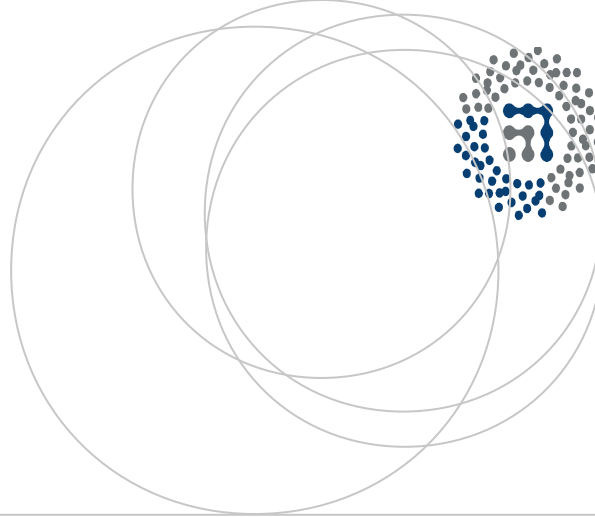


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Bioteknologiako Gradua / Grado en Biotecnología

Onddo ektomikorriziko espezie ezberdinen gaitasun antagonistaren ikerketa *Fusarium circinatum* patogenoaren aurka

Egilea/Autor:

Ander Castander Olarieta

Zuzendaria/Director/a:

Dra. Miren Karmele Duñabeitia

© 2015, se puede proteger poniendo "nombre y apellidos/izen
abizenak" ezarriz babez zaitzke edo Lizentzia CC batekin
babestu/o con una Licencia CC:

<http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

AURKIBIDEA

1. SARRERA	1-4
1.1 Helburuak	4
2. MATERIALAK ETA METODOAK	5-8
2.1 Onddo ektomikorrizikoen hazkuntza tasaren azterketa	5
2.2 <i>Fusarium circinatum</i> onddoaren aurkako gaitasun antagonistaren ebaluazioa ko-kultiboan	6-7
2.3 Onddo ektomikorrizikoen eragina <i>F. circinatum</i> -en esporen ekoizpenean eta hozitzean	7-8
2.4 Analisi estatistikoa	8
3. EMAITZAK	9-17
3.1 Onddo ektomikorrizikoen hazkuntza tasaren azterketa	9
3.2 <i>Fusarium circinatum</i> onddoaren aurkako gaitasun antagonistaren ebaluazioa ko-kultiboan	9-16
3.3 Onddo ektomikorrizikoen eragina <i>F. circinatum</i> -en esporen ekoizpenean eta hozitzean	16-17
4. EZTABAIDA	18-21
5. ONDORIOAK	21-22
6. BIBLIOGRAFIA	22-25

1. SARRERA

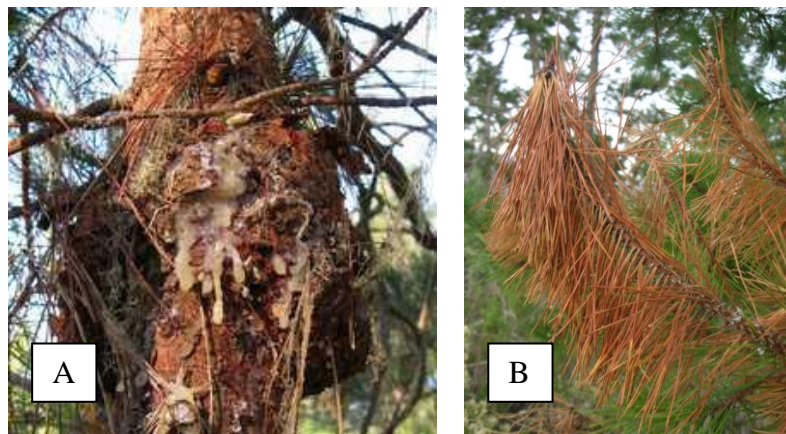
Kaliforniako pinua (*Pinus radiata* D. Don) Iberiar penintsularen iparraldean basoberritzerako gehien erabiltzen den zuhaitz espeziea da, 200.000 ha-ko baso-hedadura izatera heldu baita (Hermoso *et al.*, 2007). Pinu-sail hauek itsas mailatik 600 m-ko altuera bitartean aurkitzen dira, temperatura epeletako eta 900 mm-tik gorako urteko batezbesteko prezipitazioa duten eskualdeetan (Ceballos and Ruíz de la Torre, 1979). Baldintza hauek betetzen dituzten lur eremuak Euskal Autonomia Erkidegoan (EAE) hain zabalak izateak kaliforniako pinuaren landaketa faboratu dute aspalditik, bere presentzia zuhaitz espezie guztien artetik %53-koa izatera helduz (EUSTAT, 2005).

Gaur egun, pinu-sail hauek *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell izeneko onddo nekrotrofikoarengatik mehatxaturik aurkitzen dira, zeinak pinuek jasan dezaketen gaixotasunik larrienetarikoa sortzen duen: txankro erretxinaduna edo “pitch canker”. Gaixotasun honek baso-ustiapenaren errendimendu galera eta hilkortasun maila altua eragiten ditu bai pinu helduetan nola negutegietako landaretxoetan. Egoera honek sekulako arazoa suposatzen du EAEn ekonomia-erantzat, basogintzak lehen mailako sektorearen produktu finalaren %7,6 suposatzen baitu.

Patogenoak zuhaitz helduetan eragiten dituen efektuei dagokienez, azpimarratzekoak dira azikulen horidura, lehortzea eta ondoriozko erorketa, adarren muturra biluzik utziz (Gordon *et al.*, 2001), edota txankro erretxinadunen agerpena gaixotasunaren fase garatuetan (**1. Irudia**) (Pintos *et al.*, 2005). Efektu hauek ere nabariak izaten dira baso-mintegietan, non landaretxoen kimu terminalaren ihardura agertzen den dagoeneko aipatutako azikulen kolore aldaketa bereizgarriarekin batera.

Duela gutxira arte uste zen onddo hau klima mediterranearen edo tropikaletako eskualdeetan baino ez zela hazten, Mexiko eta Estatu Batuetako hego-ekialdeko lurraldeetako espezie endemikoa izanik. Haatik, aldaketa klimatikoaren efektuen ondorioz, onddoa hedatzen joan da, batez ere Europan (Watt *et al.*, 2011), non klima ozeanikoko lurraldeak kolonizatzerara heldu den (Garbelotto y Pautasso, 2012). Espainian 2004an aurkitu zen estreineko aldiz Asturiaseko zenbait mintegietan eta

Kantabriako baso-eremu konkretu batean, baina ordudanik egindako ikerketen arabera Kantauriar eskualde osoan zehar barreiatuak dagoela uste da (Pérez-Sierra *et al.*, 2007).



1. Irudia. *Fusarium circinatum*-ek *Pinus radiata*-n eragindako sintomarik aipagarrienak: (A) Txankro erretxinaduna zuhaitz heldu baten enborrean eta (B) azikulen lehortzea eta erorketa.

Orain dela gutxi detektaturiko gaixotasuna izateak koarentenako gaixotasun bihurtu du. Izan ere, 2006an Espainiako gobernuak 637/2006ko maiatzak 6 Errege Dekretua onartu zuen non onddoaren kontrolerako eta deuseztapenerako programa zehazten den. Gainera, dekretu honetan kutsadura saihesteko jokabide aproposak azaltzen dira. Dena dela, egungo egoerak eta kontrolerako metodo eraginkor baten faltak onddoaren ezabapen osoa epe laburrera ezinezkoa izando dela aditzera ematen dute. Horregatik, egoera honen aurrean irtebide bakarra onddoaren hedapena ekiditeko teknikak finkatzea da.

Hasiera batean uste zen *F. circinatum* airearekin soilik kontaktuan dauden landare-ataletatik kutsatzen dituela zuhaitzak (*airborne pathogen* ingelesez), airearen, uraren edota intsektuen (batez ere *Scolytidae*, *Anobidae* eta *Cercopidae* familietakoak) bidez garraiatuak edo espora asexualak zauri mekanikoetatik sartzen direnean. Hala ere, kutsadura biderik ohikoena haziak dira, batez ere mintegietan (Carey *et al.*, 2005). Gainera, azken urteotan ebidentziek lurzoru-patogenoa (*soilborne pathogen* ingelesez) izan daitekeela adierazten dute, hots, sustratuan bizirik irauteko gaitasuna dauka eta landareak sustraietatik

kutsatzen ditu (Sánchez Zabala, 2013). Azken aurkikuntza honek beraz patogenoaren kontrol eta maneiu egokia eskatzen du mintegietan, eta horregatik azken urteotan tratamendu kimiko eta fisiko ezberdinak aplikatzen hasi dira. Horien artean erabilienetakoak fungizidak dira, lurraren desinfekziorako eraginkortasun altua aurkezten dutenak baina aldi berean mikrobiota onuragarria deuseztatzen dutenak. Horrek landarearen hazkuntza moteldu eta patogenoaren ezarpena erraztu dezake fase aurreratuagoetan, fungizidek ingurumenari eragin diezazkioketen kalteak ahaztu gabe.

