



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-001

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Diversidad ecológica y transmisión de micovirus en la flora fúngica asociada a *Tomicus piniperda* en pinares amenazados por *Fusarium circinatum*.

MUÑOZ-ADALIA, E. J.^{1,2}, SANZ-ROS, A.V.^{1,3}, FLORES-PACHECO, J. A.^{1,2,4}, BEZOS, D.^{1,2}, HANTULA, J.⁵, DIEZ, J. J.^{1,2}, VAINIO, E. J.⁵ y FERNÁNDEZ, M. M.^{1,6}.

¹: Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible (iuFOR). Universidad de Valladolid– INIA, Avenida de Madrid 44, 34071 Palencia, España.

²: Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Universidad de Valladolid. Avenida de Madrid 44, 34071 Palencia, España.

³: Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos (Junta de Castilla y León), Polígono industrial de Villamuriel, S/N, 34190, Villamuriel de Cerrato, Palencia, España.

⁴: Facultad de Recursos Naturales y Medio Ambiente, Bluefields Indian & Caribbean University- BICU. Avenida Universitaria, Apartado postal N° 88 Bluefields, Nicaragua.

⁵: Natural Resources Institute Finland (Luke), Viikinkaari 4 FI-00790 Helsinki, Finlandia.

⁶: Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Valladolid. Avenida de Madrid 44, 34071 Palencia, España.

Resumen

Los barrenillos (Coleoptera, Scolytinae) son portadores de hongos filamentosos entre los cuales se encuentran especies fitopatógenas. Algunos micovirus (virus que infectan hongos) se consideran útiles en biocontrol de enfermedades forestales dado que pueden reducir la virulencia de su hospedador. En el presente estudio, se caracterizó la comunidad fúngica asociada a ejemplares de *Tomicus piniperda* capturados tanto en pinares asintomáticos como en pinares afectados por *Fusarium circinatum* en Cantabria. Para ello, se realizó tanto identificación morfológica como molecular y se calcularon diferentes índices ecológicos (riqueza, diversidad, dominancia, uniformidad y similitud). Además, se evaluó la presencia de tres micovirus, descritos para *F. circinatum*, tanto en las especies fúngicas aisladas de insectos, como en veinte aislados de *F. circinatum* procedentes de insectos capturados previamente en el mismo área de estudio. Los resultados mostraron una diversidad moderada y la dominancia del hongo *Sydowia polyspora*. Los micovirus estudiados aparecieron frecuentemente en *F. circinatum* pero estuvieron ausentes en el resto de taxones analizados.

Palabras clave

Comunidad fúngica, Chancro resinoso del pino, Micovirus, Scolytinae, Transmisión de virus.

1. Introducción

Las interacciones ecológicas que unen a los hongos filamentosos y los escolítidos o barrenillos (Coleoptera; Scolytinae) son complejas variando entre el parasitismo y la simbiosis (Six, 2012). En sanidad forestal, se han estudiado ampliamente algunas de las asociaciones existentes entre escolítidos y hongos fitopatógenos (Min et al., 2009; Sallé et al., 2005), siendo la relación de *Scolytus* spp. y los hongos causantes de la grafiosis del olmo (*Ophiostoma ulmi* (Buisman) Melin y Nannf. y *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier) uno de los casos mejor estudiados (Santini y Faccoli, 2014).

El chancro resinoso del pino causado por el hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg y O'Donnell (teleomorfo *Gibberella circinata* Nirenberg y O'Donnell) se considera una de las enfermedades más graves en plántulas de pino (*Pinus* spp.) alrededor del mundo. Este hongo provoca altas tasas de mortalidad por marchitamiento del cuello de raíz pre- y pos-emergente en viveros (hasta 90%), mientras que en arbolado adulto causa clorosis, decaimiento, abundante secreción de resina y aparición de chancros en el tronco y las ramas gruesas. Estos síntomas devalúan el precio de la madera, pudiendo llegar a causar la muerte del árbol por anillamiento del tronco o predisponerlo a sufrir roturas durante vendavales y tormentas (Aegerter et al., 2003). La infección de material vegetal por *F. circinatum* ha sido confirmada en catorce países alrededor del mundo, afectando en consecuencia a Europa, América, África y Asia. El hongo ha establecido diferentes asociaciones con invertebrados que actúan como portadores o incluso como vectores (organismos capaces de transportar e inocular el patógeno en un hospedante sano) a lo largo de su área de distribución. Así pues, en California se han descrito como vectores seis miembros de la subfamilia Scolytinae y una especie de la familia Anobiidae (Brockhoff et al., 2016). En España, se han identificado seis especies de escolítidos portadores de *F. circinatum*, además de dos especies pertenecientes a la subfamilia Molytinae y una a la subfamilia Entiminae (Iturrity et al., 2011; Romón et al., 2007a).

