos de *Fusarium circinatum* en la médula de *Pinus radiata*.

Las imágenes de microscopía confocal muestran secciones transversales del tallo de los pinos. (a) Ampliación de la Fig. 38b. Conidióforo ramificado localizado al nivel del punto de inoculación (PI), 14 días después de la inoculación (ddi). (b) Conidióforo simple con polifiálides (flecha) localizado al nivel del PI, 14 (ddi). (c) Intensa conidiación por parte del patógeno en la médula observada a los 21 ddi en muestras adquiridas al nivel del PI. Nótese la brillante emisión de fluorescencia de las células epiteliales que bordean los conductos resiníferos (flechas) y de las pequeñas gotas de resina en los alrededores. (d) Conidióforos ramificados (punta de flecha) observados a los 28 ddi en muestras obtenidas al nivel del PI. (e) Micro esporodioquio localizado en un conidioma de fiálides uniformes 1 cm por debajo del PI, a los 42 ddi. (f) Conidióforo simple con mono fiálides visualizado en una muestra tomada 3 cm por encima del PI a los 56 ddi. Barras de escala: (a) 15 μm ; (b) 25 μm ; (c) 200 μm ; (d) 100 μm ; (e) 40 μm ; (f) 10 μm .



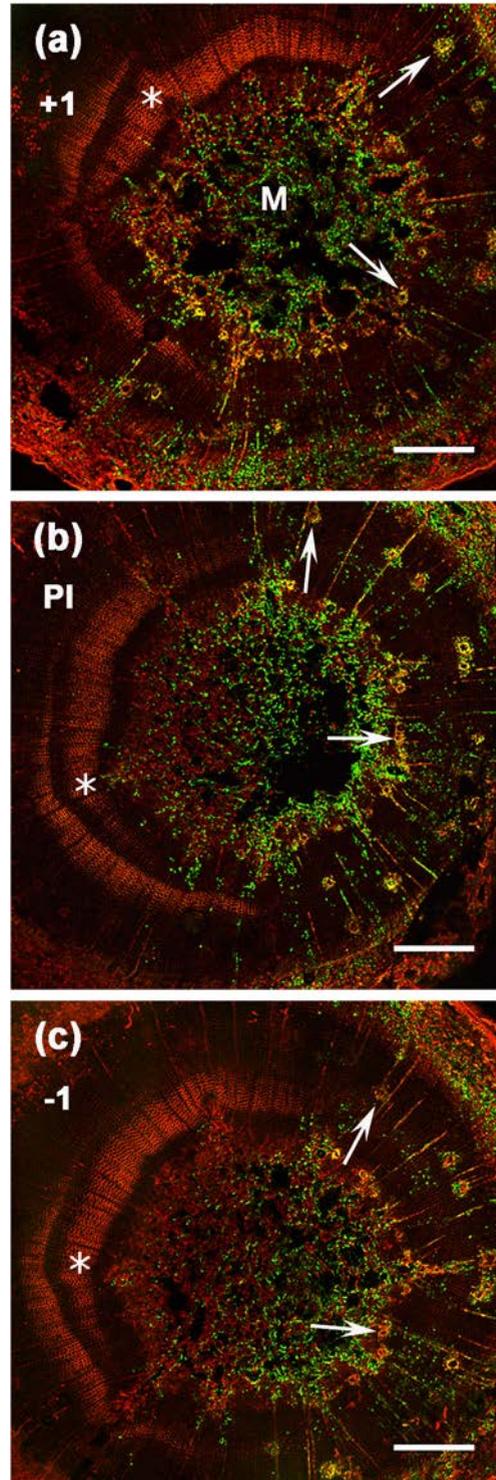
2.3.2. PROGRESIÓN VERTICAL DE LA COLONIZACIÓN DEL TALLO.

En base a las observaciones realizadas con el microscopio confocal de las secciones transversales obtenidas a lo largo del eje longitudinal del tallo, se estudió el modo en que el patógeno colonizaba los tejidos que quedaban por encima o por debajo del PI. Se comprobó que *F. circinatum* seguía un patrón de colonización muy similar en todas las plantas visualizadas, aunque se advirtieron algunas diferencias en el grado de colonización.

Las hifas de *F. circinatum* eran capaces de crecer tanto hacía arriba como hacía abajo, desde la pequeña herida practicada durante la inoculación, por las capas más externas del tallo: la corteza, y la zona que comprende el cambium y el floema. Pero además, se visualizó al patógeno en el tejido medular de cortes realizados 1 cm por encima y por debajo del PI a los 14 ddi (Fig. 40). Este hecho parece indicar que *F. circinatum*, tras alcanzar relativamente temprano el tejido más interno del tallo, es capaz de colonizar estratos superiores e inferiores del tallo a través de su desarrollo por la médula del pino. En cuanto a la expansión vertical de la infección por el cilindro vascular, merece la pena destacar el papel fundamental que adquirió el sistema interconectado de células parenquimáticas (constituido por los radios medulares y por el epitelio de los conductos resiníferos). Así lo corrobora el hecho de que, durante el análisis microscópico de muestras de tejido asintomático obtenidas de zonas alejadas del PI, era habitual encontrar hifas del patógeno únicamente en la proximidad de algunos conductos resiníferos, mientras que el resto del corte aparecía libre de presencia patógena (Fig. 41a).

A los 14 ddi, la infección se había extendido unos 2 cm alrededor de la zona de la inoculación. Así, se detectó la presencia del patógeno en el 80% de las muestras adquiridas 1 cm por encima y por debajo del PI. Cabe destacar que la colonización por parte del patógeno era más intensa en las muestras correspondientes a la zona situada por encima del PI (en las que el patógeno se encontraba principalmente en las células parenquimáticas, tanto las de la médula como las del cilindro vascular) que en las muestras situadas por debajo del PI.

Figura 40. Distribución polarizada de la presencia de *Fusarium circinatum* en el xilema de *Pinus radiata* así como de los conductos resiníferos afectados por la infección. Las imágenes de microscopía confocal muestran secciones transversales del tallo provenientes de la misma planta, 14 días después de la inoculación (ddi), realizadas a diferentes alturas: **(a)** +1 cm por encima del punto de inoculación (PI), **(b)** al nivel de la inoculación, y **(c)** 1 cm por debajo del PI. Los asteriscos indican posiciones, en el eje longitudinal, equivalentes en las tres imágenes y se han señalado con flechas algunos conductos resiníferos. Nótese cómo una parte de la sección está ampliamente colonizada por el patógeno, mientras que la otra parte se encuentra libre de él. Se observa que la distribución de los conductos resiníferos activos está polarizada en relación a la presencia del patógeno. Se entiende como conducto resinífero activo aquel cuyas células epiteliales están hipertrofiadas y, como resultado de la producción de resina, emiten una intensa fluorescencia amarilla (en torno a los 530-600 nm) cuando se excita la muestra con luz azul (488 nm). Barras de escala: 500 μ m; M, médula.



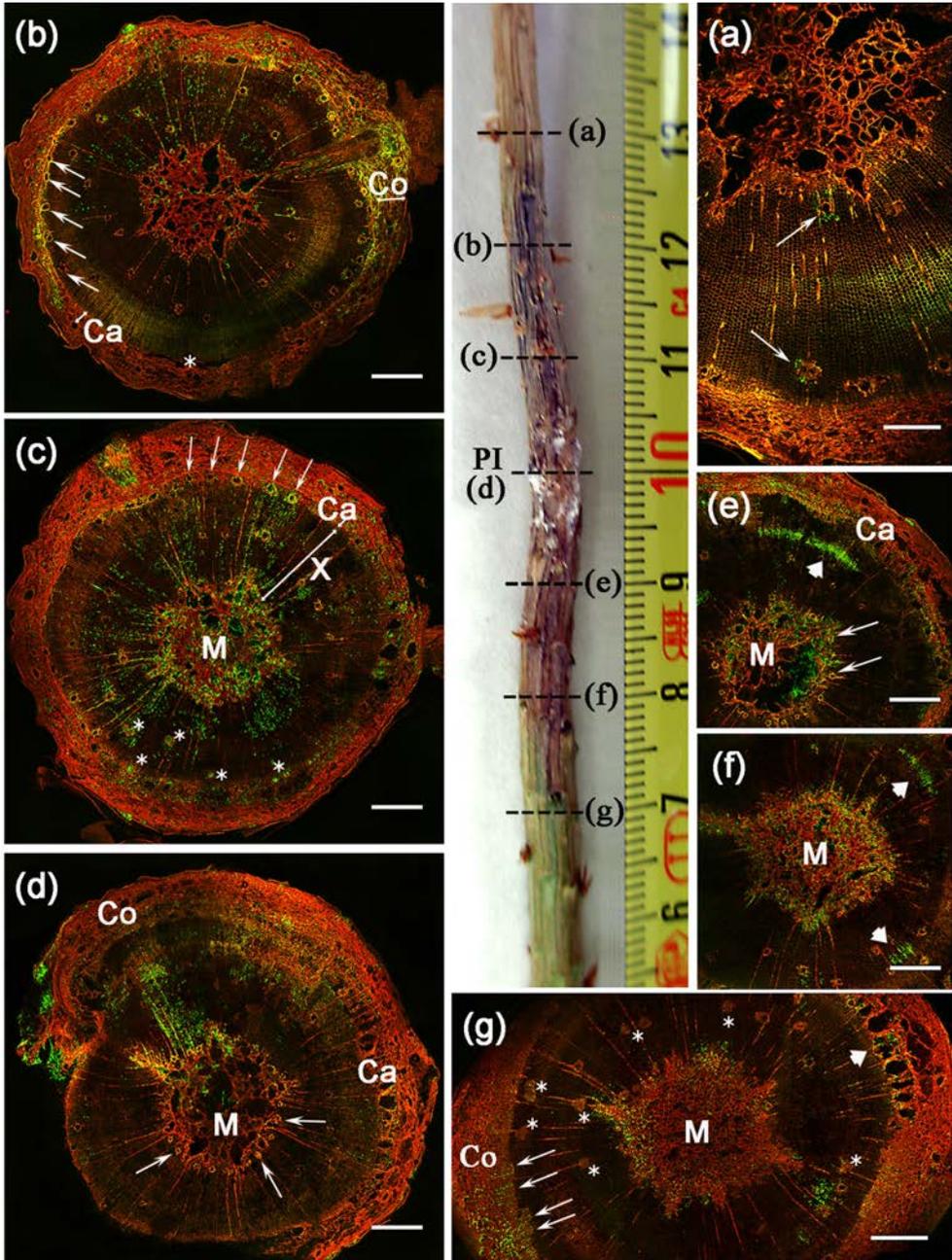


Figura 41. Progresión vertical de *Fusarium circinatum* a lo largo del tallo de *Pinus radiata*. En la imagen central se muestra una pieza de tallo en la que se aprecia la necrosis desarrollada en sus tejidos 42 días después de la inoculación con el patógeno y de la cual se tomaron distintos cortes transversales que se muestran en las microfotografías que la rodean. **(a)** 3 cm por encima del punto de inoculación (PI). Puede observarse al patógeno únicamente alrededor de conductos resiníferos (flechas) en el xilema. **(b)** 2 cm por encima del PI. La mayor cantidad de micelio patógeno se localiza en el parénquima cortical (Co) y en los tejidos en torno al cambium (Ca), aunque también pueden apreciarse bastantes hifas dispersas por el cilindro vascular. Las flechas señalan varios conductos resiníferos traumáticos en diferentes estadios de formación, que se encuentran dispuestos en fila y orientados en paralelo al cambium, únicamente en aquellas zonas colonizadas por el patógeno. Nótese que en las zonas libres de patógeno (indicada con un asterisco) no hay conductos resiníferos traumáticos. **(c)** 1 cm por encima del PI. La médula (M) y el xilema (X) aparecen intensamente colonizados por *F. circinatum*. Una extensa fila de conductos resiníferos traumáticos (flechas), localizados en las proximidades del cambium (Ca), se encuentran bordeando casi todo el perímetro del tallo. Nótese que el lumen de algunos conductos resiníferos está ocupado por el patógeno (asteriscos). **(d)** Nivel de la inoculación. Se observan grandes cavidades en zonas del parénquima medular (M), del parénquima cortical (Co) y del cambium (Ca). Nótese los numerosos conductos resiníferos presentes que se localizan en el xilema bordeando la médula (algunos de ellos se han indicado con flechas). **(e)** 1 cm por debajo del PI. El patógeno se encuentra principalmente en el parénquima medular (M) y en los tejidos en torno al cambium (Ca) donde pueden observarse grandes cavidades. Nótese la abundancia de conductos resiníferos que se encuentran bordeando la médula (algunos de ellos se han indicado con flechas). La punta de flecha en la imagen indica una zona en el xilema donde las hifas del hongo están situadas de tal modo que, vistas en conjunto, forman un arco. **(f)** 2 cm por debajo del PI. El patógeno ha colonizado por completo la médula (M). Las dos puntas de flecha en la imagen señalan dos zonas donde las hifas del hongo están dispuestas en forma de arco, como si formaran parte de un incompleto anillo en el xilema. **(g)** 3 cm por debajo del PI. El patógeno se encuentra principalmente en el parénquima cortical (Co) y medular (M) y en la zona cambial, donde pueden apreciarse varios conductos resiníferos traumáticos todavía en formación (indicados con flechas). Nótese que hay hifas del patógeno rodeando dichos conductos. También en la zona cambial, pero en el lado opuesto del corte (indicado con una punta de flecha) pueden apreciarse grandes cavidades junto con hifas patógenas. El lumen de algunos conductos resiníferos dispersos por el xilema se encuentra relleno de tilosoides (asteriscos). Barras de escala: (a) 300 μm ; (b-g) 600 μm . Ca, zona cambial; Co, corteza; M, médula; PI, punto de inoculación.

A los 21 ddi, el patógeno fue detectado en el 60% de las muestras analizadas 2 cm por encima del PI, y en el 40% de las muestras tomadas 2 cm por debajo del PI. Se registró una proporción similar a los 28 ddi, pero en este caso el patrón de colonización de la médula mostró ciertas diferencias con respecto al modo en que había sido colonizada la médula hasta ese momento. Así, mientras que ninguna de las muestras correspondientes a 2 cm por encima del PI mostró presencia fúngica en la médula, en todas aquellas muestras correspondientes a 2 cm por debajo del PI en las que se detectó al patógeno se observó cómo este sí había colonizado la médula. En estadios posteriores a los 28 ddi, la presencia del patógeno en la médula también se detectó predominantemente por debajo del PI (comparar Fig. 41a,b vs. Fig. 41f,g). Además, en aquellas muestras en las que la médula estaba libre de presencia patógena, el hongo sí que aparecía en el córtex y en el xilema, lo que indicaba que la invasión de la médula a lo largo del tallo ocurría de forma más lenta que la colonización a través de los otros tejidos del tallo.

La colonización vertical del tallo a través del tejido xilemático también mostró un patrón diferente dependiendo de si la progresión de la infección desde el PI era hacia arriba o hacia abajo. Este contraste se hizo especialmente llamativo en los estadios avanzados de la infección. Así, en las muestras correspondientes a las zonas situadas por encima del PI se percibió al patógeno desperdigado por el cilindro vascular, distribuido de un modo disperso en las traqueidas y en el lumen de los conductos resiníferos (Fig. 41b,c). Sin embargo, en las muestras correspondientes a las zonas situadas por debajo del PI, las hifas del patógeno se encontraban agrupadas en el interior de varias traqueidas cuya disposición, vista en conjunto, parecía dibujar un arco o un anillo incompleto en el xilema (puntas de flecha en Fig. 41e,f).

La colonización vertical del tallo del pino por *F. circinatum* se mantuvo activa hasta los estadios finales del proceso de infección. Así, tanto a los 42 como a los 56 ddi, se encontraron células conidiógenas en el tejido medular de muestras de tallo procedentes tanto de la zona superior

como de la inferior al PI (Fig. 39e,f). Además, a los 42 ddi, en el 60% de las muestras analizadas el patógeno ya había invadido los tejidos situados a 3 cm del PI, tanto hacia arriba como hacia abajo. Dos semanas más tarde, a los 56 ddi, la infección llegó hasta ± 3 cm del PI en el 100% de las muestras visualizadas.

2.3.3. ALTERACIÓN DE LOS CONDUCTOS RESINÍFEROS.

A nivel anatómico, la diferencia más pronunciada entre las plantas inoculadas con el patógeno y las plantas control se dio en el número y morfología de los conductos resiníferos. En los tejidos infectados, las células epiteliales que revisten los conductos resiníferos eran mayores que las observadas en los conductos resiníferos de los tallos control no infectados (Fig. 42a *vs.* Fig. 42b). Destacaba además, la intensa autofluorescencia amarilla (530–600 nm) que emitía el epitelio secretor de los canales resiníferos al excitar la muestra con luz azul (488 nm).

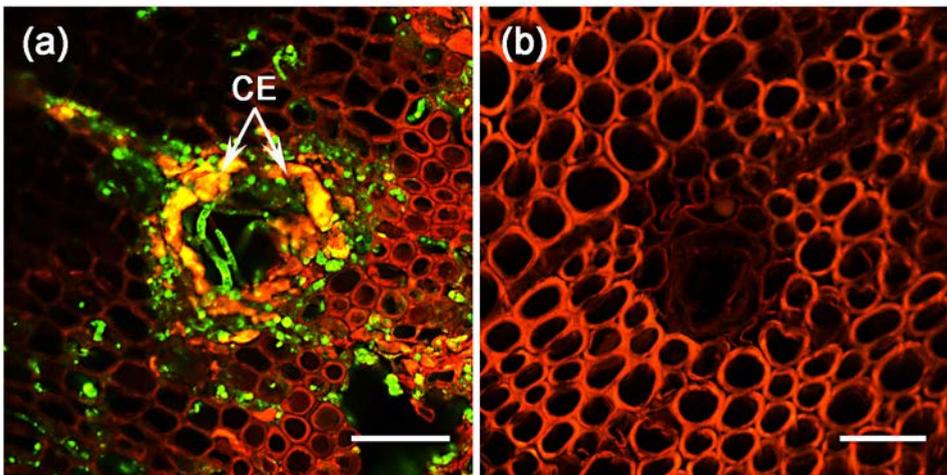


Figura 42. Conductos resiníferos de *Pinus radiata*. (a) La imagen muestra un conducto resinífero (CR) en el xilema invadido por *Fusarium circinatum*, 14 días después de la inoculación (ddi). Nótese la intensa fluorescencia amarilla (530–600 nm) emitida por las células epiteliales (flechas) del CR al excitar la muestra con luz azul (488 nm). (b) CR en el xilema de una planta control 14 ddi simulada con agua. Barras de escala: 50 μ m; CE, célula epitelial de los conductos resiníferos.

Aquellos conductos resiníferos de células epiteliales hipertrofiadas que emitían la citada señal de fluorescencia, como el representado en la Fig. 42(a), fueron considerados conductos resiníferos activados [véanse: puntas de flecha en Fig. 38(b); flechas en Fig. 39(c); flechas en Fig. 40; flechas en Fig. 41(a-e)]. Esta fluorescencia probablemente se debiera a la síntesis de nueva resina. En este sentido, merece la pena destacar la brillante fluorescencia detectada tanto en el interior de varios conductos resiníferos como en la zona de reacción contigua al rastro de una acícula (traza foliar), que se muestra en la Fig. 43.

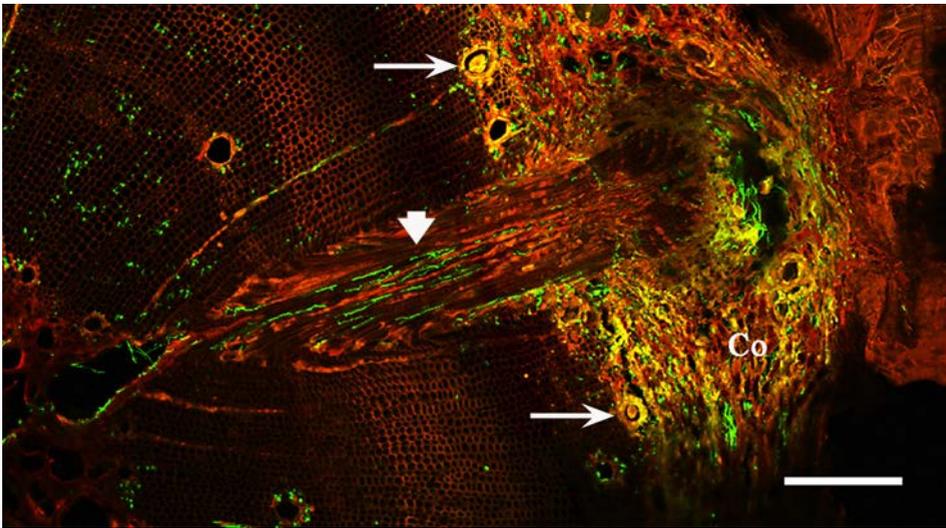


Figura 43. Traza foliar de *Pinus radiata*. La imagen es una ampliación de la Fig. 41(b) que muestra la sección longitudinal del rastro de una acícula cuyas traqueidas han sido invadidas por *Fusarium circinatum* (punta de flecha). Nótese la intensa fluorescencia amarilla tanto en el interior de los conductos resiníferos (flechas) como en el tejido cortical (Co) colonizado por el patógeno. Barras de escala: 300 μ m; Co, córtex.

En ocasiones, también se observó el lumen de algún conducto resinífero obstruido por tilosoides formadas por el sobre crecimiento de las células epiteliales hipertrofiadas (asteriscos en Fig. 41g).

Las variaciones encontradas en cuanto a la morfología de los conductos resiníferos en las plantas inoculadas con el patógeno frente a las plantas control, se hallaron igualmente al examinar, dentro de una misma planta, zonas que habían sido colonizadas por *F. circinatum* con respecto a zonas no colonizadas. Así, en todas las muestras procedentes de plantas inoculadas con el patógeno, se advirtió que la distribución de los conductos resiníferos activados estaba polarizada en función de la presencia o ausencia del patógeno (Figs 35b, 40).

Frecuentemente, podían encontrarse hifas fúngicas situadas muy cerca de las células epiteliales o incluso en el lumen de los conductos resiníferos (Fig. 42a), tanto en estadios tempranos (Figs. 35b, asterisco en 38b) como en los estadios finales de la infección (flechas en Fig. 41a;

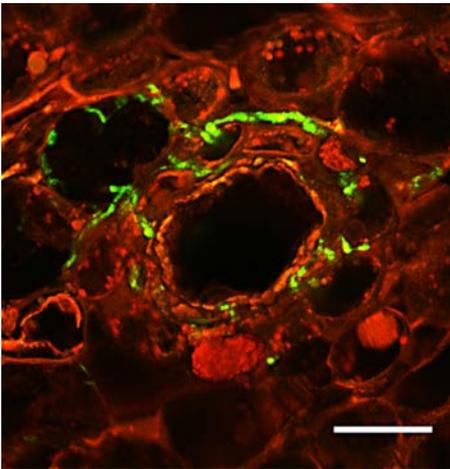


Figura 44. Conducto resinífero cortical de *Pinus radiata* 21 días después de la inoculación del tallo con *Fusarium circinatum*. Pueden observarse hifas del patógeno alrededor del conducto, pero no por dentro del mismo. Barra de escala: 50 μm .

asteriscos en Fig. 41c). Vale la pena señalar, sin embargo, que el patógeno en ningún caso mostró tan alta afinidad por los conductos resiníferos corticales. De tal forma que, aunque sí se encontraron hifas fúngicas alrededor de los conductos resiníferos corticales, raramente se observaron en su lumen (CR en Figs. 36a,b, 44).

Además, se detectaron también desigualdades en cuanto a la cantidad de conductos resiníferos en las plantas control frente a las plantas inoculadas con el patógeno. Esta diferencia se hizo más notoria en estadios avanzados de la infección. Así, a los 42 ddi, mientras los tallos de las plantas control presentaban solo unos pocos

conductos resiníferos (Fig. 45), los tallos de las plantas inoculadas con *F. circinatum* presentaban varios conductos resiníferos de tipo traumático normalmente dispuestos en fila en la zona del cambium y estrechamente vinculados a zonas en las que el patógeno estaba presente (flechas en Fig. 41b,c,g).