Hori dela eta, azken urteotan ikerketa ugari egin dira kontrol biologikoaren inguruan. Horretarako espezie ugari frogatu izan dira, zeinen artean zenbait bakteria (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* etab.), onddo saprofito (*Trichoderma* spp.) eta onddo ektomikorriziko aurki ditzakegun.

Nahiz eta *Trichoderma* generoko espezieek eraginkortasun handia erakutsi, hainbat ikerketek frogatu dute espezie hauen hazkuntza tasa altuaren ondorioz gai direla lurzoruko beste onddo saprofitoen zein mikorriren antagonistak izateko, rizosferaren mikrobiota kaltetuz eta biodibertsitatea murriztuz (Werner *et al.*, 2002).

Trichoderma-ren erabilerak dakartzan arazoak saihesteko helburuz, onddo ektomikorrizikoen erabilera proposatu da. Hauek hainbat zuhaitz-espezierekin batzeko gai dira, zeinen artean *Fagus*, *Quercus*, *Betula*, *Eucalyptus* eta *Pinus* generokoak nagusitzen diren. Anatomikoki, onddo ektomikorrizikoek hifa sare dentsoa osatzen dute, zeina fotosinbiontearen sustraietako zelula kortikalen artetik sartzen den endodermisera heldu gabe, “red de Harting” izeneko egitura osatuz (Marks, 1991). Mizelio egitura berezi hauek oso erginkorrak dira ura eta konposatu mineralak xurgatzen (George *et al.*, 1992) eta gainera entzima extrazelularrak, pisu molekular baxuko azido organikoak eta sideroforoak ekoizteko gai dira, zeintzuek N, P eta Fe bezalako nutrienteen lorpena errazten duten, landarearen hazkuntza hobetuz (Leake *et al.*, 2004). Horretaz gain, frogatu izan da onddo ektomikorrizikoek errizosferako komunitate mikrobianoaren gaineko presio selektibo garrantzitsua sortzen dutela, eta horrek ere landareen elikagaien lorpenerako dinamikan eragin zuzena eduki dezake (Frey-Klett *et al.*, 2005).

Honen guztiaren ondorioz, onddo ektomikorrizikoen erabilera kontrolatuaren bidez mintegietan landaretxoen hazkuntza eta kalitate fisiologikoa hobeto daitezke, ondorengo basoberitzea erraztuz (Duñabeitia *et al.*, 2004; Sánchez-Zabala *et al.*, 2013) eta hainbat onddo patogenok eragindako gaixotasunak kontrolatuz (Duchesne, 2000).

Zenbait espezie ektomikorrizikok *Fusarium* espezie batzuen aurrean aurkezten duten jokabide antagonista aztertu izan da (Pérez-Sierra *et al.*, 2007), baina inoiz ez *Fusarium circinatum* espeziearekin, onddo hau orain dela gutxirarte ez baitzen lurreko patogenotzat hartzen. Babes-mekanismo posibleen artean, ikusi da onddo ektomikorrizikoek sustraien inguruan sortzen duten mizelioak hesi moduan joka dezakeela eta gainera gai direla sustantzia antifungikoak ekoizteko, rizosferako elikagaiak eskuratzeko eragiten duten konpetentzia ahaztu gabe (Marx, 1972). Hau guztia espezie batetik bestera aldatu egiten da, eta hortaz, oso garrantzitsua da gaitasun antagonista horren ebaluaketa egitea espezie kandidato posible askoren artean.

1.1 HELBURUAK

Onddo ektomikorrizikoen erabileraren eraginkortasuna aztertzeko lehenik eta behin espezie antagonista posibleen hautaketa egin behar da. Horretarako ezinbestekoa da *in vitro* entseiuak egitea, gaitasun antagonista horren ebaluaketa egiteko eta ondoren hautatutako espezieak heuren ostalariarekin batera duten jokabidea ikusi ahal izateko. Horregatik, ondorengo helburuak planteatzen dira:

1. Haibat espezie ektomikorrizikok *Fusarium circinatum* onddoaren aurrean duten gaitasun antagonista ebaluatzea ko-kultiboan.
2. Onddo ektomikorrizikoek *Fusarium circinatum*-en esporen hozitzean duten eragina testatzea.

2. MATERIALAK ETA METODOAK

2.1 ONDDO EKTOMIKORRIZIKOEN HAZKUNTZA TASAREN AZTERKETA

Ikerketa honetan 8 espezie ektomikorrizio aztertu dira. Horietako bat *Agaricales* ordenekoa da (*Amanita rubescens*), beste bi *Sclerodermatales* ordenekoak (*Pisolithus arhizus* eta *Scleroderma citrinum*) eta beste bostak *Boletales* ordenekoak (*Boletus erythropus*, *Boletus edulis*, *Suillus bovinus*, *Suillus granulatus* eta *Xerocomus badius*). Espezie guztiak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Landareen Biologia eta Ekologia Saileko kultibo puruen bildumatik eskuratu dira eta Bizkaiko zonalde ezberdinetatik hartutako karpoforoetatik isolatuak izan ziren Molinak eta Palmerrek (1982) azaldutako prozedura jarraituz.

Kultibo puru horietatik 8 Petri plaka (9 cm Ø) erein ziren espezie bakoitzetik Melin-Norkrans medio eraldatua (MMN) erabiliz. Medio honen konposaketa honakoa da: 0,05 g CaCl₂, 0,025 g NaCl, 0,5 g KH₂PO₄, 0,25 g (NH₄)HPO₄, 0,15 g MgSO₄ · 7H₂O, 0,02 g sequestrene, 100 µg tiamina (HCl), 3 g malta estraktua, 10 g glukosa, 15 g agar eta ur litro bat, pHa doitzuz HCl-a erabiliz autoklabean esterilizatu aurretik.

Behin ereinda, plaka guztiak ilunpean eta 25°C-tan inkubatu ziren hilabete oso batez eta astean bitan (astelehen eta ostiral) kolonien diametroa neurtu da plakan markaturiko puntu konkretu batekiko modu paraleloan eta perpendikularrean. Bi diametroen neurketa egin da kolonien forma guztiz homogenea ez izateagatik. Modu horretan neurketaren errorea minimizatzen da. Lortutako datuak erabiliz espezie bakoitzaren hazkuntza kurba irudikatu da, kurba horretatik gero hazkuntzaren fase esponentziala mugatu eta erregrezio lineal baten bidez fase horren malda kalkulatu da, zeina aldi berean onddoaren hazkuntza tasa edo hazkuntza abiadura den, mm/egun unitatetan adierazita (Lee eta Magan, 1999).

2.2 *FUSARIUM CIRCINATUM* ONDDOAREN AURKAKO GAITASUN ANTAGONISTAREN EBALUAZIOA KO-KULTIBOAN

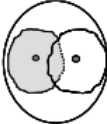


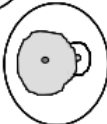

Gaitasun antagonistaren ebaluazioa MMN medio solidodun Petri plaketan (9 cm Ø) egin da Tang eta Luk (1981) deskribaturiko konfrontazio-teknika erabiliz. Jakinda onddo ektomikorrizikoen hazkuntza abiadura *F. circinatum*-ena baino motelagoa dela, ko-kultiboak egiterakoan 14 egunetan zehar egon da onddo ektomikorrizikoa bakarrik hazten patogenoaren ereinketa egin baino lehen. Modu horretan onddo ektomikorrizikoaren ezarpen eta garapen egokia bermatzen dira (Werner eta Zadworny, 2003). Prozedura honetan, kolonia ektomikorrizikoaren kontrako aldean eta plakaren ertzetik 1 cm-ra, aste bateko adina duen patogeno kolonia batetik erauzitako diska bat kokatzen da (5 mm Ø). Horrela, espezie bakoitzerako 14 plaka erabili dira, 11 enfrentamendua egiteko, zeinetatik 7 gaitasun antagonistaren ebaluazio bera egiteko erabili diren, eta beste 4 gerorako gorde diren, esporen ekoizpena aztertzeko helburuz, geroago azalduko den moduan. Beste hiru plaka kontrol moduan erabili dira, hots, *F. circinatum*-en diska gehitu gabe. Era beran, patogenoaren 7 kontrol plaka erein dira, patogenoak espezie ektomikorrizikoen presentziarik gabe aurkezten duen hazkuntza aztertu ahal izateko. Enfrentamenduaren ostean plaka guztiak 45 egunez utzi dira inkubatzen ilunpean eta 25°C-tan.

45 egun horiek pasa ondoren, enfrentaturiko plaken pHa neurtu da paperezko tirak erabiliz. Gainera, plaka bakoitzaren argazkia atera da eta “*ImageJ*” programa informatikoa erabiliz kolonien (patogeno zein ektomikorriziko) azalera (cm²) estimatu da. Jarraian, biomasa kalkulatu da Eng *et al.*-ek (2003) deskribaturiko prozedura jarraituz: onddoa daraman agarra ur berotan desegin, atal solidoa (onddoa) iragazi, berogailuan lehortu 48 orduz 60°C-tan eta pisatu. Ondoren, behin biomasa ezagututa (mg) eta kolonien azalera ezagututa (cm²), hazkuntza dentsitatea kalkulatu da, mg/cm²-tan adierazita.

