



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-480

---

---

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

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## Plántulas de *Populus alba* pretratadas con endófitos muestran una mayor tolerancia a *Venturia tremulae*

MARTÍNEZ-ARIAS, C.<sup>1</sup>, MACAYA-SANZ, D.<sup>2</sup> y MARTÍN, J.A.<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.

<sup>2</sup> Departamento de Sistemas y Recursos Naturales. ETSI Montes, Forestal y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Madrid.

\* E-mail: juan.martin.garcia@upm.es

### Resumen

Algunos hongos endófitos parecen modular la respuesta de las plantas ante ataques de ciertos patógenos o insectos. En este trabajo se estudió la implicación de hongos endófitos de *Populus alba* en la tolerancia al patógeno necrotrofo *Venturia tremulae*, causante de la muerte de ramillos en especies de la sección *Populus*, siendo *P. alba* más tolerante que otras especies de la sección. Se evaluó *in vitro* el efecto de doce cepas de endófitos enfrentándolas al patógeno con el fin de seleccionar aquellas con mayor potencial de biocontrol. Se seleccionaron diez endófitos que fueron inoculados mediante solución esporal de una mezcla de todos ellos, de forma preventiva sobre plántulas de una savia de *P. alba*. Transcurridos 15 días, se inoculó al patógeno. Aunque en general los síntomas mostrados por las plantas fueron bajos, la mezcla de endófitos redujo la incidencia y severidad de los síntomas causados por el patógeno. Los resultados sugieren que los endófitos de *P. alba* limitarían los síntomas causados por el patógeno en este hospedante.

### Palabras clave

Chopo, resistencia, biocontrol, endófitos, *Populus alba*, *Venturia tremulae*.

### 1. Introducción

En la naturaleza, las plantas viven asociadas a microorganismos simbióticos que no les causan síntomas de enfermedad. Éstos, conjuntamente con los microorganismos patógenos, conforman la microbiota vegetal. Aquellos que viven en el interior de los tejidos de las plantas sin causarles daños son conocidos como endófitos (WILSON, 1995). En plantas leñosas, los endófitos son muy diversos, formando un grupo polifilético compuesto principalmente por ascomicetos con papeles ecológicos muy diversos o, a menudo, completamente desconocidos (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Sin embargo, muchos trabajos evidencian la importancia del papel que puede jugar la microbiota contra organismos plaga y agentes patógenos (e.g. ARNOLD *et al.*, 2003; HANADA *et al.*, 2010). Se ha comprobado que bacterias y hongos endófitos son capaces de sintetizar metabolitos biológicamente activos con capacidad de modificar el metabolismo de la planta, y por tanto, de inducirle una resistencia de tipo sistémico (BAILEY *et al.*, 2006). El micoparasitismo, la síntesis de compuestos antibióticos y la competencia por el nicho ecológico, son otros de los mecanismos usados por los hongos endófitos como estrategia de biocontrol contra agentes patógenos (ARNOLD *et al.*, 2003; BLUMENSTEIN *et al.*, 2015). Un ejemplo del posible uso de endófitos como herramienta de gestión en sanidad forestal está basado en la capacidad de algunos de ellos de producir la micotoxina regulosina, la cual afecta a los gusanos barrenadores de yemas en *Picea glauca* (SUMARAH *et al.*, 2008).

Varios estudios han explorado la diversidad de endófitos y su papel ecológico en distintas especies dentro del género *Populus* (e.g., SANTAMARIA & DIEZ, 2005; ALBRECHTSEN *et al.*, 2010; MARTÍN-GARCÍA *et al.*, 2011; MARTÍN-GARCÍA *et al.*, 2012; BALINT *et al.*, 2013). En las secciones *Aigeiros* y *Tacamahaca* se ha demostrado que endófitos presentes en el tejido foliar provocan un efecto protector frente a los daños causados por el hongo *Melampsora x columbiana* (RAGHAVENDRA & NEWCOMBE, 2013). El presente trabajo se centra en endófitos de *P. alba* (sección *Populus*), que se encuentra distribuido en las cuencas del Sur de Europa, en el Norte de África y en el centro de Asia, formando corredores de especial importancia ecológica (RICHARDSON *et al.*, 2007). Los chopos,

conjuntamente con los sauces, son los principales componentes de los bosques templados de ribera y, por tanto, son especies de importancia para la conservación y restauración de los ecosistemas riparios nativos.

El género *Venturia* Sacc. (Ascomycota, *Venturiaceae* E. Müll. & Arx ex M.E. Barr.), también conocido por sus anamorfos *Fusicladium*, *Pollaccia* y *Spilocaea*, incluye varios hongos necrotrofos responsables de manchas foliares, necrosis y deformaciones en hojas y frutos (SCHUBERT *et al.*, 2003). *Venturia tremulae* y *Venturia populina* son las principales especies del género *Venturia* que afectan a *Populus* spp., provocando defoliaciones y muerte de ramillos terminales. En plantaciones jóvenes o en planta de vivero, puede retardar el crecimiento de las plantas o, incluso, provocar su muerte. *V. populina* se hospeda sobre chopos de las secciones Aigeiros y Tacamahaca (DANCE, 1961), mientras que *V. tremulae* afecta a chopos de la sección *Populus* incluyendo: *P. tremula*, *P. alba* y el híbrido *P. x canescens* (*P. tremula* x *P. alba*).