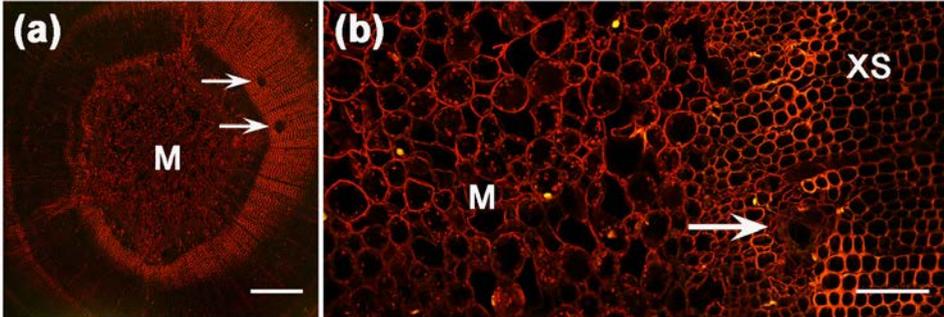


Figura 45. Plantas control de *Pinus radiata*. Las imágenes de microscopía confocal muestran secciones transversales del tallo de los pinos a los 42 días después de la inoculación con agua. Se han señalado con flechas los conductos resiníferos. (a) Se observa que hay un menor número de conductos resiníferos que en las plantas inoculadas con el patógeno. Nótese además que los conductos resiníferos no se aprecian activos. (b) La flecha en la imagen señala un conducto resinífero en el xilema sin que se aprecie el ensanchamiento o hipertrofia de sus células epiteliales. Barras de escala: (a) 500 μ m; (b) 100 μ m. M, médula; XS, xilema secundario.

Los conductos resiníferos traumáticos se formaron principalmente en la zona cambial (Fig. 46a), pero también en zonas más internas del xilema, siempre en asociación con el parénquima de los radios medulares (Fig. 46b). Se llegaron a distinguir diferentes estadios en la formación de los canales resiníferos traumáticos. Los conductos resiníferos inmaduros se apreciaron como agregaciones de células madre del xilema con forma hinchada o redondeada (nótese la flecha de la derecha en la Fig. 46a).

En la zona cambial, se observaron frecuentemente hifas del patógeno junto a los conductos resiníferos todavía inmaduros y, también, en torno a grandes espacios o huecos (Fig. 41c,d,e,g y flechas en Fig. 46c).

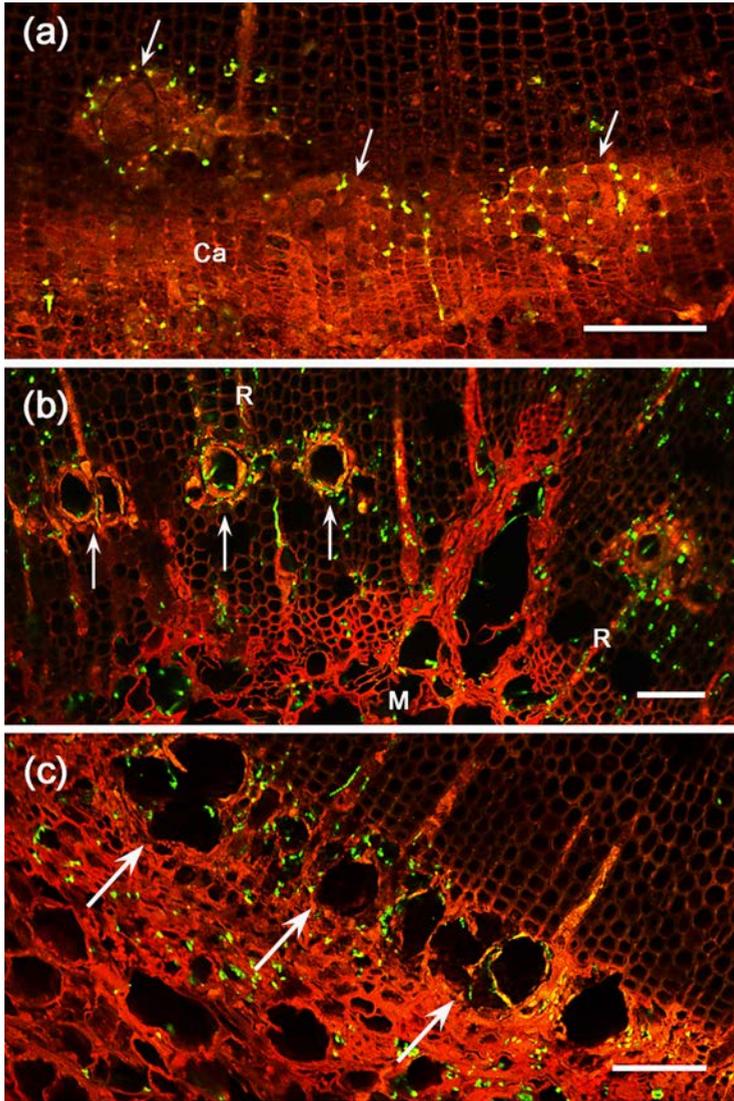


Figura 46. Conductos resiníferos traumáticos en *Pinus radiata* tras la inoculación con *Fusarium circinatum*. (a) Tres conductos resiníferos (CRs) traumáticos (señalados con tres flechas), todavía inmaduros, en fase de desarrollo y dispuestos en fila en la zona cambial a los 14 días después de la inoculación (ddi). (b) CRs traumáticos (flechas), localizados en la zona del xilema más cercana a la médula (M), cuya formación está asociada al parénquima de los radios medulares (R), 42 ddi. (c) La imagen muestra las cavidades resultantes de la desintegración de varios CRs traumáticos (flechas) en la zona cambial a los 28 días después de la inoculación con *F. circinatum*. Barras de escala: 100 μ m. Ca, zona cambial; M, médula; R, radio medular.

Presumiblemente esos huecos encontrados en la zona cambial fueran producidos por la disgregación del tejido tras la colonización de los conductos resiníferos por el patógeno.

El análisis detallado de las imágenes obtenidas reveló que, a pesar del ataque patógeno a los canales resiníferos, el número total de conductos resiníferos en el xilema (suma de constitutivos más traumáticos) de las plantas inoculadas con el patógeno se fue incrementando progresivamente a lo largo del ensayo, siendo significativas las diferencias encontradas a los 14 y 42 ddi. Por el contrario, la densidad total de conductos resiníferos en las plantas control (heridas pero no inoculadas con el patógeno) permaneció estable durante todo el ensayo (Fig. 47)

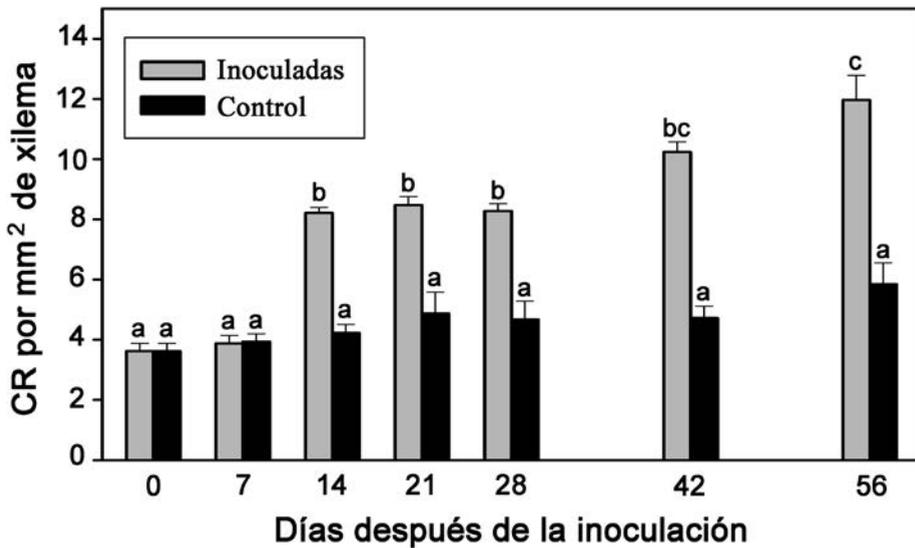


Figura 47. Variación en la densidad media de conductos resiníferos (CR) presentes en el xilema de *Pinus radiata* tras la inoculación con *Fusarium circinatum*. Se calculó el número de CRs (constitutivos más traumáticos) presentes en un cuarto de cada sección transversal analizada y el conteo total se relacionó con el área de xilema de ese cuarto de sección. Las secciones transversales fueron tomadas de la porción de tallo entre +3 cm y -3 cm en torno al punto de inoculación. Se evaluaron de 3 a 5 secciones transversales de tallo por planta. Las barras de error son la desviación estándar basada en los resultados obtenidos en 5 plantas diferentes. ANOVA: g.l.=13; F= 32,14; P < 0,001. Distintas letras encima de las barras de error indican diferencias significativas según el test de Tukey (P < 0,05).

3. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE *FUSARIUM CIRCINATUM* TRAS LA INOCULACIÓN DEL SUSTRATO DE CRECIMIENTO DE *PINUS RADIATA*

Con el fin de analizar los mecanismos mediante los cuales *F. circinatum* es capaz de infectar la planta *via* raíz, se inoculó, con micelio vegetativo, el sustrato de crecimiento de plántulas de *P. radiata*. Los eventos posteriores a la inoculación se estudiaron a nivel macroscópico, mediante la valoración visual de la progresión en que aparecen los síntomas de la enfermedad, y a nivel histológico, por observación directa al microscopio confocal de la interacción entre la planta y la estirpe patógena que expresa el gen de la *sgfp*. Además, dado que en caso de producirse la infección lo haría a través del sistema radicular de los pinos, se analizó también el estado de las raíces al finalizar los ensayos de infección. Los resultados de este apartado han sido recientemente publicados (Martín-Rodríguez y cols., 2015).

3.1. SÍNTOMAS VISIBLES DE LA ENFERMEDAD EN LA PARTE AÉREA DE LAS PLANTAS.

Para evaluar la incidencia de los síntomas de enfermedad a lo largo del tiempo, se realizaron dos ensayos de infección independientes según lo descrito en la sección 9.2 de “Materiales y Métodos”. En cada ensayo se inoculó con la estirpe transformada de *F. circinatum* Fc-GFP1 el sustrato de crecimiento de 12 plántulas, las cuales en el momento de la inoculación tenían 9 meses de edad. Además, en cada ensayo se tomaron otras 6 plantas como control negativo, a las cuales se practicó una inoculación simulada (sin el patógeno).

Un mes antes de la inoculación se midió la altura y el diámetro del tallo de los pinos y se constató su crecimiento homogéneo, caracterizado por una altura media (\pm desviación estándar) de $44,5 \pm 0,7$ cm y un diámetro de $4,6 \pm 0,1$ mm.

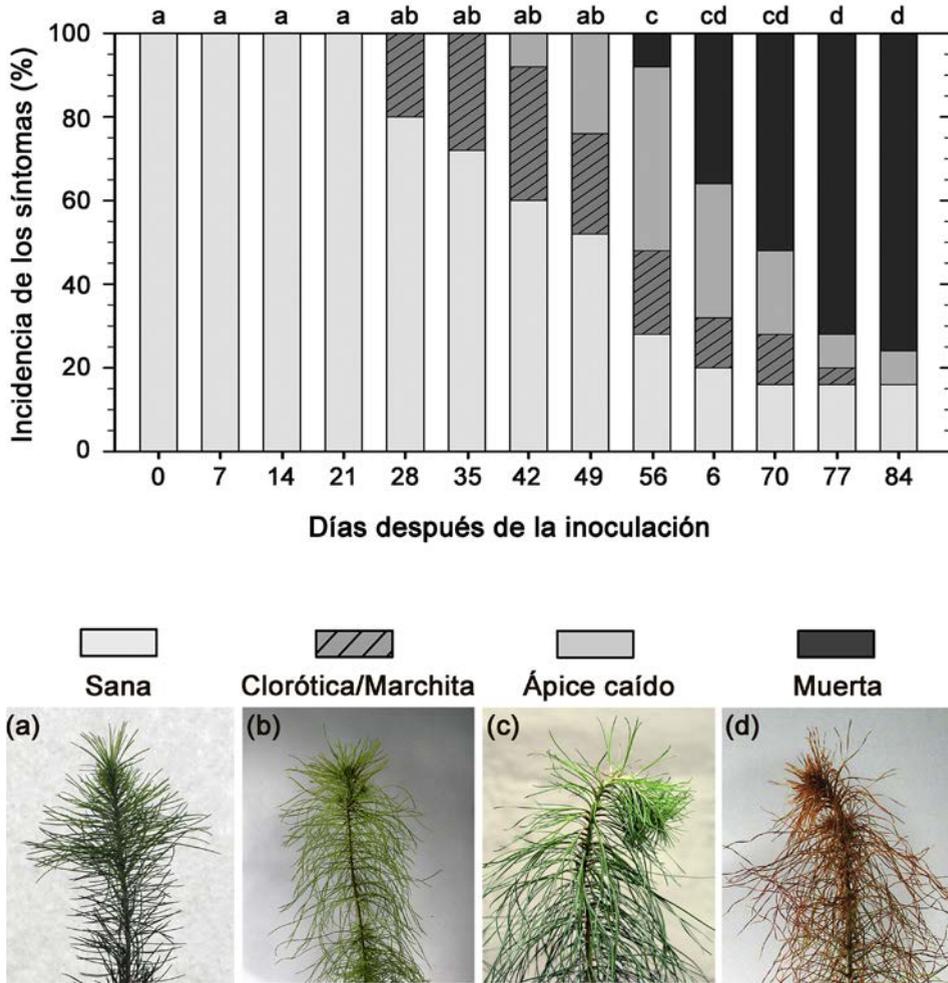


Figura 48. Evolución temporal de la incidencia de los síntomas de enfermedad que se apreciaron visualmente en la parte aérea de plántulas de *Pinus radiata* cuyo sustrato de crecimiento había sido inoculado con micelio vegetativo de *Fusarium circinatum*. Se calculó el porcentaje de plántulas (panel superior), de un total de 24, que exhibieron los distintos síntomas de la enfermedad y que fueron clasificados según una escala de severidad de 1 a 4 (panel inferior). En dicha escala el valor 1 indica que la planta estaba sana (a); 2 indica clorosis o marchitamiento de las acículas (b); 3 indica la caída del ápice caulinar de la planta (c); y 4 indica que el follaje de la planta estaba rojo y muerto (d). Distintas letras encima de las barras implican diferencias significativas entre semanas en cuanto a la incidencia de los síntomas según el modelo lineal general: g.l. = 24; $F = 82,99$; $P < 0,0001$ para ANOVA de medidas repetidas. Las comparaciones de pares se hicieron sobre las medias marginales estimadas ($P < 0,05$).

Durante casi la totalidad del primer mes después de la inoculación, todas las plántulas de los ensayos parecían sanas, sin que se apreciaran síntomas de la enfermedad (Fig. 48). Los primeros síntomas se manifestaron a los 28 ddi y estos fueron el decaimiento y decoloración de las acículas, que pasaron de ser turgentes y de color verde a laxas y amarillentas. Dos semanas más tarde, a los 42 ddi, se apreció por primera vez en un 8% de las plantas la caída del brote apical, de tal modo que este quedaba apuntando hacia abajo. La incidencia de este síntoma llegó a alcanzar su máximo (con el 44% de las plantas afectadas) a los 56 ddi. Es importante destacar que, en todos los pinos que alcanzaron esta etapa, sus acículas pasaron de color amarillento a marrón rojizo y su brote terminal finalmente acabó por secarse y morir. Al finalizar el ensayo de patogenicidad, a los 84 ddi, tan sólo el 15% de las plántulas había sobrevivido.

3.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.

La evaluación del proceso de infección a nivel histológico se realizó mediante la observación al microscopio confocal de muestras de tejido vegetal obtenidas en diferentes tiempos desde el momento de la inoculación (7, 14, 28, 42, 56 y 84 ddi) con la estirpe transformada de *F. circinatum* Fc-GFP1.

Para tal fin, se llevaron a cabo 2 ensayos de infección independientes con plántulas de *P. radiata* de 9 meses de edad. En cada uno de los ensayos, y por cada tiempo de estudio, se seleccionaron al azar 3 plantas cuyo sustrato de crecimiento se había inoculado con la estirpe Fc-GFP1 (Fig. 18), más una planta control. Se muestrearon y procesaron para la observación microscópica un total de 48 plantas [(3 plantas inoculadas con el patógeno + 1 plantas control) x (6 tiempos de estudio) x (2 ensayos de infección independientes)].

De cada uno de los pinos usados en el estudio, se tomaron diferentes tipos de muestras: 3 raicillas laterales, 1 sección transversal de la raíz principal, 1 sección transversal del cuello de raíz, y 3 secciones transversales del tallo a 1, 3 y 5 cm por encima del nivel del sustrato.

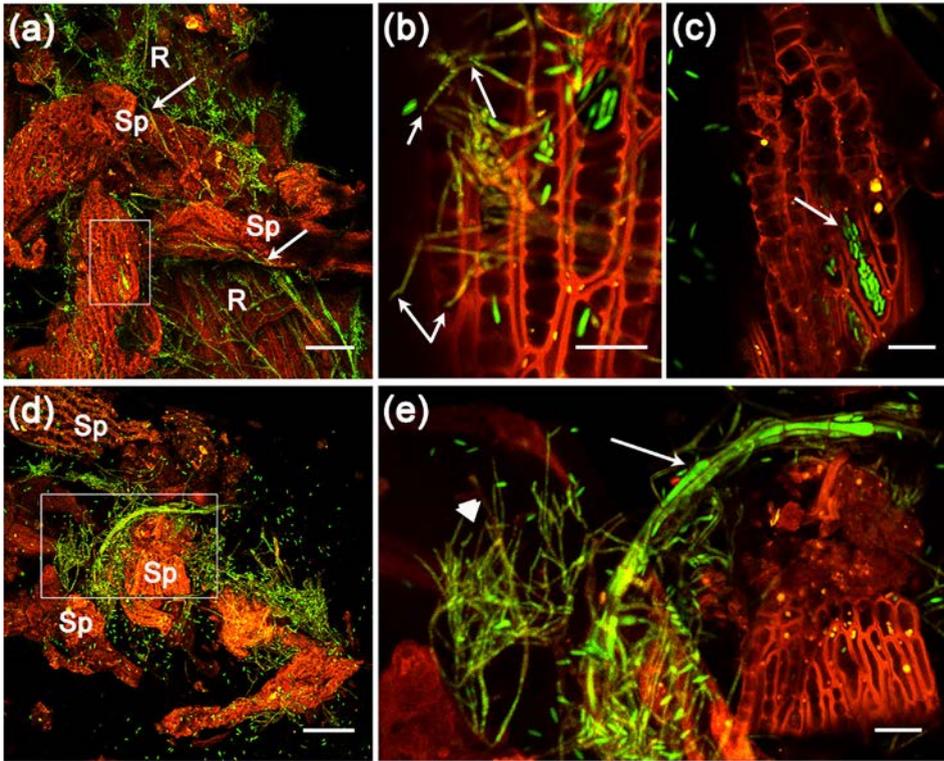


Figura 49. Análisis de la rizosfera y de las raíces de *Pinus radiata*, tras la inoculación del sustrato de crecimiento de las plantas con una cepa de *Fusarium circinatum* que expresa en su citoplasma la proteína verde fluorescente (GFP). (a) Raíz (R) cubierta de partículas de turba, constituida por hojas de *Sphagnum* (Sp), 7 días después de la inoculación (ddi). Nótese la evidente continuidad en el crecimiento de algunas hifas entre las partículas del suelo y la superficie de la raíz (indicado con flechas). (b) Las hifas, conidios y conidióforos (flechas) están dentro de las células hialinas de las hojas de *Sphagnum*, 7 ddi. (c) Aumento de la sección marcada con un cuadro en la Fig. 49(a). Se observan abundantes microconidios atrapados en una única célula hialina (flecha). (d) Se muestra el denso crecimiento micelial y los abundantes microconidios desarrollados sobre la turba *Sphagnum* (Sp), 14 ddi. (e) Ampliación de la sección marcada en la Fig. 49(d) donde se observan un conidióforo ramificado (punta de flecha) y un cordón micelial (flecha) de *F. circinatum*. Barras: (a, d) 100 μm ; (b, c, e) 25 μm . R, raíz; Sp, *Sphagnum*.

3.2.1. LLEGADA DEL INÓCULO AL SISTEMA RADICULAR DE LA PLANTA.

Transcurridos 7 y 14 días desde la inoculación, se analizaron las partículas de sustrato, constituido fundamentalmente por hojas de *Sphagnum sp.* muertas, que quedaron adheridas a las raicillas de *P. radiata*. El análisis mostró, ya desde la primera visualización (7ddi), la presencia de micelio patógeno activo, es decir, en fase de desarrollo sobre dicho sustrato (Fig. 49a). Es especialmente llamativo el hecho de que dentro de las células hialinas de las hojas de *Sphagnum*, que están vacías de protoplasma, era frecuente encontrar hifas esporulantes del patógeno (flechas en Fig. 49b), así como abundantes microconidios llenando estas cavidades (Fig. 49c). A los 14 ddi, se detectó un mayor número de microconidios de *F. circinatum* en la rizosfera (Fig. 49d), así como conidióforos ramificados sobre las partículas de turba (punta de flecha en la Fig. 49e). En esta fase, lo más destacable es la presencia de cordones miceliales formados por unas pocas hifas de *F. circinatum* compactamente agrupadas en paralelo (flecha en la Fig. 49e). Algunos de estos cordones se encontraban conectando varias partículas de sustrato (Fig. 49d), mientras que otros conectaban el sustrato con la superficie de las raicillas (Fig. 49a).

3.2.2. ADHESIÓN A LA RAÍZ DE LA PLANTA HUÉSPED.

A lo largo del ensayo de infección se advirtió que el grado de fijación de *F. circinatum* a la superficie radicular fue *in crescendo* desde el establecimiento inicial de la interacción hasta los estadios finales de la infección, en los que dejaron de observarse estructuras metabólicamente activas del patógeno asociadas a la raíz.

A los 7 ddi se detectó que, en aproximadamente el 65% de las muestras analizadas, *F. circinatum* ya había alcanzado la superficie radicular del pino aunque el grado de unión entre ambos organismos todavía era laxo. En estas primeras muestras, los cordones miceliales de *F. circinatum* aparecían asociados de una forma un tanto holgada a la superficie de las raicillas (Figs. 49a y flechas en 50a). Sin embargo, una semana más tarde (14 ddi) las hifas aparecían adheridas a la superficie

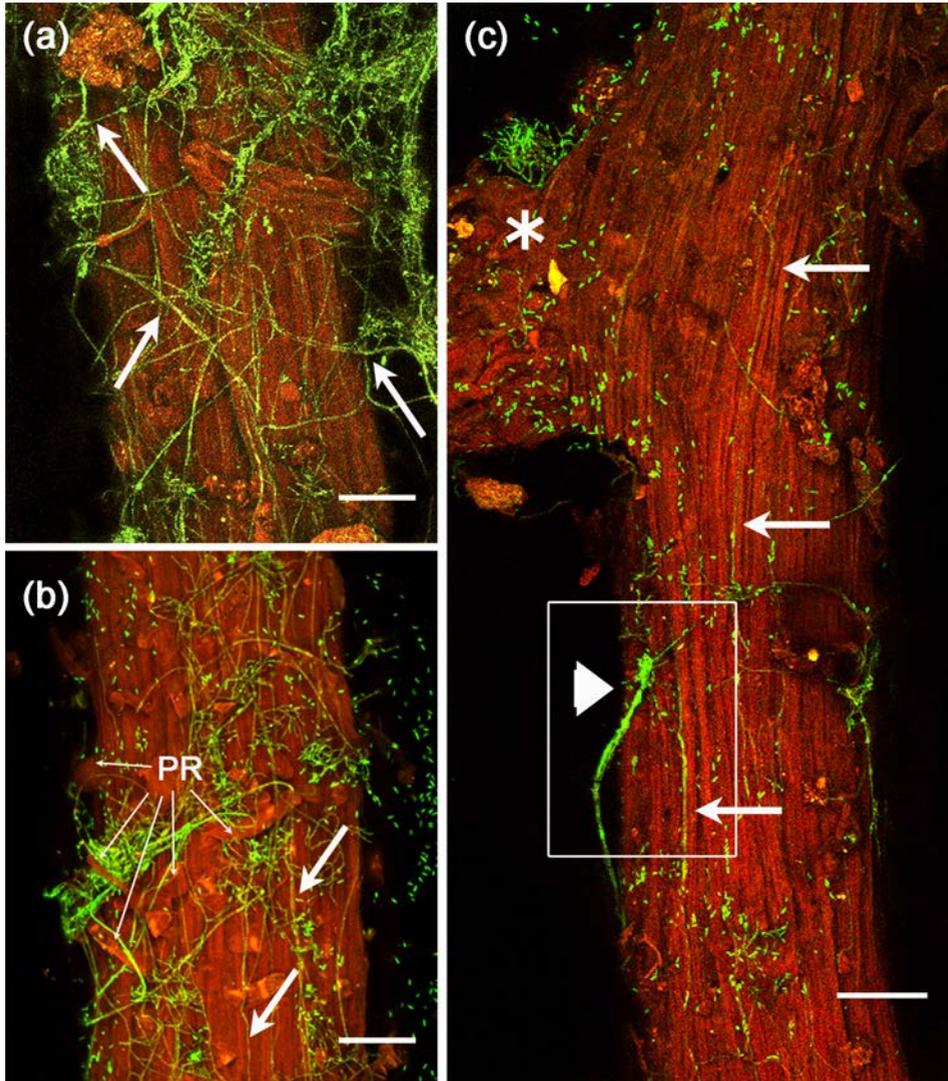


Figura 50. Estadios iniciales en la colonización de la superficie radical de *Pinus radiata* por *Fusarium circinatum*. (a) Raicilla de pino cubierta por las hifas del patógeno. Se observan cordones miceliales adheridos de forma holgada a la superficie radicular (flechas), 7 días después de la inoculación (ddi) del sustrato de crecimiento de las plantas. (b) A los 14 ddi, la adhesión del patógeno a la superficie de la raíz es mayor. Se observan hifas entrelazadas con los pelos de la raíz (PR), algunas hifas corredoras sobre la superficie radicular (indicadas con flechas) y abundantes microconidios. (c) Distintas estructuras fúngicas asociadas a la superficie de una misma raíz, 14 ddi: un cordón micelial (punta de flecha), varias hifas corredoras extracelulares (flechas) y un conidióforo anclado al punto de emergencia de una raicilla lateral (asterisco). Barras de escala: 100 µm. PR, pelos radiculares.

