

Influencia de factores de sitio en la distribución de endófitos potencialmente beneficiosos vs. perjudiciales en ramillos de pino albar (*Pinus sylvestris*) del norte de España

A.V. Sanz-Ros (Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos (CSF) e Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible (iuFOR) UVA-INIA)).
M.M. Müller (Instituto Finlandés de Recursos Naturales (LUKE)).
R. San Martín y J. J. Díez (Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible (iuFOR) UVA-INIA)).

Este trabajo trata de desvelar el papel ecológico de hongos endófitos aislados de ramillos de pino albar, y con ello las posibles aplicaciones que pueden tener estos microorganismos. La comunicación forma parte de la tesis doctoral de Antonio Vicente Sanz Ros y fue realizada en el iuFOR (Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible UVA-INIA), contando con la colaboración del Instituto Finlandés de Recursos Naturales (LUKE). A finales de septiembre se presentó en forma de panel informativo durante el XVIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF), en Palencia, donde obtuvo el 'Premio a la a la mejor comunicación en Panel' de la SEF.

Los tejidos internos de las plantas (de todas las estudiadas hasta ahora) están habitados por microorganismos endófitos, que los colonizan de modo asintomático, al menos durante parte de su vida (Carroll, 1988). Este grupo de microorganismos está compuesto principalmente por hongos y bacterias. La función ecológica de algunos de estos endófitos ha sido desvelada, sobre todo en herbáceas (Sherameti y col., 2008; Tintjer and Rudgers, 2006), sin embargo en sistemas forestales aún se desconoce la función ejercida por la mayoría de estos microorganismos (Rodríguez y col., 2009). El estudio de estos endófitos ha llevado al desarrollo de aplicaciones en diversos campos de la ciencia, como son la patología vegetal (Martínez-Álvarez y col., 2016; Romeralo y col., 2015), la restauración ecológica (Kuiper y col., 2004), la agricultura (Hamayun y col., 2010) o la medicina (Christina y col., 2013).

En este estudio se pretende I) evaluar la influencia de diversos factores de sitio en la distribución de hongos endófitos de ramillos de pino silvestre; II) identificar significación ecológica en las especies de endófitos, y III) identificar los factores que determinan la abundancia de hongos potencialmente beneficiosos o perjudiciales, así como las interacciones entre ellos.

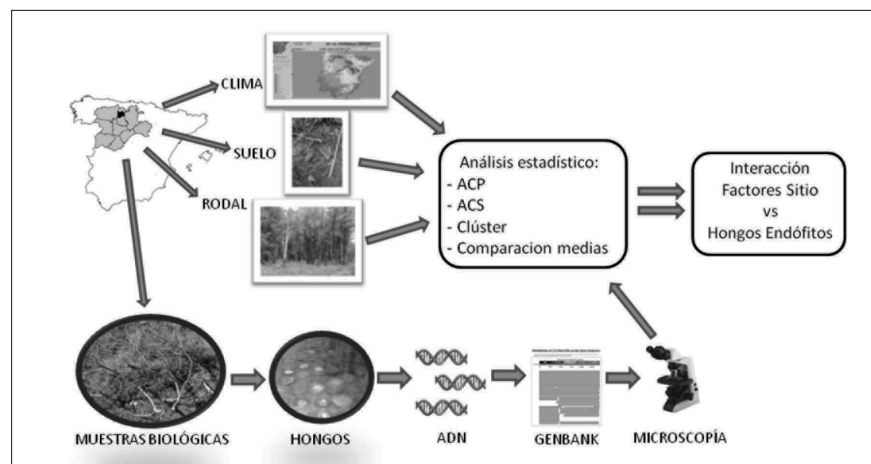


Figura 1. Localización del área de estudio (negro) en la Provincia de Palencia (Castilla Y León en color gris). Flujo de información obtenida en campo y laboratorio, mostrando un esquema del proceso de análisis de datos.

Para ello, 15 parcelas de pino albar fueron seleccionadas del Inventario Forestal Nacional en una zona piloto de unas 186000 ha. En ellas fueron cuantificadas diferentes variables que definen el ecosistema, incluyendo clima, rodal y suelo. A su vez fueron recolectadas muestras biológicas de ramillos con el fin de aislar los endófitos que albergan (Figura

1). Los datos climáticos fueron obtenidos del Atlas Climático Digital de la Península Ibérica (Ninyerola y col., 2005). El estado sanitario fue evaluado siguiendo la metodología usada en la Red Europea de Seguimiento de Daños a los Bosques (UN-ECE ICP Forests, 1998).

Las muestras biológicas fueron esterilizadas en

superficie y cultivadas en medio nutritivo generalista para hongos (agar patata dextrosa, APD). Los hongos obtenidos fueron contados y clasificados en diferentes morfotipos, atendiendo a la morfología de la colonia. De cada morfotipo fueron seleccionados varios aislados que fueron sometidos a extracción de ácidos nucleicos (Vainio y col., 1998), amplificación por PCR del ADN ribosómico (ADNr), secuenciación de esta región y comparación, mediante el uso de la herramienta BLAST (Altschul y col., 1990), con las secuencias depositadas en GenBank. La identidad de los taxones fue comprobada posteriormente mediante microscopía (Figura 1).

Los datos fueron analizados mediante análisis multivariantes (ACP, ACS, clúster) con los que se agrupó las parcelas según los hongos que presentaban. Estos grupos de parcelas fueron caracterizados a su vez por las variables ambientales que los definen, lo cual permite establecer relaciones entre los hongos que habitan estos sitios y los parámetros ambientales que los definen. Para ello, se comparó la media de cada variable en un grupo de parcelas con la media de dicha variable en el resto de grupos.