Era berean, ateratako argazkien bidez, eta kasu honetan ere “*ImageJ*” programa erabiliz, onddo ektomikorrizikoez jariatutako substantzia koloredunen azalera, fronteen agerpena eta azalera, mizelioen arteko distantzia edota gainezarpen azalera

kalkulatu dira, kasuan kasu. Modu horretan, kolonien arteko elkarrekintza mota determinatu ahal izan da (**1. Taula**).

1. Taula. Elkarrekintza motak eta bakoitzaren ezaugarriak aipagarrienak

Elkarrekintza mota	Elkarrekintzaren ezaugarriak
A	Hazkuntza normala 
B	Kontaktu bidezko elkarrekiko inhibizioa edo kolonien arteko distantzia < 2 mm 
C	Kontaktu gabeko elkarrekiko inhibizioa edo kolonien arteko distantzia > 2 mm 
D	Kontaktu bidezko mikroorganismo baten inhibizioa. Mikroorganismo inhibitzailea bestearen gainetik hazten jarraitu 
E	Kontaktu gabeko mikroorganismo baten inhibizioa. Mikroorganismo inhibitzailea bestearen gainetik hazi, bien arteko distantzia egon arren 

2.3 ONDDO EKTOMIKORRIZIKOEN ERAGINAREN IKERKETA *F. CIRCINATUM*-EN ESPOREN EKOIZPENEAN ETA HOZITZEAN.

Espora patogenoen ekoizpen-tasaren kasuan, 10 ml % 0,5 (p/b) KCl gehitu dira 45 egunez hazitako *F. circinatum* plaka kontrolei zein enfrentamenduei (aurretiaz azaldu den bezala). Jarraian, bisturi bat erabiliz agarraren gainazaleko mizelio patogenoa altxatu da kontu handiz eta medioaren azalera ondo garbitu ondoren likidoa *Falcon* tutu esteril batera transferitu da, esporak mizeliotik banatzeko muselina mintza erabiliz. Ondoren, enfrentamendu bakoitzaren kasuan ekoiztutako esporen kantitatea zehaztu da *Neubauer* kamera baten bidez. Emaitzak kontrol plaketan lortutako balioekin konparatu dira.

Onddo ektomikorrizikoek esporen hozitzean duten eragina aztertzeo, lehenik eta behin esporen erauzketa, zenbaketa eta diluzioen prestaketa egin da. Horretarako, 10 ml % 0,5 (p/b) KCl gehitu dira 14 egunez PDA (Potato Dextrosa Agar) medioan hazitako *F. circinatum* plakei eta azaldu den moduan esporak *Falcon* tutu esteril batera transferitu dira. Iragazitako likido horren parte txiki bat esporen zenbaketa egiteko erabili da eta lortutako kontzentrazioaren arabera, gainontzeko likidoa diluitu egin da esporen kontzentrazio egokia doitu arte. Gure kasuan, plaka bakoitzeko 30-300 espora egon behar zirela akordatu zenez, 1:000 diluzioa prestatu behar zela kalkulu zen eta hortik 55 µl erein behar zirela plaka bakoitzean.

Behin hau eginda, 30 egun lehenago espezie ektomikorrizikoz ereindako 40 plakari (4 plaka espezie bakoitzeko) aurretiaz kalkulaturiko espora diluzio boumena gehitu zaio eta *Digralsky* euskarri batez baliatuz likidoa kolonia ektomikorrizikoaren ingurutik hedatu da. Aurreko kasuetan bezala, oraingoan ere 4 plaka kontrol moduan erabili dira, hau da, espora diluzioa hutsik zeuden plaketara gehitu da, espezie ektomikorrizikorik gabekoa. Ondoren, plaka guztiak aste batez inkubatu dira ilunpean eta 25°C-tan gero hozitutako esporen zenbaketa egin ahal izateko.

2.4 ANALISI ESTADISTIKOA

Lortutako datu guztiak SPSS Inc. (vs. 19.0, 2011) pakete informatikoa erabiliz aztertuak izan dira. Hasteko, *Kolmogorov-Smirnov* testaren eta *Levene* frogaren bidez normaltasuna eta bariantzen homogeneotasuna egiaztatu dira. Beharrezkoa izan den kasuan zenbait aldagai ohiko eraldaketen bidez transformatuak izan dira baldintza horiekin bat egiteko. Hala ere, emaitzetan adierazitako batesbezteko eta errore estandar guztiak eraldatu gabeko datuetatik lortu dira. Taldeen edota lagin ezberdinen arteko ezberdintasun adierazgarriak detektatzeko *ANOVA* analisisa egin da, eta batesbeztekoen konparaketa aniztuna (*post hoc*) S.N.K testa erabiliz. Bestetik, korrelazio ezberdinak aztertzeo *Spearman*-en “*análisis de correlaciones bivariadas*” erabili da. Test estatistiko guztien adierazgarritasun maila $p \leq 0,05$ izan da.

3. EMAITZAK

3.1 ONDDO EKTOMIKORRIZIKOEN HAZKUNTZA TASAREN AZTERKETA

Onddo ektomikorrizikoen hazkuntza tasak (**2. Taula**) konparatzen badira hiru talde bereiz daitezke: hazkuntza tasa altukoak eta beraz oso azkar hazten direnak (*A. rubescens* eta *S. bovinus*), hazkuntza tasa ertainekoak (*P. arhizus* eta *S. granulatus*) eta hazkuntza tasa baxukoak (*B. edulis*, *X. badius*, *S. citrinum* eta *B. erythropus*).

2. Taula. Onddo ektomikorriziko bakoitzaren hazkuntza tasa

Espezia	Hazkuntza tasa (mm/egun)
<i>A. rubescens</i>	3
<i>S. bovinus</i>	2,9
<i>P. arhizus</i>	2,3
<i>S. granulatus</i>	2,1
<i>B. edulis</i>	1,2
<i>X. badius</i>	1
<i>S. citrinum</i>	1
<i>B. erythropus</i>	0,8

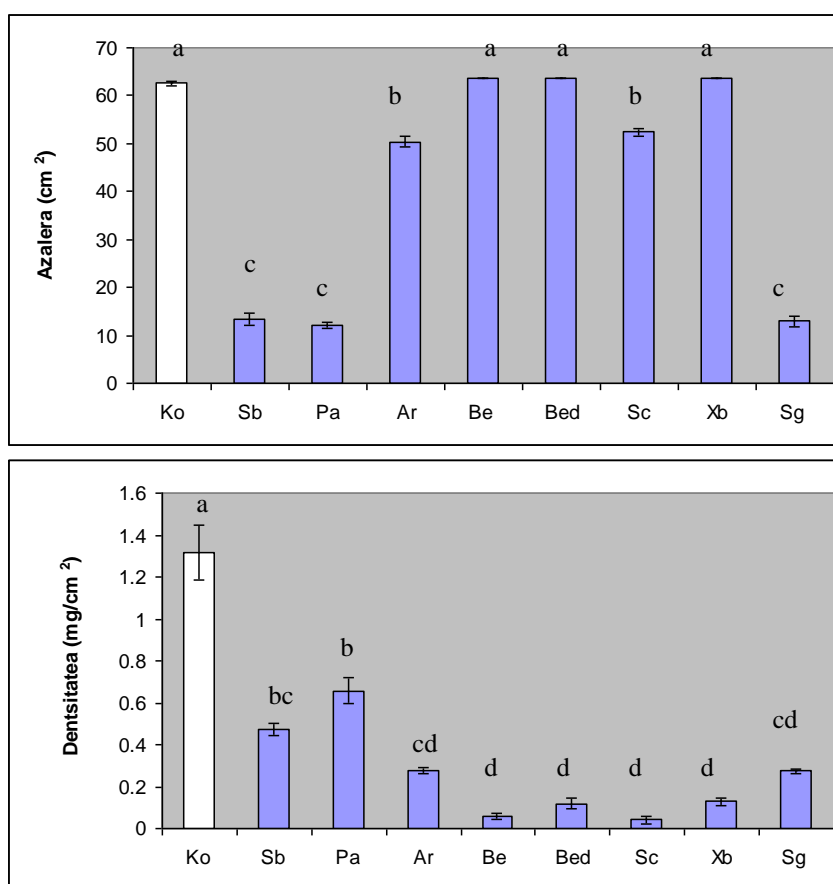
3.2 *FUSARIUM CIRCINATUM* PATOGENOAREN AURKAKO GAITASUN ANTAGONISTAREN EBALUAZIOA KO-KULTIBOAN

Espezia ektomikorriziko ezberdinekin ko-kultiboan hazitako patogenoaren hazkuntza aztertuz ikusten da espezia guztiek negatiboki eragiten diotela modu batean edo bestean, baina aldi berean, ezberdintasunak antzeman daitezkeela espezieen artean (**2. Irudia**).

