

## Caracterización de aislados de *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton mediante cromatografía de gases

A. MORET, M. NADAL, Fr. GARCÍA y C. MONTÓN

Se han caracterizado diversos aislados del hongo fitoparásito *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton mediante cromatografía de gases de los ácidos grasos de la pared celular. Por la morfología de las colonias se distinguen tres tipos de aislados: A, B y AB; sin embargo los análisis de los ácidos grasos estructurales indican que los aislados intermedios tipo AB son más próximos al tipo B que al tipo A.

A. MORET y M. NADAL. Sección de Fitopatología, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Av. Diagonal n.º 645, Barcelona 08028.

Fr. GARCÍA y C. MONTÓN. Laboratori de Diagnòstic del Servei de Protecció dels Vegetals del DARP de la Generalitat de Catalunya, Cabriels.

**Palabras clave:** *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton, ácidos grasos, cromatografía.

### INTRODUCCION

*Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton es un hongo Coelomycete parásito de gimnospermas (*Pinus* sp., *Cupressus* sp., *Abies* sp., *Cedrus* sp., *Picea* sp., *Juniperus* sp., etc.) y responsable de graves daños tanto de plantas de vivero como de individuos adultos. Los síntomas más frecuentes de la infección son marchitez y necrosis de los brotes apicales así como lesiones tipo cáncer y coloraciones azuladas de la madera, todo ello acompañado de la producción de abundantes exudados resinosos.

Se han identificado en Cataluña diversos tipos de aislados del hongo que se agruparon según las características morfológicas del micelio, tipo de crecimiento y coloración del mismo; otro criterio de clasificación que se tuvo en cuenta fueron las dimensiones de los conidios y el carácter liso o rugoso de la pared celular.

En este trabajo hemos caracterizado los aislados de *S. sapinea* utilizando por primera vez la técnica de cromatografía de gases de los ácidos grasos de su pared celular.

### Antecedentes

La determinación cuantitativa y cualitativa (formas cis y trans) de los ácidos grasos de la pared celular se aplica a la sistemática bacteriana desde principios de los años ochenta y constituye actualmente una potente herramienta de trabajo que permite a los laboratorios microbiológicos determinar con gran precisión y en muy poco tiempo la especie de un aislado bacteriano prescindiendo de la utilización de medios selectivos y pruebas bioquímicas. Casi paralelamente a las experiencias llevadas a cabo para poner a punto esta técnica para la determinación de las bacterias se intentó hacerla extensiva

a los hongos. Dada la semejanza en la composición de la pared celular entre los diversos géneros de hongos, dicha técnica no permite distinguir categorías sistemáticas superiores a la especie, pero pueden detectarse diferencias entre categorías sistemáticas inferiores.

Recientemente STEVENS JOHNK y col. (1992, 1994), han realizado la diferenciación de cepas de *Rh. solani*, basándose en el perfil de ácidos grasos celulares. En sus trabajos proponen este método para distinguir los diversos grupos de anastomosis intraespecíficos.

Por otra parte, GARCÍA y col. (1994), presentaban resultados referentes a la posibilidad de diferenciar cepas de *Rhizoctonia solani* con diferente grado de patogenicidad.

## MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado 22 aislados de *Sphaeropsis sapinea* obtenidos de *Pinus* spp., distinguiendo los siguientes grandes grupos morfológicos:

**SS-A:** de micelio grisáceo y de textura algodonosa.

**SS-B:** de micelio gris oscuro y con un crecimiento más liso.

**SS-AB:** de características intermedias: micelio gris oscuro y algodonoso.

Los cultivos se mantuvieron en PDA, presentando todos ellos un crecimiento similar. La incubación previa a la extracción de los ácidos grasos se ha realizado en medio líquido (200 ml) y con agitación continua durante 7 días a 24 °C de temperatura.

Después de la incubación se recogía la fracción miceliar del cultivo mediante centrifugación o filtrado. Se procedía a un lavado con agua estéril, se escurría y se procesaba una fracción de 50-100 mg, con la misma técnica utilizada por el sistema MIS (Microbial Identification System; Microbial ID, Inc., Newark, DE):

- Saponificación mediante calentamiento a 100 °C con NaOH + MetOH.
- Metilación con HCl + MetOH a 80 °C.
- Extracción de la fracción FAME con Hexano.
- Recuperación de la fase superior (hidrófoba).
- Cromatografía.