En España, donde encontramos poblaciones naturales de *P. alba*, *P. tremula* y *P. x canescens* de forma combinada o aislada, se identifican síntomas de *V. tremulae* con una frecuencia relativamente alta, viéndose la especie *P. alba*, normalmente, menos afectada que las otras dos especies. Este patógeno infecta hojas y ramillos en brotes terminales o laterales durante la primavera, e invernan sobre los tejidos infectados y en las hojas caídas. Los síntomas de enfermedad se localizan en hojas, peciolas y ramillos, formando manchas circulares o irregulares cubriendo gran parte de la hoja, a veces curvada. En fases severas de la enfermedad los ramillos se curvan por completo dando lugar al “twig dieback” o bastón de pastor (shepherd’s crook) (SCHUBERT *et al.*, 2003).

## 2. Objetivos

En este trabajo se plantea la hipótesis del posible efecto protector ejercido por la flora endofítica de la especie *P. alba* sobre su nivel de resistencia a la enfermedad.

Para testar nuestra hipótesis planteamos los siguientes objetivos: (i) evaluar *in vitro* el efecto antagonista de hongos endófitos aislados de *P. alba* frente al patógeno *V. tremulae*; (ii) estudiar *in vivo* el efecto de una inoculación preventiva con endófitos, seleccionados según el objetivo anterior por su potencial antagonista, sobre la tolerancia de la planta a *V. tremulae*.

## 3. Metodología

### 3.1 Aislamiento e identificación de hongos endófitos y *V. tremulae*

Se usaron 12 hongos endófitos para los experimentos (Tabla 1), los cuales se aislaron en Mayo de 2014 de ramillos de dos árboles sanos de *P. alba* situados en un bosque de ribera en Aranda de Duero (Burgos, Castilla y León). Se recolectaron 8 ramillos de tres años (cuatro por árbol, uno por cada punto cardinal y en la parte exterior de la copa) los cuales fueron transportados a 4°C hasta el laboratorio. Una vez allí, se esterilizaron superficialmente en cámara de flujo laminar sumergiendo secuencialmente los tejidos en etanol al 75% (30 s), hipoclorito de sodio al 4% (5 min) y etanol al 75% (15 s). Después de dejar secar al aire (8 min), de cada uno de los ocho ramillos se cortó asépticamente un trozo de hoja (de 1 cm de diámetro, incluyendo el nervio central) y una fina lámina de tallo (incluyendo tejido xilemático y floemático), los cuales fueron cultivados en placas Petri con distintos medios de cultivo con el objetivo de aislar hongos con distintos requerimientos nutricionales: extracto de malta agar (MEA), extracto de levadura agar (YEA), patata dextrosa agar (PDA), rosa de bengala cloranfenicol agar (RBCA) y agar de extracto de madera (SWA), todos ellos sin adición de antibióticos. Las placas fueron selladas con parafilm, y cultivadas bajo oscuridad a 25°C durante 4 semanas, realizando un seguimiento periódico y repicando sobre medio fresco aquellas colonias que iban surgiendo. De esta manera se aislaron un total de 46 colonias de endófitos, los cuales se

agruparon en 12 grupos morfológicos de acuerdo a distintos aspectos (color, forma, textura, esporulación, presencia de exudados, y tasa de crecimiento). La cepa patógena *V. tremulae* se aisló a partir de un tallo infectado de *P. x canescens* procedente de la misma población y con claros síntomas de *Venturia*: brotes terminales necróticos y curvados. El procedimiento de aislamiento fue el mismo usado para el aislamiento de endófitos. La identificación taxonómica de la cepa patógena se confirmó usando criterios morfológicos (SCHUBERT *et al.*, 2003) y moleculares.

Para identificar taxonómicamente las cepas se secuenció del Espaciador Transcrito Interno (Internal Transcribed Spacer; ITS) de su ADN ribosómico. Para ello, en primer lugar se procedió a la extracción del ADN de cada una de las colonias. Posteriormente, se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificar la citada región ITS. Los productos de PCR purificados fueron enviados a servicios externos (Secugen, Madrid, España) para su secuenciación. Mediante el programa BLAST (algoritmo MEGABLAST) del GenBank (NCBI, EEUU) se determinó la secuencia más similar (con mayor puntuación) dentro de esta base de datos.

**Tabla 1.** Identificación molecular de las cepas de endófitos mediante alineamiento con BLAST (basado en alineamiento de nucleótidos de la secuencia ITS de rDNA) con su correspondiente identificación taxonómica. ND = no determinado).