En este sentido, el barrenillo *Tomicus piniperda* L. (Col., Scolytinae) (Figura 1) ha sido recientemente identificado como una pieza relevante en el patosistema de *F. circinatum* en el norte de España, al demostrarse, en base a los postulados de Leach (1940), su papel como portador y vector plausible (Bezós et al., 2015). Este insecto perforador, es considerado una plaga secundaria en cuanto a infestación de tronco en Europa (Annala et al., 1999; Fernández y Costas, 1999), si bien causa daños relevantes en arbolado sano en Estados Unidos donde fue introducido en 1992 (Haack y Poland, 2001). Este insecto consume la médula de los ramillos sanos con el fin de completar su alimentación de maduración y acumular suficiente grasa corporal para llevar a cabo el vuelo de dispersión en primavera. En España, el insecto se queda todo el período invernal en ramillos, bien de copas, bien en aquellos caídos al suelo por el efecto del viento, la lluvia o la nieve.

Los virus que infectan hongos o micovirus son frecuentes en la naturaleza e infectan los filos Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota y Glomeromycota (Herrero et al., 2012). Algunos de estos micovirus se han perfilado como herramientas en el control biológico de enfermedades forestales al reducir, durante su infección aislada o en co-infección con otros virus, diversas características asociadas a la virulencia de los patógenos hospedantes tales como el crecimiento del micelio, la producción de esporas o la actividad enzimática, entre otras (Muñoz-Adalia et al., 2016a; Xie y Jiang, 2014). Recientemente, tres nuevos micovirus del género *Mitovirus* han sido descritos en *F. circinatum*. Estos virus de cadena simple de ARN se localizan en la mitocondria y cuentan con un tamaño que oscila entre los 1973 y 2193 pares de bases (Martínez-Álvarez et al., 2014). En la actualidad se sabe que dichos virus afectan positivamente a la virulencia de *F. circinatum* sobre plántulas de pino de Monterrey (*Pinus radiata* D. Don) por lo que se ha discutido su posible papel como agentes adaptativos (Muñoz-Adalia et al., 2016b). Su presencia en la Península Ibérica es elevada, sin embargo, no se ha detectado en aislados procedentes de Sudáfrica (Vainio et al., 2015). La transferencia efectiva de virus entre hongos de diferentes especies se ha confirmado con anterioridad en condiciones de laboratorio (Lee et al., 2011), si bien se desconoce si este proceso tiene lugar espontáneamente en la naturaleza para el caso de *F. circinatum* y otras especies de hongos con las que contacta en campo.

Las hipótesis de trabajo durante la elaboración del presente estudio fueron que *T. piniperda* podría transportar una comunidad fúngica diversa tanto en pinares asintomáticos como en masas de pino afectadas por la enfermedad del chancro resinoso del pino. Adicionalmente se hipotetizó que los aislados de *F. circinatum* obtenidos de *T. piniperda*, así como de otros insectos de hábitat subcortical, podrían albergar micovirus descritos para el patógeno aislado de material vegetal. Además, se consideró la posibilidad de que otros hongos que habitaran en las mismas parcelas y también fuesen transportados por *T. piniperda*, pudieran haber sido infectados por los mencionados micovirus descritos en *F. circinatum*.



Figura 1. Vista lateral de un ejemplar de *Tomiscus piniperda* capturado en el área de estudio.

2. Objetivos

Los objetivos perseguidos durante la elaboración de este trabajo fueron:

- Evaluar la diversidad fúngica asociada a *T. piniperda* invernantes en pinares asintomáticos e infectados por *F. circinatum* en Cantabria, España.
- Conocer la prevalencia de los micovirus descritos en *F. circinatum* en aislados del hongo obtenidos de diferentes especies de insectos subcorticales.
- Estudiar la presencia de los micovirus descritos en *F. circinatum* en otros taxones fúngicos que conviven con el mencionado agente patógeno y que son transportados por *T. piniperda*.

3. Metodología

3.1. Recolección de ramillos

Durante los meses de noviembre y diciembre de 2015 se recogieron ramillos de pino horadados por *T. piniperda* (Figura 2) caídos de las copas al suelo en los dos rodales estudiados. Uno de ellos (parcela A) correspondió a un rodal procedente de repoblación en masa pura de pino de Monterrey ubicado en Santibáñez, Cabezón de la Sal, Cantabria (UTM 398813; 4792690. 320 m.s.n.m.). Dicho rodal se encontraba seriamente afectado por *F. circinatum* siendo generalizada la aparición de clorosis y chancros resinosos en el arbolado. Se analizó otra parcela (B) localizada en San Miguel de Aguayo, Cantabria (UTM 419587; 4771507. 850 m.s.n.m.), repoblada con pino albar

(*Pinus sylvestris* L.) y pino salgareño (*Pinus nigra* subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco). Esta segunda parcela se encontró libre de síntomas de la enfermedad del chancro resinoso del pino. Tras la recogida, los ramillos fueron inspeccionados en laboratorio y los ejemplares de *T. piniperda* encontrados en su interior, fueron extraídos con pinzas entomológicas estériles y transportados a tubos Eppendorf® de 1,5 ml. Los insectos fueron conservados a 4°C hasta su procesado.



Figura 2. Ramillo de *Pinus radiata* ocupado por *Tomicus piniperda*.