## RESULTADOS

En el Cuadro 1, se muestran los porcentajes de los ácidos grasos para cada grupo morfológico expresado como **Media  $\pm$  desviación estándar**. Los ácidos grasos obtenidos han sido los siguientes:

Ácidos grasos	Nombre
C14:0	Mirístico
C15:0	Pentadecanoico
C16:0	Palmítico
C16:1 cis 7	Palmitoleico
C18:0	Estearico
C18:1 cis 9	Oleico
C18:2 cis 6,9	Linoleico
C:19:0 iso	Nonodecanoico

En las Figuras 1, 2 y 3 se comparan los perfiles de ácidos grasos de los diferentes aislados. Se ha utilizado el ECL o «Longitud de Cadena Equivalente» que nos permite comparar con cualquier otro cromatograma aunque los tiempos de retención sean distintos.

En general se observa una cierta variación en las proporciones de los ácidos grasos obtenidos para cada grupo, pero realizando pruebas estadísticas comparativas se aprecian diferencias significativas entre el tipo A y los otros dos tipos B y AB, los cuales no presentan diferencias importantes entre ellos.

**Cuadro 1.—Promedio en porcentaje de los ácidos grasos de los tres tipos morfológicos estudiados**

TIPO	ECL Fórmula	14,000 14:0	15,000 15:0	15,817 16:1 cis 7	16,000 16:0	17,000 17:0	17,720 18:2 cis 6,9	17,769 18:1 cis 9	18,000 18:0	18,633 19:0 iso	
A	Media	1,132	0,038	0,678	26,633	0,690	37,345	28,372	4,310	0,061	a
	STD	0,558	0,039	0,228	4,277	0,872	4,224	8,545	1,846	0,122	
B	Media	0,947	0,029	1,069	25,545	0,200	37,257	31,606	3,285	0,062	b
	STD	0,293	0,056	0,628	2,590	0,159	6,755	8,040	1,007	0,117	
AB	Media	0,900	0,047	1,068	25,213	0,190	36,975	31,900	3,600	0,107	b
	STD	0,188	0,065	0,748	3,248	0,122	3,271	6,027	1,167	0,139	
GLOBAL	Media	0,97221	0,03574	0,97948	25,6715	0,30788	37,1747	30,978	3,63257	0,07799	
	STD	0,355857	0,056418	0,634958	3,32154	0,48123	5,160799	7,633014	1,355959	0,12858	

**Cuadro 2.—Valores individuales de porcentaje de ácidos grasos de los 22 aislados**

Identificación	Tipo	14:0	15:0	16:1 cis 7	16:0	17:0	18:s cis 6,9	18:1 cis 9	18:0	19:0 iso
C4-2	A	0,744	0,000	0,348	20,428	0,125	37,034	38,400	2,922	0,000
C4-1	A	0,627	0,000	0,597	24,370	0,460	34,251	36,316	3,378	0,000
NC-B	A	1,470	0,064	1,011	26,250	0,214	45,544	22,285	3,161	0,000
NC	A	2,074	0,088	0,839	28,992	0,230	34,310	29,278	4,188	0,000
C4-3	A	0,746	0,000	0,594	33,125	2,420	35,587	15,583	7,902	0,306
X	AB	0,840	0,000	2,271	28,155	0,000	35,138	28,759	4,837	0,000
GRIS ST.C.	AB	0,914	0,118	0,618	24,724	0,272	34,571	34,525	4,001	0,257
XRS1	AB	0,814	0,172	2,374	28,077	0,355	35,571	27,319	4,995	0,322
C3-SER-2	AB	1,318	0,000	0,894	25,012	0,216	44,514	25,048	2,999	0,000
C3-SER-1	AB	0,964	0,087	0,344	19,920	0,161	35,280	41,448	1,796	0,000
C3-3	AB	0,958	0,000	0,903	30,350	0,292	38,515	25,535	3,170	0,277
C3-2	AB	0,634	0,000	0,700	22,190	0,000	33,772	40,515	2,189	0,000
C3-1	AB	0,758	0,000	0,437	23,276	0,226	38,441	32,050	4,813	0,000
GRIS-LL-B	B	1,103	0,161	1,198	21,917	0,249	32,113	40,718	2,541	0,000
B-3	B	0,837	0,000	2,122	24,602	0,000	34,782	32,829	4,827	0,000
B-4	B	0,818	0,000	2,175	24,184	0,000	34,651	33,201	4,972	0,000
GRIS-LL-2	B	1,339	0,000	0,635	27,304	0,405	46,197	21,913	2,206	0,000
GRIS-LL-A	B	1,414	0,096	0,431	21,186	0,249	28,684	45,613	2,327	0,000
B-2	B	0,549	0,000	1,173	29,049	0,322	34,453	31,068	3,386	0,000
GRIS-LL-1	B	1,105	0,000	0,615	27,364	0,409	46,340	21,937	2,230	0,000
C6	B	0,578	0,000	0,707	26,250	0,168	46,828	21,786	3,452	0,232
B-1	B	0,784	0,000	0,561	28,049	0,000	31,269	35,390	3,624	0,322