Cepa	Referencia accesión Genbank	Coertura /Identidad	Nombre científico	Clase	Orden
BU16-TY2	KX858814.1	100/100	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	Eurotiomycetes	Eurotiales
BU16-TY3	KX858811.1	100/100	<i>Aspergillus cristatus</i>	Eurotiomycetes	Eurotiales
BU21-TP2	KP972552.1	100/99	<i>Cylindrocladium sp</i>	Sordariomycetes	Hypocreales
BU21-TR1	NR_144909.1	100/100	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothideomycetes	Dothideales
BU16-TR1	KX424384.1	100/100	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothideomycetes	Dothideales
BU21-TR2	KR909182.1	100/99	<i>Pleosporales sp.</i>	Dothideomycetes	Pleosporales
BU21-TP1	ND	ND	ND	ND	ND
BU21-TM1	KT306947.1	99/89	<i>Allophaeosphaeria cytisi</i>	Dothideomycetes	Pleosporales
BU21-TM2	KT306947.1	99/92	<i>Allophaeosphaeria cytisi</i>	Dothideomycetes	Pleosporales
BU21-TR3	KT306947.1	99/92	<i>Allophaeosphaeria cytisi</i>	Dothideomycetes	Pleosporales
BU21-TM3	KX765267.1	96/92	<i>Muriphaeosphaeria ambrosiae</i>	Dothideomycetes	Pleosporales
BU21-TY2	NR_137875.1	100/100	<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	Dothideomycetes	Incertae sedis

### 3.2 Ensayo de antagonismo *in vitro*

El efecto antagonista de los 12 endófitos (uno por cada tipo morfológico) frente al patógeno se estudió mediante confrontaciones *in vitro*. Fragmentos de 5x5 mm de micelio en crecimiento activo de cada una de las colonias a enfrentar se colocaron en placas Petri con MEA separadas entre ellas 4 cm. Se evaluaron tres réplicas de cada uno de los enfrentamientos y se incorporaron placas control en las que se enfrentó el patógeno consigo mismo (V-V) y placas con una sola colonia (V). Las

interacciones se evaluaron a los 3, 7, 15 y 30 días. El contorno de crecimiento se marcó, se escaneó y se cuantificó midiendo el crecimiento de las colonias. El crecimiento diario medio del patógeno se calculó para cada uno de los enfrentamientos con las cepas endófitas y en las placas control. El porcentaje de antagonismo se calculó midiendo el crecimiento de la colonia del patógeno (CP) en el día 30 de interacción para cada una de las combinaciones entre endófito y *V. tremulae* y las placas control V-V (CC), estableciendo un ratio de crecimiento del patógeno para cada interacción (CP/CC) y estimando el porcentaje antagonismo ejercido por el endófito  $((1-CP/CC) \times 100)$  (KUSARI *et al.*, 2013). También se evaluaron de forma cualitativa cada una de las interacciones observadas de acuerdo con MEJÍA *et al.* (2008): i) antibiosis (inhibición en el crecimiento del patógeno sin llegar a entrar en contacto, normalmente caracterizado por la aparición de un halo), ii) competencia por el sustrato (mayor crecimiento por parte de una de las colonias) y iii) micoparasitismo (crecimiento de las hifas de un hongo sobre las de otro y crecimiento anómalo del parasitado). En vista a estos resultados, 10 endófitos con potencial de biocontrol fueron seleccionados para el experimento *in vivo*.

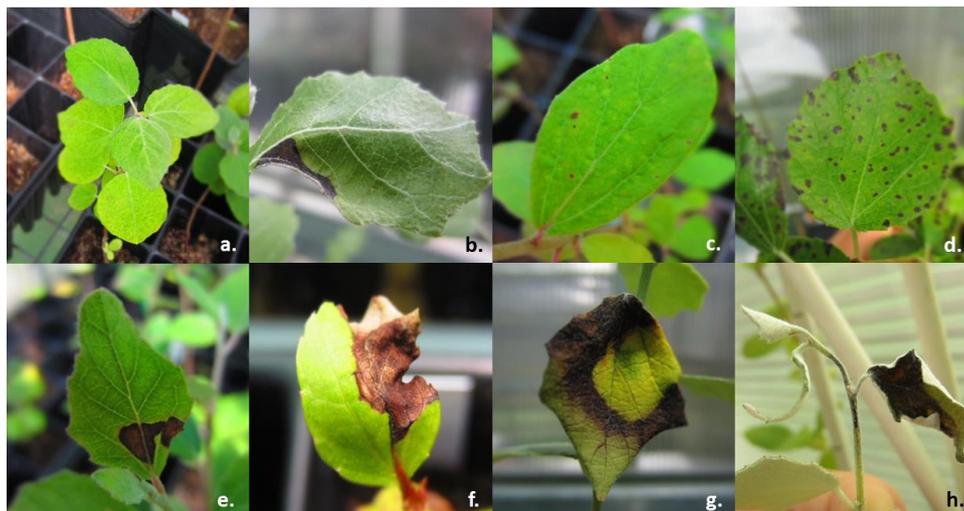
### 3.3 Experimento *in vivo*

Se recolectaron semillas de polinización abierta de tres árboles de *P. alba* sanos de la misma población de Aranda de Duero en junio de 2014. Se seleccionaron plántulas de un año con crecimiento homogéneo ( $22.3 \pm 4.1$  cm; altura media  $\pm$  SD) para el experimento (N = 114, 38 por familia), las cuales fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero a lo largo de todo el experimento.