Patogenoaren kolonien azalerari dagokionez, hiru dira eraginkortasun handiena erakusten duten espeziak: *P. arhizus*, *S. granulatus* eta *S. bovinus*, azaleraren %80,9, %79,3 eta %78,9-ko inhibizioa sortu baitute hurrenez hurren. *A. rubescens* eta *S. citrinum* espezieek inhibizio-tasa baxuagoak aurkeztu dituzte (%20 eta

%16,7) eta gainontzeko espezieek (*B. erythropus*, *B.edulis* eta *X.badius*) ez dute inolako eraginik izan patogenoaren hedapenean (**2. Irudia. A**).

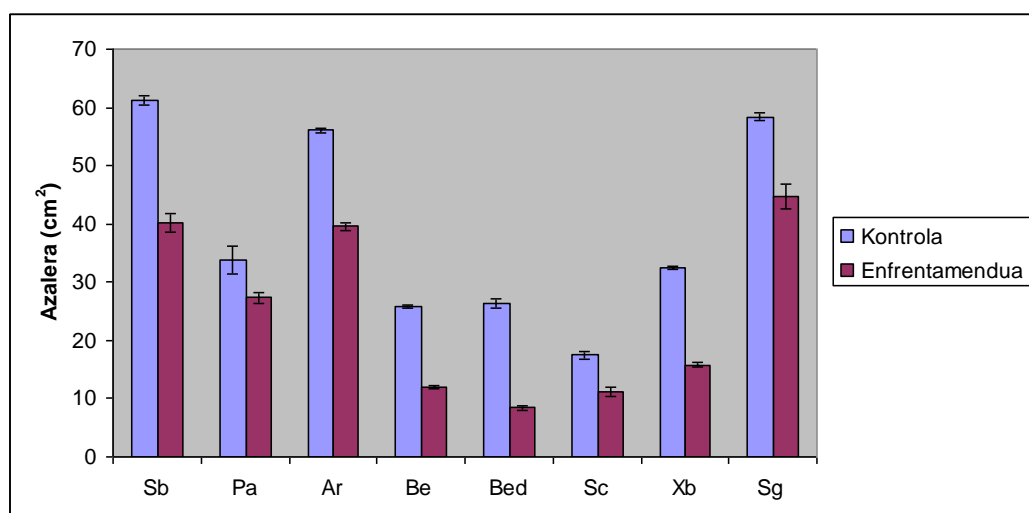
Patogenoaren dentsitatea aztertuz gero aldiz, espezie guztietan antzematen da jaitsiera nabaria. Hala ere, inhibizio-tasarik altuenak eman dituzten espezieak (>%90) *B. edulis*, *X. badius*, *S. citrinum* eta *B. erythropus* izan dira, azken bi hauek inhibiziorik adierazgarrienak sortu dituztenak izanik (%96,9 eta %95,5 hurrenez hurren). Kontrako aldean *P. arhizus* eta *S. bovinus* ditugu, %50,1 eta %64 inhibizio-tasak baino ez baitituzte aurkeztu hurrenez hurren (**2. Irudia. B**).



2. Irudia. *Fusarium circinatum* kolonien azalera (A) eta dentsitatea (B) 45 egunez bakarrik hazten denean (Ko) eta ko-kultiboan 8 espezie ektomikorrikorekin haziz gero: *Suillus bovinus* (Sb), *Pisolithus arhizus* (Pa), *Amanita rubescens* (Ar), *Boletus erythropus* (Be), *Boletus edulis* (Bed), *Scloderma citrinum* (Sc), *Xerocomus badius* (Xb) eta *Suillus granulatus* (Sg). Datuak erreplika guztien batezbestekoa dira \pm errore estandarra (n=7). Letra ezberdinek espezieen arteko ezberdintasun esangurartsuak adierazten dituzte S.N.K testaren arabera ($p \leq 0,05$).

Ikusten den moduan azaleraren inhibizioak eta dentsitatearen inhibizioak ez dute antzeko portaera adierazten. Hare gehiago, kontrako portaera dutela esan daiteke, patogenoaren azalera gehiago inhibitzen den kasuetan kolonia dentsoago hazten baita eta alderantziz, azalera murrizten ez den kasuetan patogenoa laxoago hazten da. Hori begi bistaz ere ikusi ahal izan da, koloniek kolore eta itxura ezberdina garatu baitute, geroago azalduko den moduan.

Era berean, *F. circinatum* kolonien azalera aztertu den moduan, espezie ektomikorrikoren kolonien azaleraren aldaketak ere ikertu dira patogenoarekin ko-kultiboan hazitakoan. Kasu honetan, inhibizio tasarik baxuenak jasan dituzten espezieak *P.arhizus* (%19,2) eta *S. granulatus* (%23,4) izan dira. Ondoren *A.rubescens* (%29,5), *S. bovinus* (%34,2) eta *S. citrinum* (%36,2) daude. Gainontzeko espezieetan %50-eko inhibiziotik gora eman da (**3. Irudia**).



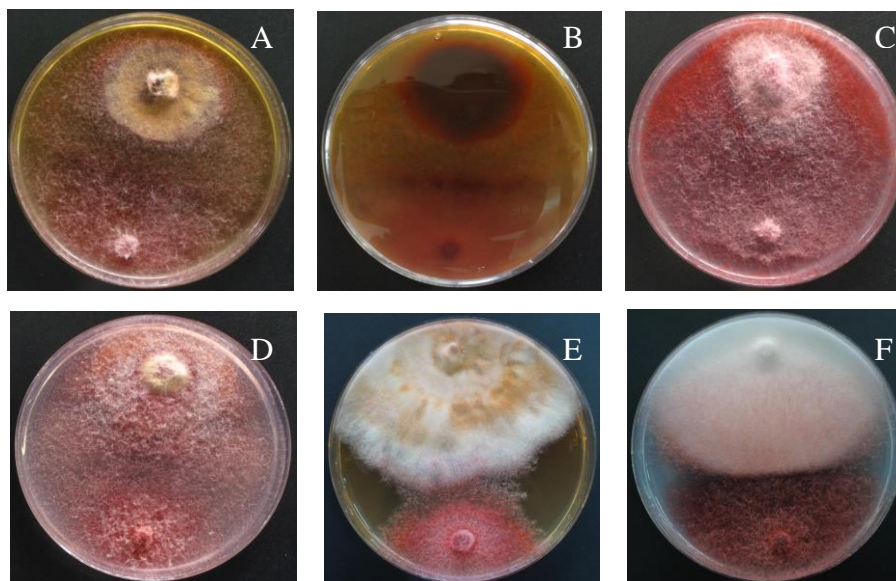
3. irudia. Espezie ektomikorrikoko bakoitzaren azalera bakarrik hazten denean (urdinez) eta *Fusarium circinatum*-ekin ko-kultiboan (morez) 45 egunez hazi ondoren: *Suillus bovinus* (Sb), *Pisolithus arhizus* (Pa), *Amanita rubescens* (Ar), *Boletus erythropus* (Be), *Boletus edulis* (Bed), *Scloderma citrinum* (Sc), *Xerocomus badius* (Xb) eta *Suillus granulatus* (Sg). Datuak erreplika guztien batezbestekoa dira \pm errore estandarra (n=7).

Kolonia patogenoaren eta espezie ektomiorrikoren arteko elkarrekintzaren ezaugarriei dagokienez, 3 elkarrekintza mota ezberdin topatu direla esan beharra dago (**3. Taula**).

Ko-kultibo	pH	Elkarrekintza mota	Kolonien arteko distantzia (cm)	Elkargurutzaketa (%)	Azalera koloreztatua (cm ²)	Frontea (cm ²)
Fc-Ko	3,5	-	-	-	-	-
Sb-Fc	2,7	C, D	0,5 / 0	5,7±2,1	8,7±0,9	0
Pa-Fc	2,8	C	0,9±0,1	0	13,7±1,1	2,2±0,1
Ar-Fc	3,3	D	0	69±3,1	0	0
Be-Fc	4	D	0	100	30,3±0,2	1,6±0,4
Bed-Fc	4,3	D	0	100	0	0
Sc-Fc	4,5	B	0	0	0	0
Xb-Fc	3,8	D	0	100	0	0
Sg-Fc	3,5	B	0	0	0	1,1±0,3

3. Taula. Enfrentamenduen ezaugarrien laburpena: *Fusarium circinatum*-en eta 8 espezie ektomikorrikoren [*Suillus bovinus* (Sb), *Pisolithus arhizus* (Pa), *Amanita rubescens* (Ar), *Boletus erythropus* (Be), *Boletus edulis* (Bed), *Scleroderma citrinum* (Sc), *Xerocomus badius* (Xb) eta *Suillus granulatus* (Sg)] hazkuntzaren ezaugarriak MMN solidoan 45 egunez ko-kultiboan inkubatuz gero: elkarrekintza mota, hazkuntza-medioaren pHa, kolonien arteko distantzia (cm), elkargurutzaketa (estalitako azaleraren %), medioko azalera koloreztatua (cm²) eta frontearen agerpena eta azalera (cm²).