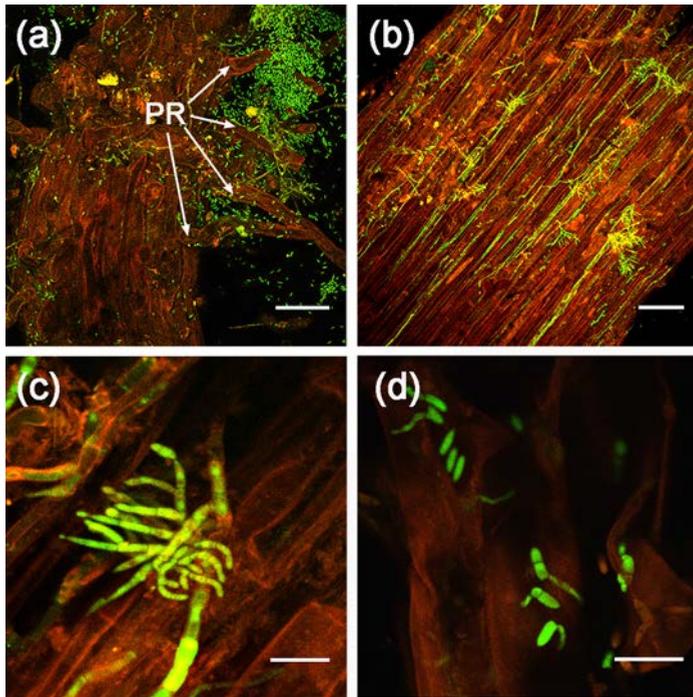


Figura 51. Estructuras relacionadas con la reproducción asexual de *Fusarium circinatum* en la superficie de las raíces de *Pinus radiata*. (a) Abundantes microconidios de *F. circinatum* entremezclados con los pelos radiculares (PR) de *P. radiata*, 28 días después de la inoculación (ddi) del sustrato de crecimiento de las plantas. Los PR ofrecen al patógeno una mayor superficie de fijación al hospedador. (b) Hay numerosos conidióforos ramificados (flechas), anclados a la raíz, cuyas filídes están orientadas hacia la rizosfera, 42 ddi. Nótese como, las hifas patógenas, dispuestas en paralelo, han crecido siguiendo el eje principal de la raíz. (c) Detalle de un conidióforo ramificado, 42 ddi. Se producen nuevos conidios sobre el tejido infectado. (d) Microconidios germinando en la superficie radical, 42 ddi. Barras de escala: (a, b) 100 μm ; (c, d) 20 μm . PR, pelos radiculares.

radical, en concreto, se observaron hifas corredoras (*runner hyphae*) dispuestas a lo largo de las depresiones que se forman entre células epidérmicas adyacentes (flechas en Fig. 50c); además, se pudieron apreciar conidióforos anclados a las zonas de emergencia de nuevas raíces laterales (asterisco en Fig. 50c) y también el extremo final de un cordón micelial hinchado ofreciendo el aspecto de un órgano de fijación que recordaba a un apresorio (punta de flecha en Fig. 50c).

A partir de los 14 ddi, el número de microconidios visualizados en la rizosfera se vio incrementado en gran medida (Figs. 49a y 50a *vs.* Figs. 49d y 50b,c). El aumento en el número de conidios fue parejo al aumento en el número de conidióforos observados, registrándose la mayor producción en torno a los 28-42 ddi. Es de destacar la presencia de abundantes conidios atrapados entre los pelos radiculares de raíces que no presentaban claros síntomas de infección (Fig. 51a), así como abundantes conidióforos fuertemente anclados a la capa epidérmica en raíces densamente colonizadas por el patógeno (Fig. 51b,c). A pesar de su abundancia, rara vez se encontraron microconidios germinando sobre la superficie radical (Fig. 51d). Hacia el final del ensayo (a los 56 y 84 ddi) las raíces examinadas manifestaron claros síntomas de necrosis, pero no se apreciaron en su superficie estructuras fúngicas que expresaran la fluorescencia de la GFP (Fig. 52).

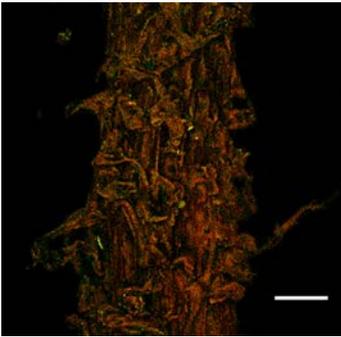


Figura 52. Raíz necrótica de *Pinus radiata*. En la superficie de esta raicilla, muestreada 56 días después de la inoculación con la cepa transformada de *Fusarium circinatum* que expresa el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), no se aprecia ninguna estructura fúngica metabólicamente activa. Barra de escala: 100 μ m.

3.2.3. PENETRACIÓN Y COLONIZACIÓN DE LA RAÍZ.

Antes de que el patógeno pueda penetrar y colonizar a la planta huésped, debe unirse a su superficie. En este sentido, los cordones miceliales al alcanzar las raíces de los pinos se desestructuraban de tal forma que las hifas que lo constituyen crecían hacia la superficie radical (flechas en la Fig. 53a). Una vez allí, las hifas desarrollaban alteraciones morfológicas que parecían constituir el mecanismo de penetración. Así, la penetración directa en las células epidérmicas de la raíz podría ocurrir por medio de hifas más finas, de menor diámetro (flecha en Fig. 53c),

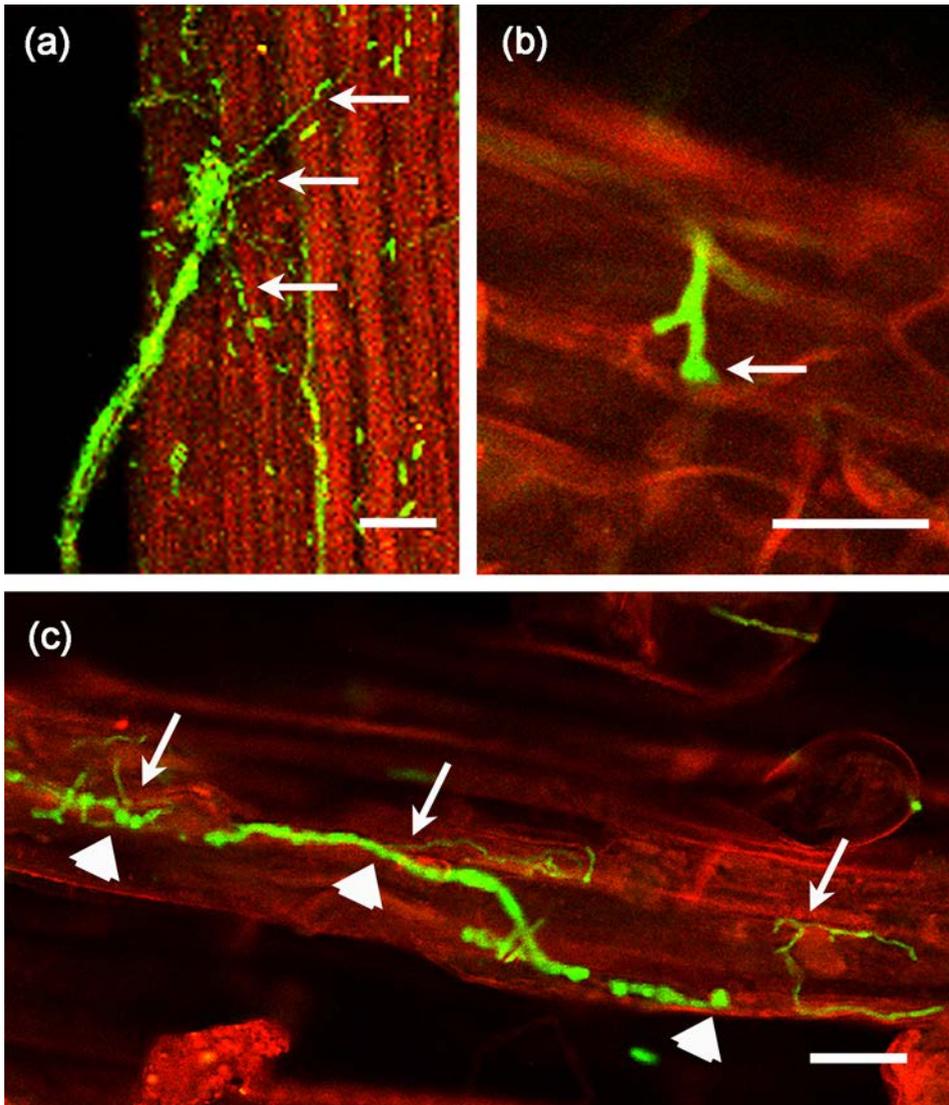


Figura 53. Fenómenos relacionados con la penetración de *Fusarium circinatum* en las raíces de *Pinus radiata*, 14 días después de su inoculación en el sustrato de crecimiento de las plantas. (a) La imagen muestra una ampliación de la sección marcada en la Fig. 50(c) y permite distinguir cómo desde el ápice hinchado de un cordón micelial surgen hifas más delgadas que crecen hacia la superficie de la raíz (flechas). (b) La flecha señala el extremo abultado de la corta ramificación de una hifa observada en la capa epidérmica. (c) Se observan hifas con diferentes formas y diámetros en la epidermis de la raíz. Las flechas indican hifas finas que probablemente surjan de la base de las estructuras hinchadas que se observan en las hifas bulbosas (punta de flecha). Barras de escala: 30 μm .

que emergían desde hifas bulbosas (punta de flecha en Fig. 53c). En el punto de penetración se encontraron estructuras que se asemejaban mucho a un hifopodio (Fig. 53b), si entendemos como tal al extremo abultado de una pequeña ramificación en la hifa. Por otro lado, la penetración al interior de la raíz también parecía ocurrir a través de los pelos radiculares puesto que, en las primeras etapas de la infección, se encontraron microconidios íntimamente unidos a los pelos radiculares (Fig. 54a) e hifas creciendo alrededor y dentro de ellos (Fig. 54b,c).

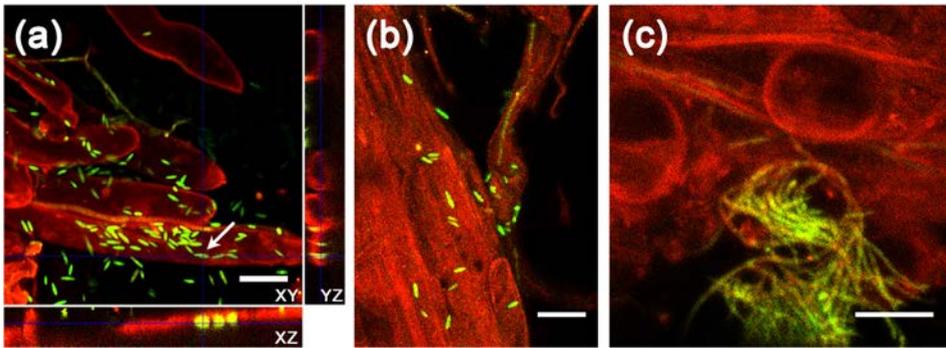


Figura 54. Penetración de *Fusarium circinatum* en las raíces de *Pinus radiata*, a través de los pelos radiculares, 14 días después de su inoculación en el sustrato de crecimiento de las plantas. (a) Esta imagen es el resultado de la proyección ortogonal de 70 secciones ópticas del plano XY adquiridas en serie a lo largo 25 μm en el eje Z. Por debajo y a la derecha de la imagen central está representada la proyección de los planos XZ e YZ respectivamente, lo cual permite la visualización del grosor de la muestra. Puede comprobarse que los microconidios están estrechamente adheridos a los pelos radiculares. (b) La flecha señala una hifa de *F. circinatum* creciendo por dentro y a lo largo de un pelo radicular. (c) La imagen exhibe la sección transversal óptica de tres pelos radiculares, uno de ellos completamente lleno por micelio del patógeno. Barras de escala: 30 μm .

Fusarium circinatum fue capaz de crecer y multiplicarse dentro de las raíces infectadas. La observación microscópica de raíces con signos macroscópicos de infección fúngica, es decir en una etapa avanzada de la infección a los 28 ddi (Fig. 55a), reveló que el patógeno se había extendido con éxito por todos los tejidos de la raíz (Fig. 55b,c).

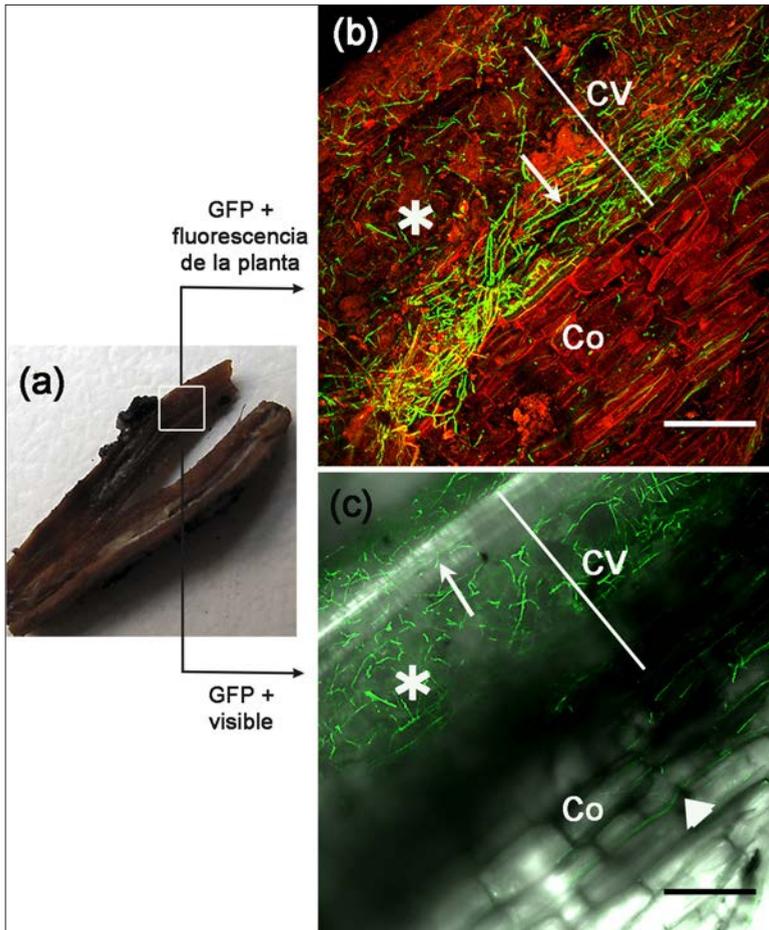


Figura 55. Colonización de la raíz de *Pinus radiata* por *Fusarium circinatum*. (a) Vista macroscópica del interior de una raíz lateral en una etapa avanzada de la infección, recogida a los 28 días después de la inoculación (ddi). (b,c) Representan la sección marcada en la figura 55a. La imagen (b) muestra la proyección en el plano XY de 40 secciones ópticas adquiridas con un intervalo-Z de 2 μm ($\sim 80 \mu\text{m}$ de dimensión Z) y presenta, en verde, la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) y, en rojo, el canal donde se registró la auto fluorescencia de los tejidos vegetales. Se pueden observar hifas del patógeno dispuestas en paralelo (flecha) a lo largo del eje principal del cilindro vascular (CV) y también hifas, sin ninguna orientación particular (asterisco), ocupando el parénquima que envuelve el cilindro vascular. La imagen (c) es la proyección en el plano XY de las 15 secciones ópticas más externas (30 μm de grosor) correspondientes a la misma serie que se representa en la figura 55b. En este caso se muestra en verde la fluorescencia verde de la GFP superpuesta al canal de luz transmitida. Aquí se pueden apreciar, por un lado, los engrosamientos helicoidales en las paredes de las traqueidas (señalado con una flecha) del cilindro vascular y, por otro lado, la presencia en el córtex (Co) de micelio patógeno intercelular (indicado con una punta de flecha). Barras de escala: 150 μm ; Co, córtex; CV, cilindro vascular.

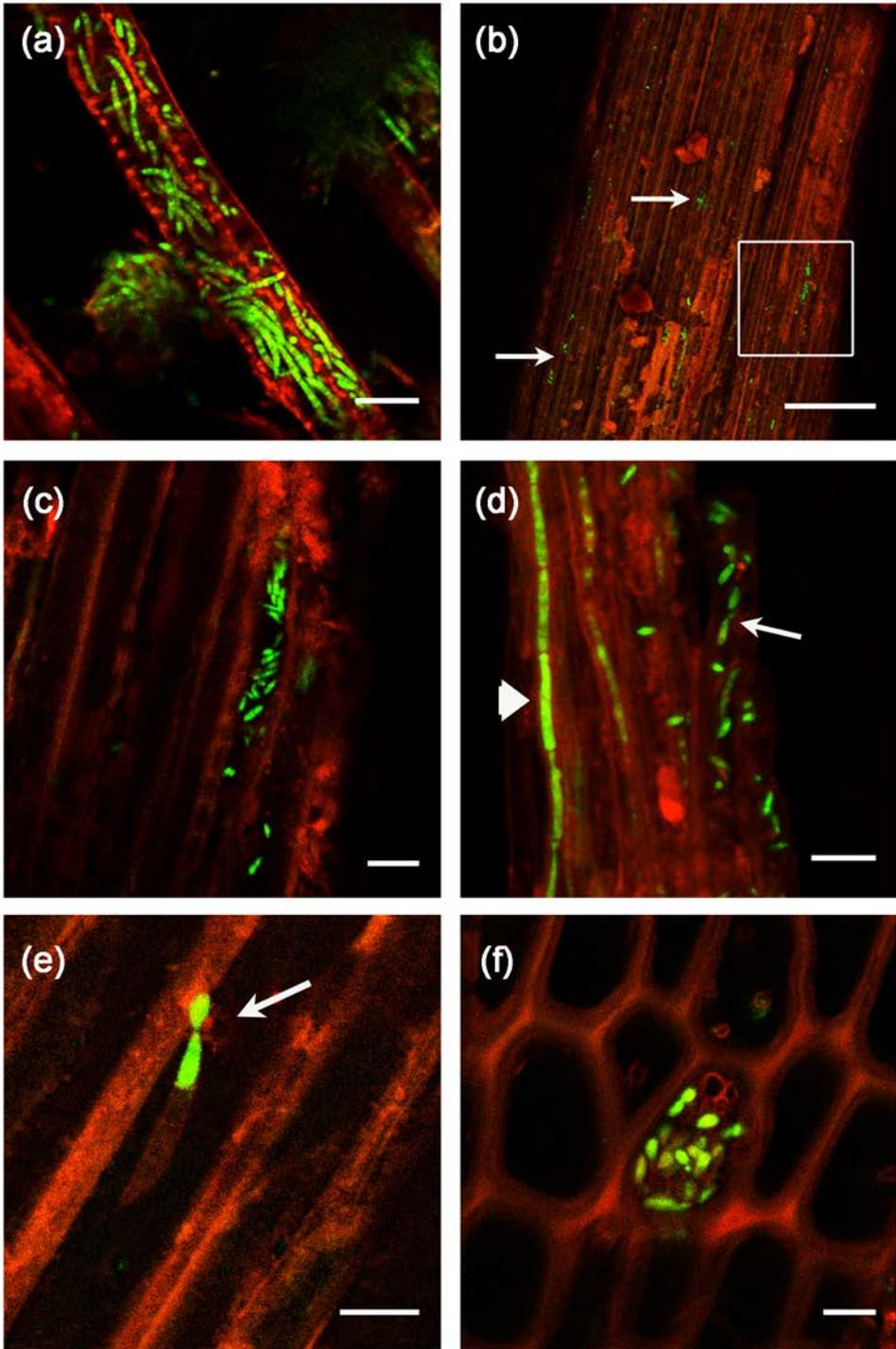


Figura 56. Invasión del tejido vascular de la raíz de *Pinus radiata* por *Fusarium circinatum*. (a) Los macroconidios llenan el lumen de las traqueidas en una raicilla a los 28 días después de la inoculación (ddi) del sustrato de crecimiento de las plantas. (b) Vista general del cilindro vascular de una raicilla. Las flechas indican algunos grupos dispersos de microconidios localizados en el interior de las traqueidas a los 28 ddi. (c) Ampliación del cuadro marcado en la figura 56b que muestra la disección óptica de varias traqueidas axiales en su eje longitudinal. En el interior de una traqueida se ve un grupo de microconidios agrupados hacia el cabo o extremo puntiagudo de la misma. Nótese las punteaduras que comunican las traqueidas por sus paredes radiales. (d) La flecha indica el tubo germinal de un microconidio dentro de una traqueida en la raíz a los 28 ddi. La punta de flecha señala una hifa individual dispuesta linealmente en la que se aprecian pronunciadas constricciones. (e) La imagen muestra la sección óptica longitudinal de un grupo de traqueidas en una raicilla a los 56 ddi. En el interior de una de las traqueidas puede apreciarse un macroconidio germinando. Nótese que el contenido citoplasmático (en verde, debido a la acumulación de la GFP) del macroconidio está siendo traspasado a la traqueida lindante a través de una punteadura (flecha). (f) Corte transversal del cuello de la raíz de un pino a los 42 ddi. Se puede observar el interior de una traqueida repleta de esporas del patógeno. Barras de escala: (a, c, d) 20 μm ; (b) 150 μm ; (h, i) 10 μm .

En el córtex de la raíz, se detectaron hifas del patógeno a lo largo de los espacios intercelulares (punta de flecha en la Fig. 55c) del tejido parenquimático, pero también se observó la presencia de abundante micelio desorganizado en el parénquima (asterisco en la Fig. 55b,c). Sin embargo, la zona de la raíz donde se registró la mayor cantidad de micelio patógeno fue el cilindro vascular (flecha en la Fig. 55b), llegando incluso al colapso de las traqueidas, taponadas tanto con micelio como con esporas (micro y macroconidios) del hongo (Fig. 56a). Es de destacar que, en aquellas raíces que presentaban un menor grado de infección (Fig. 56b-d), también se descubrieron dentro de las traqueidas tanto hifas como esporas de *F. circinatum*, aisladas o en pequeños grupos. Por ejemplo, se visualizaron varios grupos de microconidios sin presencia de micelio en las proximidades (flechas en la Fig. 56b). A veces, esos microconidios aparecían estancados en el extremo truncado de las traqueidas (Fig. 56c). Se llegó incluso a distinguir claramente microconidios en proceso de germinación (flecha en la Fig. 56d), e incluso

un macroconidio (Fig. 56e) germinando hacia la traqueida adyacente a través de la punteadura en la que había quedado retenido. El análisis de los cortes realizados en el cuerpo primario de la planta mostró también la presencia de abundantes microconidios dentro de traqueidas en la región del cuello de la raíz (Fig. 56f).

