



Diputación Provincial de Pontevedra
Servicio Agrario
Estación Fitopatológica do Areiro



Centro de Sanidad Forestal
de Calabazanos



**Junta de
Castilla y León**
Consejería de Medio Ambiente
Dirección general del Medio Natural

Distribución de los tipos de compatibilidad vegetativa de *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr en castaños de Castilla-León

Aguín, O.; Mata, M. y Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica "Do Areiro". Excma. Diputación Provincial. Subida a la Robleda s/n.
36153 Pontevedra. www.efa-dip.org

Martín, A. B. y Sierra, J. M.

Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Castilla-
León. Polígono Industrial de Villamuriel, s/n. Villamuriel de Cerrato, 34190 Palencia. :
sanidad.forestal@jcyl.es

INTRODUCCIÓN

El chancro o cáncer es una de las enfermedades más graves que afectan al castaño y que que está causada por *Cryphonectria (Endothia) parasitica* (Murrill) Barr.

La gravedad de los daños que causa este hongo ha llevado a la búsqueda de métodos eficaces de control. En los últimos años, los estudios se han centrado en el control biológico mediante la utilización de cepas hipovirulentas de *C. parasitica*, que contienen un virus que posee un ARN de doble cadena (dsRNA), que son menos patógenas y pueden transmitir su efecto a las cepas normales virulentas, provocando la cicatrización espontánea de los chancros (GRENTE, 1965).

Se ha demostrado que la compatibilidad vegetativa entre cepas de este hongo es uno de los principales factores que afecta a la dispersión natural del hipovirus, y que por lo tanto influye en el éxito del control biológico del chancro del castaño (MILGROOM *et al.*, 1996; CORTESI *et al.*, 1998). Para que se produzca la conversión de la cepa virulenta en hipovirulenta, ambas deben pertenecer al mismo grupo de compatibilidad; este proceso resultará más eficaz si se utilizan cepas hipovirulentas obtenidas espontáneamente en la zona donde se quiere realizar el control (MANSILLA *et al.*, 2000). Por tanto, cuantos menos grupos de compatibilidad existan en una zona, más efectivo será el control basado en el fenómeno de la hipovirulencia, como se ha demostrado en Francia (GRENTE y BERTHELAY-SAURET, 1978) y en Italia (BISIACH *et al.*, 1995).

En Castilla y León, según datos del II Inventario Forestal Nacional de 1995, los castañares puros de *C. sativa* ocuparían unas 17.126 ha, desglosadas en 9.292 ha en la provincia de León (siendo más abundante en las comarcas noroccidentales) y 7.834 ha en Salamanca. Estas



Diputación Provincial de Pontevedra
Servicio Agrario
Estación Fitopatológica do Areiro



Centro de Sanidad Forestal
de Calabazanos



**Junta de
Castilla y León**
Consejería de Medio Ambiente
Dirección general del Medio Natural

cifras han podido fluctuar cuantiosamente debido sobre todo a dos causas: por un lado, la superficie actual poblada por castaños sería sensiblemente mayor de la reflejada si tenemos también en cuenta las masas mixtas; por otro, podrían estar notablemente reducidas si tenemos en cuenta el azote de incendios, el abandono de los cultivos, y la incidencia de las enfermedades de la tinta y el chancro incrementada, sobre todo, en los últimos 50 años. Existe poca información sobre la situación de las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* en las masas de castaño de la comunidad castellano-leonesa por eso el objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad y distribución de los grupos de compatibilidad vegetativa (vc) de *C. parasitica* en Castilla-León.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo en tres provincias de Castilla-León (León, Zamora y Burgos) durante el año 2003. En León se inspeccionaron 111 localidades en las que vegetaban masas adultas de *C. sativa* y 68 de reciente repoblación, recogiendo 211 muestras de corteza con síntomas de enfermedad. En Burgos se visitaron dos masas, de las que se tomaron 30 muestras, mientras que en Zamora, se inspeccionaron siete y se obtuvieron 20 muestras.

Una vez seleccionado el árbol con síntomas de chancro, se localizó la zona de avance del hongo, delimitando los bordes de la lesión, y se cortaron tiras de la corteza lesionada que incluían la zona subcortical. Se recogió una sola muestra por chancro y árbol. Las muestras de corteza se guardaron en bolsas debidamente codificadas que se conservaron a 4 °C .

El estudio de la compatibilidad vegetativa se llevó a cabo mediante el método de barrera/fusión en el medio PDA_g descrito por POWELL (1995), que contiene caldo de patata dextrosa (24 g/L), extracto de malta (7 g/L), extracto de levadura (2 g/L), ácido tánico (0,8 g/L) y agar (20 g/L), suplementado con el colorante bromocresol verde (50 mg/L) que facilita la observación de la barrera formada entre los aislamientos incompatibles. Se utilizaron 239 aislados de *C. parasitica*, 191 procedentes de León, 28 de Burgos y 20 de Zamora. Los aislados de cada provincia se enfrentaron entre sí en todas las combinaciones posibles, y un aislado de cada grupo de compatibilidad vegetativa (vc) resultante se conservó como representativo del grupo.