Cada uno de los hongos endófitos seleccionados fueron cultivados en placas Petri con MEA sobre una lámina de celofán durante 30 días a 25°C con 12 horas de fotoperiodo con radiación UV cercano (320-420 nm) para inducir la esporulación. La lámina de celofán, con la colonia crecida, se metió en un tubo Falcon de 50 ml con agua destilada, se filtró la suspensión y se ajustó a una concentración de  $10^6$  esporas/ml con un hematocitómetro. En tres casos no se obtuvieron esporas y los conidios fueron sustituidos por fragmentos de hifas (de aproximadamente cuatro células o menos) obtenidas mediante un homogeneizador de tejidos de vidrio. Para las inoculaciones *in planta* se usó una mezcla de los 10 endófitos seleccionados con el fin de evaluar el efecto de una representación de la flora endófitica del hospedante. Para la obtención de conidios del patógeno se seleccionaron hojas afectadas y se lavaron con agua destilada, obteniendo una suspensión de esporas, la cual se filtró y se ajustó su concentración a  $10^6$  esporas/ml. Se usó este método de extracción de esporas ante la incapacidad para obtener esporas del patógeno *in vitro*.

Las inoculaciones *in planta* se llevaron a cabo en mayo de 2015 bajo condiciones de invernadero, y cuando las plantas habían alcanzado un tamaño de 30-50 cm. Durante las inoculaciones se mantuvo una humedad relativa de entre 70-100% para facilitar la germinación de los conidios (BLENIS & CHOW, 2001). Se aplicaron cuatro tratamientos: i) inoculación (mediante pulverización de la suspensión de esporas; concentración:  $10^6$  células/ml; volumen: 5 ml/planta) con una mezcla de los 10 endófitos seleccionados (E); ii) inoculación con los mismos endófitos y 15 días después inoculación con el patógeno (E+V); iii) aplicación de agua destilada (control negativo) (C-); y iv) inoculación con el patógeno (control positivo) (V). A los 14 y 21 días tras la inoculación (dai) con el patógeno *V. tremulae*, se evaluó la sintomatología mostrada por las plantas, y para ello se calculó la incidencia de la infección en cada una de las plantas estableciendo un ratio entre el número de hojas infectadas respecto al número total de hojas de la planta. La severidad de la infección se calculó usando una escala de severidad de 0 a 6 (Figura 1) para cada hoja de la planta para cuantificar el daño medio por planta. La severidad de los síntomas se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Severidad} = \frac{\sum \text{n}^\circ \text{ de hojas infectadas} \times \text{nivel de severidad}}{\text{n}^\circ \text{ total de hojas infectadas}}$$



**Figura 1:** Sintomatología causada por *V. tremulae* sobre plántulas de *P. alba* y niveles de severidad. a. Sin síntomas = 0; b. Borde de la hoja deformado con lesiones necróticas = 1; c. Pequeñas manchas necróticas de color negro o marrón = 2; d. Manchas necróticas cubriendo la totalidad de la hoja = 3; e. Lesiones marrones o negras cubriendo menos del 50% de la superficie de la hoja = 4; f. Lesiones marrones o negras cubriendo más del 50% de la superficie de la hoja = 4.5; g. Hoja completamente infectada = 5; h. Hojas y tallo infectado = 6.

### 3.4 Análisis estadístico

Con el objetivo de estudiar la interacción endófito-patógeno en el ensayo de interacción *in vitro*, se analizó estadísticamente el crecimiento diario medio usando un ANOVA simple. Los valores de las medias se compararon mediante el test LSD de Fisher ( $\alpha=0.05$ ). Los resultados de incidencia y severidad del ensayo *in vivo* se analizaron usando un ANOVA multifactorial, considerando tratamiento y la familia como factores, analizando también las interacciones. La normalidad de los datos se confirmó usando el test estadístico de Shapiro-Wilks (SHAPIRO & WILKS, 1965).

## 4. Resultados

### 4.1 Identificación del patógeno y los endófitos

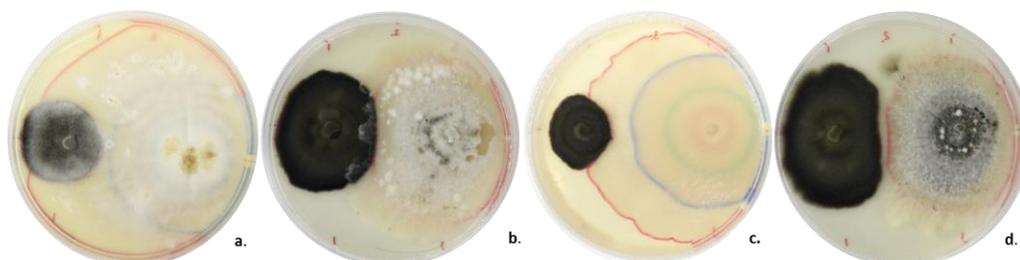
De acuerdo con datos morfológicos (MORELET, 1985) y moleculares, el patógeno se identificó como *V. tremulae*.