3.2. Preparación de muestras y aislado de colonias fúngicas

Con el objetivo de obtener suspensiones de los propágulos fúngicos adheridos al exoesqueleto de los insectos, cada ejemplar fue sumergido en 100µl de Tween 80 (PanReac) a concentración 1% v/v. Cada individuo fue sometido a ultrasonidos (J. P. Selecta Ultrasons 2.6l) durante 5s a 40kHz para obtener las suspensiones de esporas (Ambourn et al., 2006).

Se cultivaron alícuotas de 50µl de cada suspensión de esporas en placas Petri con medio de cultivo PDAs (patata-dextrosa-agar a concentración 3,9% m/v con 0,6 mg/l de estreptomina). En los casos en que las colonias bacterianas ocuparon completamente la superficie de cultivo, una nueva alícuota de suspensión de esporas se cultivó en agar-agua (1,5% m/v de agar). Las colonias que se observaron creciendo en el medio de cultivo fueron subcultivadas sucesivamente en medio MEA (1,45% m/v de agar y 1,93% m/v de extracto de malta) hasta conseguir cultivos masales puros. Las suspensiones de esporas que no aportaron ninguna colonia de hongo se consideraron estériles. Las colonias se identificaron de forma preliminar mediante observación al microscopio (LEITZ DIALUX 22/22 EB) de hifas, esporas y estructuras de reproducción. Posteriormente se empleó el protocolo de establecimiento de unidades taxonómicas operativas (siglas en inglés: OTUs) o morfotipos de acuerdo al protocolo descrito por Lacap et al. (2003) (Figura 3). Un número representativo de cultivos puros por cada OTU fueron transferidos a medio de cultivo MOS (2,84% m/v de orange serum agar, 0,85% m/v de agar, 0,76% m/v de extracto de malta y 0,76% m/v de dextrosa) cubierto con membrana de celofán para la identificación molecular.

Complementariamente, se seleccionaron veinte aislados de *F. circinatum* previamente obtenidos de insectos capturados en el mismo área de muestreo (Tabla 1). Estos aislados se emplearon en el estudio comparativo de prevalencia de micovirus (ver apartado 3.4.)

3.3. Identificación molecular de los morfotipos

Inicialmente se realizó la extracción de los ácidos nucleídos totales de cada aislado seleccionado, siguiendo el protocolo de Vainio et al. (1998). La homogeneidad de los OTUs se comprobó mediante el uso de un análisis de marcadores minisatélites con el cebador M13 (5´-GAGGGTGGCGTTCT-3´) (Stenlid et al., 1994). La PCR se desarrolló en un volumen de reacción de 50µl, los pasos de la reacción consistieron en 10 minutos a 93°C seguidos de 45 ciclos de 20 segundos a 93°C, 1 minuto a 48°C, 20 segundos a 72°C y un paso final de incubación de 6 minutos a 72°C.

Por otro lado, se realizó una amplificación de la región ITS para la identificación de los diferentes OTUs mediante el uso del par de cebadores ITS1F (5´-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3´) e ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) (Gardes y Bruns, 1993; White et al., 1990). La PCR se realizó en un volumen total de reacción de 50µl, los pasos de reacción consistieron en 10 minutos de desnaturalización a 96°C seguido de 13 ciclos de 35 segundos a 95°C, 55 segundos a 56°C, 45 segundos a 72°C; después 13 ciclos de 35 segundos a 95°C, 55 segundos a 56°C, 2 minutos a 72°C y 8 ciclos adicionales de 35 segundos a 95°C, 55 segundos a 56°C, 3 minutos a 72°C y finalmente un paso de elongación de 10 minutos a 72°C (Gardes y Bruns, 1993). Los productos de PCR (tanto para el análisis de minisatélites como para la región ITS) fueron separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa 1,6% m/v y SynerGel™ (Diversified Biotech) a 0,9% m/v. Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta.

Los amplicones resultantes de la anterior PCR se enviaron a Macrogen Inc. (www.macrogen.com) para efectuar la secuenciación de ADN. Las secuencias se analizaron de forma preliminar con el programa Sequence Scanner v1.0 (Thermo Fisher Scientific) y después se compararon con las depositadas en la base de datos de GenBank (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mediante el uso de la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990). Se consideró un porcentaje de homología mínimo de 98% para asignar un taxón a un OTU.



Figura 3. Vista general de diferentes morfotipos obtenidos de las suspensiones de esporas de *Tomicus piniperda*.