En el desarrollo del método, dos pequeños fragmentos de cada micelio de 7 días de vida media, se enfrentaron en placas Petri a 1 cm del margen y separados entre sí por 1 mm. En cada placa se incluyeron ocho pares, que se incubaron durante 1 semana a 24±1°C en oscuridad.



Diputación Provincial de Pontevedra
Servicio Agrario
Estación Fitopatológica do Areeiro



Centro de Sanidad Forestal
de Calabazanos



**Junta de
Castilla y León**
Consejería de Medio Ambiente
Dirección general del Medio Natural

Para la interpretación de los resultados, dos aislamientos se consideraron compatibles cuando los micelios de las colonias del hongo se fusionaron completamente, mientras que una reacción incompatible se apreció por la formación de una barrera o línea negra entre los dos micelios visible en la base de la placa Petri (Cortesi et al., 1996).

Se estimó la diversidad de los tipos vc en cada provincia expresado como el ratio entre el número de tipos vc y el tamaño de muestra (S/N) y el índice de diversidad de Shannon (Anagnostakis et al., 1986).

Los grupos de cada provincia se enfrentaron entre si y finalmente los vc resultantes de Castilla-León se confrontaron con las cepas de la colección de referencia europea (EU1 a EU64).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se establecieron ocho tipos de compatibilidad vegetativa en las tres provincias estudiadas a partir de los 239 aislados virulentos analizados.

Cada aislado fue incluido en un único tipo vc y el número de tipos vc detectados en cada provincia varió de 1 a 6 (Tabla 1).

Así, en la provincia de Zamora, a partir de los veinte aislados, se obtuvieron 6 grupos de compatibilidad vegetativa (Figura 1) aunque la mayoría de las muestras (75%) se incluyeron en dos tipos. Se determinaron tres tipos que únicamente estaban constituidos por una sola muestra (4,5 y 6).

En Burgos se encontró un solo tipo de compatibilidad (Figura 2), esta baja diversidad puede entenderse porque las muestras recogidas pertenecían sólo a 2 ubicaciones próximas entre sí. Por otro lado en León se establecieron 4 vc tipos (Figura 3) para un total de 191 cepas pero el tipo 1 englobó al 82% de los aislados (Tabla 1).

De esta manera se determinaron 6 grupos en Zamora, 1 en Burgos y 4 en León. El estudio de compatibilidad entre los tipos de cada provincia indicó la presencia de un mismo tipo en las tres provincias, así ZA1, BU1 y LE1 se incluyeron en el vc 1.

En el estudio de la compatibilidad vegetativa con las cepas de referencia europeas (EU1-EU64) se encontró que el tipo 1 fue compatible con la cepa EU-1, el tipo 2 con EU-12 y el tipo 6 con EU-28.

Los tipos EU1 y EU12 se encuentran dentro de los más frecuentes en Europa y se ha publicado su presencia en diferentes países (Trestic et al, 2001; Cortesi et al, 1998, Adamčíková y Juhásová, 2003).



Diputación Provincial de Pontevedra
Servicio Agrario
Estación Fitopatológica do Areiro



Centro de Sanidad Forestal
de Calabazanos



**Junta de
Castilla y León**
Consejería de Medio Ambiente
Dirección general del Medio Natural

El tipo EU28 se ha detectado en Bosnia-Herzegovina en baja proporción (Trestic et al, 2001).

De los ocho vc tipos encontrados en este trabajo solo tres mostraron compatibilidad con las cepas de referencia europeas mientras que cinco fueron incompatibles con todas. De la misma manera Robin et al (2000) encontraron en Francia 30 vc a partir del estudio de 1113 aislados de *C. parasitica*, 10 de esos grupos fueron incompatibles con los 64 tipos de referencia europeos. Estos trabajos indican que al menos es necesario un gen vic o un alelo adicional para describir de manera completa el determinismo genético de los tipos vc (Robin et al, 2000).

El índice de diversidad de Shannon de los vc encontrados en Castilla-León varió entre 0 y 1,42 (Tabla 1). En Burgos dado que todos los aislados pertenecían al mismo grupo originó la no existencia de diversidad. En León se ha determinado una diversidad del 0.596 que coincide con lo determinado en otras regiones (Pennisi et al, 1992).

CONCLUSIONES

Se han determinado ocho vc tipos en las poblaciones estudiadas pero la mayoría de los aislados pertenecen a un solo grupo que además se corresponde con uno de los grupos europeos más frecuente el EU-1. Los resultados de este trabajo indican la baja diversidad de las poblaciones de *Cryphonectria parasitica* lo que permitiría llevar a cabo un programa de control biológico mediante la utilización de cepas hipovirulentas compatibles con el grupo EU-1.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la aportación a este trabajo del Dr. P. Cortesi y del Dr. M. Milgroom. A Paula Zamora por su labor de muestreo. A Dña. Angeles Barros, por su trabajo en el procesamiento de muestras y a D. Manuel Vilas por el procesamiento informático de los datos de campo.