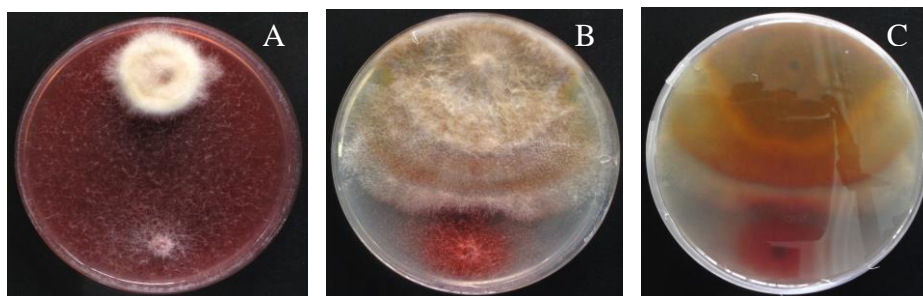
Ikusten den moduan espezie gehienek D elkarrekintza mota aurkeztu dute, non espezie inhibitzailea inhibitutako espeziearen gainetik hazten den. Kasu guztietan espezie inhibitzailea patogenoa izan da, hots, *F. circinatum*. Hala ere, patogenoaren dominantzia-maila ez da berdina izan kasu guztietan. *B. erythropus*, *B. edulis* eta *X. badius*-en kasuan dominantzia osoa izan da, %100-eko elkargurutzaketa eman baita (**4. Irudia A, C eta D**). *S. bovinus*-en eta *A. rubescens*-en kasuetan aldiz, patogenoaren dominantzia ez da hain bortitza izan, batez ere lehenengoari dagokionez, elkargurutzaketa azalera oso baxua izan delako (5,74±2,09) eta beraz B motatako elkarrekintzatik oso gertu dagoelako (**4. Irudia E eta F**). Gainera, *S. bovinus*-en erreplika batean beste motatako elkarrekintza bat antzeman da, geroago azalduko den moduan. Era berean, aipagarria da *B.erythropus*-en kasua, elkargurutzaketa osoa eman arren, zenbait berezitasun ageri direlako. Alde batetik, medioaren koloreztapena dugu, eta bestetik, kolore iluneko fronte baten agerpena (**4. Irudia B**), zeinetik aurrera patogenoaren mizelioa modu laxoagoan hazten den, modu ahulago batean, nahiz eta onddo ektomikorrikikoaren kolonia gaintitzeko gai izan.



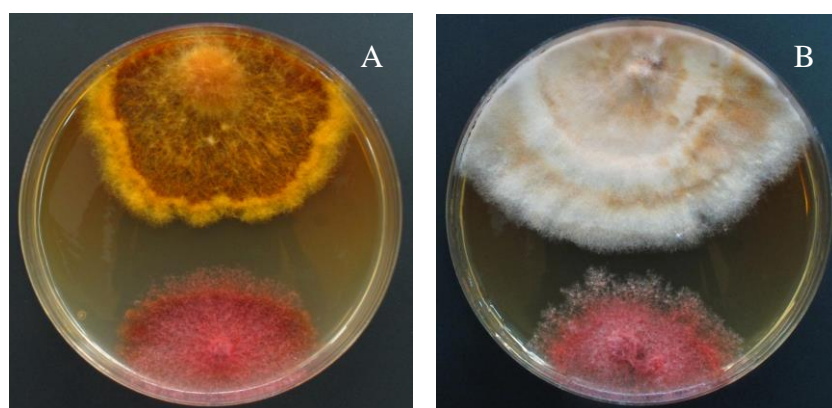
4. Irudia. D motatako elkarrekintza: *Fusarium circinatum* kolonien itxura 45 egunez kokultiboan hazita *B. erythropus*-ekin, goikaldetik (A) eta behekaldeetik (B) ikusita, *B. edulis*-ekin (C), *X.badius*-ekin (D), *S.bovinus*-ekin (E) eta *A.rubescens*-ekin (F). Petri plaketan, goian kolonia ektomikorrizikoa ageri da eta behean patogenoa.

Beste bi espezieek (*S. citrinum* eta *S. granulatus*) B motatako elkarrekintza eman dute, hots, kolonia biek elkar inhibitzen dute eta kolonien arteko distantzia 2 mm baino txikiagoa da (**5. Irudia A eta B**). Beraz, esan daiteke kontaktu bidezko inhibizioa dela. Espezie biek elkarrekintza mota berdina ageri arren, ezberdintasunak detektatzen dira enfrontamendu bietan. Izan ere, *S. granulatus*-en kasuan, kontaktu gunean patogenoaren mizelioa itxuraz eta kolorez aldatzen da, fronte bat eratuz (**5. Irudia C**), zeina ez den beste ezpezian ageri.

Azkenik, *P. arhizus* espeziean eta *S. bovinu*-en errepliketa batean C elkarrekintza mota eman da, zeinan mikroorganismo bien arteko inhibizioa sortzen den eta kolonien arteko distantzia 2 mm baino handiagoa den (*P. arhizus*-en kasuan $0,98 \pm 0,11$ mm eta *S. bovinu*-en kasuan 0,5 mm) (**6. Irudia A eta B**). Gainera, kasu bietan medioaren koloreztapena eman da (hori-laranja) eta *P. arhizus*-ek frontearen agerpena eragin du patogenoaren mizelioan, hots, kolore ilunagoko mizelioa eratu da ertzean.



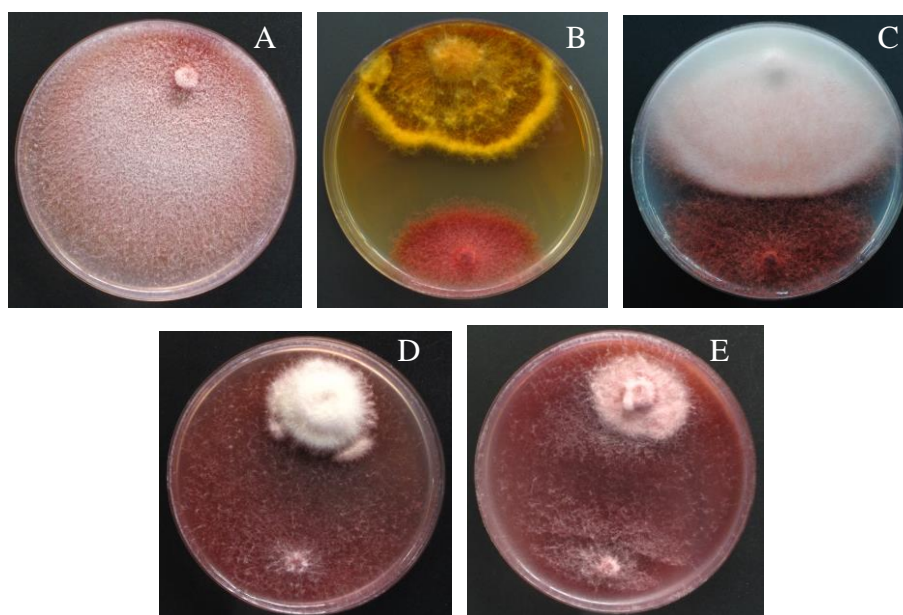
5. Irudia. B motatako elkarrekintza: *Fusarium circinatum* kolonien itxura 45 egunez ko-kultiboan hazita *S. citrinum* (A) eta *S. granulatus*-ekin, goikaldetik (B) eta behealdetik (C). Petri plaketan, goian kolonia ektomikorrizikoa ageri da eta behean patogenoa.



6. Irudia. C motatako elkarrekintza: *Fusarium circinatum* kolonien itxura 45 egunez ko-kultiboan hazita *P. arhizus* (A) eta *S. bovinus*-ekin (B). Petri plaketan, goian kolonia ektomikorrizikoa ageri da eta behean patogenoa.

Era berean, garrantzitsua da ere patogenoaren mizelioak aurkeztutako morfologia. Lehenago aztertu den moduan, patogenoa espezie ektomikorrizikoekin batera hazitakoan, aldaketak sumatzen dira bai bere hedapen azaleran nola dentsitatean ere. Hori begi bistaz ere detektatu ahal izan da, enfrentamenduetako koloniak kolonia kontrolekin konparatuz gero (**7. Irudia**). Ikusten den moduan, azalera mailan inhibizio-tasarik altueta sortu duten espezieetan patogenoaren mizelioak kontrolaren mizelioaren antza du, nahiz eta hain dentsoa ez izan. Horren adibide dira *P. arhizus* (**7. Irudia B**), *S. bovinus* eta *S. granulatus*. *A. rubescens*-en kasuan berriz, tarteko egoera bat dugu. Izan ere, patogenoa aurreko enfrentamenduetan bezalako hazkuntzarekin abiarazten da, baina onddo ektomikorrizikoaren gainetik hazten denean mizelioa laxotu egiten da zeharo (**7. Irudia C**). *B. erythropu*-en

enfrentamenduetan lehen esan bezala, antzeko hazkuntza eman da, oraingoan mizelioaren aldaketa frontetik aurrera eman da. Gainontzeko espezieei dagokienez, patogenoaren hazkuntza nahiko homogeneoa izan da eta kasu guztietan oso dentsitate baxuko mizelioa aurkeztu du. Zenbait egoeratan gainera medioa gorritu egin da, nabariagoa eginez *S. citrinum*-en eta *B. edulis*-en ko-kultiboetan (**7. Irudia D eta E**).