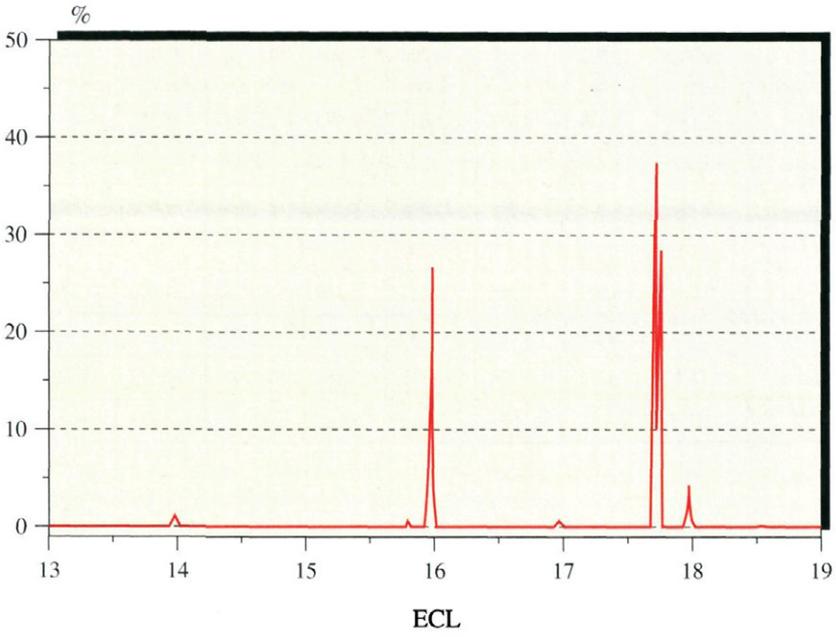


Fig. 1.-Perfil de los ácidos grasos del tipo morfológico -A-

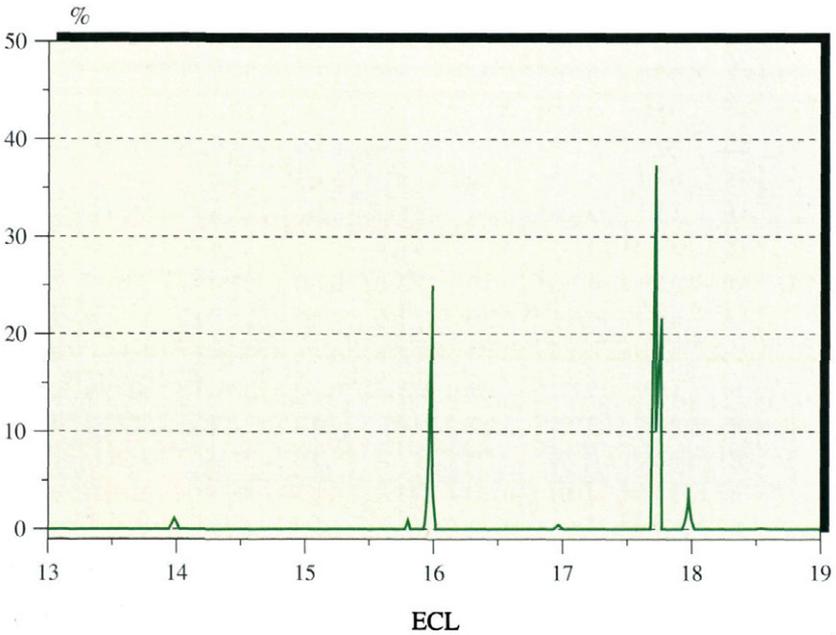


Fig. 2.-Perfil de los ácidos grasos del tipo morfológico -B-

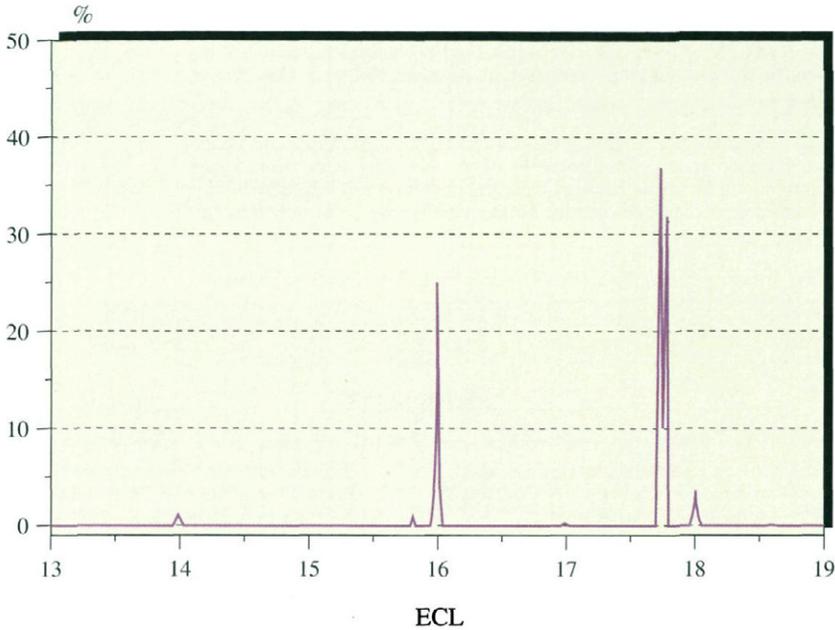


Fig. 3.-Perfil de los ácidos grasos del tipo morfológico -AB-

## DISCUSION

PALMER y col. (1987), determinaron los diferentes tipos de aislados (**A**, **B** y uno intermedio) en función del carácter liso o rugoso de la pared del conidio y la morfología de la colonia. El tipo **A** y el intermedio, presentan la superficie del conidio lisa, mientras que en el tipo **B** rugosa.

En este trabajo, no obstante, mediante el análisis de los ácidos grasos estructurales se ha constatado que el tipo intermedio (**AB**) es más próximo al tipo **B**.

A pesar de estos resultados, es necesario realizar un muestreo más amplio y profundi-

zar en los distintos tipos de aislados para llegar a obtener resultados más precisos.

## CONCLUSIONES

El análisis de los ácidos grasos de los distintos tipos morfológicos, nos ha permitido poner de manifiesto ciertas diferencias entre ellos, apareciendo dos grupos:

- **Grupo A:** grisáceo algodonoso.
- **Grupo B:** gris oscuro, liso y **AB** de características intermedias.

## ABSTRACT

MORET, A.; NADAL, M.; GARCÍA, Fr. y MONTÓN, C., 1995: Caracterización de aislados de *Sphaeropsis sapinea* mediante cromatografía de gases. *Bol. San. Veg. Plagas*, **21**(3): 371-376.