REFERENCIAS

ADAMČÍKOVÁ, K. & JUHÁSOVÁ, G. 2003. Diversity of subpopulation of *Cryphonectria parasitica* in Horná Nitra. *Folia oecologica* 30/1:149-155.

ANAGNOSTAKIS, S.L. 1977. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. *Experimental Mycology*, 1: 306-316.



Diputación Provincial de Pontevedra
Servicio Agrario
Estación Fitopatológica do Areeiro



Centro de Sanidad Forestal
de Calabazanos



**Junta de
Castilla y León**
Consejería de Medio Ambiente
Dirección general del Medio Natural

ANAGNOSTAKIS, S.L, HAU, B. & KRANZ, J.1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. *Plant Disease* 70:536-538.

BISIACH, M., CORTESI, P., DE MARTINO, A. & INTROPIDO, M. 1995. Biological control of chesnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Abstr. En: Proc. Int. Congress "Microbial Control Agents in Sustainable Agriculture. Saint Vincent (Aosta) pp 167.

COLINAS, C. ; USCUPPLIC, M. 1999. Studies on Chesnut blight (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr) in North-East Spain. *Acta Horticulturae* 494-500.

CORTESI, P., MILGROOM, M.G. & BISIACH M. 1996. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycol. Res.*, 100: 1087-1093.

CORTESI, P., RIGLING, D. & HEINIGER, U. 1998. Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of *Cryphonectria parasitica*. *Eur. J. For. Path.* 28: 167-176.

GREENTE, J. 1965. Les formes hypovirulentes d'Éndothia parasitica et les espoirs de lutte contre le chancre du châtaignier. *C.R. Hebd. Seances Acad. Agr. France* 51:1033-1037.

GREENTE, J. & BERTHELAY-SAURET, S. 1978. Biological control of chestnut blight in France. En: Proc. Am. Chestnut Symp. Morgantown: Virginia University Books pp 30-34.

HOMS, G., RODRÍGUEZ, J., RIGLING, D. & COLINAS, C. 2002. Caracterización de la población de *Cryphonectria parasitica* y detección de cepas hypovirulentas en 3 subpoblaciones de Cataluña. *Actas del III Congreso Forestal Español*. Ed. Junta de Andalucía.

MANSILLA, J.P.,Pintos, C. & Salinero,M.C. 2000. Plagas y enfermedades del castaño en Galicia. Ed. Xunta de Galicia. 93 páginas

MILGROOM, M.G., WANG, K., ZHOU, Y. & KANEKO, S. 1996. Intercontinental population structure of the chesnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia*, 88: 176-190.

PENNISI, A.M.; MANGNANO, G. & GRASSO, S. 1992. Compatibilità vegetativa di isolati di *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr ottenuti da castagneti in Calabria. *Petria* 2 (1),1-10.

POWELL, W.A. 1995. Vegetative incompatibility and mycelial death of *Cryphonectria parasitica* detected with a pH indicator. *Mycologia* 87: 738-741.

ROBIN, C.; ANZIANI, C. & CORTESI, P. 2000. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathology* 90:730-737.

TRESTIC, T.; USCUPPLIC, M; COLINAS, C.; ROLLAND, G.; GIRAUD, A. & ROBIN, C. 2001. Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow Landscape Research* 76:391-396



Diputación Provincial de Pontevedra
Servicio Agrario
Estación Fitopatológica do Areiro



Centro de Sanidad Forestal
de Calabazanos



**Junta de
Castilla y León**
Consejería de Medio Ambiente
Dirección general del Medio Natural

Tablas

Tabla 1. Diversidad de los tipos de compatibilidad vegetativa (vc) de los aislados de *Cryphonectria parasitica* de Castilla-León.

Tipos VC	PROVINCIAS		
	León	Zamora	Burgos
1 (EU1)	157	8	28
2 (EU12)	0	2	0
3	26	7	0
4	0	1	0
5	0	1	0
6 (EU28)	0	1	0
7	1	0	0
8	7	0	0
N^a	191	20	28
S^b	4	6	1
S/N	0.02	0.30	0.03
H' ^c	0,59	1.42	0.00

^a Tamaño de cada subpoblación (nº de aislados).

^b Nº de vc encontrados en cada subpoblación

^c Índice de diversidad de Shannon: $H' = -(\sum pi \ln pi)$, donde pi es la frecuencia de cada vc.

Figuras

Figura 1. Distribución de los tipos de compatibilidad vegetativa de *Cryphonectria parasitica* en la provincia Zamora.

Figura 2. Distribución de los tipos de compatibilidad vegetativa de *Cryphonectria parasitica* en la provincia de Burgos.

Figure 3. Distribución de los tipos de compatibilidad vegetativa de *Cryphonectria parasitica* en la provincia de León.