7. Irudia. Kolonia patogenoen ezaugarriak: *Fusarium circinatum* kolonien itxura 45 egunez bera bakarrik (A) eta ko-kultiboan hazita *P. arhizus* (B), *A. rubescens* (C), *S. citrinum* (D) eta *B.edulis* (E) espezieekin. Enfrentamenduetan, goian kolonia ektomikorrizikoa ageri da eta behean *F. circinatum*. Aipagarria da *F. circinatum* kolonien dentsitate aldaketa eta medioaren koloreztapena, kasuan kasu.

pHari dagokionez, esan beharra dago kasu guztietan medioaren azidifikazioa gertatu dela, baina hala ere ez da espezieen artean ezberdintasun esanguratsurik detektatu, balio guztiak 2,75-4,5 tartean mantenduz. Kontrolareriko alderatuz, zeinaren pHa 3,5-ekoa izan den, hiru espezieen ko-kultibok balio horretatik beherako pHa aurkeztu dute: *P. arhizus*, *S. bovinus* eta *A. rubescens*. *S. granulatus*-en enfrentamenduak kontrolaren pH bera adierazi du eta gainontzekoek balio horretarik gorako pHa.

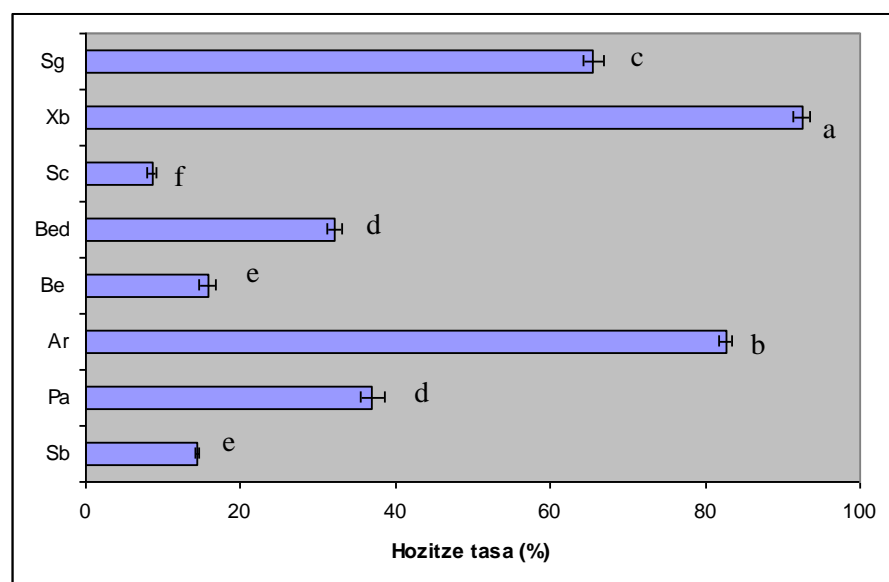
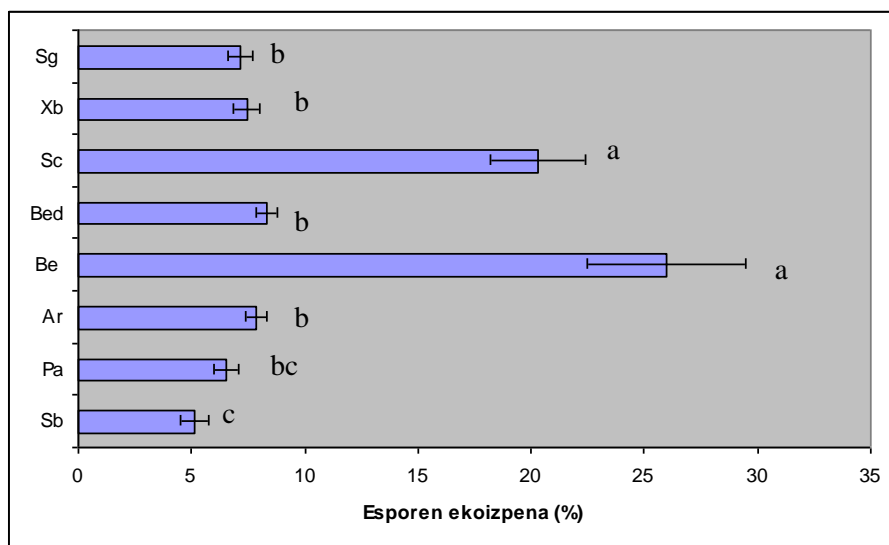
Azkenik, aipagarria da ez dagoela korrelaziorik 8 espezie ektomikorrizikoen hazkuntza tasa eta patogenoaren inhibizio-mailaren artean, baina bai beste bi korrelazio adierazgarri topatu direla ($p \leq 0,05$). Onddo ektomikorrizikoek koloreztatutako medioaren azaleraren eta sortutako frontearen azaleraren kasuan adibidez, korrelazio positiboa eta estatistikoki nahiko sendoa (*Spearman*-en $Rho = 0,689$; $p \leq 0,01$) existitzen da. Antzeko egoera dugu koloreztatutako azaleraren eta kolonien arteko distantziarekin, non korrelazio positiboa eta estatistikoki esanguratsua ematen den, nahiz eta aurrekoa bezain sendoa ez izan (*Spearman*-en $Rho = 0,513$). Hortaz, kasu bietarako, koloreztatutako azalera zenbat eta handiagoa izan, bai frontearen azalera nola kolonien arteko distantzia handiagoa izando dela suposatzen da.

3.3 ONDDO EKTOMIKORRIZIKOEN ERAGINAREN IKERKETA

F. CIRCINATUM-EN ESPOREN EKOIZPENEAN ETA HOZITZEAN.

45 egunetako enfrontamenduen ostean egindako esporen zenbaketak demostratu du kasu guztietan patogenoaren espora ekoizpena zeharo murriztu dela kontrolarekin alderatuz gero, inhibizioa %70-etik gorakoa izan baita. Dena dela, aldeak daude espezie batetik bestera eta estatistikoki bi taldetan bana daitezke: alde batetik *B.edulis* eta *S. citrinum* ditugu, zeintzuek espezie guztien artetik inhibizio-tasarik baxuena eragin dutenak diren (%74 eta %79 hurrenez hurren). Beste taldean gainontzeko espezieak sartzen dira (inhibizio-tasa $> \%90$), zeinetatik *S. bovinus* azpimarra daiteke, esporen ekoizpenarik baxuena aurkeztu duen enfrontamendua baita (inhibizio-tasa $= \%94,9$) (**8. Irudia A**).

Esporen hozitzeari dagokionez emaitzak bestelakoak izan dira. Kasu honetan, lau bloke bereiz daitezke. Lehenengo blokean *X. badius* dago, zeinak ez duen inhibizio adierazgarririk aurkeztu. Bigarren taldean inhibizio-tasa baxua sortu dutenak daude: *A. rubescens* eta *S. granulatus*. Hirugarren blokean %35 inguruko hozitze-tasa aurkeztu duten bi espezie daude: *P. arhizus* eta *B. edulis*, eta azkenik inhibizio-tasa oso altuko espezieak ditugu: *S. citrinum* (%91,5), *S. bovinus* (%85,6) eta *B. erythropus* (%84,3) (**8. Irudia B**).



8. Irudia. Esporen ekoizpenaren (A) eta hozitzearen (B) portzentaiak, kontrolarekiko adierazita (%100), 8 espezie ektomikorrikorekin ko-kultibatu ostean: *Suillus bovinus* (Sb), *Pisolithus arhizus* (Pa), *Amanita rubescens* (Ar), *Boletus erythorpus* (Be), *Boletus edulis* (Bed), *Scleroderma citrinum* (Sc), *Xerocomus badius* (Xb) eta *Suillus granulatus* (Sg). Datuak erreplika guztien batezbestekoa dira \pm errore estandarra (n=4). Letra ezberdinek ezpezieen arteko ezberdintasun esangurartsuak adierazten dituzte S.N.K testaren arabera ($p \leq 0,05$).

4. EZTABAIDA

8 espezie ektomikorrizikoren gaitasun antagonistaren ikerketak demostratu du modu batean edo bestean espezie guztiek negatiboki eragiten diotela *F. circinatum*-en hazkuntzari. Orokorrean, ikusi da enfrentamenduen ondorioz patogenoaren azaleraren eta dentsitatearen murrizketa gertatzen dela, nahiz eta inhibizio-maila hori aldakorra izan espezie batetik bestera. Horrek beraz, indartu egiten du espezie askoren erabileraren garrantzia mota honetako entseietan, Zhao *et al.*-ek 1988an aipatu bezala.

