

Aplicación del método de conversión para la obtención de cepas hipovirulentas de *Cryphonectria parasitica*

Aguín Casal, O.; Montenegro Gregorio, D.; Pérez Otero, R.; Mansilla Vázquez, J. P.
Estación Fitopatológica do Areeiro. Servicio Agrario. Excma. Diputación Provincial de Pontevedra. Subida a la Robleda s/n.36153 Pontevedra. efa@efa-dip.org

Resumen

Cryphonectria parasitica es un patógeno de cuarentena que está causando importantes pérdidas en los castaños del norte peninsular. Para minimizar los daños que ocasiona, el control biológico basado en el fenómeno de la hipovirulencia está resultando el más eficaz. Para poder implantarlo es necesario conocer la diversidad y distribución de las poblaciones de *C. parasitica*, y disponer de cepas hipovirulentas compatibles con los tipos de compatibilidad presentes en la zona afectada. La detección de estas cepas, basada en criterios morfológicos y moleculares resulta complicada y además, si se localizan, puede que resulten incompatibles con los tipos de compatibilidad establecidos. Por eso en este trabajo se presentan los resultados obtenidos al realizar el test de conversión entre aislados virulentos obtenidos en distintas zonas de España con aislados hipovirulentos de *C. parasitica*, de diferente procedencia, para evaluar la capacidad de conversión. Las confrontaciones se mantienen en luz a 25°C y se chequean a los 11,13 y 20 días. Para confirmar la transformación de cepas virulentas en hipovirulentas se realizan subcultivos y extracción del dsRNA.

Palabras clave: chancro, compatibilidad, control biológico, dsRNA

INTRODUCCIÓN

Cryphonectria parasitica es el hongo responsable de la enfermedad conocida como cancro o chancro del castaño (HEINIGER & RIGLING, 1994). Detectada en España por primera vez en el año 1947, en la actualidad afecta prácticamente a todas las masas de *Castanea sativa* del norte peninsular (HOMS *et al.*, 2002). El control biológico basado en la hipovirulencia es el que hasta el momento ha permitido minimizar el avance de la enfermedad en Europa (GARBELOTTO *et al.*, 1992).

En 1943, en Italia, se detectaron por primera vez cepas menos agresivas denominadas también cepas no patógenas o hipovirulentas de *C. parasitica*. El estudio pormenorizado de estas cepas indicó la presencia de un virus de ARN de doble cadena de alto tamaño molecular perteneciente a la familia Hypoviridae localizado a nivel del citoplasma del hongo (LIU & MILGROOM, 1995). Este virus es el responsable de la atenuación de la virulencia y es capaz de transmitirse por unión o anastomosis de las hifas si existe compatibilidad genética (ANAGNOSTAKIS & DAY, 1979; LIU & MILGROOM, 1995; ROBIN *et al.*, 2000).

En Europa, el hipovirus tipo se conoce con el nombre de CHV1 y se han detectado diferentes subtipos lo que confirma la hipótesis de múltiples introducciones del virus (ALLEMANN *et al.*, 1999). En España se han realizado pocos estudios sobre hipovirulencia siendo la primera referencia en 1992 (HEINIGER & RIGLING, 1994) posteriormente, HOMS *et al.* (2002) encontraron otra cepa hipovirulenta en Cataluña y recientemente se han detectado dos en Galicia.

Para que el control biológico funcione con éxito se recomienda usar cepas hipovirulentas localizadas en la misma zona donde se aplica el control (MANSILLA *et*

al., 2000; SIDOTI & GRANATA, 2000), pero la detección e identificación de estas cepas resulta complicada y, en algunos casos, aunque se obtengan puede que no sean compatibles con los grupos virulentos existentes en la zona afectada.