De entre los 12 endófitos estudiados (Tabla 1), cada uno de ellos representando un morfotipo, los órdenes Pleosporales (5 cepas), Dothideales (2) y Eurotiales fueron los más representativos del conjunto (Tabla 1). La cepa BU21-TP1 no pudo ser identificada molecularmente al no existir en la base de datos ninguna secuencia similar. Tres cepas de Pleosporales (BU21-TM1, BU21-TM2 y BU21-TR3) resultaron ser muy próximas taxonómicamente de acuerdo con sus secuencias ITS. Sin embargo, sus diferencias fenotípicas parecen indicar que son diferentes cepas dentro de la misma especie, posiblemente *Allospheerosphaeria*.

### 4.2 Experimento *in vitro*

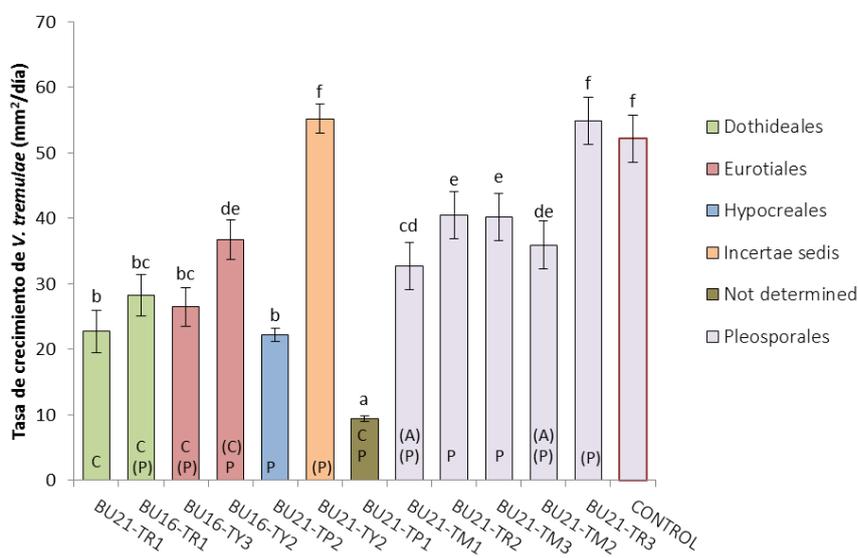
Los ensayos de antagonismo *in vitro* revelaron distintos tipos de interacciones entre *V. tremulae* y los distintos endófitos (Figura 2). La interacción más frecuente fue el parasitismo (Figura 2a, b). Once de los doce endófitos mostraron algún tipo de interacción parasítica a lo largo del experimento. A los 28 días varios endófitos mostraron un claro comportamiento parasítico (e.g., BU21-TP1 y BU21-TP2), mientras que otros comenzaron a exhibir este comportamiento a partir del día

48 (e.g., BU21-TR2, BU21-TM3, BU21-TY2 y BU21-TR3). Estos resultados nos indican niveles de parasitismos variables, en algunos casos apareciendo de forma combinada con otros tipos de interacción (i.e. BU16-TY3, competencia por el sustrato y parasitismo débil, Figura 3).



**Figura 2.** Ejemplos de interacciones in vitro entre *V. tremulae* (color oscuro, en la parte izquierda de la placa) y distintos hongos endófitos sobre placas de MEA (Malt Extract Agar). a) Parasitismo fuerte del hongo endófito BU21-TP2. b) Parasitismo débil por la cepa BU21-TM3. c) Inhibición del crecimiento de *V. tremulae* por competencia por el sustrato por el endófito BU21-TR1. d) Antibiosis débil por la cepa BU21-TM2.

Diez de los doce endófitos ensayados fueron capaces de reducir la tasa de crecimiento de *V. tremulae* con respecto a las placas control (V-V) ( $P < 0.05$ ) (Figura 3). La cepa BU21-TP1 (no identificado) exhibió una inhibición fuerte del crecimiento del patógeno (82% de reducción del área de crecimiento, 52% de antagonismo), debido a una combinación de los mecanismos de competencia por el sustrato y micoparasitismo provocando el colapso de las hifas del patógeno al tercer día de interacción. Las cepas BU21-TR1 (Dothideales) y BU21-TP2 (Hypocreales) ejercen una fuerte inhibición del patógeno por competencia por el sustrato y parasitismo, respectivamente. La cepa BU21-TP2 dio lugar a la interacción parasítica más clara frente al patógeno (Figura 2 a) reduciendo su crecimiento de 0.52 mm<sup>2</sup>/día a 0.22 mm<sup>2</sup>/día.