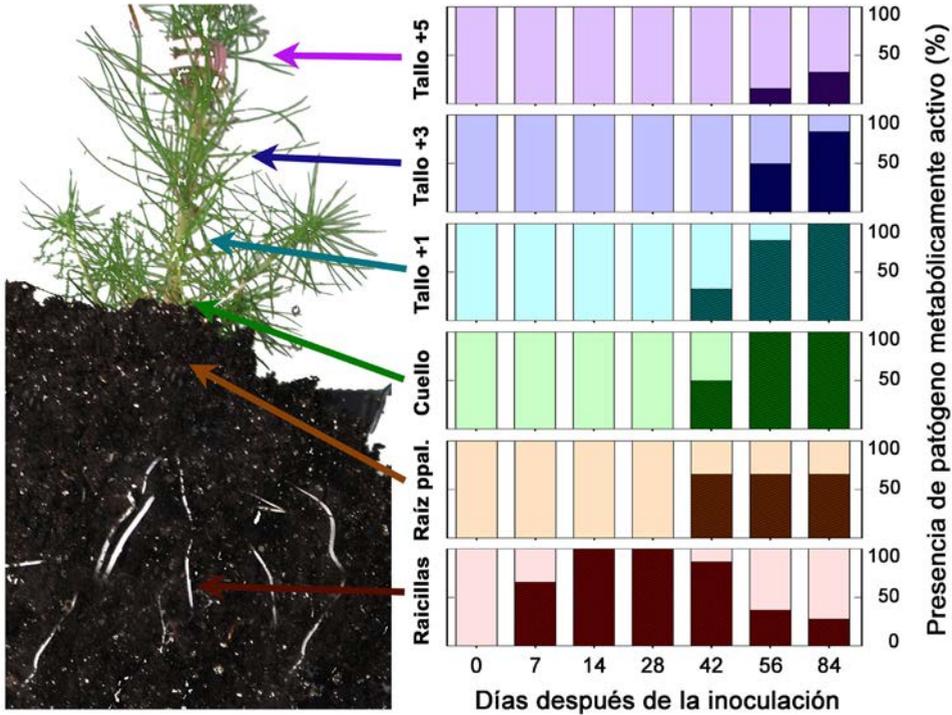


Figura 57. Representación esquemática de la secuencia temporal en que se detecta, en las distintas regiones del cuerpo de *Pinus radiata*, a la cepa de *Fusarium circinatum* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). El patrón general de la invasión de la planta está basado en la visualización mediante microscopía láser confocal de distintas secciones de tejido vegetal efectuadas a lo largo del proceso de infección. La presencia/ausencia de patógeno metabólicamente activo (que expresa la GFP) en cada una de las muestras de la planta examinadas: raicillas laterales (raicillas), raíz principal (raíz ppal.), cuello de raíz (cuello) y secciones transversales del tallo obtenidas 1 cm (tallo + 1), 3 cm (tallo + 3) y 5 cm (tallo + 5) sobre el nivel del sustrato, se calculó como un porcentaje utilizando 6 plantas por cada tiempo de estudio. Para cada sección de la planta, la barra de color representa la presencia (color oscuro) o ausencia (color claro) de micelio patógeno metabólicamente activo.

3.2.4. INVASIÓN Y COLONIZACIÓN DE LA RAÍZ PRINCIPAL, EL CUELLO DE LA RAÍZ Y EL TALLO DE *PINUS RADIATA*.

La presencia del patógeno no se advirtió en ninguna de las secciones transversales obtenidas del cuerpo primario de la planta, hasta transcurridos 42 ddi. En ese momento, se encontró que *F. circinatum* ya había invadido la raíz principal en 4 de las 6 plantas examinadas. En las muestras procedentes de esas 6 plantas, se detectó además la presencia del hongo en 3 de las 6 secciones del cuello de la raíz y en 2 de las 6 secciones del tallo efectuadas 1 cm por encima del nivel del sustrato (Fig. 57).

La distribución del patógeno por las secciones analizadas de la raíz principal era, en general, bastante dispersa aunque hubo zonas que destacaron por la mayor concentración de micelio patógeno tales como el floema (Fig. 58a) y la red de células parenquimáticas del xilema, es decir, los radios medulares y el epitelio de los canales resiníferos (Fig. 58b,c). Merece la pena recalcar que en todas las secciones de la raíz principal que habían sido invadidas por el patógeno se observaron hifas dentro de las traqueidas del xilema primario (aquellas situadas en el núcleo de la sección). Las traqueidas del xilema primario se pueden distinguir de las del xilema secundario por su mayor diámetro y forma más redondeada (Fig. 58c). También se observó presencia patógena dentro de las traqueidas que unían el sistema vascular de la raíz principal con las raíces secundarias (flechas en la Fig. 58d) y en el interior de los conductos resiníferos del xilema (Fig. 58e). Las células epiteliales de dichos conductos emitieron una intensa auto fluorescencia amarilla (530-600 nm) cuando se excitó la muestra con luz azul (488 nm), lo cual indicaba un estado activado de los mismos. Esta característica no se observó en las plantas control, inoculadas de forma simulada. Además, en los controles se contó un menor número de conductos resiníferos y no se observó hipertrofia en las células del epitelio que revisten los canales secretores (Fig. 58e *vs.* Fig. 58f).

A los 56 ddi, se observó que el patógeno había invadido el cuello de la raíz en todas las plantas analizadas y, en 5 de esas 6 plantas, había ascendido por el tallo 1 cm por encima de la línea del sustrato (Fig. 57).

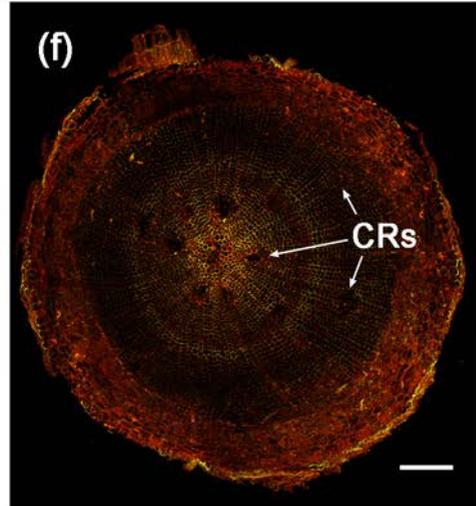
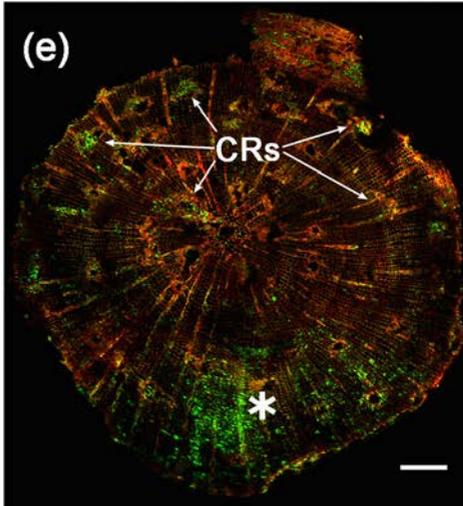
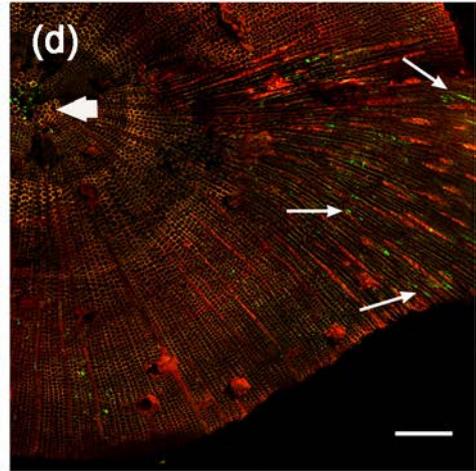
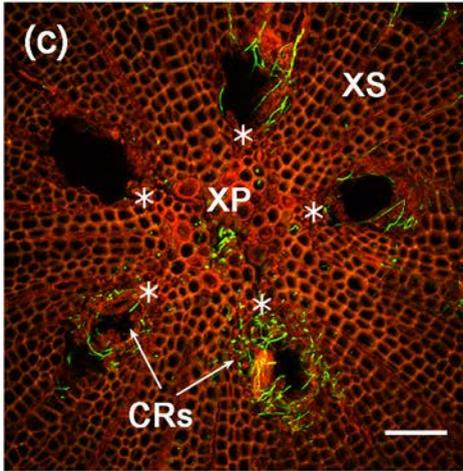
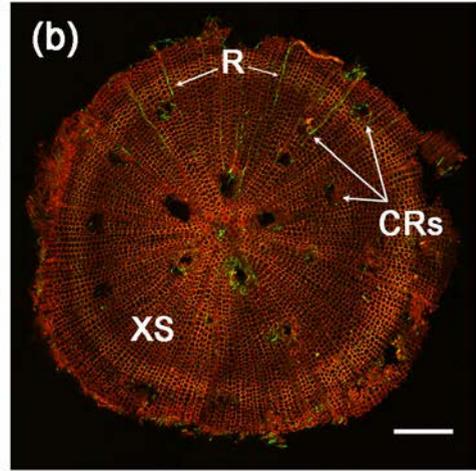
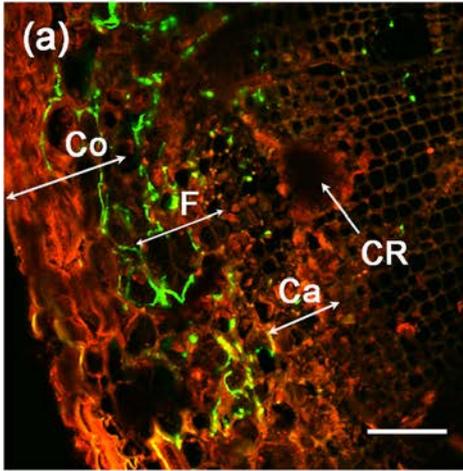


Figura 58. Colonización de la raíz principal de *Pinus radiata* por *Fusarium circinatum*. (a) Región más externa de la raíz principal, 42 días después de la inoculación (ddi). Se observa presencia patógena principalmente en el floema (F), pero también en los espacios intercelulares del córtex (Co) y en la zona cambial (Ca). Nótese además, el conducto resinífero (CR) recientemente desarrollado en el xilema. (b) El patógeno se encuentra dispersamente distribuido por la sección de esta raíz a los 56 ddi. Se observa presencia del patógeno en el xilema primario, localizado en el núcleo central de la sección, y también en los radios medulares (R) y los conductos resiníferos (CR) del xilema secundario (XS). (c) Aumento de la región central de la figura 58b. El xilema primario (XP) se puede distinguir del xilema secundario (XS), además de por su localización en el núcleo central de la raíz, por la mayor dimensión de sus traqueidas. Destacan 5 conductos resiníferos (CRs) asociados a los 5 polos del xilema primario (indicados por 5 asteriscos) presentes en esta raíz. El micelio de *F. circinatum* se ha desarrollado tanto en el XP como en los grandes CRs. (d) Corte transversal de una raíz principal a los 56 ddi. A la derecha de la imagen puede verse una parte de la raíz secundaria que emerge de la raíz principal. Se puede distinguir al patógeno dentro de las traqueidas (flechas) de la raíz secundaria y también en el xilema primario de la raíz principal (punta de flecha). (e) Sección transversal de la raíz principal de una plántula con las acículas marchitas a los 42 ddi. El asterisco indica una zona del xilema cuyas traqueidas han sido intensamente colonizada por *F. circinatum*. Nótese la gran cantidad de conductos resiníferos activos (CRs) que hay por toda la sección. Consideramos CRs activos a aquellos que presentan una intensa auto fluorescencia (530 a 600 nm) cuando se excitan con luz azul (488 nm). (f) Sección transversal de la raíz principal de una plántula control, 42 días después del simulacro de infección. Téngase en cuenta el pequeño número de conductos resiníferos (CRs) dispersos por el xilema y la ausencia total de CRs activos. Barras de escala: (a, c) 100 μm ; (b, d, e, f) 300 μm .

Cabe destacar que, en aquellas plántulas en las que la invasión patógena progresó hacia arriba por el tallo, se observó con frecuencia que sus raíces primarias quedaban libres de patógeno (Fig. 59a *vs.* Fig. 59b,c y la Fig. 60a *vs.* Fig. 60b). En lo que respecta a los tejidos que, dentro de la anatomía del cuello de raíz y del tallo, fueron colonizados por el patógeno se comprobó que éste ocupaba los tejidos en localizaciones similares a las previamente colonizadas en la raíz principal. Por lo tanto, se encontró al patógeno en el núcleo de las secciones visualizadas, en el xilema secundario (tanto disperso dentro de las traqueidas como en la red de células parenquimáticas) y también en los tejidos de la región externa (el córtex, el floema y la zona cambial). Típicamente, el floema apareció completamente colapsado por hifas fúngicas (Fig. 60b).

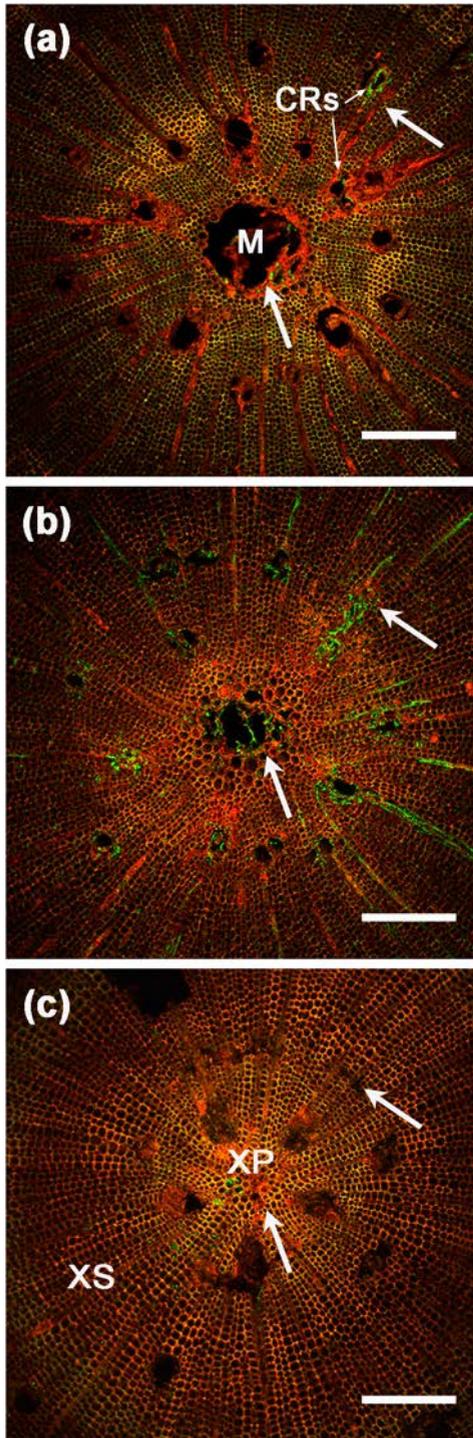


Figura 59. Progresión vertical de la infección del cuerpo primario de *Pinus radiata*, desde la raíz principal hacia el tallo. Las imágenes son tres secciones transversales que provienen de la misma planta (la cual presentaba su ápice caído) efectuadas a diferentes alturas: (a) muestra de una sección del tallo tomada 1 cm por encima del nivel del sustrato, (b) muestra del cuello de la raíz y (c) muestra de la raíz principal. Las flechas indican posiciones longitudinales equivalentes en las tres imágenes. En la sección proveniente de la raíz principal (Fig. 59c), sólo se observa al patógeno en el interior de algunas traqueidas del xilema primario (XP) y del xilema secundario (XS). Sin embargo, la sección del cuello de la raíz (Fig. 59b) estaba ampliamente colonizada por el patógeno y se pudo comprobar que, 1 cm más arriba (Fig. 59a), éste había llegado a alcanzar la médula (M) y el interior de algunos conductos resiníferos (CRs). Barras de escala: 300 μ m. CRs, conductos resiníferos; M, médula; XP, xilema primario; XS, xilema secundario.

Al finalizar el ensayo, a los 84 ddi, se constató la presencia del patógeno 1 cm por encima del nivel del sustrato en las 6 plantas analizadas y, en dos de ellas, *F. circinatum* llegó a alcanzar los 5 cm por encima del nivel del sustrato (Fig. 57).

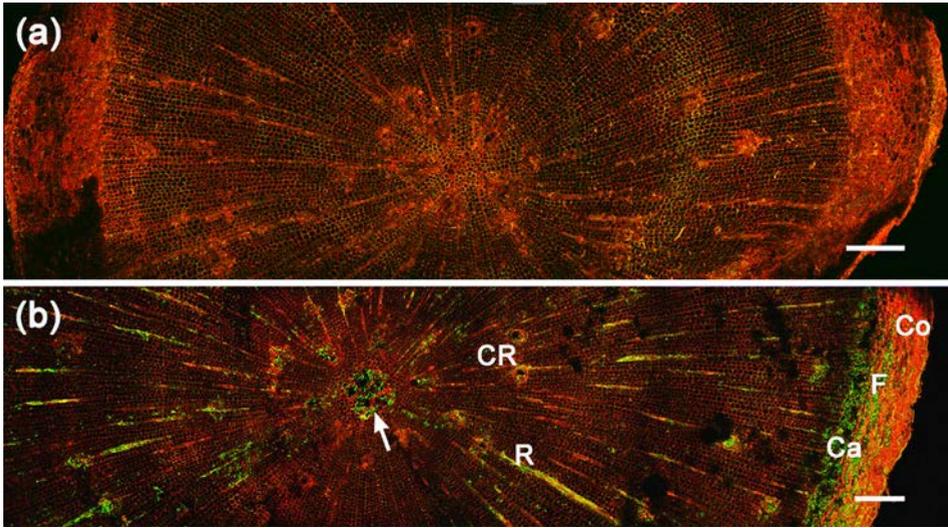


Figura 60. Colonización del cuello de la raíz de *Pinus radiata* por *Fusarium circinatum*, 56 días después de la inoculación (ddi). Se muestran dos secciones transversales de la misma planta (el follaje de la cual estaba marchito) realizadas a diferentes alturas: la imagen (a) muestra la raíz principal con poco o ningún signo de patógeno metabólicamente activo a lo largo de toda la sección; la imagen (b) muestra el cuello de la raíz, con abundante presencia del hongo en el córtex (Co), el floema (F), la zona cambial (Ca), los radios medulares (R), los conductos resiníferos (CRs) y en el núcleo central de la sección (indicado con una flecha) que está constituido por tejido parenquimático. Nótese la dispersa distribución del hongo por todo el cilindro vascular. Barras de escala: 300 μm . Ca, zona cambial; Co, córtex; CRs, conductos resiníferos; F, floema; M, médula; R, radio medular.

3.2.5. OBSTRUCCIÓN DEL XILEMA DE LOS PINOS

A lo largo de todas las visualizaciones realizadas con el microscopio confocal, se percibió que las hifas del hongo estaban delimitadas por un material que, al ser excitado por luz azul (488 nm), exhibía una intensa auto fluorescencia en el rango de 580 a 680 nm (Fig. 61a). Esto, probablemente, fuera causado por algún componente de la pared celular de las hifas dado que también estaba presente en los septos que dividen longitudinalmente el largo de las hifas, llegándose incluso a apreciar en el poro central del septo (puntas de flecha en la Fig. 61a). Así que la fluorescencia verde que proviene del citoplasma de la cepa transformada

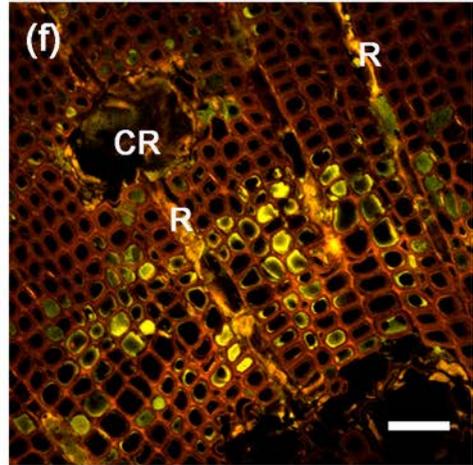
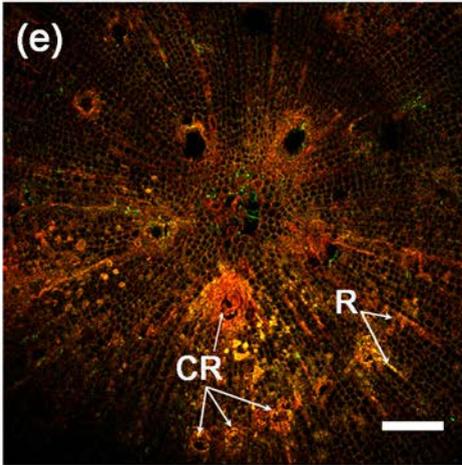
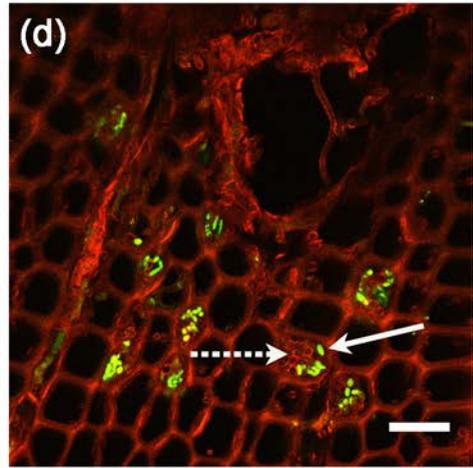
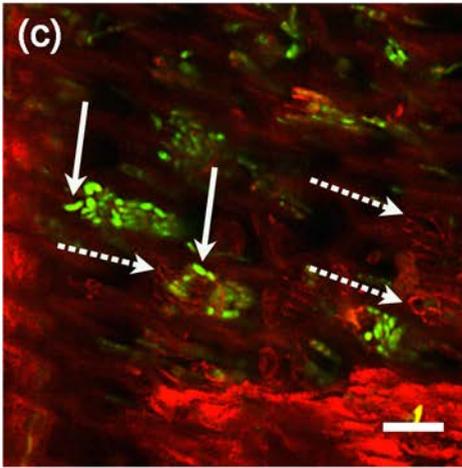
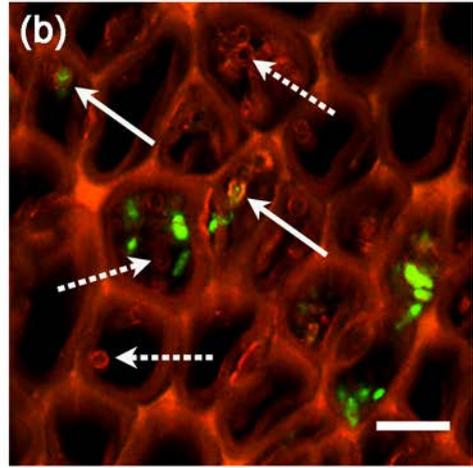
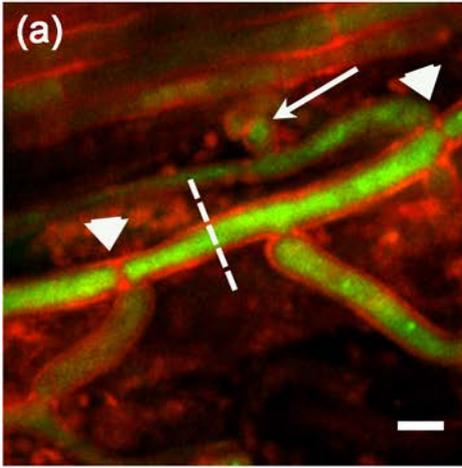


Figura 61. Fenómenos relacionados con la obstrucción del xilema de *Pinus radiata* después de haber inoculado su sustrato de crecimiento con una cepa de *Fusarium circinatum* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en su citoplasma. (a) Sección óptica longitudinal de una hifa delimitada por un material que emite una intensa auto fluorescencia roja (580-680 nm) cuando se excita con luz azul (488 nm). Dicho material puede distinguirse claramente en los septos fúngicos y en sus poros centrales (puntas de flecha). La línea discontinua marca la sección de una hifa típica de aproximadamente 5 µm de diámetro. (b) Se puede observar el lumen de algunas traqueidas lleno de hifas metabólicamente activas (GFP+, flechas continuas) y de hifas metabólicamente inactivas (GFP-, flechas discontinuas) en el cuello de la raíz a los 84 ddi. (c,d) Secciones del cuello de la raíz de dos plantas diferentes, a los 42 ddi, las cuales habían mostrado recientemente síntomas de marchitamiento en las acículas y la caída del brote apical respectivamente. En ambas imágenes las flechas continuas indican microconidios dentro de las traqueidas y las flechas discontinuas señalan la pared celular de las células conidiógenas tras la liberación de los microconidios al lumen de las traqueidas. (e) Sección transversal del cuello de la raíz tomada 56 ddi. Se observa la intensa auto fluorescencia (530 a 600 nm) al excitarse la muestra con luz azul (488 nm) en torno a algunos conductos resiníferos (RD) y radios medulares (R) en el xilema. (f) Sección transversal del tallo tomada 84 ddi. Se puede observar que el lumen de algunas traqueidas, localizadas en las inmediaciones de un conducto resinífero (CR), está ocupado por un material que emite una brillante fluorescencia. Barras de escala: (a) 5 µm; (b) 15 µm; (c) 20 µm; (d) 30 µm; (e) a 200 µm; (f) 50 µm. CR, conducto resinífero; R, radio medular.

de *F. circinatum* se pudo observar claramente rodeada por la pared celular de la hifa en las secciones ópticas, tanto longitudinales (Fig. 61a) como transversales (flechas continuas en la Fig. 61a,b), realizadas con el microscopio confocal. Cuando se observaron este tipo de estructuras, se asumieron como hifas activas del hongo, es decir hifas en las cuales se expresa la GFP porque el metabolismo del hongo está activo. Sin embargo, también se encontraron habitualmente hifas en las que no se observaba la fluorescencia verde de la GFP (hifas inactivas), las cuales pudieron identificarse únicamente por la fluorescencia roja de su característica pared (flechas discontinuas en la Fig. 61b).