Por eso en este trabajo se evaluó la eficacia en la aplicación del método de conversión para la obtención *in vitro* de cepas hipovirulentas de *C. parasitica* y la comprobación de su efectividad en el control del patógeno mediante la inoculación sobre material vegetal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se aplicó el método de conversión (GARBELOTTO *et al.*, 1992) para la obtención *in vitro* de cepas hipovirulentas de *C. parasitica*. Se utilizaron 16 aislados virulentos de *C. parasitica*, obtenidos a partir de un muestreo realizado en sotos de castaños en la comunidad gallega y en Castilla y León. Cada aislado representa a un grupo de compatibilidad vegetativa (vc). Se seleccionaron 4 aislados hipovirulentos de diferente procedencia: dos de Galicia, uno de Cataluña y otro de Italia (Tabla 1).

El método consistió en enfrentar en todas las combinaciones posibles los aislados virulentos con los hipovirulentos. En una placa Petri (9 cm de diámetro) sobre el medio de cultivo PDA (Patata-dextrosa-agar, Difco) se colocaron 4 fragmentos de micelio (dos de micelio virulento y dos de micelio hipovirulento) enfrentados entre sí. Las placas se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron en cámara de cultivo a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 16 horas luz. El ensayo se repitió dos veces.

Se observó la morfología de las confrontaciones a los 11, 13 y 20 días. Al final del experimento se transfirió un fragmento de las zonas de intersección de los micelios a una nueva placa Petri con medio de cultivo PDA para comprobar las características de crecimiento de la colonia. Para confirmar la transmisión del hipovirus se realizó la extracción molecular para la detección del dsRNA mediante el método descrito por MORRIS y DODD (1979) con modificaciones. Para ello el micelio se hizo crecer en el medio de cultivo PDA sobre celofán y se mantuvo en oscuridad en estufa de cultivo a $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Una vez que el hongo cubría la superficie de toda la placa (5-7 días), se retiró el celofán y el micelio resultante se liofilizó. A partir del material liofilizado se realizó el método de extracción con celulosa CF 11. A continuación se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TBE 1X a 100 voltios durante 60 minutos. En cada prueba se incluyó un control positivo (micelio hipovirulento suministrado por el Dr. Cortesi) y otro negativo (ausencia de dsRNA), además del marcador λ Hind III. Después de la electroforesis el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio durante 30 minutos, se capturó la imagen en el sistema de documentación SYNGENE y se analizó mediante el programa de densiometría 1-D Manager (TDI, Madrid).

Para comprobar la fiabilidad de la conversión se puso en práctica el método de evaluación *in vitro* de la virulencia de *C. parasitica* sobre material vegetal recogido en campo (CHEE *et al.*, 1992) con algunos cambios. En enero de 2005 se recogieron ramas de *Castanea sativa* y se prepararon trozos de 15 cm de longitud x 5 cm de diámetro. Estos trozos se pelaron y se colocaron de forma individual en cajas de plástico sobre papel de filtro humedecido. En el centro de cada trozo se hicieron dos agujeros de 6 mm de diámetro separados entre sí 1 cm. En el interior de cada agujero se colocó el trozo de micelio correspondiente según el tratamiento. Se establecieron 4 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. Los tratamientos fueron: testigo (t), inoculación con cepa virulenta (vir), inoculación con cepa hipovirulenta convertida (hpc) e inoculación con cepa virulenta y cepa hipovirulenta convertida (vir x hpc). El ensayo se realizó por duplicado. En los huecos, en el tratamiento testigo, se colocaron dos fragmentos de agar