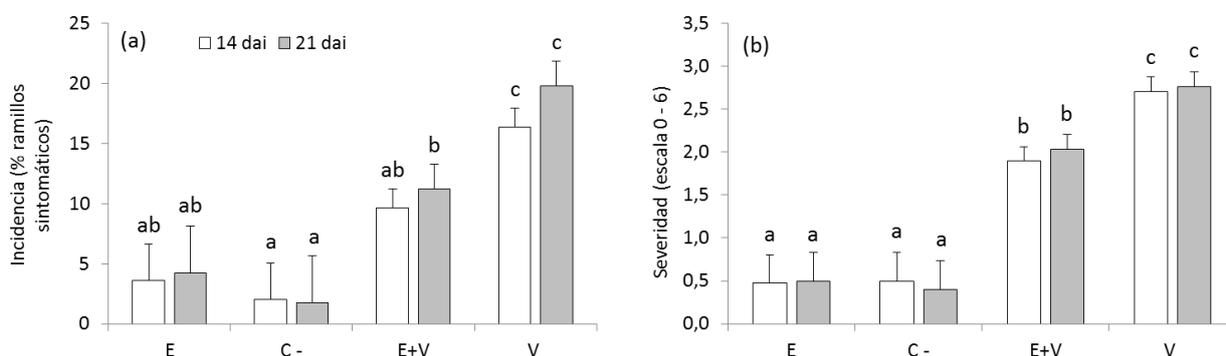


**Figura 3:** Resultados del test in vitro; crecimiento diario medio del patógeno enfrentado a cada uno de los endófitos (mm<sup>2</sup>/día). Las letras sobre las barras indican grupos homogéneos (test LSD,  $\alpha=0.05$ ), barras verticales indican el error estándar, letras en el interior de las barras indican el tipo de interacción según el siguiente código: A: antibiosis (en endófito inhibe el crecimiento del patógeno sin contacto físico), C= competencia por el sustrato (el crecimiento del endófito es mayor que el del patógeno, inhibiendo su desarrollo), P= parasitismo (el endófito crece sobre el micelio del patógeno). CONTROL: crecimiento diario medio de la planta V-V (enfrentamiento *Venturia* - *Venturia*).

### 4.3 Experimento *in vivo*

Los tratamientos V y E+V mostraron una amplia variabilidad en la incidencia y severidad de los síntomas. Los resultados del ANOVA para los valores de incidencia y severidad a los 14 y 21 dai mostraron un efecto significativo entre tratamientos ( $P < 0.0001$ ). La familia y las interacciones entre familia y tratamiento no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.17$ ).

Respecto a las comparaciones entre tratamientos, las plantas V mostraron una incidencia mayor que las plantas E+V, tanto a los 14 como a los 21 dai (Figura 4a). Las plantas E+V mostraron una incidencia necrótica similar a las plantas E o C- a los 14 dai, pero superiores a las plantas C- a los 21 dai ( $P < 0.05$ ). La reducción de la incidencia de los síntomas en las plantas E+V con respecto a las V fue de un 43,18%. Una tendencia similar se observó para la severidad de los síntomas, mostrando las plantas E+V valores inferiores a las plantas V en ambas fechas de evaluación (Figura 4b).



**Figura 2:** Incidencia y severidad de los síntomas mostrados por *P. alba* sometidas a los siguientes tratamientos: E = plantas inoculadas con una mezcla de esporas de 10 endófitos; C= plantas inoculadas con agua destilada esterilizada; E+V= plantas inoculadas con la mezcla de 10 hongos endófitos infectadas 15 días después con el patógeno *V. tremulae*; V= plantas infectadas con esporas de *V. tremulae*. Las letras superiores indican grupos homogéneos (LSD test,  $\alpha=0.05$ ), las barras verticales muestran el error estándar.

### Discusión

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de la implicación de los hongos endófitos en la mitigación de los síntomas causados por *V. tremulae* sobre la especie *P. alba*. Plántulas de un año fueron inoculadas con una mezcla de diez endófitos con potencial de biocontrol, exhibiendo estas plantas una menor incidencia y severidad de síntomas frente al patógeno que los controles positivos. En esta misma línea, RAGHAVENDRA & NEWCOMBE (2013) demostraron que hongos endófitos foliares eran capaces de reducir la severidad de los síntomas causados por el hongo biotrofo *Melampsora x columbiana* en 6 genotipos de *Populus* distintos. El efecto beneficioso de los hongos endófitos ha sido también demostrado en otras especies arbóreas (MEJÍA *et al.*, 2008).