Kolonia patogenoaren azalerari dagokionez, hiru dira inhibizio-mailarik altuena aurkeztu dutenak: *P. arhizus*, *S. bovinus* eta *S. granulatus*. Dena dela, hauen artetik *P. arhizus* da espezierik nabarmenena, patogenoaren azalera gehien murrizteaz gain kontaktu gabeko inhibizioa eragin duelako. *S. granulatus*-en kasuan, kontaktu bidezko inhibizioa eman da, baina ezin da ziurtatu enfrentamendua luzatzekotan egoera hori mantenduko litzatekeenik, kolonia mota bien elkarrekintzak *S. bovinus* enfrentamenduaren hasierako etapetan behatutako elkarrekintzaren antza hartu baitu. Azken honen kasuan, hasiera batean patogenoak kolonia ektomikorrizikoarekin topatzean bere hazkuntza eten egin du epe labur batez, harik eta arerioa gainditzeko gai izan den arte. Horregatik, antzekotasunak antzematen dira espezie bietan eta beraz 45 egun baino gehiagoko inkubazioa beharko litzateke *S. granulatus* enfrentamenduaren elkarrekintza B motatakoa dela ziurtatzeko. Gainera, *S. bovinus*-en kasuan erreplika batean ez da kolonia bien arteko kontakturik eman, baina gainontzeko errepliketan elkargurutzamenduak gertatu direla ikusiz, esan daiteke kasu horretan kolonien hazkuntza tasa motelagoa izan dela eta beraz ez dutela denbora nahikorik eduki benetazko elkarrekintza aurkezteko. Azken honek beraz, enfrentamenduen iraupena emendatu beharko litzatekeelaren teoria indartzen du.

Bibliografian *Fusarium* espezie ezberdinen hazkuntza inhibitzeko gai diren espezie ektomikorriziko ugari topa daitezke. Hauen artean, *Suillus* generoa oso ikertua izan da eta frogatu da adibidez *S. granulatus* (L.:Fr.) Roussel (Dar *et al.*, 2011) eta *S. bovinus* (L.:Fr.) eraginkorrak direla *F. oxysprum* eta *F. solani* espezieen aurka

(Zengpu *et al.*, 1989). *P. arhizus*-ek ere *F. oxysporum*-en aurkako gaitasun antagonista duela ikusi izan da (Vaidya *et al.*, 2005).

Kolonia patogenoaren azaleran eta dentsitatean gertaturiko aldaketak aztertuz gero, ikus daiteke azaleraren inhibizio-tasa altua den kasuetan kolonia dentsuago hazten dela eta alderantziz, kolonia patogenoak inhibiziorik pairatzen ez duenean mizelioak trinkotasuna galtzen duela. Beraz, bi inhibizio-mota ezberdin daudela esan daiteke. Zenbait ikerketek aditzera eman dutenez, *F. circinatum* elikagai eskasia egoera baten aurrean dagoenean bere hedadura emendatzeko joera du, koloniaren dentsitatea murriztuz (Sanchez Zabala, 2013). Hortaz, ezaugarri horiek detektatu direnko enfrentamenduetan ondoriozta daiteke patogenoaren ereinetaren aurretik kolonia ektomikorrizikoak medioko elikagaiak agortu dituela eta beraz, patogenoa erein denean, elikagai falta horren aurrean, azken honek hedatzeko joera hartu duela. Gainera, kasu horietan medioa gorritu egin dela ikusi da. Horren arrazoia ere patogenoak jasan duen estres egoera izan daiteke. Izan ere, frogatu da *F. circinatum* estres egoeretan hazten denean kolore gorriko pigmentuak jariatzen dituela mediora, defentsa mekanismo modura. Inhibizio mota honen adibiderik aipagarrienak *S. citrinum* eta *B. edulis* izan dira. Baina ikusi da ez dagoela korrelaziorik onddo mikorrizikoen hazkuntza tasa eta patogenoaren inhibizio-mailaren artean; adibidez *A. rubescens*-ek, zeinak hazkuntza tasa handiena duen, inhibizio-maila baxuena eragiten du. Aitzitik, *B. edulis* eta *B. erythropus* espezieek hazkuntza tasa baxua erakutsi arren biomasaren murrizketa handia eragiten dute, dentsitatea nabarmenki txikituz. Beraz, ezin da esan elikagaien defizita patogenoaren egoera estresagarriaren eragile bakarra izan denik.

Bestalde, bigarren inhibizio motari dagokionez, bi talde bereiz daitezke: medioa koloreztatu duten espezieak eta medioa koloreztatu ez dutenak. Azken hauen artean *S. granulatus* eta *A. rubescens* aurkitzen dira. Hauen kasuan, patogenoaren kolonia nahiko dentsu hasi da, kontaktua eman den arte behintzat, eta azaleran inhibizioa detektatu da. Hortaz, kasu honetan ezin da esan elikagaien egorpena eman denik. Espezie bi hauen ezaugarriarik aipagarrienetakoa heuren hazkuntza tasa altua da (*A. rubescens* 3 mm/egun eta *s. granulatus* 2,1 mm/egun), *lag* fase oso labur batez gain. Hori ikusita, eta patogenoaren hazkuntza aztertuz, pentsa daiteke espazioan

oinarritako inhibizioa eman dela. Izan ere, patogenoa erein denean modu normalean hazten hasi da, baina berehala kolonia ektomikorrizikoaren topo egin du. *S. granulatus*-en kasuan hazkuntza hor gelditu da eta *A. rubescens*-en kasuan berriz bere gainetik hazten jarraitu du, baina mizelioa ahuldu egin da zeharo.

Medioa koloreztatu deten espezien taldean, *P. arhizus*, *S. bovinus* eta *B. erythropus* daude. Mucha eta kolaboratzaileek (2008) garatutako ikerketetan jada azaldu egiten da *S. bovinus*-ek eragindako kolore aldeketan hori metabolito sekundarioen ekoizpenaren emaitza dela eta sustantzia horiek propietate antifungikoak dituztela, gai direnak mediotik difunditzeko eta bestelako onddoen hazkuntza kontakturik gabe inhibitzeko, *P. arhizus* enfrentamenduetan ikusi ahal izan den moduan. Gure ikerketan koloreztatutako azaleraren eta kolonien arteko distantziaren arteko korrelazio positiboak ideia hau berresten du, naiz eta *S. bovinus*-en eta *B. erythropus*-en kasuan hau ez den bete. Lehenengoaren kasuan, koloreztatutako azalera oso txikia izan da eta intentsitate nahiko baxukoa, eta beraz, pentsa daiteke metabolito sekundarioen ekoizpena ez dela nahikoa izan patogenoa inhibitzeko. Bigarrenaren kasuan, nahiz eta metabolito sekundario ugari ekoiztu, posiblea litzateke kolonia ektomikorrizikoaren hazkuntza oso motela izateak (0,8 mm/egun) inhibizio gaitasunean eragina eduki izana.

Antzekoa gertatu da frontearen agerpenean. Kasu honetan ere korrelazio estua detektatu da koloreztatutako azaleraren eta frontearen azaleraren artean. Frontearen agerpena patogenoaren mizelioan sortutako kalteen ondorio dela frogatu izan da. Zenbait ikerketen arabera, metabolito sekundario horietako batzuek zeluletako mintz zelularren gaineko eragina eduki dezakete, zelularen ohiko funtzioak deuseztatuz (Belanger *et al.*, 1995). Gainera, ikusi da zenbait espezie ektomikorriziko gai direla kitinasa, β -1-3-glukanasa eta β -glukosidasa bezalako entzimak jariatzeko, zeintzuek *F. circinatum*-en morfologiaren aldaketarekin lotura zuzena eduki dezaketen (Tang *et al.*, 2008).

Aipagarria da ere bai ko-kultiboetan eta kontroletan eman den pH diferentzia. Izan ere, patogenoa bakarrik hazi denean medioa 3,5-era arte azidifikatu da, baina ko-kultiboan hazitakoan pH hori aldatu egin da. Patogenoaren azalera gehien inhibitu duten espezieen kasuan pHa 3,5-etik behera kokatu da. Horrek beraz aditzera

ematen du medioaren gehiegizko azidifikazioa patogenoari aurre egiteko estrategia izan daitekeela kolonia ektomikorrizikoaren partetik, eta azidifikazio hori aldi berean, jariatutako sustantzia antifungikoekin erlazionaturik egon daitekeela.