mientras que en el tratamiento vir se inoculó en uno de los agujeros agar y en el otro micelio del aislado vir 1. En la inoculación hpc se inoculó agar y micelio aislado 1 convertido con hp3. En el tratamiento de interacción se inoculó, primero micelio del aislado 1 y a la aparición de los primeros síntomas se colocó micelio del aislado 1 convertido con hp3. Las cajas se colocaron en cámara de cultivo en oscuridad a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Diariamente se evaluó el estado de los fragmentos de castaño estableciéndose un código de incidencia de 0-4 (0: ningún síntoma, 1: presencia de micelio y/o picnidios alrededor de la zona de infección, 2: presencia de micelio y/o picnidios en 1/3 del fragmento, 3: presencia de micelio y/o picnidios en 2/3 del micelio, 4: toda la superficie del fragmento presenta micelio y/o picnidios), presencia de necrosis y medida de la infección en centímetros (cm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 128 confrontaciones realizadas con el método de conversión sólo se obtuvo un resultado positivo, es decir, éxito en la transmisión del virus en una de las combinaciones (Tabla 2), lo que supone un porcentaje inferior al 1%. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores; así LIU & MILGROOM (1995) consiguen un 24% de éxito en la transformación indicando que la frecuencia de la transmisión entre aislados es inversamente proporcional al número de genes vic, responsables de la incompatibilidad vegetativa. GARBELOTTO *et al.* (1992) obtienen un 77% de éxito lo que indica el alto poder de conversión de las cepas hipovirulentas utilizadas. Una explicación del bajo porcentaje de éxito en nuestro experimento sería la poca capacidad de conversión de las cepas hipovirulentas seleccionadas y/o que los aislados virulentos, que son representativos de grupos de compatibilidad, presentasen genes vic muy diferentes a las cepas hipovirulentas lo que influiría negativamente en la transmisión.

A nivel morfológico, en el único caso de conversión obtenido se observó unión de los micelios sin líneas de separación. Como consecuencia de los repicados de las zonas de unión se observó un crecimiento típico de cepa hipovirulenta con micelio blanco y ausencia o escasa presencia de cuerpos de fructificación. La extracción molecular ha permitido detectar la presencia de moléculas de dsRNA de alto peso molecular en la conversión realizada.

En el resto de las confrontaciones, los aislados virulentos han mantenido sus características con micelio blanco que posteriormente cambia a anaranjado y presencia de abundantes cuerpos de fructificación. En las zonas de confrontación de los micelios se observaban líneas miceliales de separación bastante evidentes y en consecuencia los micelios no llegaban a unirse (Figura 1).

Aunque el porcentaje de éxito en la transmisión del hipovirus fue claramente bajo, sin embargo, la obtención de un aislado hipovirulento compatible con algún grupo de compatibilidad vegetativa supone un avance importante en el desarrollo de un programa de control biológico de la enfermedad.

Por lo tanto, el método de conversión es una herramienta útil para la obtención de micelios hipovirulentos *in vitro* aunque el proceso es laborioso, lento y exige un alto número de repicados para lograr un porcentaje elevado de éxito. Es conveniente que las cepas hipovirulentas tengan un alto poder conversor y que las virulentas no presenten muchos loci vic diferentes con las hipovirulentas.

La inoculación *in vitro* de fragmentos de *C. sativa* permite comprobar de una forma rápida la acción de aislados de *C. parasitica* sobre material vegetal (LEE *et al.*, 1992). Los primeros síntomas de la enfermedad se detectaron a los 8 días de la inoculación. En primer lugar se observa sobre la superficie un micelio blanquecino, alrededor del punto de inoculación, y posteriormente ese micelio adquiere un color amarillento. Los picnidios aparecen entre los 15-20 días (Figura 2).

Durante la evolución del ensayo no se observó presencia de necrosis en ninguno de los fragmentos utilizados, lo que indicaría la necesidad de mantener el experimento durante más tiempo para ver si se llegan a desarrollar. El tratamiento de interacción (vir x hpc) permitió comprobar que la cepa hipovirulenta redujo la extensión de la infección pero, igual que en el caso anterior, sería necesario una mayor tiempo de ensayo para confirmar el efecto de esta cepa. Estos resultados son similares a los encontrados por LEE *et al.* (1992) que sobre fragmentos de castaño más pequeños observó los primeros síntomas a los 4 días y a las tres semanas observó presencia de picnidios. Las cepas hipovirulentas ocasionaban daños de inferior tamaño que las virulentas y producían necrosis.