De acuerdo con nuestras observaciones en campo, los árboles de *P. alba* parecen más resistentes a *V. tremulae* que otras especies dentro de la sección *Populus*, y nos planteamos si esta mayor tolerancia a la enfermedad podría ser debida al efecto de su flora endófitica. A pesar de observarse una reducción de la sintomatología en plantas tratadas con endófitos, las plantas inoculadas solamente con el patógeno mostraron síntomas bastante moderados, lo que sugiere que la mayor parte de la tolerancia de las plantas tratadas previamente con endófitos se debería a una respuesta genética. En un ensayo paralelo con plantas de *Populus x canescens* se obtuvieron valores de incidencia de síntomas notablemente mayores con una inoculación similar del patógeno (datos no

mostrados), lo que sugiere que los bajos síntomas encontrados no fueron debidos a la metodología. Posiblemente, en otras especies de *Populus* ocurra algo similar a lo observado para *P. alba*, siendo la componente genética más importante que la carga endófito. Sin embargo, el genotipo del hospedante puede influir en la tasa de colonización de endófitos (MARTÍN *et al.*, 2013), y por lo tanto, el papel de los endófitos en la defensa podría ser más relevante en unos genotipos que en otros.

El 83% de los hongos ensayados, mostraron algún grado de parasitismo frente al patógeno, evidenciando el potencial de los endófitos en la restricción del crecimiento del patógeno. A pesar de que los ensayos *in vitro* no reflejan fielmente lo que ocurre *in planta*, son de utilidad para hacer una primera selección (MARTÍN *et al.*, 2015). De acuerdo con este test de antagonismo *in vitro*, la interacción predominante fue el parasitismo de las hifas del endófito sobre las del patógeno, induciendo un crecimiento anormal de las mismas y reduciendo la tasa de crecimiento del patógeno. El efecto antibiótico de los endófitos no fue muy evidente en ninguna cepa durante el ensayo *in vitro*, probablemente debido al lento crecimiento del patógeno en el medio de cultivo. Sin embargo, no podemos descartar que la protección ejercida por alguno de estos endófitos *in vivo* sea debida a una inducción de los mecanismos de resistencia de la planta de forma sistémica (WALLER *et al.*, 2005). Tres cepas del orden Pleosporales y muy próximas taxonómicamente, según sus secuencias ITS, mostraron comportamientos distintos frente al patógeno. Este resultado nos sugiere la importancia de trabajar a nivel de cepa a la hora de seleccionar hongos con potencial de biocontrol, tal y como se evidenció en el caso de *Verticillium* spp. frente a la grafiosis del olmo (SCHELFER *et al.*, 2008).

El orden Pleosporales fue el más abundante de entre los endófitos aislados. Es considerado como un orden de endófitos generalistas (SIEBER, 2007), siendo también el principal orden aislado en otros trabajos con *Populus* spp. (SANTAMARÍA & DÍEZ, 2005; MARTÍN-GARCÍA *et al.*, 2011; MARTÍN-GARCÍA *et al.*, 2012; BALINT *et al.*, 2013). A nivel de especie, *Aureobasidium pullulans* se aisló también en otras especies de *Populus*: *P. tremula* (SANTAMARÍA & DIEZ, 2005), *P. x euramericana* (MARTÍN-GARCÍA *et al.*, 2011) y *P. nigra* (MARTÍN-GARCÍA *et al.*, 2012). En nuestro estudio, este hongo es representado por la cepa BU16-TR1, la cual es capaz de inhibir el crecimiento del patógeno por competencia por el sustrato.

## 5. Conclusiones

Este estudio aporta nuevas evidencias de la implicación de los hongos endófitos en la tolerancia de las plantas frente a patógenos en los bosques templados. Algunos endófitos de *P. alba* parecen incrementar dicha tolerancia cuando son inoculados de forma preventiva ante el patógeno *V. tremulae*. De esta manera, una inoculación artificial durante las fases tempranas del crecimiento de las plántulas podría beneficiar su estado fitosanitario y su crecimiento. Sin embargo, es necesario conocer más en profundidad la distribución espacial y temporal de los endófitos *in planta*, su modo de transmisión o su influencia sobre el metabolismo de la planta.

## 6. Agradecimientos

Queremos dar las gracias al Dr. Hugo Mas por facilitarnos el material vegetal del ensayo y a un revisor anónimo por sus sugerencias de mejora en el manuscrito. Este trabajo fue financiado por el proyecto CTQ2011-28503-C02-02 (Ministerio de Economía y Competitividad).

## 7. Bibliografía

- ALBRECHTSEN, B.R., BJORKEN, L., VARAD, A., HAGNER, A., WEDIN, M., KARLSSON, J., JANSSON, S., 2010. Endophytic fungi in European aspen (*Populus tremula*) leaves-diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance. *Fungal Divers.* 41, 17-28.
- ARNOLD, A.E., MEJIA, L.C., KYLLO, D., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., ROBBINS, N., HERRE, E.A., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100,