3.4. Identificación de virus de *Fusarium circinatum* mediante amplificación por RT-PCR

Se analizó la presencia de los micovirus *Fusarium circinatum* mitovirus 1, 2-1 y 2-2 (FcMV1, FcMV2-1 y FcMV2-2 respectivamente) en posibles hospedantes no descritos previamente y que formasen parte de la comunidad fúngica transportada por *T. piniperda*. Para ello, se seleccionaron todos los aislados obtenidos de insectos de la parcela A (infectada por *F. circinatum*) y un número representativo de aislados por OTU de la parcela B (libre de la enfermedad). Además fue evaluada su presencia en 20 aislados de *F. circinatum* obtenidos previamente de insectos en la zona de estudio (Tabla 1). Los ácidos nucleídos totales se extrajeron de acuerdo al protocolo de Vainio et al. (1998). La cantidad inicial de ARN se estimó mediante el uso de un espectrofotómetro NanoVue™ Plus UV/Visible (GE HealthCare Life Sciences). La RT-PCR para identificación de micovirus se llevó a cabo con ADNc generado mediante el uso de cebadores aleatorios (Jurvansuu et al., 2014; Vainio et al., 2013). El proceso de RT-PCR siguió el protocolo descrito por Vainio et al. (2015). Los productos de RT-PCR se visualizaron mediante electroforesis de la forma anteriormente descrita.

3.5. Análisis de la comunidad ecológica

La comunidad de hongos aislados de los insectos se estudió mediante el uso del índice de diversidad de Shannon (H'), así como la riqueza de taxones (S). Se utilizó el índice de uniformidad de Shannon (J) para conocer la equidad en las abundancias relativas de los taxones y se calculó la similitud de comunidades de hongos entre parcelas empleando el índice de Sorensen (I) (Zak y Willing, 2004). Además, se obtuvo la dominancia taxonómica de acuerdo al índice de Camargo (Camargo, 1993) ($1/S$; se definió un taxón como dominante en la comunidad si $p_i > 1/S$, siendo p_i la abundancia relativa del taxón i).

4. Resultados

4.1. Capturas

Se recogieron un total de 499 ramillos a razón de 58,11% de pino de Monterrey (parcela A), 33,27% de pino salgareño (parcela B) y 8,62% de pino albar (parcela B). La tasa de ocupación de *T. piniperda* ascendió a 9,02%, siempre con un único ejemplar por ramillo ocupado. Se capturaron 45 imagos de *T. piniperda* a razón de 12 ejemplares en pino de Monterrey, 29 en pino salgareño y 4 en pino albar.

4.2. Composición de la comunidad fúngica

Se obtuvieron un total de 108 aislados de las suspensiones de esporas en una proporción de $2,70 \pm 0,14$ aislados por insecto (media y error estándar) (24,07% de los aislados totales procedieron de la parcela A y 75,93% de la parcela B). Se identificaron un total de 13 OTUs ($1,35 \pm 0,08$ OTUs por insecto) los cuales fueron compatibles con los patrones de bandas descritos por el análisis de minisatélites. Atendiendo a las secuencias genéticas obtenidas para la región ITS, se identificaron un total de 11 taxones ($1,30 \pm 0,08$ taxones por insecto). Los taxones identificados en la parcela infectada (A) fueron *Cladosporium* sp. (3,85%), *Fusarium* sp. (3,85%), *Mucor hiemalis* Wehmer (3,85%), *Penicillium* sp. (11,53%), *Pestalotiopsis* sp. (19,23%), *Phaeomoniella effusa* Damm & Crous (7,69%) y *Sydowia polyspora* (Bref. & Tavel) E. Müll. (50,00%). En la parcela asintomática (B) los taxones identificados fueron *Fusarium lateritium* Nees (2,44%), *Fusarium sporotrichioides* Sherb. (3,66%), *Fusarium* sp. (9,76%), *M. hiemalis* (2,44%), *Ophiostoma canum* (Münch) Syd. & P. Syd. (2,44%), *Pestalotiopsis* sp. (1,22%), *P. effusa* (3,66%), *Phoma herbarum* Westend (4,88%) y *S. polyspora* (69,51%). Un total de 3 ejemplares se consideraron estériles al no aportar ninguna colonia de hongo tras el cultivo de sus respectivas suspensiones de esporas.

Tabla 1. Aislados de *Fusarium circinatum* obtenidos de insectos en el área de estudio. Se muestran los resultados positivos de amplificación por RT-PCR empleando los diferentes pares de

cebadores para la identificación de *Fusarium circinatum* mitovirus 1, 2-1 y 2-2 (FcMV1, FcMV2-1 y FcMV2-2, respectivamente).

Aislado	Especie portadora	Origen	FcMV1	FcMV2-1	FcMV2-2
FC054	<i>Hylastes attenuatus</i> Erichson	Vejeorís (Santiurde)			
FC110	<i>Tomicus piniperda</i> L.	Santibañez (C. Sal)			
FC113	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			
FC115	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			
FC116	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			
FC118	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			
FC120	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			
FC130	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			
FC132	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			
FC133	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)	✓		
FC119	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)		✓	
FC122	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)		✓	
FC311	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)		✓	
FC842	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)		✓	
FC921	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)		✓	
FC111	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			✓
FC117	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			✓
FC841	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)			✓
FC179	<i>T. piniperda</i>	Santibañez (C. Sal)	✓	✓	
FC213	<i>Pityophthorus pubescens</i> Marsham	Vejeorís (Santiurde)	✓	✓	

Las diversidad según el índice de Shannon resultó $H' = 1,42$ con una uniformidad asociada de $J = 0,58$. Respecto de la dominancia, *S. polyspora*, *Pestalotiopsis* sp. y *Penicillium* sp. dominaron la comunidad fúngica transportada por *T. piniperda* en la parcela A de acuerdo al índice de Camargo, mientras que en la parcela B la flora fúngica estuvo dominada únicamente por *S. polyspora*. Tomando todos los datos en conjunto, *S. polyspora* dominó la comunidad de las parcelas A y B. En cuanto a la similitud de la comunidad entre parcelas, el índice de Sorensen resultó $I = 0,62$, con un total de 5 taxones compartidos entre ambas parcelas.