Las hifas inactivas de *F. circinatum*, a pesar de que pudieron llegar a verse en cualquiera de las regiones de la planta, se distinguieron con mayor frecuencia dentro de las traqueidas de las secciones provenientes del cuello de la raíz (Figs. 56f, 61b,c,d). En muchos casos, este tipo

de estructuras parecían estar asociadas con el proceso de conidiogénesis, de tal modo que lo que se percibía como una hifa en la que no se detectaba la expresión de la GFP podría ser la sección óptica de una hifa hueca (flechas discontinuas en la Fig. 61c,d) perteneciente a lo que queda de las células conidiógenas después de haber liberado las esporas (flechas continuas en la Fig. 61c,d) en el lumen de las traqueidas. A medida que se intensificaba la colonización del sistema vascular, era frecuente observar hifas tanto activas como inactivas llenando el lumen de las traqueidas en el xilema de *P. radiata*.

Otra observación destacable, fue que la excitación de las muestras con luz azul (488 nm) reveló una brillante auto fluorescencia amarilla (530-600 nm) en el xilema cerca de algunos conductos resiníferos y de los radios medulares asociados a dichos conductos (Fig. 61e). Este material auto fluorescente con forma de burbuja (Fig. 61f) se localizó relleno el lumen de algunas traqueidas en aquellas muestras que mostraban alteraciones muy evidentes del sistema secretor de canales resiníferos y por lo tanto, la fluorescencia se atribuyó a la resina recién sintetizada.

3.3 ARQUITECTURA DEL SISTEMA RADICAL.

Finalmente, con respecto al aspecto del sistema radical, la evaluación visual durante el procesamiento de las muestras reveló que algunas de las raíces de los pinos inoculados con *F. circinatum* presentaban lesiones oscuras y necróticas en la corteza, mientras que otras raíces, en las que se evidenciaban sus puntas de color blanco, aparecían sanas y activas.

La determinación de los parámetros biométricos relacionados con la superficie y el grado de ramificación de la raíz mostraron la existencia de daños significativos en las raíces de los pinos cuyo sustrato fue inoculado con *F. circinatum*. Así, al final del ensayo de infección (es

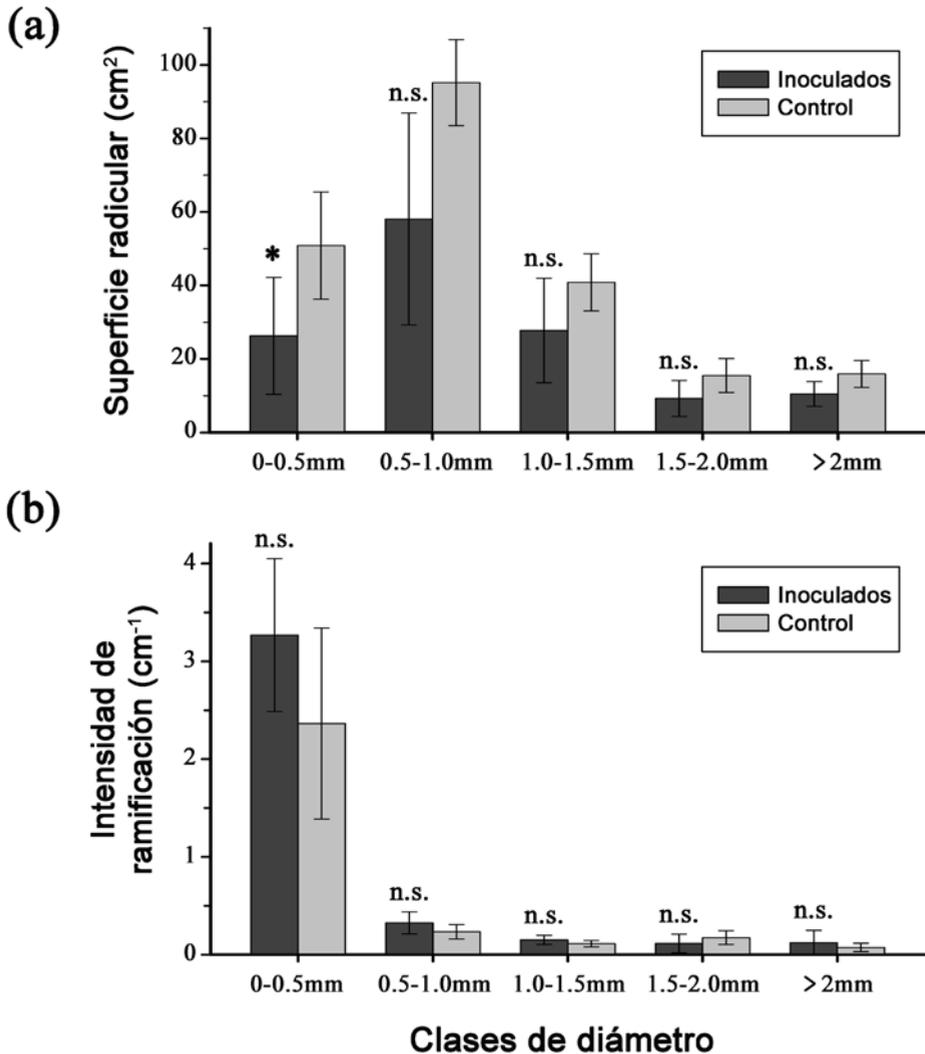


Figura 62. Arquitectura del sistema radical de plántulas de 1 año de edad de *Pinus radiata*. Se determinó (a) la superficie radical y (b) la intensidad de ramificación (número de ápices de raíz por longitud, cm^{-1}) a los 84 días después de la inoculación del sustrato de crecimiento con *Fusarium circinatum*. Las barras de error son la desviación estándar obtenida de las medidas de 5 plántulas individuales. (*) indica una diferencia significativa en comparación con el tratamiento control en la misma clase de diámetro; (ns) indica ausencia de diferencias significativas (t -test, $p < 0,05$).

decir, a los 84 ddi), la superficie radical total estimada para las plantas inoculadas fue de $131,87 \pm 62,58 \text{ cm}^2$, frente a $218,34 \pm 34,13 \text{ cm}^2$ estimado para las plantas control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (test *t-Student*, $P < 0,05$) y representó una disminución del 39,6% en el área total de la superficie radical de las plántulas inoculadas.

Teniendo en cuenta las clases diamétricas en las que se agruparon las raíces (los distintos intervalos de diámetros se trataron como una unidad) se encontró, sin embargo, que esta diferencia solo fue estadísticamente significativa en las raíces más finas, aquellas con un diámetro inferior a 0,5 mm (Fig. 62a). Merece la pena subrayar que fueron precisamente las raíces más finas las que presentaron la intensidad de ramificación más alta (número de puntas por unidad de longitud de la raíz) tanto para las plantas inoculadas como para los controles (Fig. 62b). Además, la intensidad de ramificación fue mayor en las raíces de los pinos inoculados que en las raíces de los pinos control, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa para ninguna de las clases de diámetro consideradas.

DISCUSIÓN

5



Este trabajo se ha centrado en el estudio de la interacción compatible que tiene lugar entre el patógeno *F. circinatum* y su hospedador natural *P. radiata*, utilizando para ello diferentes técnicas de biotecnología.

El avance de la tecnología “*DNA-transkingdom*” (transferencia horizontal de ADN entre dos organismos de diferente reino) nos ha permitido transformar genéticamente una estirpe patógena de *F. circinatum* con el gen de la proteína verde fluorescente, original de una medusa pero cuya secuencia ha sido modificada para optimizar su señal de fluorescencia en otros organismos. La acumulación de esta variante sintética de la GFP en el citoplasma del hongo, y la intensidad de su brillo, han convertido a la estirpe de *F. circinatum* Fc-GFP1, generada en este trabajo, en un excelente marcador vital de la infección que, combinado con técnicas de microscopía de alta resolución (como la CLSM) ha posibilitado la clara diferenciación entre la fluorescencia proveniente de la GFP y la auto-fluorescencia de la planta. Esto nos ha provisto de una perspectiva espacio-temporal totalmente novedosa, que nos ha permitido llevar a cabo un estudio histológico profundo y detallado de los tejidos del pino enfermos. Gracias a ello, no sólo hemos podido monitorizar el proceso de infección del patógeno *in planta*, sino que también hemos identificado signos que relacionan un patrón de fluorescencia característico con una respuesta de la planta frente al organismo invasor.

Por otra parte, la cuantificación de la biomasa fúngica *in planta* en diferentes etapas de la infección mediante qPCR es una técnica que ya ha demostrado su utilidad en el estudio de la interacción planta-patógeno, especialmente en estadios tempranos de la infección (Sánchez-Vallet y cols., 2013; Haegi y cols., 2013). Todo ello convierte a las técnicas usadas en la presente tesis en valiosas herramientas para el estudio de las interacciones planta-microorganismo en su ambiente natural.

1. GENERACIÓN DE TRANSFORMANTES GFP DE *FUSARIUM CIRCINATUM*.

La transformación mediada por *A. tumefaciens* es un buen método para el desarrollo de transformantes estables de *F. circinatum*, como lo demuestra la obtención del transformante *hph::PgpdA-sgfp*-TrpC, conseguida en este trabajo a partir de una estirpe patógena de *F. circinatum*. Este sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* ha sido el método elegido en numerosos estudios realizados con otros hongos patógenos, tanto para la identificación de genes implicados en su patogenicidad (Blaise y cols., 2007; Duyvesteijn y cols., 2005; Idnurm y cols., 2004; Meng y cols., 2007; Michielse y cols., 2005), como para estudios de la progresión de la enfermedad utilizando la GFP (Xiao y cols., 2009; Zvrin y cols., 2010; Jimenez-Díaz y cols., 2013).

En nuestro caso, la eficiencia de la transformación obtenida para *F. circinatum*, que fue de 16 transformantes por 10^5 esporas, estuvo en consonancia con la publicada por Covert y cols. (2001), también para *F. circinatum*, cuyo valor oscilaba entre 2 y 250 transformantes por 10^5 esporas.

La homogeneidad genética del transformante seleccionado para los siguientes experimentos se garantizó a partir de la obtención de un cultivo monospórico; y, al comprobarse que la integración de los genes *hph* y *sgfp* se mantuvo estable a lo largo de sucesivas generaciones, también se garantizó la estabilidad genética del nuevo fragmento integrado en el genoma de las cepas transformantes.

El transformante Fc-GFP1 de *F. circinatum* desarrollado con el objetivo de monitorizar el proceso de infección *in planta*, demostró un comportamiento fenotípico similar al del tipo silvestre:

- I. Por un lado, los datos de la tasa de crecimiento vegetativo y de la formación de conidios en un medio *in vitro* obtenidos a partir de ambas estirpes resultaron estadísticamente equiparables.
- II. Por otro lado, en lo referente a su comportamiento *in planta*, transcurridas 8 semanas de la inoculación no se encontraron diferencias significativas en el índice de progresión de la enfermedad (IPE) causado por la estirpe silvestre y la estirpe transformada.

Con respecto al mencionado IPE, hay que destacar que se trata de un índice que refleja la rapidez en que van apareciendo los síntomas de la enfermedad o la severidad de los mismos y, dado que es un valor sumatorio, sirve para resaltar las diferencias existentes entre los grupos de plantas evaluados. Este índice ha demostrado ser muy adecuado para discriminar aislados patógenos según su grado de virulencia en los trabajos realizados por García-Sánchez y cols. (2010) y de Vega-Bartol y cols. (2011).

Finalmente destacar que, a la vista de las evaluaciones realizadas, la integración del T-DNA en el transformante Fc-GFP1 no afectó al crecimiento vegetativo ni a la formación de conidios sobre un medio *in vitro*, así como tampoco provocó cambios en su patogenicidad o virulencia. De tal modo que, en base a las observaciones del transformante, queda justificada la inferencia que se haga de los resultados al aislado silvestre.

2. INOCULACIÓN EN EL TALLO

Con respecto a la progresión de la enfermedad tras la inoculación del patógeno en el tallo, hemos comprobado que la dinámica espacial de la infección sigue un patrón definido por la accesibilidad a los recursos nutritivos del huésped. Además, cabe destacar que el patrón de coloni-

zación del tallo de plántulas de un año de pino radiata por *F. circinatum* es bastante homogéneo tanto en lo relativo a la colonización radial al nivel del punto de inoculación como en su dispersión a lo largo del eje longitudinal de la planta. Así, durante las etapas iniciales de la colonización, existen dos vías predominantes y simultáneas para el avance del hongo:

- I. por un lado, un avance radial hacia la médula a través de los radios medulares. En los radios heterogéneos encontramos al hongo además de en el tejido parenquimático, en las traqueidas axiales y en los conductos resiníferos;
- II. por otro lado, la infección va bordeando el cuerpo de la planta a modo de anillo a través de la invasión de las capas más externas del tallo (córtez-floema-cambium).

Esta tendencia inicial refleja la necesidad que tiene el patógeno de buscar las reservas de nutrientes de su hospedador. Dichas reservas se encuentran almacenadas, principalmente en forma de almidón, en la médula, la corteza, el parénquima radial y el epitelio de los canales resiníferos (Sinnot, 1918).

Asimismo, hemos podido establecer que, inicialmente, las hifas de *F. circinatum* crecen intercelularmente en el parénquima cortical y medular (36a, 38a). En este proceso, es probable que el hongo libere al apoplasto enzimas que degradan la pared celular de estos tejidos vegetales y, como consecuencia, se libere la gran cantidad de nutrientes que el patógeno requiere para su mantenimiento y avance, ocasionando, en consecuencia, la desorganización de los tejidos del huésped. Observación respaldada por la secuenciación y caracterización de un gen de *F. circinatum* que codifica una endopoligalacturonasa (Chimwamurombe y cols., 2001), enzima que está directamente implicada en la digestión de los polisacáridos presentes en la pared primaria de las células.

Una vez superada la etapa inicial, el avance de la enfermedad da lugar a la colonización vertical del tallo, proceso en el que se han diferenciado tres vías principales:

- I. a través del córtex, del floema y del cambium en la zona periférica del tallo, en consonancia con las lesiones necróticas externas que pueden apreciarse visualmente;
- II. a través del xilema por medio de las traqueidas axiales y los conductos resiníferos;
- III. y a través del tejido parenquimatoso de la médula, por el centro del tallo.

Por otra parte, la dinámica temporal de la infección muestra la rápida adaptación de *F. circinatum* al nuevo entorno hallado en la planta, así como su elevada capacidad inicial de proliferación en esas nuevas condiciones.

Ateniéndonos únicamente a la colonización de la zona en que se inoculó al patógeno, pudimos diferenciar tres fases en la curva de crecimiento del patógeno.

- I. una primera fase de crecimiento exponencial, que tiene lugar durante la primera semana después de la inoculación del tallo con esporas del patógeno (0-7 ddi);
- II. una segunda fase, que dura dos semanas (de 7 a 21 ddi) y se corresponde con la fase de transición;
- III. finalmente, una tercera fase, en la que apenas se producen cambios detectables en la biomasa fúngica, y que se corresponde con la fase estacionaria (21-56 ddi).

Durante la fase exponencial, *F. circinatum* establece el primer contacto con la planta huésped y se produce la germinación de las esporas y el desarrollo de las hifas desde el punto de inoculación hacia el floema a través del parénquima cortical. Hemos podido constatar que *F. circinatum* invade inicialmente los tejidos del huésped más accesibles y ricos en nutrientes, como es el caso del floema, lo cual le permite obtener los recursos requeridos para tan rápida proliferación. Desde el primer momento el patógeno experimenta un crecimiento exponencial, sin que

apreciamos en su curva de crecimiento la característica fase de latencia (o fase lag) indicativa de un periodo de adaptación inicial en el proceso de infección. Si bien este hecho podría deberse al procedimiento de inoculación usado, según el cual el patógeno entró directamente en contacto con los tejidos de la planta, es también un hecho indicativo de la rápida adaptación del hongo al nuevo entorno de crecimiento.

La fase de transición, caracterizada por producirse una desaceleración del crecimiento fúngico, se alarga durante dos semanas en el tiempo, desde los 7 hasta los 21 ddi. Esta fase coincide con la colonización del xilema y de la médula por *F. circinatum*, así como con la producción de conidióforos en el parénquima medular. El proceso morfológico que implica el cambio de micelio vegetativo a reproductivo requiere de la alteración del patrón de expresión génica (Iida y cols., 2006; Garzia y cols., 2013). Presumiblemente, el hongo invierte una gran cantidad de energía en este proceso, lo cual explicaría la mencionada ralentización del crecimiento. Parece lógico pensar que el patógeno obtenga dicha energía del almidón que el hospedador almacena en las células parenquimáticas de la médula.

La esporulación de *Fusarium circinatum* en la médula de los pinos extiende el ciclo de la enfermedad dentro de la planta.

La producción de conidióforos a los 14 ddi, que concurre con la aparición de los primeros síntomas externos de la enfermedad, es un descubrimiento especialmente destacable ya que atestigua que *F. circinatum* es capaz de completar su ciclo asexual dentro del hospedador durante el periodo de incubación de la enfermedad.

Se sabía ya que *F. circinatum* es capaz de producir, en la superficie de los brotes o acículas muertas de las plantas infectadas, esporodoquios macroscópicos (1-3 mm de diámetro) y microscópicos (0,06-0,2 mm de diámetro) que le sirven de fuente de inóculo para propagar la infección a las plantas vecinas (Blakeslee y cols., 1978; Barrow-Broadbent y Dwinell, 1984). Sin embargo, esta es la primera vez que se demuestra, de forma visual e indiscutible, la presencia de estructuras reproductivas

de *F. circinatum* dentro de los pinos, al nivel más profundo. Además, es la primera vez que se describe este fenómeno en plantas gimnospermas.

En los cultivos de angiospermas, se ha considerado que la producción de conidios en los tejidos más internos del huésped está relacionada con la propagación del patógeno, tanto en el espacio, como en el tiempo. Así, puede contribuir a propagar la infección a diferentes partes de la misma planta, como es el caso de los denominados patógenos vasculares, por ejemplo *F. oxysporum* (Di Pietro y cols., 2003); o bien funcionar como reservorio de inóculo y favorecer la perpetuación del hongo en el tiempo, caso por ejemplo de algunos endoparásitos como *M. oryzae* (Terui, 1940), patógeno causante del añublo del arroz.

En este estudio, realizado a partir de la inoculación del tallo de *P. radiata* con esporas de *F. circinatum*, no hemos encontrado conidios dentro de los tejidos vasculares que nos permitieran pensar que son transportados hacia arriba vía xilema o hacia abajo vía floema. Sin embargo, sí hemos visto que los conidióforos se desarrollaron con sus fiáldes orientadas hacia las cavidades de la médula, lo que puede favorecer su esparcimiento a través de dichas cavidades y consecuentemente, generar nuevos focos de infección dentro de la médula en puntos alejados del foco inicial. Hay que tener en cuenta que la difusión de esporas es un mecanismo pasivo, por lo que su dispersión estará sujeta a la fuerza de gravedad. La germinación de micelio secundario a partir de los nuevos focos de infección así generados, además de contribuir a explicar la ralentización observada en el avance del hongo a través de este tejido, aclararía al menos en parte, la invasión predominante de la médula que observamos en las zonas del tallo situadas por debajo del punto de inoculación en etapas de la infección posteriores a los 21 ddi. De hecho, la colonización de la médula por debajo del punto de inoculación parece ser intrínseca, es decir, que no observamos presencia patógena en los tejidos contiguos (41e,f,g); y en cambio, por encima del punto de inoculación, el patógeno parece alcanzar la médula a través de las traqueidas y conductos resiníferos del xilema localizados en sus inmediaciones, e invadidos previamente (41a,b,c).

***Fusarium circinatum* obstruye el xilema de las plántulas de pino infectadas.**

Los síntomas de la enfermedad se manifestaron progresivamente en las plantas infectadas, comenzando por la necrosis de los tejidos en torno al punto de inoculación y terminando por la denominada muerte descendente (*diedback*, en inglés) de la planta, que consistía en la clorosis y marchitamiento de las acículas y en la desecación y caída del brote apical, todos ellos coincidentes con los descritos por otros autores para planta joven de pino (Solel y Bruck, 1990; Correll y cols., 1991; Viljoen y cols., 1994).

A la hora de explicar porque se produce el marchitamiento de la parte aérea de la planta, que acaba en completa desecación, algunos autores, como Solel y Brock (1990), consideran que se debe a que el patógeno obstruye el sistema vascular de la plántula y, como consecuencia, a que el flujo de agua queda interrumpido. En nuestro caso, tanto los análisis de qPCR como el estudio histopatológico mediante microscopia confocal, realizados a nivel del punto de inoculación, corroboran esta suposición. En la interpretación de los datos que nos conducen a esta conclusión, debemos en primer lugar recordar que la caída del brote apical, que es el síntoma de marchitamiento clave o más característico del dieback de las plantas, apareció en los ensayos de patogenicidad por primera vez a los 21 ddi y alcanzó su mayor incidencia a los 28 ddi (30). El análisis cuantitativo del proceso de infección reveló que a los 21 ddi se alcanzó la capacidad de carga de *F. circinatum* (34). Por su parte, la microscopia confocal desveló la casi total colonización del xilema por parte del patógeno entre los 21 y los 28 ddi (35c,d), tanto de las traqueidas del xilema como de la extensa red tridimensional de parénquima inmersa en el cilindro vascular (constituida por los radios medulares y el epitelio de los conductos resiníferos). Además, también en ese momento se registró la exudación de las cantidades más elevadas de resina (31). Todas estas evidencias, tomadas en conjunto, indican que *F. circinatum* juega un papel activo tanto en la obstrucción física del interior de las traqueidas, como en el colapso generalizado de la red de células vivas del xilema y en la estimulación de la producción de resina, eventos que de forma combinada acaban por conducir a la muerte de la planta.

***Fusarium circinatum* usa el sistema vascular de los pinos para ascender por el tallo.**

El examen histopatológico durante la dinámica vertical del proceso de infección, nos ha permitido diferenciar dos etapas:

- I. entre el momento de la inoculación y la aparición de los primeros síntomas de *diedback* (a los 21 ddi), el proceso de colonización tiene lugar preferentemente hacia arriba en el tallo de los pinos;
- II. a partir del marchitamiento de los ápices de las plántulas, la dirección de la colonización se da preferentemente hacia abajo en el tallo de los pinos.

Como posible explicación a este aspecto del proceso de infección a lo largo del eje longitudinal del tallo, consideramos que tanto el flujo de agua como el estado de hidratación de la planta condicionan la dirección en que el hongo invade las distintas regiones de la planta huésped. Para representar visualmente esta idea, tomemos como ejemplo el patrón de colonización consumada, reproducido en la figura 41. Si *F. circinatum* coloniza las zonas situadas por encima del punto de infección favorecido por la corriente de transpiración del xilema, este hecho quedaría reflejado en una distribución del patógeno más o menos homogénea y dispersa por todo el xilema como puede verse en la Fig. 41(a-c). Si esta corriente se interrumpiera, por las causas detalladas anteriormente, la invasión ascendente perdería protagonismo en favor de la invasión descendente de las zonas ubicadas por debajo del punto de infección, zonas que todavía están vivas y con tejidos suculentos totalmente disponibles para el patógeno (Fig. 41e,f,g).

Las zonas con un patrón de fluorescencia claramente diferente pueden deberse a la acumulación de compuestos fenólicos liberados al medio durante la interacción planta-patógeno.

En este trabajo, hemos encontrado que *F. circinatum* es capaz de invadir las trazas foliares en el tallo de los pinos, lo cual concuerda con las observaciones de Barrows-Broadus y Dwinell (1984). Pero además, hemos percibido que, en el punto de anclaje del fascículo de acículas al

tallo, aparecen extensas zonas de reacción, caracterizadas por mostrar un patrón de fluorescencia claramente distinguible al del resto de los tejidos (41b y 43). Dicha fluorescencia seguramente esté relacionada con la secreción de sustancias de tipo fenólico, que se caracterizan por presentar diferentes propiedades auto-fluorescentes (Hutzler y cols., 1998), durante la interacción planta-patógeno (Witzell y Martín, 2008).

Las coníferas presentan distintas barreras defensivas que tratan de impedir la entrada y proliferación de organismos patógenos. El córtex, que se forma durante el desarrollo primario del tallo, es una de las primeras capas con las que el patógeno se encuentra durante la invasión de la planta. En este tejido hay células parenquimáticas con grandes vacuolas que acumulan sustancias fenólicas que, tras el ataque patógeno, pueden contribuir mediante su vaciado en el tejido infectado al refuerzo de las paredes celulares o a la síntesis de compuestos fenólicos más complejos (como los taninos) implicados en defensa (Franceschi y cols., 2005).