En este estudio fueron identificados 34 taxones fúngicos en ramillos de pino albar, descritos por los autores en un estudio previo (Sanz-Ros y col., 2015). Los resultados indican que la comunidad de hongos endófitos está claramente asociada a condiciones ambientales y factores de sitio particulares. Estos factores

no ejercen su acción de forma independiente, sino que especies o grupos de especies fúngicas endófitas estaban asociados a combinaciones concretas de dichos factores, las cuales producen nichos determinados.

Además, han sido identificadas varias asociaciones que sugieren un papel ecológico para algunas de las especies fúngicas encontradas. Endófitos como *Phoma herbarum* están asociados a árboles con altas tasas de crecimiento. Esta especie y otras del género *Phoma* son capaces de sintetizar giberelinas y de estimular el crecimiento vegetal (Rim y col., 2007; Hamayun y col., 2009; 2010). Por ello, sería deseable realizar ensayos de inoculación con el fin de determinar cuál es el efecto sobre pinos u otros hospedantes, y evaluar su potencial aplicación como bioestimulante del crecimiento en coníferas.

Otras especies, como *Hormonema dematioides* aparecen inversamente distribuidas respecto a *Biscogniauxia mediterranea*, un patógeno de encinas y alcornoques que, sin embargo, aparece como endófito en más del 50% de las parcelas de *P. sylvestris*. Su exclusión podría representar un papel protector por parte de *H. dematioides* ante organismos potencialmente perjudiciales. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios previos en los que también se ha sugerido a *H. dematioides* como protector de yemas de pino silvestre (Pirttilä y col., 2003). Ello nos lleva a plantear la posible aplicación práctica de esta especie fúngica como agente fitoprotector.

Por otro lado, endófitos como *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Biscogniauxia mediterranea* y *Ophiostoma nigrocarpum* se encuentran asociados a pies con bajas tasas de crecimiento, sugiriendo que éstos podrían ejercer un efecto perjudicial sobre su hospedante. Posiblemente estos hongos resulten inocuos mientras el vigor del hospedador es suficiente, sin embargo, en ambientes desfavorables son capaces de proliferar, actuando como patógenos oportunistas o de debilidad.

En definitiva, las parcelas en las que las combinaciones de condiciones climáticas, edafológicas y del rodal son más favorables para el crecimiento vegetal, como en este caso es la combinación de altas temperaturas y precipitaciones, un elevado contenido de nutrientes edáficos y una gestión forestal adecuada, muestran una mayor abundancia de hongos con un efecto positivo sobre el hospedante. Por el contrario, parcelas situadas en sitios estresantes (debido a clima o suelo), o con unas malas características de rodal (por ejemplo, densidad excesiva de pies) muestran una mayor abundancia de hongos potencialmente perjudiciales.

El estudio de la ecología de estos organismos constituye el germen para nuevas investigaciones con la finalidad de determinar el uso de algunos de estos microorganismos como bioestimulantes y/o fitoprotectores.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman, D., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- Carroll, G., 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69, 2–9.
- Christina, A., Christopher, V., Bhoré, S.J., 2013. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacogn. Rev.* 7, 11–16.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Tang, D.-S., Hussain, J., Ahmad, B., Anwar, Y., Lee, I.-J., 2010. Growth promotion of cucumber by pure cultures of gibberellin-producing *Phoma* sp. GAH7. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 889–894.
- Hamayun, M., Khan, S., Khan, A., Rehman, G., Sohn, E.-Y., Shah, A., Kim, S.-K., Joo, G.-J., Lee, I.-J., 2009. *Phoma herbarum* as a New Gibberellin-Producing and Plant Growth-Promoting Fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1–6.
- Kuiper, I., Legendijk, E., Bloemberg, G., Lugtenberg, B., 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant–microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 6–15. *Mol. plant-microbe Interact.* 17, 6–15.
- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R.A., Sanz-Ros, A.V., Pando, V., Diez, J.J., 2016. Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biol. Control* 94, 1–10.
- Ninyerola, M., Pons, X., Roure, J., 2005. Atlas Climático Digital de la Península Ibérica. Metodología y aplicaciones en bioclimatología y geobotánica. Bellaterra.
- Pirttilä, A.M., Pospiech, H., Laukkanen, H., Myllylä, R., Hohtola, A., 2003. Two endophytic fungi in different tissues of scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microb. Ecol.* 45, 53–62.
- Rim, S., Lee, J., Khan, S., Lee, I., Rhee, I., Lee, K., Kim, J., 2007. Isolation and identification of fungal strains producing gibberellins from the root of plants. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 357–363.
- Rodríguez, R., White Jr, J., Arnold, A., Redman, R., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182, 314–30.
- Romeralo, C., Witzel, J., Romeralo-Tapia, R., Botella, L., Diez, J.J., 2015. Antagonistic activity of fungal endophyte filtrates against *Gremmeniella abietina* infections on Aleppo pine seedlings. *Eur. J. Plant Pathol.* 143, 691–704.
- Sanz-Ros, A., Müller, M., San Martín, R., Diez, J., 2015. Fungal endophytic communities on twigs of fast and slow growing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in northern Spain. *Fungal Biol.* 119, 870–883.
- Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A., Oelmüller, R., 2008. The root-colonizing endophyte *Piriifomopsis indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21, 799–807.
- Tintjer, T., Rudgers, J.A., 2006. Grass-herbivore interactions altered by strains of a native endophyte. *New Phytol.* 170, 513–521.
- UN-ECE ICP Forests, 1998. International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests. Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. Federal Research. Hamburg.
- Vainio, E., Korhonen, K., Hantula, J., 1998. Genetic variation in *Phlebia gigantea* as detected with random amplified microsatellite (RAMS) markers. *Mycol. Res.* 102, 187–192.