4.3. Prevalencia de micovirus

No se obtuvo amplificación alguna empleando los cebadores de FcMV1, FcMV2-1 y FcMV2-2 en los aislados de hongos analizados (ni procedentes de la parcela A, ni de la parcela B). Por el contrario, se obtuvo amplificación para FcMV1 en infección sencilla en el 5% de los aislados de *F. circinatum* analizados (Tabla 1). Se obtuvieron amplificaciones con los pares de cebadores para FcMV2-1 y FcMV2-2 en infección sencilla en un 25% y 15% de los aislados de *F. circinatum* respectivamente. Un 10% de los aislados mostraron amplificación para más de un par de cebadores, por lo que se consideraron co-infectados. En el 45% de los aislados de *F. circinatum* obtenidos de insectos no se obtuvo amplificación por RT-PCR y se consideraron libres de virus (Tabla 1).

5. Discusión

El estudio de la comunidad de hongos transportados por *T. piniperda* mostró una riqueza taxonómica y una diversidad biológica moderadas. El valor de diversidad resultó similar al encontrado por Romón et al. (2008) para otros escolítidos asociados a *F. circinatum* en España. No obstante, se han documentado valores inferiores de diversidad fúngica atendiendo a comunidades de hongos Ophiostomatales transportados por *T. piniperda* (Romón et al., 2014, 2007b). Los índices de dominancia y uniformidad, por su parte, pusieron de manifiesto la abundancia significativa de unos pocos taxones (en concreto, *S. polyspora* de forma general y *Pestalotiopsis* sp. y *Penicillium* sp. en la parcela A), mientras que el resto apareció en muy baja proporción. Dicha tendencia ha sido descrita frecuentemente tanto para hongos transportados por insectos como para comunidades de hongos endófitos en pinos (Romón et al., 2008; Sanz-Ros et al., 2015). La densidad de población de *T. piniperda* resultó baja, esto podría ser debido a que la población se encontraba en una fase endémica en el área de estudio.

Respecto a los taxones identificados, buena parte de ellos habían sido descritos previamente como especies asociadas a escolítidos (p. ej. *O. canum*, *S. polyspora* o *Fusarium* spp.) (Jankowiak, 2008, 2006; Silva et al., 2015), mientras que *P. herbarum*, *Pestalotiopsis* sp. o *P. effusa*, entre otros, son considerados endófitos y pudieron ser adquiridos por el insecto durante su fase de alimentación (Giordano et al., 2009; Sanz-Ros et al., 2015; Zamora et al., 2008). Además, se encontraron presentes algunas especies fúngicas, que son frecuentes en la hojarasca en descomposición así como en el suelo como es el caso de *S. polyspora*, *Penicillium* sp. y *M. hiemalis*, lo cual explicaría su aparición en los individuos invernantes ubicados en los ramillos de las copas que posteriormente cayeron al suelo. *Cladosporium* sp. es considerado un hongo oportunista cuya aparición pudiera ser debida al azar o al contacto ocasional durante el vuelo del insecto (Jankowiak and Bilański, 2007). Por lo que se refiere a *F. circinatum*; no se obtuvo ningún aislado en las suspensiones de esporas, ni siquiera de aquellas procedentes de la parcela A. La explicación más plausible de este resultado negativo podría ser la escasa tasa de transporte que existe entre este patógeno y *T. piniperda* evaluada en trabajos previos y cercana al 4% (Bezós et al., 2015; Romón et al., 2007a, 2008).

Una de las teorías más aceptadas sobre la evolución de los micovirus sostiene que este grupo de virus pudo cambiar de hospedante, pasando de las plantas a los hongos endófitos o patógenos en épocas pretéritas (Pearson et al., 2009). De acuerdo a esta teoría, sería esperable que la transmisión de micovirus entre diferentes especies de hongos fuese más o menos frecuente. En este estudio la prevalencia de FcMV1, FcMV2-1 y FcMV2-2 resultó entre moderada y alta en aislados de *F. circinatum* obtenidos de insectos, de forma similar a lo encontrado en otros aislados analizados previamente (Vainio et al., 2015). No se detectó presencia de estos virus en ninguno de los aislados de los diferentes taxones evaluados, a pesar de haberse analizado todas las colonias obtenidas de *T. piniperda* en la zona gravemente afectada por *F. circinatum* y un número representativo de aquellas que se obtuvieron en los pinares asintomáticos. Contrariamente a esto último, la transmisión de virus entre *Heterobasidion australe* Y.C. Dai y Korhonen y *Heterobasidion parviporum* Niemelä y Korhonen ha sido comprobada (Vainio et al., 2011), demostrando que tiene lugar entre especies del mismo género que contactan en la naturaleza (Ihrmark et al., 2002; Vainio et al., 2010). Además, la transmisión inter-específica de micovirus ha aportado resultados satisfactorios *in vitro* para especies