Con el tiempo, el papel defensivo del córtex pierde protagonismo en favor del floema secundario puesto que este tejido se desarrolla, formando nuevas capas, a lo largo de más años. En el floema secundario de la mayoría de las coníferas se desarrollan las denominadas células PP (*polyphenolic parenchyma cells*, en inglés) que están especializadas en la síntesis y almacenamiento de compuestos fenólicos en vacuolas. Se ha visto que el contenido vacuolar de las células PP es dinámico y cambia de apariencia tras el ataque patógeno (Krokene y cols., 2008). La naturaleza fenólica del contenido vacuolar de las células PP se ha relacionado con una intensa emisión fluorescente en el rango amarillo del espectro, tras su excitación con luz azul (450-490 nm), que puede observarse microscópicamente (Franceschi y cols., 1998).

Otro de los principales componentes en la defensa de muchas coníferas (principalmente de las *Pinaceae*) son los conductos resiníferos traumáticos, los cuales pueden formarse tras una lesión proveniente tanto de factores bióticos como abióticos. Se sabe que la resina sintetizada

y secretada por los conductos resiníferos traumáticos es muy rica en compuestos fenólicos (Nagy *y cols.*, 2000). Esto contribuiría a explicar la intensa emisión de fluorescencia emitida por las células epiteliales que tapizan los conductos resiníferos (35b, 39d, 40 and 42a) que se ha observado en este trabajo.

La inducción de las células PP y de los conductos resiníferos traumáticos se ha asociado con el fenómeno de resistencia sistémica inducida en el patosistema *Pinus nigra* - *Sphaeropsis sapinea* (Bonello y Blodgett, 2003). Este fenómeno ha sido descrito en algunos miembros de las pináceas (Christiansen *y cols.*, 1999; Krokene *y cols.*, 1999, 2000, 2003; Bonello *y cols.*, 2001) pero se considera, en general, un fenómeno extendido en las coníferas.

La formación de nuevos conductos resiníferos parece favorecer a *Fusarium circinatum*.

A pesar de que la biosíntesis y la acumulación de oleoresina es un mecanismo de defensa química inducida, considerado de efectividad generalizada en muchas especies de coníferas (Eyles *y cols.*, 2010), nuestros resultados son totalmente discordantes en este aspecto, y sugieren que la producción de resina en el pino tras la infección con *F. circinatum* es proporcional al grado de susceptibilidad al patógeno. Evidencias de esta posibilidad se pueden encontrar también en los trabajos de Enebak y Stanosz (2003), así como en los de Kim *y cols.* (2008, 2010), en los que se evalúa la tolerancia a la infección por *F. circinatum* de diferentes especies de pino. De la misma opinión son Barrows-Broadbent y Diwnell, (1983), quienes plantearon hace ya décadas, que la producción de resina puede no servir como mecanismo de protección frente a *F. circinatum*.

Nuestro estudio indica que *F. circinatum* no sólo tolera la resina (42a), sino que incluso estimula su producción, inicialmente en las células epiteliales que recubren los conductos resiníferos constitutivos (35b) y posteriormente, de modo indirecto, al inducir la reprogramación de la zona cambial y estimular la formación de conductos resiníferos traumáticos (flechas en 41b,c,g). La formación de nuevos conductos

resiníferos traumáticos en *P. radiata* tan pronto como a los 14 ddi (46a) concuerda en tiempo con las observaciones que otros autores hicieron en *Picea abies* tras la inoculación con *Ceratocystis polonica* y *Heterobasidium annosum* (Nagy y cols., 2000; Krekling y cols., 2004). Con el paso de los días y a medida que la infección progresaba, la densidad de conductos resiníferos en el xilema aumentó con el consiguiente incremento significativo de la exudación de resina (Fig. 31 vs. Fig. 47).

Fusarium circinatum parece explotar en su beneficio uno de los mecanismos clásicos de defensa en las coníferas, es decir, el aumento del número de conductos resiníferos traumáticos y, en consecuencia, de la producción de resina. Así, el patógeno se beneficiaría:

- I. por un lado, de la utilización de los conductos resiníferos para la colonización vertical de nuevas zonas en el tallo de pino, lo cual no es la primera vez que se plantea puesto que Barrows-Broadus y Diwnell, (1984) ya sugirieron que los conductos resiníferos podían ser utilizados como portales para la propagación vertical de *F. circinatum*;
- II. Por otro lado, del suministro adicional de nutrientes que suponen los granos de almidón contenidos en las células epiteliales que recubren los conductos de resina y en las células del parénquima circundante (Hudgins y cols., 2005 Nagy y cols., 2005).
- III. Y finalmente, de las consecuencias derivadas del incremento en la producción de resina ya que la acumulación de esta en las traqueidas puede provocar el bloqueo del suministro de agua (Umebayashi y cols., 2011) y, como ya apuntaba Gordon (2011), conducir a la muerte de la planta.

La idea de que *F. circinatum* pueda sacar provecho de una reacción de la planta diseñada en principio para servir como defensa, se ve apoyada por los resultados del trabajo de Krekling y cols. (2004), así como de Hudgins y cols. (2005). Los primeros encontraron que clones de *P. abies* susceptibles a *H. annosum* produjeron, en respuesta a las inoculación con el patógeno, más canales resiníferos traumáticos que los clones resistentes; los segundos autores muestran evidencias de que la

acumulación de resina producida por los conductos resiníferos constitutivos y traumáticos de *Pinus monticola* Douglas ex D. Don. no afectaba directamente al desarrollo del *Cronartium ribicola*; Mencionar además, que Luchi y cols. (2005) a partir de los ensayos de infección realizados en *Pinus nigra* Arnold con *Sphaeropsis sapinea* y *Diplodia scrobiculata* concluyen que el flujo de resina puede no ser un buen indicador de la resistencia del hospedante a los patógenos.

Es bastante intrigante que *F. circinatum* sea capaz de inducir un mecanismo de defensa en la planta, que finalmente termine por dañar la salud de pino a favor del establecimiento patógeno. Este sutil aspecto de la interacción planta-patógeno requiere más estudios y un abordaje a distintos niveles, ya que como algunos autores han sugerido, supuestas moléculas relacionadas con la defensa, como por ejemplo los estilbenos, funcionan más como marcadores de la enfermedad que como mecanismo de defensa e incluso pueden ser tóxicos para la propia planta (Bonello y cols., 1993). En este sentido, nuestros resultados apoyan la idea propuesta por Lombardero y cols. (2006) de que el aumento de flujo de resina en las coníferas producido tras la inoculación con algunos patógenos fúngicos no debe interpretarse exclusivamente como un mecanismo efectivo de defensa inducible.

3. INOCULACIÓN EN EL SUSTRATO

Con respecto a la progresión de la enfermedad tras la inoculación del sustrato de crecimiento de *P. radiata* con propágulo vegetativo de *F. circinatum*, hemos constatado que este patógeno, además de ser un hongo de transmisión aérea, debe ser también considerado como un hongo capaz de infectar los plantones de pino a través de sus raíces.

El comportamiento de *F. circinatum* es muy similar al descrito por Waksman (1944) para hongos invasores del suelo, concepto que fue posteriormente redefinido por Garrett (1956), considerando como tal a

aquellos parásitos que infectan las raíces y que pueden vivir en el suelo por períodos cortos, pero cuya presencia está, en general, estrechamente relacionada con la de sus plantas huésped. En este sentido, se ha comprobado que *F. circinatum* puede persistir en el suelo durante varios meses mediante un crecimiento saprófito y la supervivencia en sustratos orgánicos muertos (Hammerbacher, 2006; Gordon, 2011), y que puede llegar a sobrevivir hasta tres años en los tejidos muertos del propio hospedador (Mc Nee y cols., 2002).

En nuestro estudio, como sustrato de crecimiento para las plantas hemos utilizado una mezcla de turba de *Sphagnum sp.* y como vehículo para el inóculo vegetativo de *F. circinatum* hemos utilizado semillas de mijo. En lo que al sustrato se refiere, se ha demostrado que el peculiar tejido de las hojas de *Sphagnum* forma microambientes regulares muy adecuados para el establecimiento de comunidades microbianas (Bragina y cols., 2012). Estos micronichos parecen facilitar el crecimiento de *F. circinatum* en el sustrato, al proporcionar al hongo un hábitat agradable en el que crecer, así como esporular, especialmente en los espacios internos de las células hialinas (Fig. 49b). Esta novedosa observación puede ayudar a explicar el aumento exponencial en el tamaño de la población de *F. circinatum* que Hammerbacher (2006) registró tras inocular 4 tipos diferentes de sustrato con propágulos fúngicos. Pero además, recientemente se han publicado nuevos datos que implican que la longevidad de este hongo en el suelo puede extenderse aún más allá de su capacidad para sobrevivir como saprófito. El grupo de trabajo del doctor Thomas R. Gordon (Universidad de California) descubrió recientemente que distintas especies herbáceas (pertenecientes a la familia de las gramíneas o *Poaceae*) localizadas en bosques nativos y plantaciones de pino habían sido naturalmente infectadas por *F. circinatum* sin producirse en ellas síntomas de enfermedad (Swett y Gordon., 2012; Swett y cols., 2014). Los mismos autores han publicado recientemente con más detalle la asociación de tipo endófito que *F. circinatum* establece con las raíces de plantas

de maíz (Swett y Gordon, 2015). Esta fuente de inóculo adicional, derivada de la capacidad de *F. circinatum* para infectar hospedadores alternativos, incrementa el peligro potencial que supone este patógeno para el establecimiento de nuevas plantaciones de pino.

Como hemos visto en el presente trabajo, *F. circinatum* produce órganos lineales (cordones miceliales, Fig. 49e) gracias a los cuales puede trasladar los nutrientes obtenidos de un sustrato previamente colonizado (en nuestro estudio fueron las semillas de mijo) al ápice de los cordones miceliales en crecimiento (Klein, 1996). Los cordones miceliales son una característica particularmente relevante de aquellos hongos capaces de infectar raíces, ya que permiten a las colonias de hongos moverse y explorar el suelo en busca de nuevos sustratos que colonizar (Cooke y Rayner, 1984). De hecho, hemos observado que los cordones miceliales de *F. circinatum*, al entrar en contacto con la superficie de la raíz, fueron capaces de reestructurarse hacia formas de crecimiento difuso, es decir, de recuperar el característico patrón de crecimiento de las hifas fúngicas (flechas en la Fig. 53a). Como explica Klein (1996) la capacidad de cambiar la morfología, del tipo de crecimiento con organización lineal de los cordones miceliales al tipo de crecimiento con simetría circular del micelio difuso, al entrar en contacto con un sustrato rico y conforme a señales ambientales adecuadas, es crítico para la supervivencia del micelio fúngico (Klein, 1996).

***Fusarium circinatum* es capaz de penetrar las raíces de su hospedador sin necesidad de heridas previas.**

En su interacción con las raíces de los pinos, *F. circinatum* utiliza mecanismos similares a los ya descritos en patógenos que infectan las raíces, como por ejemplo hifas corredoras (flechas en la Fig. 50b,c) y estructuras de tipo hifopodio (Fig. 53b) características de *Gaeumannomyces graminis* (Garret, 1944). Los hifopodios simples, definidos como el extremo abultado de una pequeña ramificación en la hifa que media la penetración de las raíces (Howard, 1997), fueron también observa-

dos por otros autores en los patosistemas *M. oryzae*-arroz (Sesma y Osbourn, 2004; Marcel y cols., 2010) y *C. graminícola*-maíz (Sukno y cols., 2008). Tanto *M. oryzae* como *C. graminícola* son organismos tradicionalmente considerados patógenos foliares en los que, no hace mucho, se ha descrito su capacidad de infectar al hospedador a través de las raíces. Además, ambos son hongos hemibiotróficos que desarrollan hifas especializadas para invadir las células vivas del huésped. Este tipo de hifas caracterizan la invasión biotrófica que se establece durante la interacción inicial con sus hospedadores (Kankanala y cols., 2007 y sus referencias). En este trabajo hemos observado, en la capa epidérmica de las raíces de pino, gruesas hifas bulbosas y estrechas hifas invasivas (Fig. 53c) que sugieren una posible fase biotrófica de *F. circinatum* durante la penetración de la raíz. Esta peculiar observación concuerda con, y contribuye a explicar, el hallazgo de Swett y Gordon (2013), quienes documentaron que *F. circinatum* habitaba las raíces del 80% de los plantones en rodales nativos de *P. radiata* sin inducir síntomas de enfermedad en ellos. Estos autores proponen la emergencia de *F. circinatum* como patógeno necrotrófico a partir de especies endofíticas ancestrales (Swett y Gordon, 2015). Su hipótesis se apoya en el hecho de que el cruce entre un aislado de *F. circinatum* y otro de *F. subglutinans* recuperado del teosinte (planta originaria de Centroamérica considerada la especie antecesora del maíz) resultó ser fértil, lo cual sugiere una relación evolutiva y recientemente divergente entre ambos organismos. En lo que respecta a la capacidad de *F. circinatum* de infectar las raíces, consideramos posible que haya conservado dicha capacidad desde un ancestral estilo de vida endófito y que la patogénesis del chancro resinoso de los pinos hubiera evolucionado más tarde.

La emergencia de nuevas raíces en *Pinus radiata* podría jugar un papel relevante en la interacción con *Fusarium circinatum*.

Una vez dentro de la raíz, comprobamos que *F. circinatum* se comportó como un patógeno altamente invasivo, siendo capaz de crecer en todos los tejidos susceptibles del huésped, desde la corteza hasta el

cilindro vascular. Si bien, se observó que *F. circinatum* crecía intercelularmente por el parénquima cortical (punta de flecha en la fig. 55c), también se apreció claramente, sobre todo en aquellas raíces que presentaban un estadio avanzado de la infección, que provocaba la desorganización de los tejidos susceptibles (asterisco en la Fig. 55b,c), quedando así perfectamente representado su estilo de vida necrotrófico. Esta pudrición probablemente contribuyera a la bajada del área superficial total que se produjo en las raíces de las plántulas inoculadas con respecto a las plantas control. No obstante, teniendo en cuenta las clases diamétricas en que agrupamos las raíces, advertimos que esta diferencia en el área superficial con respecto a los controles únicamente resultó significativa en las raíces más finas, es decir, aquellas de diámetro inferior a 0,5 mm (Fig. 62a). Precisamente las raíces más finas fueron las que presentaron además la mayor intensidad de ramificación (Fig. 62b). Es decir, las raíces más afectadas al finalizar el ensayo de patogenicidad fueron aquellas con mayor intensidad de ramificación. Estos datos sugieren que el nacimiento de las raíces en los pinos puede jugar un importante papel en la interacción con *F. circinatum*.

- I. Por un lado, los puntos de emergencia de las raíces laterales pueden ser sitios diana para la infección fúngica (asterisco en la Fig. 50c).
- II. Por otro lado, nuestros datos indican una tendencia al aumento de la intensidad de ramificación en las plántulas infectadas por *F. circinatum*.

Aunque en nuestro estudio el aumento en la intensidad de ramificación en las plantas infectadas no resultó estadísticamente significativo en relación a las plantas control, los datos de Swett y Gordon (2013) sí corroboran esta tendencia.

Se ha visto que la ramificación es un rasgo que, dentro de los parámetros relacionados con la arquitectura radicular de una planta, puede ser plástico en respuesta a factores ambientales (Nibau y cols., 2008;

Nan y cols., 2013; Kong y cols., 2014). De tal forma que, el rápido reemplazo de las raíces infectadas permitiría, por ejemplo, que las plantas pudieran aprovechar el agua y los nutrientes del entorno, constituyendo esta capacidad un eficiente mecanismo para aumentar su tolerancia al ataque de los hongos. Otro mecanismo mediante el cual los árboles pueden mejorar su capacidad de absorción es modificando la morfología y la actividad fisiológica de las raíces. Por ejemplo, se ha publicado que si las raíces finas (normalmente encargadas de la absorción de agua y nutrientes) se vuelven menos funcionales, aumenta el papel en la absorción de las raíces de mayor orden (MacFall y cols., 1991). Las diferentes posibilidades que tienen las plantas para incrementar su tasa de absorción, unido al hecho de que los muestreos a lo largo de los ensayos de patogenicidad revelaron gran cantidad de raíces sanas, son indicativos de que, en nuestras muestras, el sistema radicular no había perdido su integridad funcional.

***Fusarium circinatum* usa el sistema vascular de los pinos y propaga la infección desde las raíces hasta la parte aérea de las plantas.**

Durante la colonización de las raíces de maíz, descrita por Swett y Gordon (2015), *F. circinatum* se restringió al crecimiento intercelular en el tejido epidérmico y cortical. Sin embargo, como hemos visto en el presente trabajo, *F. circinatum* no se limitó al crecimiento intercelular sino que provocó la degradación del parénquima cortical en las raíces y alcanzó tanto el floema como el xilema de los pinos. Además, la infección se propagó desde la raíz hasta las partes aéreas de la planta. En esta tesis se presentan evidentes indicios del probable uso, por parte de *F. circinatum*, del sistema vascular para llegar a nuevas áreas susceptibles en las plantas de pino infectadas, lo cual quizás sea uno de los aspectos más reveladores derivados de nuestro estudio.

La primera prueba que presentamos y la más evidente es que *F. circinatum* produce esporas dentro de las traqueidas de las raíces (Fig. 56). Las esporas pueden transportar la infección hacia las partes supe-

riores de la planta con el flujo de savia. Ya hemos visto que, si quedan atrapadas en las punteaduras entre traqueidas contiguas (Fig. 56c), pueden germinar (flechas en Fig. 56d,e) y penetrar a través de la traqueida vecina. Además, también observamos que el patógeno producía esporas dentro de las traqueidas del cuello de la raíz (Figs. 56f, 61c,d).

El cuello de la raíz representa la zona de transición entre la raíz y el tallo. Es en esa zona donde el núcleo central de la raíz principal, que está constituido por xilema primario, cambia progresivamente hasta dar lugar a la médula del tallo que está formada por tejido parenquimático (Fig. 59). El incipiente tejido parenquimático localizado en el núcleo central del cuello de la raíz puede proporcionar a *F. circinatum* los suficientes recursos energéticos como para permitir la esporulación y la generación de micelio secundario dentro de la planta, extendiéndose así el proceso de infección. Esta idea está en consonancia con el hallazgo de conidióforos, desde las primeras etapas de la infección, en la médula de los pinos que fueron inoculados en el tallo. En ese caso, vimos que, desde el punto de inoculación situado en el exterior del tallo, *F. circinatum* accedía rápidamente al succulento tejido de la médula a través de los radios medulares. Precisamente, en el modo en que el patógeno accede a la médula de los pinos encontramos otra prueba del probable uso que hace *F. circinatum* del sistema vascular para llegar a nuevas áreas susceptibles en la planta. Y es que si la infección sucede a través de las raíces, el patógeno parece colonizar el parénquima medular del cuello de la raíz a través de los conductos resiníferos que se encuentran asociados a los polos del xilema primario de la raíz principal y de las traqueidas del xilema secundario que los circundan (Figs. 59c, 60a-b).

En el núcleo central de todas las secciones de la raíz principal que habían sido colonizadas por *F. circinatum*, hemos distinguido invariablemente hifas del patógeno. Este hecho está relacionado con la tercera prueba que presentamos para alegar que *F. circinatum* se sirve del sistema vascular para transportar la infección a nuevas zonas dentro de la

planta. A este especial enclave central en la raíz principal (que conduce directamente al parénquima medular del tallo) llega el sistema vascular de las raíces laterales ya que en gimnospermas, las raíces laterales se originan a partir de la división de las células del periciclo asociadas a los polos del xilema primario (Fahn, 1982; De Smet, 2012). Por lo tanto, una vez *F. circinatum* ha invadido las traqueidas de las raíces secundarias, como hemos visto en la figura 59(d), estas lo conducen hasta la región central de la raíz principal.

Pudrición radicular vs. obstrucción vascular.

Otro aspecto clave que discutir a partir de los resultados de este trabajo es el relacionado con la causa de la muerte en los pinos cuyas raíces han sido infectadas por *F. circinatum*. Antes de nada cabe recordar que el marchitamiento en las plantas indica que la tasa de pérdida de agua es mayor que la tasa de absorción. Esta situación puede ser el resultado tanto de una reducción en la absorción de agua, debida a un sistema radicular deteriorado, como de un aumento de la resistencia al flujo de agua, ocasionado por el colapso del sistema vascular (Ayres, 1978). Cabe por lo tanto preguntarse si, en nuestro estudio, ¿mueren los pinos por el colapso de su sistema vascular? ¿o mueren a causa de la pudrición de su sistema radicular? Desde nuestro punto de vista, ambas situaciones podrían estar contribuyendo al resultado final. Si bien, los resultados que mostramos no constituyen evidencias indiscutibles, sí contribuyen a despejar alguna de las incógnitas planteadas.

I. Con respecto al deterioro del sistema radicular: el examen que se hizo de la arquitectura radical mostró por un lado que el grupo de raíces con mayor área superficial fue la clase diamétrica de 0,5 a 1,0 mm (Fig. 62a). Por otro lado, este análisis reveló que, si bien la superficie radicular total fue significativamente menor en los pinos inoculados con el patógeno que en los pinos control, no sucedió lo mismo en el análisis estadístico aplicado independientemente a la clase diamétrica de raíces con mayor área superficial (Fig. 62b). Teniendo en cuenta que al finalizar el

ensayo de patogenicidad (a los 84 ddi) la mayoría de los pinos presentaban su brote apical caído o estaban ya muertos desde un tiempo atrás (Fig. 48) y que el área superficial del grupo de raíces que seguramente tuviera la mayor tasa de absorción no fue significativamente diferente en las plantas inoculadas con respecto a los controles, es razonable pensar que las plantas no murieron por la falta de funcionalidad de su sistema radicular tras el ataque del patógeno.

II. Con respecto a la obstrucción del sistema vascular: a los 28 días después de haber inoculado el sustrato de crecimiento de los pinos con *F. circinatum* se percibió el primer síntoma de enfermedad (que fue la marchitez o clorosis de las acículas) en el 20% de las plantas (Fig. 48) y para entonces, el patógeno ya había invadido el sistema vascular en las raíces de los pinos (Fig. 56). En el momento en que un patógeno entra en un elemento conductor, la embolia producida deja de inmediato fuera de función a dicho elemento y el agua debe reanudar su movimiento por los elementos conductores circundantes (Tyree y Zimmermann, 2002). Por lo tanto, es muy probable que, más que la pudrición de las raíces infectadas por *F. circinatum*, haya sido la presencia del patógeno en el interior de las traqueidas lo que haya influido en la marchitez observada. En nuestro estudio, observamos frecuentemente la acumulación de hifas vivas o muertas en el interior de las traqueidas, sobre todo en la región del cuello de la raíz a los 42 y 56 ddi (Figs. 58e, 60b, 61b-d). Precisamente, a los 56 ddi el patógeno había colonizado el cuello de la raíz de todas las plantas analizadas, lo cual coincidió además con el momento en que, durante los ensayos de patogenicidad, se detectó el mayor porcentaje de plantas con el ápice caído. A nivel estadístico, la incidencia de los síntomas observados a los 56 ddi fue significativamente diferente con respecto a las semanas anteriores y posteriores del proceso de infección (Fig. 48). Otro factor que seguramente también podría contribuir a la restricción del suministro de agua a los brotes de las plantas son las fugas de resina desde los conductos resiníferos hacia el xilema (Fig. 61e,f) pues se cree que también provocan la cavitación y embolia en las traqueidas (Umebayashi y cols., 2011).

En conjunto, presentamos signos que parecen relacionar los síntomas de marchitez en los pinos con el resultado de la invasión por *F. circinatum* de su sistema vascular, subrayando en este punto el papel clave que juega la colonización del cuello de la raíz. Consideramos que una vez que el patógeno establece contacto con los tejidos de la región de cuello de la raíz (energéticamente más aprovechables) la tasa de propagación del hongo excede la posibilidad de las plantas de parar el ataque patógeno, y entonces la proliferación del hongo se ve favorecida. No obstante, nuestros resultados ponen de relieve también la crucial importancia de la robustez del sistema radicular de la planta para tolerar o superar el ataque del patógeno antes de que este se propague por el resto de la planta.

4. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Para finalizar, cabe destacar que los hallazgos aquí detallados amplían nuestro conocimiento sobre la interacción entre un hongo patógeno y su planta hospedadora, perteneciente esta a las coníferas: el grupo de plantas gimnospermas más exitosas. Hoy en día, los bosques de coníferas son dominantes en el este de América del Norte, Europa y Siberia y son fuente de una gran riqueza de recursos, paisajística y ambiental. Para mejorar los sistemas de gestión, con el objetivo de minimizar el daño o las pérdidas causadas por *F. circinatum* tanto desde el punto de vista ecológico como económico, es fundamental comprender y caracterizar de forma precisa qué mecanismos subyacen al desarrollo de la enfermedad. Dos ejemplos, derivados de la presente tesis, que ilustran esto son:

- I. El descubrimiento de conidióforos de *F. circinatum* dentro del tallo de *P. radiata* durante el periodo de incubación de la enfermedad; así como la posibilidad de que los nuevos conidios generados en el interior de la médula de los pinos extiendan, a largo plazo, la infección hacia la base de la planta.