Azkenik, esporen ekoizpenari dagokionez, testatutako onddo ektomikorriziko guztiek patogenoaren esporen ekoizpenari negatiboki eragiten diotela nabarmenki ikusten da. Murrizketa txikiena *S. citrinum* eta *B. erythropus* espezieek erakusten dute, baina txikiena izan arren esporen inhibizio-tasa %75 ingurukoa da kasu bietan. Beste guztiek %90 edo gehiago murrizten dute. Kasu honetan deigarria da inhibizio-tasarik baxuena aurkeztu duten enfrontamenduetan patogenoaren estresa nabariagoa izan dela, medioa gorritu egin baita, lehenago azaldu den moduan. Hortaz, ondoriozta daiteke estres horrek patogenoaren esporen ekoizpena indusitzen duela.

Hozitze-tasa aztertuz gero aldiz, desberdintasun handiak ikusten dira onddo ektomikorrizikoen artean. Orokorrean, *X. badius*, *A. rubescens* eta *S. granulatus* kenduta gainontzeko espezieek inhibizio-tasa nahiko altuak aurkeztu dituzte, baina hauen artean aipagarrienak *S. citrinum*, *S. bovinus* eta *B. erythropus* dira. Hortaz, elikagaien eskasiaz gain, beste faktore bat hartu behar da kontuan. Ikusten den moduan, inhibizio-maila altuena eragiten dutenen artean medioa koloreztatu duten espezieak daude. Beraz, kasu honetan ere seguruena da inhibizio horren atzean konposatu metabolikoren bat egotea (Díez eta Alves-Santos, 2011), ko-kultiboan ondorioztatu den moduan. *P. arhizus*-en kasuan, deigarria da inhibizio-tasa altuenetarikoen artean ez egotea, bere kasuan koloreztatutako azalera nahiko handia izan baita. Dena dela, kontuan hartu behar da koloniaren tamaina ez dela handiegia izan eta beraz plakan hozitza eremu libre gehiago egon dela.

5. ONDORIOAK

1. Bi inhibizio posible egon daitezkeela ikusi da: elikagaien defizitan oinarritutakoa eta kolonia ektomikorrizikoek mediora jariatutako konposatu antifungikoetan oinarritutakoa.
2. Elikagaien defizitan oinarritutako inhibiziorik sendoena erakutsi duten espezieak *Scleroderma citrinum* eta *Boletus edulis* izan dira. Nahiz eta kontaktu

bidezko inhibizioa izan, patogenoaren garapen mizeliarra eta esporen hozitzea nabarmenki oztopatu dute.

3. Konposatu antifungikoen ekoizpenean oinarritutako inhibizioaren erakuslerik aipagarrienak *P. arhizus* eta *S. bovinus* dira, patogenoaren hedapena murrizteaz gain esporen hozitzea ere inhibitzeko gai izan baitira.
4. *B. erythropus* konposatu antifungiko ugari ekoizten ditu, zeintzuek patogenoaren mizelioan kalteak eragiteko gai diren eta esporen hozitzea inhibitzen duten, baina espezie honen hazkuntza tasa hain baxua izateak biokontrolerako espezierik egokiena ez izatea bihurtzen du.
5. Orokorrean, *P. arhizus* da biokontrol-agente moduan etorkizun handiena aurkezten duena: kontaktu gabeko inhibizioa sortzen du, hazkuntza-tasa nahiko altua du, patogenoaren esporen hozitzea nabarmenki inhibitzen du, konposatu antifungiko asko ekoizten ditu, ondoriozko fronte bat sortuz patogenoaren mizelioan, eta ko-kultiboan ez du apenas hazkuntza-tasaren murrizketarik pairatzen.

6. BIBLIOGRAFIA

- Belanger R, Dufuor N, Caron J y Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Science Technology* 5: 41-54.
- Carey W.A., Oakc S.W. and Enebak S.A. 2005. Pitch canker rating of longleaf pine clones correlate with *Fusarium circinatum* infestation of seeds and seedling mortality in containers. *For. Pathol.*, 35: 205-212.
- Ceballos, L., Ruíz De La Torre, J., 1979. Árboles y Arbustos de la España Peninsular. IFIE, España.
- Dar GH, Beig MA, Ahanger FA, Ganai, NA, Ahanger MA (2011). Management of root rot caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* in Blue pine (*Pinus wallichiana*) through use of fungal antagonists. *Asian J. Plant Pathol.* 5(2):62-67.

- Diez J. and Alves-Santos F.M. 2011. Use of edible ectomycorrhizal fungi to control *Fusarium* diseases in forest nurseries. En: Control of *Fusarium* diseases. Alves-Santos F.M. and Diez J.J. (eds.). Research Signpost, Kerala, India.
- Duchesne L.C. 2000. Role of ectomycorrhizal fungi in biocontrol. En: *Mycorrhizae and Plant Health*. Pflieger F.L. and Linderman R.G., (eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 27–46.
- Duñabeitia M.K., Hormilla S., García-Plazaola J.I., Txarterina K., Arteche U. and Becerril J.M. 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza*, 14: 11-18.
- Eng F., Gutiérrez-Rojas M., Favela-Torres E. 2003. Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1. *Rev. Iberoam. Micol.*, 20: 172-175.
- EUSTAT. 2005. Euroregión en cifras 2005. Instituto Vasco de estadística.
- Frey-Klett P., Chavatte M., Clausse M., Courier S., Le Roux C., Raaijmakers J. and Martinotti M.G., Pierrat C. and Garbaye J. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol.*, 165:317.
- Garbelotto M. and Pautasso M. 2012. Impacts of exotic forest pathogens on Mediterranean ecosystems: four case studies. *Eur. J. Plant Pathol.*, 133: 101-116.
- George E., Häussler K., Kothari S.K., Li X.L. and Marschner H. 1992. Contribution of mycorrhizal hyphae to nutrient and water uptake of plants. En: *Mycorrhizas in Ecosystems*. Read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H. and Alexander I.J. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Gordon T.R., Storer A.J. and Wood D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. *Plant Dis.*, 85: 1128-1139.
- Hermoso, E., Carballo, J., Fernández-Golfín, J.I., 2007. Structural characterization of *Pinus radiata* D. Don timber from Pais Vasco (Spain) according to standard modifications. *Maderas-Cienc Tecnol* 9, 223-232.
- Leake J., Johnson D., Donnelly D., Muckle G., Boddy L. and Read D.J. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in

- controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.*, 82:1016- 1045.
- Lee, H.B., Magan, N., 1999b. Environmental influences on in vitro interspecific interactions between *Aspergillus ochraceus* and other maize spoilage fungi on growth and ochratoxin production. *Mycopathologia* 146, 43– 47.
- Marks, G.C.1991. Causal morphology ad evolution of mycorrhizas. *Agric. Ecosyst. Environ.*,35:89-104.
- Marx D.H. 1972. *Ectomycorrhizae* as biological deterrents to pathogenic root infections. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 10: 429–454.
- Molina, R. y Palmer, J.G.1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Schenck, N.C. (ed.)pp:115-129. Am. Phytopath.Soc., St. Paul, MN.
- Mucha,J., Zadworny, M., Werner, A., Napierala-Filipiak, A. y Lakomy, P.(2008). Antagonistic activity of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* challenged by saprotrophic fungi from different soils. *Nova Hedwigia*. 87. 373-385.
- Pérez-Sierra A., Landeras E., León M., Berbegal M., García-Jiménez J. and Armengol J. 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycol. Res.*, 111: 832-839.
- Pintos C., González B., Mansilla J.P., Agín O. and Salinero M.C. 2005. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donell: Teleomorfo *Gibberella circinata*. *Foresta*, 31: 9-11.
- Sanchez Zabala J. 2013. Biotecnología forestal aplicada a la mejora de la producción de *Pinus radiata* d. Don y *Pinus pinaster* ait. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco- Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Tang W. and Lu S. 1981. *Ecological research methods for plant pathogens*. Science Publishing House, Beijing.
- Tang M., Zhang R.Q., Chen H., Zhang H-H., y Tian Z-Q., 2008. Induced hidrolytic enzymes of ectomycorrhizal fungi against pathogen *Rhizoctonia solani*. *Biotechnol Lett.* 30:1777-1782.

- Vaidya G.S., Shrestha K. and Wallander H. 2005. Antagonistic study of ectomycorrhizal fungi isolated from Baluwa forest (Central Nepal) against with pathogenic fungi and bacteria. *Scientific World*, 3:49-52.
- Watt M.S., Ganley R.J., Kriticos D.J. and Manning LK. 2011. Dothistroma needle blight and pitch canker: the current and future potential distribution of two important diseases of pinus species. *Can. J. For. Res.*, 41: 412-424.
- Werner A., Zadworny M. and Idzikowska K. 2002. Interaction between *Laccaria laccata* and *Trichoderma virens* in co-culture and in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* grown in vitro. *Mycorrhiza*, 12:139-145.
- Zengpu L., Junran J. and Changwen W. 1989. Antagonism between ectomycorrhizal fungi and plant pathogens. *Scientia Silvae Sinicae*, 6: 77-81.
- Zhao ZP, Kuo SC (1988). Study on hyphal hyperparasitic relationships between *Rhizoctonia solani* and ectomycorrhizal fungi. *Proceedings of the 5th International Congress of Plant Pathology, (ICPP'88), Kyoto, Japan*, pp. 184-186.