de los géneros *Cryphonectria* (Liu et al., 2003) y *Sclerotinia* (Melzer et al., 2002), así como entre *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill. y varios Sordariomycetes (Kanematsu et al., 2010). A la vista de estos datos, los resultados de este estudio sugieren que la transmisión de FcMV1, FcMV2-1 y FcMV2-2 entre *F. circinatum* y otras especies de hongos es infrecuente o no existe en la naturaleza. No obstante, se requiere de nuevos estudios en condiciones controladas a fin de conocer en profundidad los mecanismos que rigen la transferencia de micovirus entre diferentes especies de hongos filamentosos.

6. Conclusiones

Las principales conclusiones aportadas por este estudio son:

- 1) *T. piniperda* transporta una comunidad fúngica de diversidad moderada durante su hibernación en ramillos. Dicha comunidad no muestra diferencias relevantes entre las dos parcelas evaluadas.
- 2) *S. polyspora* dominó la comunidad fúngica de forma global. Siendo el hongo aislado en mayor proporción de los extractos de esporas obtenidos de *T. piniperda*.
- 3) La prevalencia de micovirus de *F. circinatum* en aislados de este hongo procedentes de insectos resultó moderada-alta. La prevalencia vírica resultó nula en otros taxones fúngicos que conviven con el patógeno o con su plausible vector, *T. piniperda*.

7. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por los proyectos AGL2015-69370-R "Nuevas tecnologías de secuenciación para el estudio del micovirus en *Fusarium circinatum*" (MINECO / FEDER, UE) y AGL2012-39912 "Control biológico del chancro resinoso del pino con micovirus de *Fusarium circinatum*" (Ministerio de Economía y Competitividad). La movilidad internacional fue sufragada por la Acción COST FP1406 PINESTRENGTH a través de una Short Scientific Mission (STSM). E. J. Muñoz-Adalia es investigador predoctoral contratado bajo la participación del Fondo Social Europeo y de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (ORDEN EDU/1083/2013). Los autores agradecen a Milagros de Vallejo y Juan Blanco (Gobierno de Cantabria) y José Ángel Arranz Sanz (JCyL) su ayuda en la realización del estudio. Los autores desean agradecer a Muhammad Kashif su colaboración en las tareas de laboratorio y a Mariano Rodríguez y Marja-Leena Santanen el apoyo técnico brindado.

8. Bibliografía

- AEGERTER, B.J.; GORDON, T.R.; STORER, A.J.; WOOD, D.L., 2003. Pitch Canker. A Technical Review, University of California. Agriculture and Natural Resources. University of California.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- AMBOURN, A.K.; JUZWIK, J.; EGGERS, J.E., 2006. Flight periodicities, phoresy rates, and levels of *Pseudopityophthorus minutissimus* branch colonization in oak wilt centers. *For. Sci.* 52, 243–250.
- ANNILA, E.; LÅNGSTRÖM, B.; VARAMA, M.; HIUKKA, R.; NIEMELÄ, P., 1999. Susceptibility of defoliated Scots pine to spontaneous and induced attack by *Tomicus piniperda* and *Tomicus minor*. *Silva Fenn.* 33, 93–106.