II. La confirmación de la capacidad de *F. circinatum* de crecer y reproducirse en el sustrato orgánico, así como su potencial para explorar el suelo (a través de estructuras tipo rizomorfo) e infectar eficazmente las raíces de sus hospedadores, sin que sea necesaria una herida por la que penetrar.

Ambas circunstancias, apuntan a la importancia de evitar, mediante el correcto manejo y gestión de los plántones en el vivero y de los árboles en las plantaciones, que la infección sirva como inóculo secundario que extienda la infección a otras plantas.

Aunque el chancro resinoso de los pinos esté incluido en la lista A1 de organismos de cuarentena de la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) apenas existen medios para la erradicación de las infecciones ya establecidas. Por ello, es sumamente importante que se apliquen medidas profilácticas eficaces que prevengan la propagación y el establecimiento de esta enfermedad, y que éstas se apliquen correctamente. Por ejemplo, el artículo 6 (sobre las medidas preventivas) del Real Decreto 637/2006 por el que se establece el programa nacional de erradicación y control de esta enfermedad propone “la tala y eliminación de la parte aérea cortada de todas las plantas de especies sensibles que presenten síntomas de la enfermedad”. En vista de lo anteriormente expuesto, la práctica correcta implicaría no dejar el tocón de los pinos en el suelo, sino retirar los árboles infectados con la mayor parte posible de su sistema radicular. En zonas infectadas o circundantes a ellas, tampoco sería recomendable llevar a cabo la cada vez más habitual trituración y retorno al suelo de los restos de podas y talas puesto que contribuirían a diseminar la infección.

Otra medida que debiera tomarse en cuenta como una estrategia adecuada para el control de la enfermedad en los viveros forestales es la implementación, dentro de las prácticas de cultivo, de la inoculación de los plántones de pino con micorrizas. Las micorrizas son organismos simbiotes, extremadamente importantes para el funcionamiento de la

raíz, que pueden reducir los efectos nocivos de los agentes patógenos en las raíces y pueden proteger del ataque de otros hongos las raíces laterales recién surgidas. Además de fortalecer a la planta, la ectomicorriza ejerce una fuerte presión de selección en la comunidad microbiana asociada con la rizosfera, lo que contribuye a mejorar la tolerancia de la planta al ataque del patógeno. Además, proporcionan protección directa a las raíces al actuar como una barrera física que dificulta la entrada y el desarrollo del patógeno en el interior de la raíz (Brazanti y cols., 1999), así como produciendo y liberando compuestos antifúngicos (Duchesne y cols., 1987) que incluyen fenoles y fitoalexinas, o enzimas que degradan la pared celular del patógeno (Mucha y cols., 2006).

Finalmente destacar la que consideramos una de las estrategias más eficientes y rentables para el manejo del chancro resinoso de los pinos, que es el uso de materiales de reproducción genéticamente resistentes destinados a las reforestaciones o como suministro para los viveros (Rockwood y cols., 1988). Se ha confirmado la existencia de diferencias en la susceptibilidad de *Pinus spp.* tanto a nivel de especie como de híbrido (Storer y cols., 1999; Hodge y Dvorak, 2000; Roux y cols., 2007), e incluso, en el caso concreto de *P. radiata*, se ha comprobado que también existe diferente susceptibilidad a *F. circinatum* a nivel de clon dentro de una misma familia (Roux y cols., 2007). Además, existen evidencias suficientes para considerar que la resistencia genética que media en esta interacción patogénica es de tipo cuantitativo, es decir que es el resultado de la acción de múltiples genes, siendo la contribución de cada uno relativamente pequeña (Kayihan y cols., 2005; Poland y cols., 2009). El hecho de que ésta sea de tipo cuantitativo dificulta la obtención de marcadores moleculares para discriminar las plantas susceptibles de las resistentes, lo que ha ocasionado que, hasta el momento, el método de testado comúnmente utilizado sea la medida de la longitud de la lesión necrótica provocada por el patógeno tras su inoculación en el tallo de la planta y el posterior re-aislamiento del patógeno (Gordon y cols., 1998; Roux y cols., 2007). Dicho método, conceptualmente simple, es muy

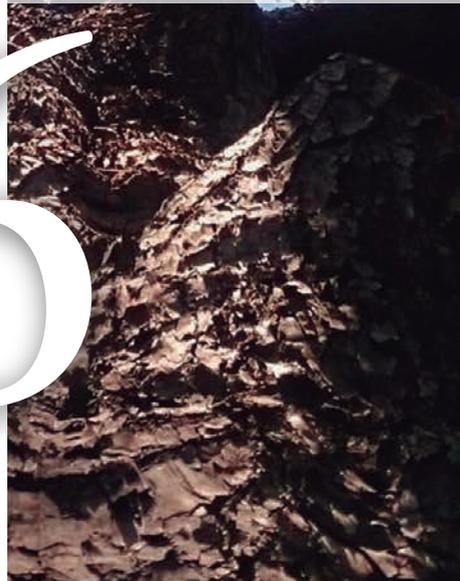
costoso en tiempo (meses) y recursos necesarios y no ofrece la garantía de una correcta evaluación e interpretación (Aegerter y Gordon., 2006; Sakamoto y cols., 2006; Roux y cols., 2007). Es por ello que el desarrollo de un método de escrutinio más rápido y adecuado constituiría una herramienta de gran valor tanto a la hora de testar materiales en busca de resistencia como cuando se quiera verificar el impacto de otras medidas

En este sentido, tanto la microscopía confocal como la qPCR se proyectan como técnicas muy efectivas para la temprana detección de la enfermedad, puesto que como hemos visto en los ensayos de patogenicidad realizados, hemos detectado con ambas técnicas signos de la enfermedad antes incluso de que la manifestación externa de la sintomatología delatara la infección. A pesar de que la microscopía confocal nos ha permitido detectar a *F. circinatum* a los 7 ddi, consideramos que la qPCR es una técnica aún mucho más efectiva para la detección temprana de la infección patógena. Hemos desarrollado un protocolo que nos permite detectar en una muestra compleja, como es el tallo de los pinos, cantidades de ADN de *F. circinatum* del orden de 10^{-5} ng (=0,01 pg). El siguiente paso sería establecer la correlación entre la cantidad de biomasa fúngica en los tejidos de plantas de pino infectadas con *F. circinatum* con la severidad de los síntomas de la enfermedad desarrollados, con la lesión necrótica producida o con el índice de supervivencia al final del ensayo, como han publicado otros autores para otros patosistemas (Hietala y cols., 2003; Jiménez-Fernández y cols., 2011). Esto validaría a la técnica aquí presentada como una valiosa herramienta para el diagnóstico rápido de plantas que muestren un mayor grado de resistencia, evitando así la necesidad de tener que recurrir a los tradicionales y laboriosos ensayos de patogenicidad.

La base establecida en este trabajo permitirá establecer protocolos de selección de Material Forestal de Reproducción resistente, aunque para la optimización de la eficacia de dichos protocolos sean necesarios más estudios.

CONCLUSIONES

6



1.-La estirpe de *Fusarium circinatum* transformada con el gen de la proteína verde fluorescente (*sgfp*) en un excelente marcador vital de la infección que, combinado con la microscopía confocal, proporciona una perspectiva totalmente novedosa en el estudio histológico de los tejidos del pino enfermos.

2.-Hemos desarrollado un protocolo para cuantificar específicamente el ADN de *F. circinatum* y el de *Pinus radiata* a partir de una muestra compleja como es el tallo de los pinos. Este protocolo:

- I. Es una técnica idónea para el estudio de la interacción entre *F. circinatum* y *P. radiata* en su ambiente natural, dado que permite estimar la biomasa fúngica *in planta* en diferentes etapas de la infección, incluso en estadios muy tempranos.
- II. Es una valiosa herramienta para comparar el grado de infección de distintas muestras de *P. radiata*, dado que permite detectar pequeñas variaciones en la biomasa de *F. circinatum* en relación a la biomasa de *P. radiata*.

3.-La dinámica espacial de la infección en el tallo sigue un patrón definido por la accesibilidad de los recursos nutritivos del huésped, invadiendo inicialmente los tejidos más accesibles y ricos en nutrientes.

- I. En la colonización horizontal destaca la rápida invasión de la parte central del pino (constituido por parénquima medular) a través de los radios medulares y la invasión del floema y la zona cambial, a modo de anillo, circunvalando el tallo.
- II. En el caso de la colonización vertical la infección progresa por esas mismas vías tanto hacia arriba como hacia abajo en el tallo, pero además, destaca la propagación del patógeno a través del xilema, por medio tanto de las traqueidas axiales como de los conductos de resina.

4.-La dinámica temporal de la infección en el tallo muestra la rápida adaptación y proliferación de *F. circinatum* al nuevo entorno hallado en *P. radiata*. El patógeno experimenta un crecimiento exponencial *in*

planta desde el primer momento de la infección. No se aprecia una fase de latencia que sería una característica indicativa de un periodo de adaptación inicial en el proceso de infección.

5.-*Fusarium circinatum* es capaz de completar su ciclo asexual dentro del hospedador durante el periodo de incubación de la enfermedad, antes de que se manifiesten los primeros síntomas visibles. Este es un descubrimiento especialmente relevante a tener muy en cuenta en los protocolos de manejo de la enfermedad, puesto que si no se toman las medidas adecuadas se puede contribuir a la dispersión de la enfermedad fuera de la planta.

6.-El peculiar tejido de las hojas de *Sphagnum sp.* genera micronichos que favorecen el crecimiento de *F. circinatum* en el sustrato y que sirven de reservorio de inóculo tanto en forma de micelio vegetativo como de esporas.

7.-*Fusarium circinatum* produce órganos lineales (cordones miceliales) con los que explorar el sustrato hasta alcanzar el sistema radical de la planta de pino, anclarse a su superficie e infectar eficazmente las raíces de su hospedador.

8.-La penetración de las raíces puede ser directa, sin que sea necesaria una herida por la que penetrar, a través de estructuras tipo hifopodio, con el desarrollo de hifas bulbosas y de estrechas hifas invasivas, características de una invasión biotrófica.

9.-La penetración de las raíces también puede darse de forma indirecta, a través de heridas naturales en las zonas de emergencia de nuevas raíces. De hecho, la intensidad de ramificación de las raíces de los pinos parece jugar un papel importante en la interacción con *F. circinatum*.

10.-*Fusarium circinatum* utiliza el sistema vascular de *P. radiata* para ascender y llegar a nuevas áreas susceptibles en las plantas de pino infectadas, extendiendo así el ciclo de la enfermedad dentro de la planta.

11.-Una vez que *F. circinatum* invade la médula del tallo de los pinos (en caso de infección por transmisión aérea) o que invade la región central del cuello de la raíz (en caso de que la infección suceda a través de las raíces) la tasa de propagación del hongo, mediante la generación de esporas asexuales dentro de los pinos, excede la posibilidad de las plantas de frenar el ataque patógeno y, entonces, se ve favorecida la proliferación del hongo.

12.-La interacción planta-patógeno produce en los tejidos del pino llamativas zonas de reacción caracterizadas por mostrar un patrón de fluorescencia claramente diferente al del resto de los tejidos, lo que probablemente esté relacionado con la secreción de sustancias de tipo fenólico liberadas al medio durante la interacción planta-patógeno.

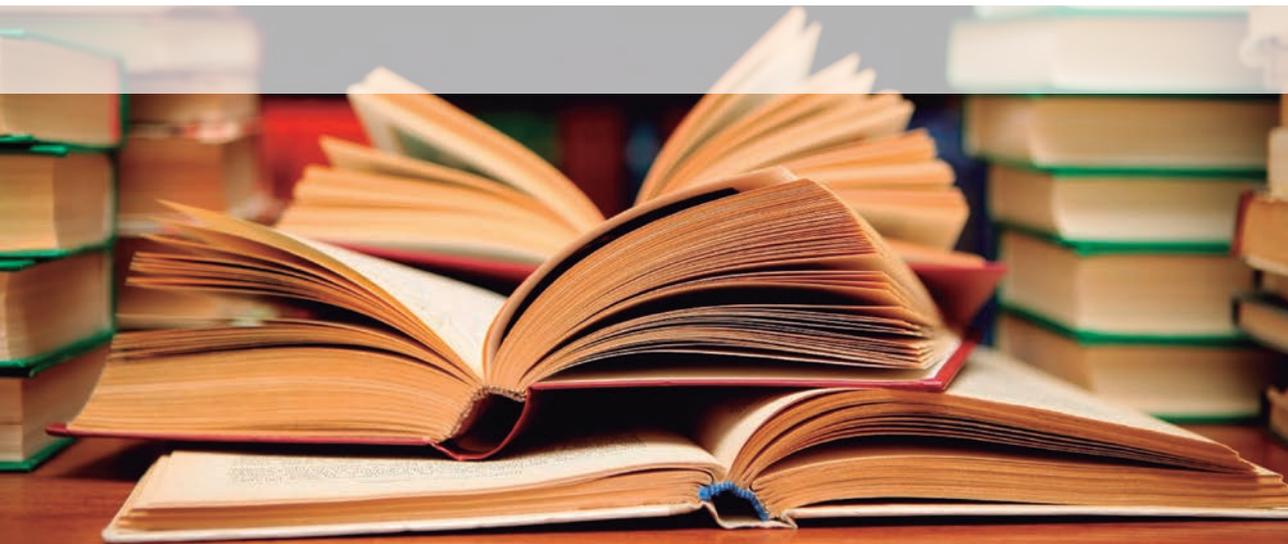
13.-*Fusarium circinatum*, en el transcurso de la infección, tolera la resina producida por *P. radiata* e induce la formación de nuevos conductos resiníferos en la planta.

14.-Nuestros resultados sugieren que la producción de resina en *P. radiata* tras la infección por *F. circinatum* es directamente proporcional al grado de susceptibilidad al patógeno.

15.-El marchitamiento de la parte aérea de los pinos, que acaba en completa desecación, se debe principalmente al bloqueo del suministro de agua que sucede como consecuencia de la invasión de *F. circinatum*. Dos causas de este bloqueo son:

- I. la obstrucción de las traqueidas por las hifas y esporas patógenas;
- II. la obstrucción de las traqueidas por la acumulación y vertido de resina al xilema, tras haber sido estimulada su producción.

BIBLIOGRAFÍA



- Aegerter BJ, Gordon TR. 2006.** Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Pinus radiata*). *Forest ecology and management* 235: 14-17.
- Alonso R, Bettucci L. 2009.** First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes* 4: 91-92.
- Aragones A, Espinel S, Ritter E. 1994.** Caracterización mediante el uso de RAPD de la población de *Pinus radiata* del País Vasco (España). *Forest Systems*, 3: 135-143.
- Ayres PG. 1978.** Water relations of diseased plants. In: Kozlowski TT, ed. *Water deficits and plant growth*. London, UK: Academic Press 5: 1-60.
- Bannan MW. 1936.** Vertical resin ducts in the secondary wood of the *Abietineae*. *New Phytologist* 35: 11-46.
- Barnard EL, Blakeslee GM. 1980.** Pitch canker on slash pine seedlings: a new disease in forest tree nurseries. *Plant disease* 64, 695-96.
- Barrows-Broadus J, Dwinell LD. 1980.** Decay and colonization of gladiolus corms by the pine pitch canker fungus. *Phytopathology* 70: 847-850.
- Barrows-Broadus J, Dwinell LD. 1983.** Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in four species of Southern pines. *Phytopathology* 73:882-889.
- Barrows-Broadus J, Dwinell LD. 1984.** Variation in susceptibility to the pitch canker fungus among half-sib and full-sib families of Virginia pine. *Phytopathology* 74:438-444.
- Barrows-Broadus J, Dwinell LD. 1985.** Branch dieback and cone and seed infection caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a loblolly pine seed orchard in South Carolina. *Phytopathology* 75: 1104-1108.
- Blaise F, Remy E, Meyer M, Zhou L, Narcy JP, Roux J, Balesdent MH, Rouxel T. 2007.** A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* 44: 123-138.
- Blakeslee GM, Oak SW, Gregory W, Moses CS. 1978.** Natural association of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* with *Pissodes nemorensis*. *Phytopathology News* 12: 208.
- Blakeslee GM, Miller T, Barnard EL. 1981.** Pitch canker in forest tree nurseries. Southeastern Forest Experiment Station, USDA Forest Service.
- Bonello P, Blodgett JT. 2003.** *Pinus nigra-Sphaeropsis sapinea* as a model pathosystem to investigate local and systemic effects of fungal infection of pines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 249-261.
- Bonello P, Gordon TR, Storer AJ. 2001.** Systemic induced resistance in Monterey pine. *Forest Pathology* 31: 99-106.
- Bonello P, Heller W, Sandermann H. 1993.** Ozone effects on root-disease susceptibility and defence responses in mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *New Phytologist* 124: 653-663.
- Braganca H, Diogo E, Moniz F, Amaro P. 2009.** First Report of Pitch Canker on Pines Caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease* 93:1079-1079. doi: 10.1094/pdis-93-10-1079a.
- Bragina A, Berg C, Cardinale M, Shcherbakov A, Chebotar V and Berg G. 2012.** *Sphagnum* mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. *The ISME journal* 6: 802-13.
- Branzanti MB, Rocca E, Pisi A. 1999.** Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 9: 103-109.

- Britz H, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Gordon TR, Leslie, JF. 1999.** *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Applied and Environmental Microbiology 65: 1198-1201.
- Britz H, Coutinho TA, Gordon TR, Wingfield MJ. 2001.** Characterisation of the pitch canker fungus, *Pinus radiata*, from Mexico. South African Journal of Botany 67: 609-614.
- Burdon JJ, Jarosz AM. 1991.** Host-pathogen interactions in natural populations of *Linum marginale* and *Melampsora lini*. I. Patterns of resistance and racial variation in a large host population. Evolution 45: 205-217.
- Bustin SA, Nolan T. 2004.** Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. J Biomol Tech. 15: 3155-66.
- Bustin SA. 2000.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 25: 169-93.
- Carlucci A, Colatruglio L, Frisullo S. 2007.** First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). Plant Disease 91: 1683-1683. doi: 10.1094/pdis-91-12-1683c.
- Cavanilles A. 1858.** Lekeitio en 1857. Madrid: imprenta de J. Martín Alegría, 151pp.
- Chimwamurombe PM, Wingfield BD, Botha AM, Wingfield MJ. 2001.** Cloning and sequence analysis of the endopolygalacturonase gene from the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*. Current Microbiology 42: 350-352.
- Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J. 1996.** Engineered GFP as a vital reporter in plants. Current Biology 6: 325-330.
- Christiansen E, Krokene P, Berryman AA, Franceschi VR, Krekling T, Lieutier F, Lönneborg A, Solheim H. 1999.** Mechanical injury and fungal infection induce acquired resistance in Norway spruce. Tree Physiology 19: 399-403.
- Cook RJ. 1998.** The molecular mechanisms responsible for resistance in plant-pathogen interactions of the gene-for-gene type function more broadly than previously imagined. Proc Natl Acad Sci U S A. 95: 9711-2.
- Cooke RC, Rayner ADM. 1984.** Ecology of Saprotrophic Fungi. New York, USA: Longman.
- Correll JC, Gordon TR, McCain AH, Fox JW, Koehler CS, Wood DL, Schultz ME. 1991.** Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution and canker development on Monterey pines (*Pinus radiata*). Plant Disease 75: 676-682.
- Correll JC, Gordon TR, McCain AH. 1992.** Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. Phytopathology 82: 415-420.
- Coutinho TA, Steenkamp ET, Mongwaketsi K, Wilmot M, Wingfield MJ. 2007.** First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. Australasian Plant Pathology 36: 256-261.
- Covert S, Kapoor P, Lee M, Briley A, Nairn J. 2001.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus radiata*. Mycological Research 105: 259-264.
- Crecente Campo F. 2008.** Modelo de crecimiento de árbol individual para *Pinus radiata* D. Don en Galicia. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Crous JW. 2005.** Post establishment survival of *Pinus patula* in Mpumalanga, one year after planting. Southern African Forestry Journal 205: 3-11.
- Czymmek KJ, Fogg M, Powell DH, Sweigard J, Park SY, Kang S. 2007.** *In vivo* time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. Fungal Genetics and Biology 44: 1011-1023.

- Dans del Valle F, Fernández de Ana-Magan FJ, Romero García A. 1999.** Manual de Selvicultura del pino radiata en Galicia. Proxecto Columella. Universidade de Santiago de Compostela.
- Davis JM, Wu H, Cooke JEC, Reed JM, Luce KS, Michler CH. 2002.** Pathogen challenge, salicylic acid and jasmonic acid regulate expression of chitinase gene homologs in Pine. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 380-387.
- De Smet I. 2012.** Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytologist* 193: 867-73.
- De Vega-Bartol JJ, Martín-Dominguez R, Ramos B, García-Sánchez MA, Díaz-Mínguez JM. 2011.** New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *fff1* correlates with virulence. *Phytopathology* 101: 470-479.
- Di Pietro A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG. 2003.** *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology* 4: 315-325.
- Dixon MS, Hatzixanthis K, Jones DA, Harrison K, Jones JD. 1998.** The tomato Cf-5 disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* 10: 1915-25.
- Duchesne LC, Peterson RL, Ellis BE. 1987.** The accumulation of plant-produced antimicrobial compounds in response to ectomycorrhizal fungi: a review. *Phytoprotection* 68: 17-27.
- DuTeau NM, Leslie JF. 1991.** A simple, rapid procedure for the isolation of DNA for PCR from *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Fungal Genet Newslett* 38: 72.
- Duyvesteijn RG, van Wijk R, Boer Y, Rep M, Cornelissen BJ, Haring MA. 2005.** Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Mol. Microbiol.* 57: 1051-1063.
- Dwinell LD, Barrows-Braddus JB, Kuhlman EG. 1985.** Pitch canker: a disease complex of southern pines. *Plant Disease* 69: 270-276.
- Eldridge KG. 1997.** Genetic resources of Radiata Pine in New Zealand and Australia. En: R.D. Burdon & J.M. Moore (Eds.). *Proceedings of IUFRO '97 genetics of radiata pine: Forest Research Institute Bulletin* 203: 26-41. Rotorua, Nueva Zelanda.
- Enebak SA, Carey WA. 2003.** Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* identified on spruce pine in Alabama. *Plant Disease* 87: 449-449.
- Enebak SA, Stanosz GR. 2003.** Responses of conifer species of the Great Lakes region of North America to inoculation with the pitch canker pathogen *Pinus radiata*. *Forest Pathology* 33: 333-338.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006.** First report of *Gibberella circinata* in France. *EPPO Reporting services* 2006/104, n°5. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, France.
- Eyles A, Bonello P, Ganley R, Mohammed C. 2010.** Induced resistance to pests and pathogens in tress. *New Phytologist* 185: 893-908.
- Fahn A, Pérez JF, Arenal FG, Casas FJF. 1978.** Anatomía vegetal. Ediciones Pirámide, Madrid.
- FAO. 2001. Evaluación mundial de recursos forestales 2000.** (ERF 200). Estudio FAO Montes 139. <http://www.fao.org/forestry/fo/fra/index.jsp> FAO, Roma.
- Fernández-Ábalos JM, Fox H, Pitt C, Wells B, Doonan JH. 1998.** Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 27: 121-130.
- Fernández-Manso A, Sarmiento-Maino A. 2004.** Manual de gestion forestal sostenible. Junta de Castilla y Leon, Valladolid.