We have characterized some isolates of the phytoparasitic fungus *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton by gas chromatography of cell-wall fatty acids. Morphologically, it is possible to differentiate between three isolates: A, B and AB. Structurally, however fatty-acid analysis indicates that the isolates type AB are more similar to type B than type A.

**Key words:** *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton, fatty acids, chromatography.

## REFERENCIAS

GARCÍA, F.; NADAL, M. y MORET, A., 1994: *Caracterización de aislados de Rhizoctonia solani mediante cromatografía de gases*. Resúmenes VII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología.

MORET, A. y NADAL, M., 1994: *Distribution of Sphaeropsis sapinea in Catalunya*. Proceedings 9<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union.

NADAL, M. y MORET, A., 1994: *Variation among isolates of Sphaeropsis sapinea in Catalunya*. Proceedings 9<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union.

PALMER, M. A. et col., 1987: Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States. *Phytopathology*, **77**: 944-948.

STEVENS JOHNK y JONES, R. K., 1992: Determination of whole-cell fatty acid in isolates of *Rhizoctonia solani* AG1 IA. *Phytopathology*, **82**: 68-72.

STEVENS JOHNK y JONES, R. K., 1994: Comparison of whole-cell fatty acid compositions in intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* AG-1. *Phytopathology*, **84**: 271-275.

(Aceptado para su publicación: 21 febrero 1995)