- BEZOS, D.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; DIEZ, J.J.; FERNÁNDEZ, M.M., 2015. The pine shoot beetle *Tomicus piniperda* as a plausible vector of *Fusarium circinatum* in northern Spain. *Ann. For. Sci.* 72, 1079–1088. doi:10.1007/s13595-015-0515-4
- BROCKERHOFF, E.G.; DICK, M.; GANLEY, R.; ROQUES, A.; STORER, A.J., 2016. Role of insect vectors in epidemiology and invasion risk of *Fusarium circinatum*, and risk assessment of biological control of invasive *Pinus contorta*. *Biol. Invasions* 18, 1177–1190. doi:10.1007/s10530-016-1059-8
- CAMARGO, J.A., 1993. Must dominance increase with the number of subordinate species in competitive interactions? *J. theor. Biol.* 161, 537–542.
- FERNÁNDEZ, M.M.; COSTAS, J.M.S., 1999. Susceptibility of fire-damaged pine trees (*Pinus pinaster* and *Pinus nigra*) to attacks by *Ips sexdentatus* and *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae). *Entomol. Gen.* 24, 105–114.
- GARDES, M.; BRUNS, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118.
- GIORDANO, L.; GONTHIER, P.; VARESE, G.C.; MISERERE, L.; NICOLOTTI, G., 2009. Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Divers.* 38, 69–83.
- HAACK, R.A.; POLAND, T.M., 2001. Evolving management strategies for a recently discovered exotic forest pest: the pine shoot beetle, *Tomicus piniperda* (Coleoptera). *Biol. Invasions* 3, 307–322. doi:10.1023/A
- HERRERO, N.; DUEÑAS, E.; QUESADA-MORAGA, E.; ZABALGOGEAZCOA, I., 2012. Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8523–8530. doi:10.1128/AEM.01954-12
- IHRMARK, K.; JOHANNESSEN, H.; STENSTRÖM, E.; STENLID, J., 2002. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genet. Biol.* 36, 147–154. doi:10.1016/S1087-1845(02)00011-7
- ITURRITXA, E.; GANLEY, R.J.; WRIGHT, J.; HEPPE, E.; STEENKAMP, E.T.; GORDON, T.R.; WINGFIELD, M.J., 2011. A genetically homogenous population of *Fusarium circinatum* causes pitch canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain. *Fungal Biol.* 115, 288–295. doi:10.1016/j.funbio.2010.12.014
- JANKOWIAK, R., 2008. Fungi associated with *Tomicus minor* on *Pinus sylvestris* in Poland and their succession into the sapwood of beetle-infested windblown trees. *Can. J. For. Res.* 38, 2579–2588. doi:10.1111/j.1439-0329.2004.00395.x
- JANKOWIAK, R., 2006. Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedlings. *Ann. For. Sci.* 63, 801–808. doi:10.1051/fores:2006063
- JANKOWIAK, R.; BILAŃSKI, P., 2007. Fungal flora associated with *Tomicus piniperda* L. in an area close to a timber yard in southern Poland. *J. Appl. Entomol.* 131, 579–584. doi:10.1111/j.1439-0418.2007.01194.x
- JURVANSUU, J.; KASHIF, M.; VAARIO, L.; VAINIO, E.; HANTULA, J., 2014. Partitiviruses of a fungal forest pathogen have species-specific quantities of genome segments and transcripts. *Virology* 462–463, 25–33. doi:10.1016/j.virol.2014.05.021

KANEMATSU, S.; SASAKI, A.; ONOUE, M.; OIKAWA, Y.; ITO, T., 2010. Extending the fungal host range of a partitivirus and a mycoreovirus from *Rosellinia necatrix* by inoculation of protoplasts with virus particles. *Phytopathology* 100, 922–30. doi:10.1094/PHYTO-100-9-0922

LACAP, D.C.; HYDE, K.D.; LIEW, E.C.Y., 2003. An evaluation of the fungal “morphotype” concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Divers.* 12, 53–66.

LEACH, L.G., 1940. Insects transmission of plant diseases. McGraw Hill, New York, USA, p. 615.

LEE, K.M.; YU, J.; SON, M.; LEE, Y.W.; KIM, K.H., 2011. Transmission of *Fusarium boothii* mycovirus via protoplast fusion causes Hypovirulence in other phytopathogenic fungi. *PLoS One* 6, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0021629

LIU, Y.C.; LINDER-BASSO, D.; HILLMAN, B.I.; KANEKO, S.; MILGROOM, M.G., 2003. Evidence for interspecies transmission of viruses in natural populations of filamentous fungi in the genus *Cryphonectria*. *Mol. Ecol.* 12, 1619–1628. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01847.x

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; VAINIO, E.J.; BOTELLA, L.; HANTULA, J.; DIEZ, J.J., 2014. Three mitovirus strains infecting a single isolate of *Fusarium circinatum* are the first putative members of the family Narnaviridae detected in a fungus of the genus *Fusarium*. *Arch. Virol.* 159, 2153–2155. doi:10.1007/s00705-014-2012-8

MELZER, M.S.; IKEDA, S.S.; BOLAND, G.J., 2002. Interspecific Transmission of Double-Stranded RNA and Hypovirulence from *Sclerotinia sclerotiorum* to *S. minor*. *Phytopathology* 92, 780–4. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.7.780

MIN, L.; ZHOU, X.D.; DE BEER, Z.W.; WINGFIELD, M.J.; SUN, J.-H., 2009. Ophiostomatoid fungi associated with the invasive pine-infesting bark beetle, *Dendroctonus valens*, in China. *Fungal Divers.* 38, 133–145.

MUÑOZ-ADALIA, E.J.; FERNÁNDEZ, M.M.; DIEZ, J.J., 2016a. The use of mycoviruses in the control of forest diseases. *Biocontrol Sci. Technol.* 26, 577–604.