- 15649-15654.
- BAILEY, B.A., BAE, H., STREM, M.D., ROBERTS, D.P., THOMAS, S.E., CROZIER, J., SAMUELS, G.J., CHOI, I.Y., HOLMES, K.A., 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224, 1449-1464.
- BALINT, M., TIFFIN, P., HALLSTROEM, B., O'HARA, R.B., OLSON, M.S., FANKHAUSER, J.D., PIEPENBRING, M., SCHMITT, I., 2013. Host Genotype Shapes the Foliar Fungal Microbiome of Balsam Poplar (*Populus balsamifera*). *Plos One* 8.
- BLENIS, P.V., CHOW, P.S., 2001. Inoculation of *Populus tremuloides* with *Pollaccia americana*. *Can. J. Plant Pathol.* 23, 149-157.
- BLUMENSTEIN, K., ALBRECHTSEN, B.R., MARTIN, J.A., HULTBERG, M., SIEBER, T.N., HELANDER, M., WITZELL, J., 2015. Nutritional niche overlap potentiates the use of endophytes in biocontrol of
- DANCE, B.W., 1961. Leaf and Shoot Blight of Poplars (Section *Tacamahaca* Spach) Caused by *Venturia populina* (Vuill.) Fabric. *Can. J. Bot.* 39, 875-890.
- HANADA, R.E., POMELLA, A.W.V., COSTA, H.S., BEZERRA, J.L., LOGUERCIO, L.L., PEREIRA, J.O., 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biol.* 114, 901-910.
- KUSARI, P., KUSARI, S., SPITELLER, M., KAYSER, O., 2013. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Divers.* 60, 137-151.
- MARTIN, J.A., MACAYA-SANZ, D., WITZELL, J., BLUMENSTEIN, K., GIL, L., 2015. Strong *in vitro* antagonism by elm xylem endophytes is not accompanied by temporally stable *in planta* protection against a vascular pathogen under field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 185-196.
- MARTIN, J.A., WITZELL, J., BLUMENSTEIN, K., ROZPEDOWSKA, E., HELANDER, M., SIEBER, T.N., GIL, L., 2013. Resistance to Dutch Elm Disease Reduces Presence of Xylem Endophytic Fungi in Elms (*Ulmus* spp.). *Plos One* 8, 13.
- MARTIN-GARCIA, J., ESPIGA, E., PANDO, V., DIEZ, J.J., 2011. Factors Influencing Endophytic Communities in Poplar Plantations. *Silva Fenn.* 45, 169-180.
- MARTIN-GARCIA, J., MULLER, M.M., DIEZ, J.J., 2012. ITS-based comparison of endophytic mycota in twigs of native *Populus nigra* and cultivated *P. x euramericana* (cv. I-214) stands in Northern Spain. *Ann. For. Sci.* 69, 49-57.
- MEJIA, L.C., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., VAN BAEL, S., ARNOLD, A.E., HEBBAR, P., SAMUELS, G.J., ROBBINS, N., HERRE, E.A., 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol. Control* 46, 4-14.
- MORELET, M., 1985. The genus *Venturia* on *Populus* species of section *Leuce*. 1. Taxonomy. *Cryptogamie Mycologie* 6, 101-117.
- RAGHAVENDRA, A.K.H., NEWCOMBE, G., 2013. The contribution of foliar endophytes to quantitative resistance to *Melampsora* rust. *New Phytol.* 197, 909-918.
- RICHARDSON, D.M., HOLMES, P.M., ESLER, K.J., GALATOWITSCH, S.M., STROMBERG, J.C., KIRKMAN, S.P., PYSEK, P., HOBBS, R.J., 2007. Riparian vegetation: degradation, alien plant invasions, and restoration prospects. *Diversity and Distributions* 13, 126-139.
- RODRIGUEZ, R.J., WHITE, J.F., JR., ARNOLD, A.E., REDMAN, R.S., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182, 314-330.
- SANTAMARIA, O., DIEZ, J.J., 2005. Fungi in leaves, twigs and stem bark of *Populus tremula* from northern Spain. *For. Pathol.* 35, 95-104.
- SCHELFER, R.J., VOETEN, J.G.W.F., GURIES, R.P., 2008. Biological control of dutch elm disease. *Plant Dis.* 92, 192-200.
- SCHUBERT, K., RITSCHEL, A., BRAUN, U., 2003. A monograph of *Fusicladium* s.lat. (Hyphomycetes). *Schlechtendalia*, 1-132.
- SHAPIRO, S.S., 1965. Analysis of variance test for normality (complete samples). In: Wilks, M.B., (Ed.). *Biometrika*, pp. 591-611.
- SIEBER, T., 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. *Fungal Biol. Reviews*

- SUMARAH, M.W., ADAMS, G.W., BERGHOUT, J., SLACK, G.J., WILSON, A.M., MILLER, J.D., 2008. Spread and persistence of a rugulosin-producing endophyte in *Picea glauca* seedlings. *Mycol. Res.* 112, 731-736.
- WALLER, F., ACHATZ, B., BALTRUSCHAT, H., FODOR, J., BECKER, K., FISCHER, M., HEIER, T., HUCKELHOVEN, R., NEUMANN, C., VON WETTSTEIN, D., FRANKEN, P., KOGEL, K. 2005. the endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS.* 102, 386-391
- WILSON, D., 1995. Endophytes - The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73, 274-276.