- Franceschi V, Krekling T, Berryman A, Christiansen E. 1998.** Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (*Pinaceae*) bark are an important site of defense reactions. *American Journal of Botany* 85: 601-601.
- Franceschi VR, Krokene P, Christiansen E, Krekling T. 2005.** Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* 167: 353-376.
- Fox JW, Wood DL, Koehler CS, O'keefe ST. 1991.** Engraver beetles (*Scolytidae: Ips species*) as vectors of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans*. *The Canadian Entomologist* 123: 1355-1367.
- Garbelotto M, Pautasso M. 2012.** Impacts of exotic forest pathogens on Mediterranean ecosystems: four case studies. *European journal of plant pathology* 133: 101-116.
- Garbelotto M, Schweigkofler W, Shaw D. 2007.** First report of *Pinus radiata*, causal agent of pitch canker disease, from the roots of mature Aleppo pines in California. *Plant Health Progress* (February): 1-2.
- García-Sánchez MA, Martín-Rodríguez N, Ramos B, de Vega-Bartol JJ, Perlin MH, Díaz-Mínguez JM. 2010.** Fost 12, the *Fusarium oxysporum* homolog of the transcription factor *Ste 12*, is upregulated during plant infection and required for virulence. *Fungal Genetics and Biology* 47: 216-225.
- Garrett SD. 1944.** Root disease fungi. Waltham, Massachusetts. Chronica Botanica Company.
- Garrett SD. 1956.** Biology of root-infecting fungi. *Soil Science*, 82: 97.
- Garzia A, Etxebeste O, Rodríguez-Romero J, Fischer R, Espeso EA, Ugalde U. 2013.** Transcriptional changes in the transition from vegetative cells to asexual development in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 12: 311-321.
- Geiser DM, del Mar Jiménez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward T J, ..., O'Donnell K. 2004.** FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* (pp. 473-479). Springer Netherlands.
- Gerlach W, Nirenberg H. 1982.** The genus *Fusarium*--a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, (209).
- Gordon TR, Kirkpatrick SC, Aegerter BJ, Fisher AJ, Storer AJ, Wood DL. 2011.** Evidence for the occurrence of induced resistance to pitch canker, caused by *Gibberella circinata* (anamorph *Pinus radiata*), in populations of *Pinus radiata*. *Forest Pathology* 41: 227-232
- Gordon TR, Okamoto D, Storer AJ, Wood DL. 1998.** Susceptibility of five landscape pines to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. pini. *HortScience* 33: 868-871.
- Gordon TR. 2011.** Biology and management of *Gibberella circinata*, the cause of pitch canker in pines. In: Alves-Santos FM, Diez JJ, eds. *Control of Fusarium Diseases*. Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India. Research Signpost: 195-207.
- Gordon TR, Kirkpatrick SC, Aegerter BJ, Wood DL, Storer AJ. 2006.** Susceptibility of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) to pitch canker, caused by *Gibberella circinata* (anamorph= *Pinus radiata*). *Plant pathology* 55: 231-237.
- Guerra-Santos JJ. 1999.** Pitch canker on Monterey pine in Mexico. *Forestry and forest products. Current and potential impacts of pitch canker in Radiata pine. Technical Report* 112: 58-61.
- Gupta S, Chakraborti D, Rangi RK, Basu D, Das S. 2009.** A Molecular insight into the early events of Chickpea (*Cicer arietinum*) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (race 1) interaction through cDNA-AFLP analysis. *Phytopathology* 99:1245-1257.
- Gupta S, Chakraborti D, Sengupta A, Basu D, Das S. 2010.** Primary metabolism of chickpea is the initial target of wound inducing early sensed *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race I. *PLoS One* 5: e9030.

- Haegi A, Catalano V, Luongo L, Vitale S, Scotton M, Ficcadenti N, Belisario A. 2013.** A newly developed real-time PCR assay for detection and quantification of *Fusarium oxysporum* and its use in compatible and incompatible interactions with grafted melon genotypes. *Phytopathology* 103: 802-10.
- Hammerbacher A. 2006.** Biology and epidemiology of *Pinus radiata*. Pretoria, South Africa: University of Pretoria, PhD thesis.
- Heath MC. 2000.** Advances in imaging the cell biology of plant-microbe interactions. *Annual review of phytopathology* 38: 443-459.
- Hepting GH, Roth ER. 1946.** Pitch canker, a new disease of southern pines. *Journal of Forestry* 44: 742-744.
- Hepting GH, Roth ER. 1953.** Host relations and spread of the pine pitch canker disease. *Phytopathology* 43.
- Herrera T, Ulloa M. 1990.** El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. 552 pp. México. Universidad Nacional Autónoma de México & Fondo de Cultura Económica.
- Hietala AM, Eikenes M, Kvaalen H, Solheim H, Fossdal CG. 2003.** Multiplex real-time PCR for monitoring *Heterobasidion annosum* colonization in Norway spruce clones that differ in disease resistance. *Applied and environmental microbiology* 69: 4413-4420.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 4413-7.
- Hodge GR, Dvorak WS. 2000.** Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. *New Forest* 19: 241-258.
- Holub EB, Beynon JL, Crute IR. 1994.** Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 7:223-239.
- Howard RJ. 1997.** Breaching the outer barriers—cuticle and cell wall penetration, p. 43–60. In G. Carroll and P. Tudzynski (eds.), *Plant relationships*, vol. 5A. Springer-Verlag, New York, NY.
- Hsieh WH, Smith SN, Snyder WC. 1977.** Mating groups in *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 67: 3.
- Hudgins JW, McDonald GI, Zambino PJ, Klopfenstein NB, Franceschi VR. 2005.** Anatomical and cellular responses of *Pinus monticola* stem tissues to invasion by *Cronartium ribicola*. *Forest Pathology* 35: 423-443.
- Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenböck G, Schnitzler JP. 1998.** Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* 49: 953-965.
- Iida Y, Ohara T, Tsuge T. 2006.** Identification of genes up-regulated during conidiation of *Fusarium oxysporum* through expressed sequence tag analysis. *Fungal Genetics and Biology* 43: 179-189.
- Ioos R, Fourrier C, Iancu G, Gordon TR. 2009.** Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* 99: 582-590.
- Idnurm A, Reedy JL, Nussbaum JC, Heitman J. 2004.** *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryot. Cell* 3: 420-429.
- Iturriza E, Ganley RJ, Wright J, Heppe E, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield MJ. 2011.** A genetically homogenous population of *Fusarium circinatum* causes pitch canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain. *Fungal Biology* 115: 288-295.

- Jansen C, Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk A, Maier FK. 2005.** Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. PNAS 102: 16892-16897.
- Jarosz AM, Burdon JJ. 1991.** Host-pathogen interactions in natural populations of *Linum marginale* and *Melampsora lini*: II: Local and regional variation in patterns of resistance and racial structure. Evolution 45: 1618-1627.
- Jiménez-Díaz RM, Basallote Ureba MJ, Rapoport H. 1989.** Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. En: Vascular Wilt Diseases of Plants. E. C. Tjamos and C. H. Beckman, eds. NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin. H 28, pp. 113-121.
- Inventario Forestal del País Vasco (2004-2005).** Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad. Gobierno Vasco.
- Jiménez-Díaz D, Landa BB, Kang S, Jiménez-Díaz RM. 2013.** Quantitative and Microscopic Assessment of Compatible and Incompatible Interactions between Chickpea Cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Races. PLoS ONE 8: e61360.
- Jiménez-Fernández D, Montes-Borrego M, Jiménez-Díaz RM, Navas-Cortés JA, Landa BB. 2011.** In planta and soil quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and evaluation of *Fusarium* wilt resistance in chickpea with a newly developed quantitative polymerase chain reaction assay. Phytopathology 101: 250-262.
- Jones NB, Ford CM, Lighth ME, Nadel RL, Greyling I, Fourie G, Wingfield MJ, Morris AR. 2014.** Effect on nursery and field performance of *Pinus patula* seedlings after inoculation with *Pinus radiata*. Southern Forest 76:125-36.
- Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JD. 1994.** Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. Science 266: 789-93.
- Kankanala P, Czymmek K, Valent B. 2007.** Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. The Plant Cell 19: 706-24.
- Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield M J, Steenkamp ET. 2009.** Diversity and evolution of *Fusarium species* in the *Gibberella fujikuroi* complex. Fungal divers 34: 1-21.
- Kayihan GC, Huber DA, Morse AM, White TL, Davis JM. 2005.** Genetic dissection of fusiform rust and pitch canker disease traits in loblolly pine. Theoretical and applied genetics 110: 948-958.
- Kim KW, Lee IJ, Kim CS, Eom IY, Choi JW, Lee DK, Park EW. 2010.** Resin flow, symptom development and lignin biosynthesis of two pine species in response to wounding and inoculation with *Pinus radiata*. The Plant Pathology Journal 26: 394-401.
- Kim KW, Lee IJ, Thongchaleun V, Kim CS, Lee DK, Park EW. 2009.** Visualization of wound periderm and hyphal profiles in pine stems inoculated with the pitch canker fungus. Microscopy Research and Technique 72: 965-973.
- Kim YS, Woo KS, Koo YB, Yeo JK. 2008.** Variation in susceptibility of six pine species and hybrids to pitch canker caused by *Pinus radiata*. Forest Pathology 38: 419-428.
- Klein K. 1996.** Pattern formation and development of the fungal mycelium. In: Chiu SW, Moore D, eds. Patterns in fungal development. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 70-87.
- Kong D, Ma C, Zhang Q, Li L, Chen X, Zeng H, Guo D. 2014.** Leading dimensions in absorptive root trait variation across 96 subtropical forest species. New Phytologist 203: 863-72.
- Krekling T, Franceschi VR, Krokene P, Solheim H. 2004.** Differential anatomical response of Norway spruce stem tissues to sterile and fungus infected inoculations. Trees 18: 1-9.
- Krokene P, Christiansen E, Solheim H, Franceschi VR, Berryman AA. 1999.** Induced resistance to pathogenic fungi in Norway spruce. Plant Physiology 121: 565-570.

- Krokene P, Solheim H, Långström B. 2000.** Fungal infection and mechanical wounding induce disease resistance in Scots pine. *European Journal of Plant Pathology* 106: 537-541.
- Krokene P, Solheim H, Krekling T, Christiansen E. 2003.** Inducible anatomical defense responses in Norway spruce stems and their possible role in induced resistance. *Tree Physiology* 23: 191-197.
- Kuhlman EG, Dwinell LD, Nelson PE, Booth C. 1978.** Characterization of the *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. *Mycologia* 1131-1143.
- Kuhlman EG. 1982.** Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia*, 759-768.
- Lagopodi AL, Ram AFJ, Lamers GEM, Punt PJ, Van den Hondel CAMJJ, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. 2002.** Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 172-179.
- Landeras E, García P, Fernández Y, Braña M, Fernández-Alonso O, Méndez-Lodos S, ..., Beltrán R. 2005.** Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus spp.* in northern Spain. *Plant Disease* 89: 1015-1015.
- Lavery PB, Mead DJ. 1998.** *Pinus radiata*: a narrow endemic from North America takes the world. En D. M. Richardson (Ed.) *Ecology and Biogeography of Pinus*: 452-449. Cambridge. Cambridge University Press.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA. 1991.** A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* 9: 963-967.
- Lee JK, Lee SH, Yanh SI, Lee YW. 2000.** First report of pitch canker disease on *Pinus rigida* in Korea. *Plant Pathol. J.* 16: 52-54.
- Le Guill C, Dery CV. 1991.** A rapid procedure for the screening of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res* 19: 6655.
- Lewis NB, Ferguson IS, Sutton WRJ, Donald DGM, Lisboa HB. 1993.** Management of radiata pine. Inkata Press Pty Ltd/Butterworth-Heinemann.
- Libby WJ. 1997.** Native Origins of Domesticated Radiata Pine, En: RD Burdon & JM Moore (Eds.) *Proceedings of IUFRO '97 genetics of radiata pine*: Forest Research Institute Bulletin 203: 9-21. Rotorua, New Zealand.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 1995.** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4: 6357-62.
- Lombardero MJ, Ayres MP, Ayres BD. 2006.** Effects of fire and mechanical wounding on *Pinus resinosa* resin defenses, beetle attacks and pathogens. *Forest Ecology and Management* 225: 349-358.
- Luchi N, Ma R, Capretti P, Bonello P. 2005.** Systemic induction of traumatic resin ducts and resin flow in Austrian pine by wounding and inoculation with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Planta* 221: 75-84.
- MacFall JS, Johnson GA, Kramer PJ. 1991.** Comparative water uptake by roots of different ages in seedlings of Loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *New Phytologist* 119, 551-60.
- Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Talbot NJ, López-Llorca LV. 2009.** Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytologist* 182: 213-228.
- Marasas WF, Rheeder JP, Lamprecht SC, Zeller KA, Leslie JF. 2001.** *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia*, 1203-1210.

- Marcel S, Sawers R, Oakeley E, Angliker H, Paszkowski U. 2010.** Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The plant Cell* 22: 3177-87.
- Martín-Rodrigues N, Espinel S, Sanchez-Zabala J, Ortíz A, González-Murua C, Duñabeitia MK. 2013.** Spatial and temporal dynamics of the colonization of *Pinus radiata* by *Pinus radiata*, of conidiophora development in pith and of traumatic resin duct formation. *New Phytologist* 198: 1215-1227.
- Martín-Rodrigues N, Sanchez-Zabala J, Salcedo I, Majada J, González-Murua C, Duñabeitia MK. 2015.** New insights into radiata pine seedling root infection by *Fusarium circinatum*. *Plant pathology* 64: 1336-1348.
- Mc Nee WR, Wood DL, Storer AJ, Gordon TR. 2002.** Incidence of the pitch canker pathogen and associated insects in intact and chipped Monterey pine branches. *The Canadian Entomologist* 134: 41-57.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H. 1996.** Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology* 34: 367-386.
- Meng Y, Patel G, Heist M, Betts MF, Tucker SL, Galadima N, Donofrio NM, Brown D, Mitchell TK, Li L, Xu JR, Orbach M, Thon M, Dean RA, Farman ML. 2007.** A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 44: 1050-1064.
- Michaels JE, Hall JS, Michaels TE. 2009.** Adaptive imaging of damage from changes in guided wave signals recorded from spatially distributed arrays. In *SPIE Smart Structures and Materials+ Nondes- tructive Evaluation and Health Monitoring* (pp. 729515-729515). International Society for Optics and Photonics.
- Michel M. 2004.** El pino radiata (*Pinus radiata* D. Don) en la historia de la Comunidad Autónoma de Euskadi. Análisis de un proceso de forestalismo intensivo. 395 pp. Tesis doctoral nº 53. Vitoria-Gasteiz. Gobierno Vasco.
- Millar CI. 1999.** Evolution and biogeography of *Pinus radiata*, with a proposed revision of its Quater- nary history. *New Zealand Journal of Forestry Science* 29: 335-365.
- Mitchell RG, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield MJ. 2011.** The pitch canker fungus, *Pinus radiata*: implications for South African forestry. *Southern Forest* 73: 1-13.
- Mitchell RG, Zwolinski J, Jones NB, Coutinho TA. 2004.** The effect of applying prophylactic mea- sures on the post-planting survival of *Pinus patula* in South Africa. *Southern African Forestry Journal* 200: 51-58.
- Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF. 2005.** *Agrobacterium*-mediated transfor- mation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.* 48: 1-17.
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. 1992.** A simple and efficient protocol for iso- lation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* 20: 6115-6.
- Mucha J, Zadworny M, Werner A, Napierala-Filipiak A, Lakomy P. 2008.** Antagonistic activity of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* challenged by saprotrophic fungi from different soils. *Nova Hedwigia* 87: 373-385.
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S. 2001.** *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *The American Phytopathological Society* 91: 173-180.
- Muramoto M, Dwinell LD. 1990.** Pitch Canker of *Pinus luchuensis*, in Japan. *Plant Disease* 74:530.
- Muramoto M, Tashiro T, Minamihashi H. 1993.** Distribution of *Fusarium moniliforme* var. *subglu- tinans* in Kagoshima prefecture (Japan) and its pathogenicity to pines (*Pinus*). *Journal of the Japanese Forestry Society* (Japan).

- Nagy NE, Franceschi VR, Solheim H, Krekling T, Christiansen E. 2000.** Wound-induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (*Pinaceae*): Anatomy and cytochemical traits. *American Journal of Botany* 87: 302-313.
- Nagy NE, Krokene P, Solheim H. 2005.** Anatomical-based defense responses of Scots pine (*Pinus sylvestris*) stems to two fungal pathogens. *Tree Physiology* 26: 159-167.
- Nan H, Liu Q, Chen J, Cheng X, Yin H, Yin C, Zhao C. 2013.** Effects of nutrient heterogeneity and competition on root architecture of Spruce seedlings: implications for an essential feature of root foraging. *PLoS one* 8: e65650.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. 1983.** *Fusarium species*: an illustrated manual for identification.
- Nibau C, Gibbs DJ, Coates JC. 2008.** Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist* 179: 595-614.
- Nirenberg HI. 1989.** Identification of *Fusaria* occurring in Europe on cereals and potatoes. *Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* 179-193.
- Nowak DJ. 1993.** Historical vegetation change in Oakland and its implications for urban forest management. *Journal of Arboriculture* 19: 313-319.
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI. 1998.** Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*: 465-493.
- O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Casper HH. 2000.** Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 7905-7910.
- Pérez-Sierra A, Landeras E, León M, Berbegal M, García-Jiménez J, Armengol J. 2007.** Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus spp.* in northern Spain. *Mycological research* 111: 832-839.
- Pfaffl MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res* 29: 9 e45.
- Pfenning H, Costa SS, Melo MP, Costa H, Ventura JA, Auer CG y Santos AF. 2014.** First report and characterization of *Pinus radiata*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39: 210-216.
- Phillips MA, Croteau RB. 1999.** Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science* 4: 184-190.
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ. 2009.** Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in plant science* 14: 21-29.
- Punt PJ, Dingemans MA, Jacobs-Meijsing BJM, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ. 1988.** Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 69: 49-57.
- Ramos B, Alves-Santos FM, García-Sánchez MA, Martín-Rodríguez N, Eslava AP, Díaz-Mínguez JM. 2007.** The gene coding for a new transcription factor (*ftf1*) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genet Biol* 44: 864-76.
- Reid RW, Whitney HS, Watson JA. 1967.** Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* Hopkins and blue stain fungus. *Canadian Journal of Botany* 45: 1115-1126.
- Ridley GS, Dick MA. 2000.** Pine pitch canker disease: the name of the causal fungus and its distribution. *Australasian Plant Pathology* 29: 263-266.
- Rockwood DL, Blakeslee GM, Lowerts GA, Underhill EM, Oak SW. 1988.** Genetic strategies for reducing pitch canker incidence in slash pine. *Southern Journal of Applied Forestry* 12: 28-32.
- Rodríguez F, Broto M, Lizarralde I. 2006.** Densidad normal de la madera de las principales especies forestales de Castilla y León. Documento interno. http://cubicor.cesefor.com/docs/densidad_madera.pdf

- Roux J, Eisenberg B, Kanzler A, Nel A, Coetzee V, Kietzka E, Wingfield MJ. 2007.** Testing of selected South African *Pinus* hybrids and families for tolerance to the pitch canker pathogen, *Pinus radiata*. *New Forests* 33: 109-123.
- Sakamoto JM, Gordon TR. 2006.** Factors influencing infection of mechanical wounds by *Fusarium circinatum* on Monterey pines (*Pinus radiata*). *Plant pathology* 55: 130-136.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual.
- Sánchez-Vallet A, Ramos B, Bednarek P, Lopez G, Pislewski-Bednarek M, Schulze-Lefert P Molina A. 2010.** Tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana* confer non-host resistance to necrotrophic *Plectosphaerella cucumerina* fungi. *Plant J.* 63: 115–127
- Sanchez-Zabala, 2013.** Biotecnología forestal aplicada a la mejora de la producción de *Pinus radiata* D. Don y *Pinus pinaster* Ait. Leioa, España: Universidad del País Vasco, PhD thesis.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis, KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M. 2004.** Detection and quantification of airborne conidia of *Pinus radiata*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3512-3520.
- Schweingruber FH, Börner A, Schulze ED. 2006.** Atlas of woody plant stems. Evolution, structure, and environmental modifications. Springer-Verlag, Berlin, 229 pp.
- Scot CW. 1961.** Pino insigne (*Pinus radiata* D. Don). Roma, Publicaciones FAO. Estudios sobre silvicultura y productos forestales 14: 333.
- Sesma A, Osbourn AE. 2004.** The rice blast pathogen undergoes developmental processes typical of root infecting fungi. *Nature* 431: 582–86.
- Simons G, Groenendijk J, Wijbrandi J. 1998.** Dissection of the *Fusarium* I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell.* 10: 1055-1068.
- Sinnot EW. 1918.** Factors determining character and distribution of food reserve in woody plants. *Botanical Gazette* 66: 162-175.
- Snyder CW, Toole ER, Hepting GH. 1949.** *Fusaria* associated with mimosa, sumac wilt and pine pitch canker. *Journal of Agricultural Research* 78: 365-382.
- Solé A, Sánchez C, Vielba JM, Valladares S, Abarca D, Díaz-Sala C. 2008.** Characterization and expression of a *Pinus radiata* putative ortholog to the Arabidopsis SHORT-ROOT gene. *Tree physiology* 28:1629-1639.
- Solel Z, Bruck RI. 1990.** Relation between wilt rate and obstruction of water flow in stems of two families of loblolly pine affected by pitch canker. *Europäische Zeitschrift fuer Forstpathologie* 20: 317-320.
- Soylu EM, Soylu S. 2003.** Light and electron microscopy of the compatible interaction between *Arabidopsis* and the downy mildew pathogen *Peronospora parasitica*. *J. Phytopathol.* 151:300-306.
- Steenkamp ET, Rodas CA, Kvas M, Wingfield MJ. 2012.** *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. *Australasian Plant Pathology* 41: 483-491.
- Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Wingfield M J, Marasas WF O. 1999.** Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by Histone Gene Sequence Data. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3401-3406.
- Stephens AE, Gardiner DM, White RG, Munn AL, Manners JM. 2008.** Phases of infection and gene expression of *Fusarium graminearum* during crown rot disease of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1571-1581.

- Stevenson PC, Turner HC, Haware MP. 1997.** Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings associated with resistance to *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*), *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 50:167-178.
- Storer AJ, Bonello P, Gordon TR, Wood DL. 1999.** Evidence of resistance to the pitch canker pathogen in native stands of Monterey pine. *Forest Science* 45: 500-505.
- Storer A, Gordon T, Dallara P, Wood D. 1994.** Pitch canker kills pines, spreads to new species and regions. *California Agriculture* 48: 9-13.
- Storer AJ, Gordon TR, Wood DL, Bonello P. 1997.** Pitch canker disease of pines: current and future impacts. *Journal of Forestry* 95: 21-26.
- Sukno SA, García VM, Shaw BD, Thon MR. 2008.** Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 823-32.
- Sutton WRJ. 1999.** The need for planted forest and the example of radiata pine. En *Planted Forest: contributions to the quest for sustainable societies* (pp 95-109). Springer Netherlands.
- Swett CL, Gordon TR. 2012.** First report of grass species (*Poaceae*) as naturally occurring host of the pine pathogen *Giberella circinata*. *Plant Disease* 96: 908.
- Swett CL, Gordon TR. 2013.** Dualism in symbiosis: growth and defense enhancement of symptomless infection by the pathogen *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Phytopathology* 103: S2.191
- Swett CL, Gordon TR. 2015.** Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). *Fungal Ecology* 13: 120-29.
- Swett CL, Porter B, Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield MJ. 2014.** Association of the pitch canker pathogen *Fusarium circinatum* with grass hosts in commercial pine production areas of South Africa. *Southern Forest* 76: 161-166.
- Terui M. 1940.** Internal formation of conidia of the rice blast fungus. *Annual phytopathology society.* 10: 265-268.
- Thoungchaleun V, Kim WK, Lee DK, Kim CS, Park EW. 2008.** Pre-infection behavior of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* on pine stems. *The Plant Pathology Journal* 24: 112-117.
- Tyree MT & Zimmermann MH. 2002.** Pathology of the xylem. In: Timell TE, ed. *Xylem structure and the ascent of sap.* Heidelberg, Germany: Springer-Verlag: 239-255.
- Umebayashi T, Fukuda K, Haishi T, Sotooka R, Zuhair S and Otsuki K. 2011.** The developmental process of xylem embolisms in pine wilt disease monitored by multipoint imaging using compact magnetic resonance imaging. *Plant physiology* 156, 943-51.
- Van Der Does HC, Duyvesteijn RGE, Goltstein PM, Van Schie CCN, Manders EMM, Cornelissen BJC. 2008.** Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genet. Biol.* 45: 1257-1264 10.1016/j.fgb.2008.06.002
- Viljoen A, Marasas WFO, Wingfield MJ, Viljoen CD. 1997.** Characterization of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. *Mycological Research* 101: 437-445.
- Viljoen A, Wingfield MJ, Marasas WFO. 1994.** First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.
- Voigt K, Schleier S, Brückner B. 1995.** Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 27: 528-535.
- Waksman SA. 1944.** Three decades with soil fungi. *Soil Science* 58: 89-116.

Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD, Coutinho TA. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* – a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* 37: 319–334.

Wingfield M.J, Jacobs A, Coutinho, TA, Ahumada R, Wingfield BD. 2002. First report of the pitch canker fungus, *Pinus radiata*, on pines in Chile. *Plant Pathologie* 51: 397.doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00710.x.

Wikler K, Gordon TR. 2000. An initial assessment of genetic relationships among populations of *Fusarium circinatum* in different parts of the world. *Canadian Journal of Botany* 78: 709-717.

Witzell J, Martín JA. 2008. *Can. J. For. Res.* 38: 2711-2727.

Wong ML, Medrano JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.

Xiao RF, Zhu YJ, Li YD, Huang SF, Liu B. 2009. Green fluorescent protein gene (GFP) transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* strain, FOV-135. *Fujian Journal of Agricultural Sciences* 24: 519-22.

Xu JR, Yan K, Dickman MB, Leslie JF. 1995. Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* 8: 74-84.

Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. 2006. Statistical analysis of realtime PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85.

Zvirin T, Herman R, Brotman Y, Denisov Y, Belausov E, Freeman S, Perl-Treves R. 2010. Differential colonization and defense responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1·2. *Plant Pathology* 59: 576-585.