MUÑOZ-ADALIA, E.J.; FLORES-PACHECO, J.A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; MARTÍN-GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, M.; DIEZ, J.J., 2016b. Effect of mycoviruses on the virulence of *Fusarium circinatum* and laccase activity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 94, 8–15. doi:10.1016/j.pmpp.2016.03.002

PEARSON, M.N.; BEEVER, R.E.; BOINE, B.; ARTHUR, K., 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 10, 115–128. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x

ROMÓN, P.; DE BEER, Z.W.; FERNÁNDEZ, M.; DIEZ, J.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J., 2014. Ophiostomatoid fungi including two new fungal species associated with pine root-feeding beetles in northern Spain. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 106, 1167–1184. doi:10.1007/s10482-014-0286-1

ROMÓN, P.; ITURRONDOBEITIA, J.C.; GIBSON, K.; LINDGREN, B.S.; GOLDARAZENA, A., 2007a. Quantitative association of bark beetles with pitch canker fungus and effects of verbenone on their semiochemical communication in Monterey pine forests in Northern Spain. *Environ. Entomol.* 36, 743–750. doi:10.1603/0046-225X(2007)36[743:QAOBBW]2.0.CO;2

ROMÓN, P.; TROYA, M.; FERNÁNDEZ DE GAMARRA, M.E.; EGUZKITZA, A.; ITURRONDOBEITIA, J.C.; GOLDARAZENA, A., 2008. Fungal communities associated with pitch canker disease of *Pinus radiata*

caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain: association with insects and pathogen-saprophyte antagonistic interactions. *Can. J. Plant Pathol.* 30, 241–253. doi:10.1080/07060661.2008.10540539

ROMÓN, P.; ZHOU, X.; ITURRONDOBEITIA, J.C.; WINGFIELD, M.J.; GOLDARAZENA, A., 2007b. Ophiostoma species (Ascomycetes: Ophiostomatales) associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) colonizing *Pinus radiata* in northern Spain. *Can. J. Microbiol.* 53, 756–767. doi:10.1139/W07-001

SALLÉ, A.; MONCLUS, R.; YART, A.; GARCIA, J.; ROMARY, P.; LIEUTIER, F., 2005. Fungal flora associated with *Ips typographus*: Frequency, virulence, and ability to stimulate the host defence reaction in relation to insect population levels. *Can. J. For. Res.* 35, 365–373. doi:10.1139/x04-186

SANTINI, A.; FACCOLI, M., 2014. Dutch elm disease and elm bark beetles: A century of association. *IForest* 8, 126–134. doi:10.3832/ifor1231-008

SANZ-ROS, A. V.; MÜLLER, M.M.; SAN MARTÍN, R.; DIEZ, J.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. doi:10.1016/j.funbio.2015.06.008

SILVA, X.; TERHONEN, E.; SUN, H.; KASANEN, R.; HELIÖVAARA, K.; JALKANEN, R.; ASIEGBU, F.O., 2015. Comparative analyses of fungal biota carried by the pine shoot beetle (*Tomicus piniperda* L.) in northern and southern Finland. *Scand. J. For. Res.* 30, 497–506. doi:10.1080/02827581.2015.1031824

SIX, D.L., 2012. Ecological and evolutionary determinants of bark beetle - Fungus symbioses. *Insects* 3, 339–366. doi:10.3390/insects3010339

STENLID, J.; KARLSSON, J.-O.; HÖGBERG, N., 1994. Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycol. Res.* 98, 57–63. doi:10.1016/S0953-7562(09)80337-7

VAINIO, E.J.; HAKANPÄÄ, J.; DAI, Y.C.; HANSEN, E.; KORHONEN, K.; HANTULA, J., 2011. Species of *Heterobasidion* host a diverse pool of partitiviruses with global distribution and interspecies transmission. *Fungal Biol.* 115, 1234–1243. doi:10.1016/j.funbio.2011.08.008

VAINIO, E.J.; KORHONEN, K.; HANTULA, J., 1998. Genetic variation in *Phlebiopsis gigantea* as detected with random amplified microsatellite (RAMS) markers. *Mycol. Res.* 102, 187–192. doi:10.1017/S0953756297004577

VAINIO, E.J.; KORHONEN, K.; TUOMIVIRTA, T.T.; HANTULA, J., 2010. A novel putative partitivirus of the saprotrophic fungus *Heterobasidion ecrustosum* infects pathogenic species of the *Heterobasidion annosum* complex. *Fungal Biol.* 114, 955–965. doi:10.1016/j.funbio.2010.09.006

VAINIO, E.J.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; BEZOS, D.; HANTULA, J.; DIEZ, J.J., 2015. *Fusarium circinatum* isolates from northern Spain are commonly infected by three distinct mitoviruses. *Arch. Virol.* 160, 2093–2098. doi:10.1007/s00705-015-2462-7

VAINIO, E.J.; PIRI, T.; HANTULA, J., 2013. Virus community dynamics in the conifer pathogenic fungus *Heterobasidion parviporum* following an artificial introduction of a partitivirus. *Microb. Ecol.* 65, 28–38. doi:10.1007/s00248-012-0118-7

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.W. (Eds.), *PCR Protocols – A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., San Diego, USA, p. 482.

XIE, J.; JIANG, D., 2014. New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annu. Rev. Phytopathol* 52, 45–68. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-050222

ZAK, J.C.; WILLING, M.R., 2004. Fungal Biodiversity Patterns. En: MUELLER, G.M., BILLS, G.F., FOSTER, M.S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. El Sevier Academic Press, USA, p. 777.

ZAMORA, P.; MARTÍNEZ-RUIZ, C.; DIEZ, J.J., 2008. Fungi in needles and twigs of pine plantations from northern Spain. *Fungal Divers.* 30, 171–184.