Aunque para llevar a cabo el control biológico es aconsejable utilizar cepas hipovirulentas presentes de forma espontánea en la zona a tratar y al mismo tiempo compatibles con las virulentas detectadas, la obtención de cepas hipovirulentas a través del método de conversión puede ser una vía alternativa de éxito al control sobre todo en aquellas áreas donde todavía no se hayan detectado cepas hipovirulentas.

Agradecimientos

Los autores queremos agradecer la aportación a este trabajo del Dr. Paolo Cortesi y del Dr. Carlos Colinas por el envío de cepas hipovirulentas y a Dña. Angeles Barros, técnico de laboratorio, por su paciente labor de análisis de muestras. El estudio ha sido financiado por la Consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia y por el Servicio de Protección de la Naturaleza de la Junta de Castilla y León.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLEMANN, C.; HOEGGER, P.; HEINIGER, U. & RIGLING, D.1999. Genetic variation of *Cryphonectria* hypoviruses (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular ecology* 8:843-854.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. & DAY, P.R. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 69:1226-1229.
- LEE, J.K.;TATTAR, T.A.;BERMAN, P.M. & MOUNT, M.S.1992. A rapid method for testing the virulence of *Cryphonectria parasitica* using excised bark and wood of American Chestnut. *Phytopathology* 82:1454-1456
- LIU, Y.C. & MILGROOM, M.G.1995. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (vic) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 86:79-86.
- MANSILLA, J.P.; PINTOS, C. Y SALINERO, M.C.2000. Plagas y enfermedades del castaño en Galicia. Ed. Xunta de Galicia. España.
- MORRIS, T.J.& DODDS, J.A.1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69:854-858.

GARBELOTTO, M.; FRIGIMELICA, G. & MUTTO-ACCORDI, S. 1992. Vegetative compatibility and conversion to hypovirulence among isolates of *Cryphonectria parasitica* from northern Italy. Eur. J. For. Path. 22:337-348.

HEINIGER, U. & RIGLING, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. Annu. Rev. Phytopathol. 32:581-599.

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

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.

SIDOTI, A & GRANATA, G. 2000. Esperienze di lotta biologica contro *Cryphonectria parasitica* in castagneti dell'Etna. Tec. Agric., nº4 pág.1-7.

Tabla 1. Código, aislado, virulencia y procedencia de los aislados de *C. parasitica* utilizados en el test de conversión.

Código	Aislado	Virulencia	Procedencia
A	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Virulento	Galicia
B			
C			
D			
E			
F			
G			
H			
1	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Virulento	Castilla y León
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
HP1	<i>C. parasitica</i> hipovirus CHV1	Hipovirulento	Galicia
HP2			Italia
HP3			Cataluña
HP4			

Tabla 2. Resultados de las confrontaciones realizadas entre aislados virulentos e hipovirulentos de *C. parasitica*.

Confrontaciones	Resultados			
	HP1	HP2	HP3	HP4

A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	-	-	-	-
D	-	-	-	-
E	-	-	-	-
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-
H	-	-	-	-
1	-	-	+	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-

Tabla 3. Incidencia, presencia de necrosis, picnidios y longitud de infección en los diferentes tratamientos realizados sobre fragmentos de castaño.

Tratamiento	Incidencia	Necrosis	Picnidios	Infección (cm)
T	0	-	-	0
Vir	2.6	-	+	9.5
Hpc	0	-	-	0
Vir x Hpc	2	-	+	8.5

Figura 1. Confrontación sin conversión entre una cepa hipovirulenta y otra virulenta.



Figura 2. Material vegetal de *C. sativa* inoculado. Parte superior: fragmento inoculado sólo con agar (tratamiento testigo). Parte inferior: fragmento inoculado con la cepa virulenta de *C. parasitica* perteneciente al aislado 1 (tratamiento vir).

